

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA**

**ESTUDO PREDITIVO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE
ALBENDAZOL E HIDROCLOROTIAZIDA EM RATOS**

MARIELY CAMILA PRITSCH

Toledo
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL**

**ESTUDO PREDITIVO DA BIOEQUIVALÊNCIA DE
ALBENDAZOL E HIDROCLOROTIAZIDA EM RATOS**

MARIELY CAMILA PRITSCH

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Monteiro de Lima

Co-orientadora: MSc. Josélia Larger Manfio

Toledo
2011

Catlogação pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Monteiro de Lima, pela credibilidade, oportunidade e orientação. Deixo aqui minha imensa gratidão, respeito e extrema admiração por sua indiscutível competência.

A co-orientadora deste trabalho, MSc. Josélia Larger Manfio, pelo incentivo, compreensão e confiança. Minha eterna gratidão por contribuir decisivamente para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, Astério e Isabel, pelo amor e educação, e a minha irmã Lidiane, pelo amor e cumplicidade. Espero que todo o empenho e esforço dedicados a mim, e que hoje se tornam frutos, possa fazer com que um dia vocês venham sentir tanto orgulho de mim, quanto eu sinto de vocês.

Às minhas amigas de trabalho e mestrado, Fabiane e Micheline, pelo apoio e sugestões na realização desse trabalho, mas acima de tudo pela amizade e ótimos momentos de convívio.

Ao meu amigo Mauricio, pela contribuição estatística que foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À minha amiga Ana Maria, pelo apoio de sempre em cada passo importante de minha vida.

A todos os colegas e funcionários do laboratório Biocinese, pela presteza, colaboração e amizade incondicional.

À Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos e à Prati, Donaduzzi Indústria Farmacêutica pelo apoio financeiro e disponibilização de equipamentos e materiais para a realização das análises.

RESUMO

Estudo preditivo da bioequivalência de albendazol e hidroclorotiazida em ratos

O estudo de bioequivalência garante a intercambiabilidade entre o medicamento referência e o genérico. Várias metodologias têm sido desenvolvidas para fornecer previsões farmacocinéticas em humanos. Entre elas, os ensaios em ratos podem ser uma ferramenta útil para prever a bioequivalência de produtos farmacêuticos. Neste trabalho os fármacos hidroclorotiazida e albendazol foram submetidos a testes de bioequivalência farmacêutica em ratos e seus dados comparados a dados clínicos, a fim de verificar o potencial preditivo do modelo animal. As formulações foram administradas por via oral a ratos Wistar. Coletas seriadas de sangue em períodos determinados foram realizadas na veia caudal. A quantificação das amostras foi realizada por Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massas (CLUP-EM/EM). Os resultados dos ensaios clínicos de bioequivalência dos produtos foram cedidos pelo laboratório Biocinese e as análises estatísticas foram realizadas comparando-se os resultados de humanos e animais para os parâmetros farmacocinéticos ASC_{0-t} , $ASC_{0-\infty}$, $C_{máx}$, $T_{máx}$ e $T_{1/2}$. De maneira geral, os dados farmacocinéticos obtidos em ratos seguiram o mesmo comportamento dos dados obtidos em seres humanos, sendo que o desempenho do fármaco em animais foi capaz de prever os dados em humanos para albendazol, fármaco da classe IV (baixa permeabilidade/ baixa solubilidade) na formulação suspensão. Assim, o estabelecimento de um modelo animal para predição de bioequivalência pode contribuir para melhorar a qualidade durante o desenvolvimento de formulações, possibilitando, para os produtos que apresentem a mesma biodisponibilidade do produto referência, um custo menor e também um tempo menor no estudo de sua bioequivalência.

Palavras-chave: bioequivalência; predição; ratos, albendazol; hidroclorotiazida.

ABSTRACT

Pharmacokinetic of albendazole and hidrochlorothiazide in rats as a predictor to human assays of bioequivalence

The study of bioequivalence ensures the interchangeability between the generic and the reference drug. Several methods have been used to provide pharmacokinetic predictions in humans, among them animal tests can be a useful tool in predicting the bioequivalence of pharmaceuticals. This study aimed to test the bioequivalence of albendazole and hydrochlorothiazide in rats, after the oral administration of the formulations. Serial blood collections were performed through the tail vein during predetermined periods. The quantification of the samples was performed by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). Results of bioequivalence tests of the same products on clinical trials were provided by the Biocinese Laboratory. Statistical analysis was performed comparing the results of human and animal studies for the pharmacokinetic parameters AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , T_{max} and $T_{1/2}$. The pharmacokinetic data obtained in rats followed the same pattern of the data obtained in humans for albendazole, a class IV drug (low solubility/low permeability), in suspension, showing that drug performance in rats could be useful to predict the human data. The establishment of an animal model for prediction of bioequivalence contributes to improve the quality in the development of pharmaceuticals formulations presenting the same bioavailability of the reference product with lower cost and in a shorter time.

Keywords: bioequivalence; prediction, rats; albendazole; hydrochlorothiazide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do albendazol (ABZ).	21
Figura 2: Estrutura química da hidroclorotiazida (HCTZ).	22
Figura 3: Divisão de grupos e subgrupos experimentais.	29
Figura 4: Cromatograma representativo de amostra plasmática branca ABZ analisados por CLUP-EM/EM.	32
Figura 5: Cromatograma de CLUP-EM/EM representativo de plasma contendo os fármacos ABZ e Tiabendazol.	33
Figura 6: Cromatograma representativo de amostra plasmática branca de HCTZ analisados por CLUP-EM/EM.	34
Figura 7: Cromatograma de CLUP-EM/EM representativo de plasma contendo os fármacos HCTZ e Clortalidona.	34
Figura 8: Curva média da concentração plasmática de albendazol (ABZ) versus tempo nos voluntários dos medicamentos teste e referência.	36
Figura 9: Curva média da concentração plasmática de hidroclorotiazida (HCTZ) versus tempo nos voluntários dos medicamentos teste e referência.	38
Figura 10: Curva média da concentração plasmática de albendazol (ABZ) versus tempo dos medicamentos teste e referência, em ratos.	40
Figura 11: Curva média da concentração plasmática de hidroclorotiazida (HCTZ) versus tempo dos medicamentos teste e referência, em ratos.	42
Figura 12: Curva de concentração plasmática média versus tempo dos medicamentos teste e referência do medicamento albendazol (ABZ), em seres humanos e ratos.	43
Figura 13: Curva de concentração plasmática média versus tempo dos medicamentos teste e referência do medicamento hidroclorotiazida (HCTZ), em seres humanos e ratos.	

ANEXOS

Figura 14: Animal 1 – Medicamento Referência ABZ	61
Figura 15: Animal 2 – Medicamento Referência ABZ	62

Figura 16: Animal 3 – Medicamento Referência ABZ.....	62
Figura 17: Animal 4 – Medicamento Referência ABZ.....	63
Figura 18: Animal 5 – Medicamento Referência ABZ.....	63
Figura 19: Animal 6 – Medicamento Referência ABZ.....	64
Figura 20: Animal 7 – Medicamento Teste ABZ.....	65
Figura 21: Animal 8 – Medicamento Teste ABZ.....	65
Figura 22: Animal 9 – Medicamento Teste ABZ.....	66
Figura 23: Animal 10 – Medicamento Teste ABZ.....	66
Figura 24: Animal 11 – Medicamento Teste ABZ.....	67
Figura 25: Animal 12 – Medicamento Teste ABZ.....	67
Figura 26: Animal 1 – Medicamento Referência HCTZ.....	68
Figura 27: Animal 2 – Medicamento Referência HCTZ.....	69
Figura 28: Animal 3 – Medicamento Referência HCTZ.....	69
Figura 29: Animal 4 – Medicamento Referência HCTZ.....	70
Figura 30: Animal 5 – Medicamento Referência HCTZ.....	70
Figura 31: Animal 6 – Medicamento Referência HCTZ.....	71
Figura 32: Animal 7 – Medicamento Teste HCTZ	72
Figura 33: Animal 8 – Medicamento Teste HCTZ	72
Figura 34: Animal 9 – Medicamento Teste HCTZ	73
Figura 35: Animal 10 – Medicamento Teste HCTZ	73
Figura 36: Animal 11 – Medicamento Teste HCTZ	74
Figura 37: Animal 12 – Medicamento Teste HCTZ	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Medidas farmacocinéticas em seres humanos para o medicamento albendazol (ABZ).....	34
Tabela 2: Medidas farmacocinéticas em seres humanos para o medicamento hidroclorotiazida (HCTZ).....	36
Tabela 3: Medidas farmacocinéticas obtidas em ratos para o medicamento Albendazol (ABZ).....	38
Tabela 4: Medidas farmacocinéticas obtidas em ratos para o medicamento hidroclorotiazida (HCTZ).....	40
Tabela 5: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Referência ABZ.....	62
Tabela 6: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Teste ABZ.....	65
Tabela 7: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Referência HCTZ.....	69
Tabela 8: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Referência HCTZ.....	72

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ABZ	Albendazol
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	rea Sob a Curva
CEUA	Comitê de tica no Uso de Animais
CLUP-EM/EM	Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplado a Espectrometria de Massas
$C_{máx}$	Concentrao Máxima
CV	Coefficiente de variao
Da	Dalton
DP	Desvio padrão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
h	Hora
HCTZ	Hidroclorotiazida
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
L	Litro
LQ	Limite de quantificao
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRM	Monitoramento de Reaos Múltiplas
m/z	Massa/carga
ng	Nanograma
nm	Nanmetro
r^2	Coefficiente de determinao
RPM	Rotaos por Minuto
RE	Resoluo
SCB	Sistema de Classificao Biofarmacêutico
SQR	Substância química de referência
$T_{1/2}$	Tempo de meia vida
$t_{máx}$	Tempo para atingir concentrao máxima
TMB	Taxa Metabólica Basal

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UI	Unidade Internacional
UNIPAR	Universidade Paranaense
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
V	Volts
Kg	Quilogramas
KV	Quilovolts
°C	Grau centígrado
∞	Infinito
μL	Microlitro
μg	Micrograma
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	223
2.1	Objetivos específicos.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	Considerações éticas	25
3.2	Produtos Farmacêuticos	25
3.3	Quantificação das amostras	25
3.3.1	Albendazol	25
3.3.2	Hidroclorotiazida.....	26
3.3.3	Validação.....	26
3.4	Etapa Clínica	27
3.5	Etapa pré-clínica.....	27
3.5.1	Condições experimentais.....	27
3.5.2	Grupos experimentais.....	28
3.5.3	Administração da medicação.....	29
3.5.4	Coletas das amostras	30
3.5.5	Eutanásia dos animais	30
3.6	Parâmetros farmacocinéticos.....	31
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Validação de método.....	32
4.1.1	Albendazol	32
4.1.2	Hidroclorotiazida.....	33
4.2	Dados clínicos	35
4.2.1	Albendazol	35
4.2.2	Hidroclorotiazida.....	36
4.3	Dados pré-clínicos.....	38
4.3.1	Albendazol	39
4.3.2	Hidroclorotiazida.....	40
4.4	Dados clínicos versus pré-clínicos	42
5	DISCUSSÃO.....	45
6	CONCLUSÕES.....	50
7	REFERÊNCIAS	51
8	ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Em 1999, foi promulgada a lei 9.787 que estabeleceu as bases legais para a introdução de medicamentos genéricos no país. Esta lei representa um avanço na busca pela qualidade dos medicamentos e uma política de preços mais condizentes com a realidade sócio-econômica no Brasil. A regulamentação desta lei foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) ainda no ano de 1999 com a publicação da resolução 391/99, na qual foram incluídos os conceitos de equivalência, biodisponibilidade e bioequivalência farmacêutica. Após a implantação desta resolução, várias outras resoluções foram publicadas a fim de revisar, detalhar e atualizar os procedimentos relacionados aos estudos de bioequivalência e biodisponibilidade (BUENO, 2005; ANVISA, 1999a; ANVISA, 1999b; PITTA, 2004).

A implantação dos genéricos estimulou a concorrência e disponibilizou produtos intercambiáveis de diferentes preços aos consumidores. A competição pelo menor preço proporcionou benefício a todos os segmentos envolvidos na cadeia de produção, controle, comercialização e consumo. O medicamento genérico no Brasil despertou o interesse das indústrias nacionais e internacionais. A geração de empregos no setor farmacêutico aumentou assim como o investimento na qualificação profissional para que as empresas sejam capazes de atender às novas regulamentações (SOMMER, 2005).

No Brasil, o medicamento genérico é definido com equivalente farmacêutico em relação ao medicamento referência ou inovador, que se pretende ser intercambiável, produzido após a expiração, ou renúncia de patente, ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade (ANVISA, 1999a).

Para garantir a intercambiabilidade entre medicamento de referência e genérico se fazem necessários os testes de bioequivalência farmacêutica, pois é a partir destes que garantimos a biodisponibilidade, isto é, a velocidade e a extensão da absorção de um produto farmacêutico que se torna disponível no local de ação (DIGHE, 1999). Estes testes podem ser considerados como mais um teste de qualidade do medicamento, através da comparação do seu perfil de concentração plasmática em função do tempo, nas mesmas condições experimentais (FLACH & COSTA, 1999).

O estudo de biodisponibilidade permite avaliar a linearidade farmacocinética, estudar a melhor forma farmacêutica para apresentação do fármaco, investigar as diversas variáveis envolvidas na administração de um produto e comparar um medicamento genérico com seu inovador

através de um estudo de bioequivalência. Segundo a ANVISA, a biodisponibilidade indica a velocidade e a extensão de absorção de um fármaco em uma forma de dosagem, a partir de sua curva concentração *versus* tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (ANVISA, 2007; ANVISA, 2002; METZLER, 1974).

O estudo de bioequivalência estima a biodisponibilidade relativa entre dois produtos, portanto, seu foco está na comparação do desempenho de dois produtos. Essa comparação só é possível para fármacos que apresentem uma relação definida da concentração do fármaco na corrente circulatória, efeito terapêutico e segurança, pois nos estudos de bioequivalência considera-se que curvas estatisticamente semelhantes de decaimento sanguíneo de fármacos produzem o mesmo resultado em termos de eficácia e segurança (PEARCE et al., 2004; NATION & SANSOM, 1994; HERCHUELZ, 1996; MEREDITH, 1996; GLEITER et al., 1998; PORTA, 1999).

Dois formas farmacêuticas são ditas bioequivalentes quando, ao serem administradas ao mesmo indivíduo, nas mesmas condições experimentais e na mesma dose molar, não apresentem diferenças estatisticamente significativas em relação à biodisponibilidade (ANVISA, 2007; ANVISA, 2003; CID, 1982; GIBALDI, 1991, RITSCHER, 1992, WAGNER, 1977; CONSIGLIERI & STORPIRTIS, 2000).

Os estudos de bioequivalência são realizados em seres humanos, através da administração dos medicamentos pela mesma via extravascular, sob condições experimentais padronizadas, seguida pela quantificação das concentrações plasmáticas, séricas ou sanguíneas dos fármacos e/ou metabólito ativo em função do tempo. A determinação da bioequivalência deve refletir especificamente os processos sofridos pelo fármaco após administração, de um modo linear e com sensibilidade. Os parâmetros farmacocinéticos utilizados na avaliação da bioequivalência são basicamente, a concentração máxima ($C_{máx}$) do fármaco e/ou metabólito ativo na corrente sanguínea e a área sob a curva (ASC) de decaimento sanguíneo (ENDRENYI et al., 1995; PORTA, 1999; ANVISA, 2006).

Com o surgimento dos medicamentos genéricos no Brasil, os estudos de biodisponibilidade e bioequivalência constituem hoje um dos temas mais relevantes na área farmacêutica e médica, tendo originado, nos últimos 25 anos, provavelmente o maior número de publicações e de encontros científicos que qualquer outro tópico da biofarmacotécnica (ABDOU, 1989; GLEITER et al., 1998; PORTA, 1999).

Com o aumento da capacidade de métodos bioanalíticos iniciado em meados dos anos 50, o comportamento dos produtos pode ser mais facilmente monitorado e quantificado. Estes dados reuniram esforços nacionais e internacionais para definir a biodisponibilidade e a bioequivalência e determinar os procedimentos adequados para sua avaliação.

Os estudos de bioequivalência em humanos devem ser delineados de forma a evitar exposição dos voluntários sadios a riscos advindos da utilização do medicamento. Visando reduzir a necessidade de realização dos mesmos, a ANVISA, baseada em parâmetros científicos, estabeleceu critérios de isenção de bioequivalência para alguns medicamentos, como é o caso de medicamento na forma líquida para administração parenteral, tópica ou oral, desde que os adjuvantes não interfiram na absorção do medicamento e que o medicamento apresente equivalência farmacêutica com o produto referência (FLACH & COSTA, 1999; FARINHA, 2001). O FDA (2009) recomenda que não sejam realizados ensaios em seres humanos caso haja resultados *in vitro* que apresentem correlação com dados de biodisponibilidade humana.

Para aperfeiçoar o desenvolvimento de novos fármacos, tem havido um crescente interesse em prever o comportamento farmacocinético de novas drogas. Tais simulações poderiam também ajudar a selecionar os candidatos mais promissores para o desenvolvimento e rejeitar aqueles com baixa probabilidade de sucesso (HOSEA, 2009; VAN DE WATERBEEMD & GIFFORD, 2003).

O processo de desenvolvimento de novos fármacos poderia ser mais bem delineado se os candidatos a fármaco passassem por um método confiável a fim de prever a disposição de drogas em humanos, o que diminuiria o número de desenvolvimentos perdidos devido a características farmacocinéticas inaceitáveis. A melhor técnica descrita para prever farmacocinética humana a partir de dados pré-clínicos é o dimensionamento alométrico, o qual explica as relações observadas entre o tamanho de órgão e do peso corporal de animais (DEDRICK et al., 1973.; MORDENTI, 1986).

O efeito biológico em um modelo animal apropriado pode ser qualitativamente associado ao comportamento do fármaco no homem. Não é necessário, no entanto, que o comportamento do fármaco observado em animais seja o mesmo que em humanos, é necessário apenas que um seja capaz de prever o outro (WARD & SMITH, 2004; MAHMOOD, 2000; ALARIE, 1981).

A farmacocinética humana pode ser prevista em animais de diferentes espécies, porém o rato é rotineiramente utilizado nos testes de

primeira linha de estudos farmacocinéticos (TANG, 2005; TANG, 2007).

Os estudos de biodisponibilidade relativa em humanos são minuciosos, detalhados e abrangentes, podendo o modelo animal ser uma alternativa a ser utilizada simultaneamente ao desenvolvimento de fármacos para orientar o desenho de estudos clínicos e aumentar as chances de uma bioequivalência em humanos.

Em estudos de farmacocinética básica a espécie animal, idade (jovens, adultos, recém-nascido) e sexo devem ser muito bem definidos. Os estudos devem ser realizados em animais representativos, em número suficiente e saudáveis, lembrando que a via de administração do medicamento pode afetar a absorção e a disposição do fármaco no organismo. A dose a ser administrada deve ser calculada com base no peso corporal do animal, assim como o número de amostras de sangue coletadas deve ser adequado para permitir uma determinação adequada de absorção, distribuição e eliminação (EMEA, 2000).

A escala alométrica tem sido aplicada para prever uma variedade de fatores, taxas biológicas, tempos e dimensões entre as espécies de várias ordens de magnitude no corpo peso. O metabolismo de drogas é uma área onde os métodos das escalas alométricas se tornaram a base para estudos pré-clínicos de farmacocinética, com modelos para prever o curso do tempo de concentrações da droga no homem (BOXENBAUM, 1982). A premissa para o cruzamento de escalabilidade entre espécies é baseada em dois princípios fundamentais pressupostos, que o modelo descreva um elemento essencial como parte da fisiologia do sistema estudado e, tanto a interação fármaco-receptor e o controle fisiológico dos sistemas são similares entre as espécies estudadas (GRONERT, 1995; ZUIDEVELD, 2006).

A comparação da biodisponibilidade de produtos veterinários é executada de maneira muito próxima à condução de estudos em seres humanos, onde a bioequivalência é demonstrada pela comparação da taxa e extensão de absorção, sendo um produto veterinário dito bioequivalente quando o ativo dos produtos difere dentro de limites aceitáveis de 80% para ASC (EMEA, 2001).

Por outro lado, os modelos *in vitro* para prever a biodisponibilidade em humanos dependem da combinação de dois testes que fornecem dados separados sobre permeabilidade e da depuração hepática. Para reduzir os custos de estudos em animais, e diminuir a taxa de reprovação de ensaios clínicos, muitos estudos têm se concentrado na predição *in vitro* da farmacocinética de humanos (LAU, 2004).

Além disso, é bem sabido que a resposta biológica ou terapêutica do produto farmacêutico pode estar relacionada com a quantidade e a velocidade de passagem do fármaco para a corrente sanguínea. Para fármacos contidos em formas farmacêuticas sólidas é necessário que ocorra a sua liberação da formulação, seguida da dissolução nos líquidos corpóreos e posterior permeação através das membranas biológicas (DUNNE et al., 1999). Sendo assim, modelos *in vitro* que permitam simular estes processos são úteis para prever a absorção *in vivo*.

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) pode auxiliar na previsão da absorção *in vivo* e identificar se a biodisponibilidade de determinado produto farmacêutico é sensível a alterações do processo produtivo, dos constituintes da formulação ou da concentração do fármaco (DRESSMAN et al., 1998; KASSIN et al., 2003).

A avaliação do fármaco quanto à solubilidade e permeabilidade está baseada SCB dos fármacos, o qual foi estabelecido com o intuito de auxiliar a indústria farmacêutica na solicitação de isenção dos ensaios de bioequivalência para um determinado medicamento, baseando-se nos testes de dissolução *in vitro*. Através desse sistema, os fármacos podem ser classificados em quatro grupos de acordo com suas propriedades de solubilidade e permeação na mucosa gastrintestinal (AMIDON, et al., 1995; STAVCHANSKY & PADE, 1998):

Classe I: alta permeabilidade - alta solubilidade: Estes fármacos são rápida e completamente absorvidos. A correlação esperada entre os dados é baixa, devido a alta velocidade da dissolução e esvaziamento gástrico (AMIDON et al., 1995).

Classe II: alta permeabilidade – baixa solubilidade: A dissolução no trato gastrintestinal é a etapa limitante para o processo de absorção. A boa correlação desta classe é garantida devido à escolha adequada do meio e do método de dissolução utilizado nos testes *in vitro*, deve representar as condições fisiológicas e refletir o comportamento *in vivo* (AMIDON et al., 1995).

Classe III: baixa permeabilidade – alta solubilidade: A permeação do fármaco através da membrana intestinal é a etapa limitante no processo de absorção. A correlação baixa deste grupo é devido a velocidade e extensão de absorção de fármacos que podem ser altamente variáveis devido às diferenças no trânsito gastrintestinal (AMIDON et al., 1995).

Classe IV: baixa permeabilidade – baixa solubilidade: A correlação desta classe é limitada devido a possuírem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção. Possuem absorção ruim, sendo problemáticos para utilização oral (AMIDON et al., 1995).

A preocupação do Controle de Qualidade restringia-se às análises físico-químicas a fim de atestar o teor da substância ativa e sua uniformidade na formulação, não se questionando a capacidade desta em liberar o fármaco para que fosse absorvido em quantidade e velocidade adequadas para o alcance do efeito terapêutico desejado. Mesmo fornecendo valiosas informações sobre a disponibilidade biológica do fármaco, a dissolução não comprova sua eficiência terapêutica (ABDOU, 1989; STORPIRTIS & CONSIGLIERI, 1995).

A previsão de farmacocinética humana é um desafio importante na descoberta da droga e o processo de desenvolvimento para minimizar risco para os participantes durante os primeiros estudos em humanos. Várias metodologias têm sido desenvolvidas para fornecer previsões farmacocinéticas em humanos e estas metodologias têm sido cada vez mais integradas em todas as fases da pesquisa do fármaco (HOSEA, 2009; DEDRICK, 1973; MORDENTI, 1986; HOUSTON, 1994; IWATSUBO, 1997; LAVE, 1997; OBACH, 1997; LAVE, 1999; WARD & SMITH, 2004; NAGILLA, 2004; JONES, 2006).

Acredita-se que a avaliação de resultados obtidos em ensaios de biodisponibilidade em ratos pode prever com segurança a bioequivalência de produtos farmacêuticos em estudos com seres humanos. Neste contexto, foram submetidos a testes de bioequivalência farmacêutica em ratos os fármacos Hidroclorotiazida, classificado como grupo III do Sistema de Classificação Biofarmacêutico: baixa permeabilidade – alta solubilidade, e o fármaco Albendazol classificado como grupo IV: baixa permeabilidade – baixa solubilidade.

O albendazol (ABZ) é um derivado imidazólico com amplo espectro de ação, pois é eficaz no tratamento da ascariíase, enterobíase, tricocefalíase e ancilostomíase, entre os nematóides, sendo recentemente utilizado como droga preferida no tratamento da cisticercose. É absorvido irregularmente pelo tubo gastrointestinal após administração por via oral, sendo então metabolizado pelo fígado, formando o sulfóxido de ABZ, que tem potente atividade anti-helmíntica.

Estudos mostram que o albendazol é eficaz no tratamento de infecções por *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermiculares*; *Necator americanus*; *Ancylostoma duodenale*; *Trichuris trichiura*; *Strongyloides stercoralis*, *Taenia sp.* e *Hymenolepis nana* (SILVA, 2006).

Produz poucos efeitos colaterais quando utilizados para o tratamento de helmintoses intestinais. Nos tratamentos prolongados, como acontece na cisticercose, podem ser observadas elevação das transaminases e icterícia por colestase, retornando à normalidade após o término do tratamento (GOODMAN & GILMAN, 2006; SILVA, 2006).

Sua fórmula química ([metil-5-(propil-tio)-1H-benzimidazol-2-il] carbamato), (FIGURA 01), em estudos nos animais e no homem, exhibe propriedades ovicida, larvicida e helminticida, e atua inibindo a captação de glicose associada a uma depleção de glicogênio e diminuição do ATP, que é essencial para a sobrevivência e a reprodução dos parasitas. Essa ação bloqueadora é a responsável pelo amplo espectro da droga (GOODMAN & GILMAN, 2006; SILVA, 2006).

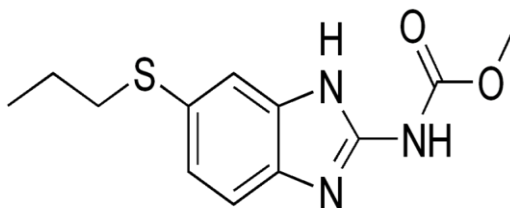


Figura 1: Estrutura química do albendazol (ABZ).

O ABZ tem uma pequena absorção (menos de 5%). A maior parte de sua ação antihelmíntica é na luz intestinal. Com uma dose de ABZ de 6,6 mg/kg de peso, a concentração plasmática atinge o máximo de 0,25 a 0,30 µg/mL após aproximadamente 2,5 h. A vida média de eliminação do seu metabólito plasmático é de 8,5 h (GOODMAN & GILMAN, 2006; SILVA, 2006).

Já a hidroclorotiazida (HCTZ), que apresenta a seguinte fórmula química 6-cloro-3, 4-dihidro-2H-1, 2, 4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dióxido (FIGURA 02), pertence à classe dos diuréticos tiazídicos, que curiosamente foram sintetizados por acaso quando se tentava aumentar a potência dos inibidores da anidrase carbônica. Constatou-se que a urina dos pacientes tratados possuía altos teores de íons cloro, o que naquela época era uma resposta um pouco diferente a dos diuréticos convencionais e, portanto, estes novos compostos representaram uma preciosa descoberta para a medicina (ERK, 2003)

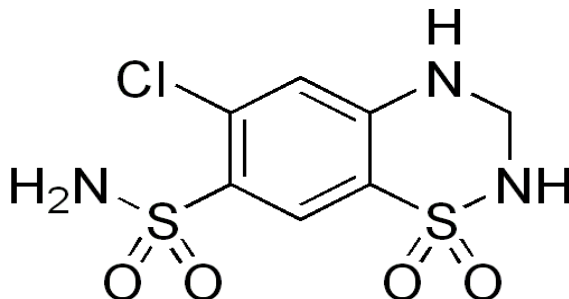


Figura 2: Estrutura química da hidroclorotiazida (HCTZ).

A HCTZ age diretamente sobre os rins, atuando sobre o mecanismo de reabsorção de eletrólitos no túbulo contornado distal. Aumenta a excreção de sódio e cloreto (em quantidades aproximadamente equivalentes) e, conseqüentemente, de água. A excreção renal aumentada destes íons é acompanhada pelo aumento do débito urinário. Ocorre aumento da excreção de potássio e magnésio e diminuição da excreção de ácido úrico (LIU, 2007).

Além do efeito diurético, a HCTZ apresenta efeito anti-hipertensivo. Sua ação anti-hipertensiva parece estar relacionada com excreção e redistribuição de sódio, assim como pelo efeito vasodilatador. A HCTZ é indicada no tratamento da hipertensão arterial, quer isoladamente ou em associação com outros fármacos anti-hipertensivos nos casos mais graves de hipertensão (ERK, 2003).

A HCTZ é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo a absorção da ordem de 60% pela via oral. Distribui-se preferencialmente ligada aos eritrócitos, seu volume de distribuição varia de 3,6 a 7,8 L/kg. Sua excreção renal, é cerca de 95% sob forma inalterada e a mesma se encontra relativamente ligada às proteínas plasmáticas. A diurese inicia-se dentro de 2 h após a administração oral e alcança o nível máximo em cerca de 4 h. O tempo para atingir a concentração máxima plasmática, após administração oral, é de aproximadamente 3 h. Sua meia vida inicial é de 3 a 4 h, sendo que sua ação persiste por aproximadamente 6 a 12 h. É excretada rapidamente pelos rins, após a administração de 25 a 100 mg, por via oral, cerca de 72 a 97% das doses são excretadas na urina (GOODMAN & GILMAN, 2006; SILVA, 2006).

Assim, o desenvolvimento de técnicas pré-clínicas eficientes, como o proposto no presente trabalho, para se obter um método de

avaliação que mais se aproxime do resultado que poderá ser gerado em humanos é de extrema importância, pois poderá contribuir para o desenvolvimento de formulações que apresentem a mesma biodisponibilidade que o produto de referência, predizendo estudos de bioequivalência em humanos, preferencialmente com menor custo e, quiçá, em menor tempo,

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por finalidade avaliar um modelo de predição por comparação da farmacocinética e bioequivalência após a administração oral de hidroclorotiazida (HCTZ), classe III, e albendazol (ABZ), classe IV, em ratos Wistar.

2.1 Objetivos específicos

- Quantificar os fármacos ABZ e HCTZ em plasma de ratos Wistar através de método bioanalítico validado em Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massa (CLUP-EM/EM).
- Comparar a biodisponibilidade relativa através de parâmetros farmacocinéticos relevantes obtidos da concentração dos produtos na corrente sanguínea dos ratos.
- Comparar os dados obtidos no modelo animal cruzando com os resultados de dados já existentes de estudos realizados em seres humanos a fim de verificar correlação ou não dos dados encontrados.
- Estabelecer um modelo experimental em animais que seja aplicável como ferramenta no desenvolvimento de fármacos, para avaliar o comportamento farmacocinético dos medicamentos que serão submetidos à Bioequivalência Farmacêutica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Os experimentos em animais foram realizados conforme as normas internacionais de bem-estar animal, sendo os protocolos experimentais previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o número 23080.023787/2010-11/CEUA/UFSC (ANEXO I).

3.2 Produtos Farmacêuticos

Para a realização dos experimentos foram utilizados dois medicamentos diferentes de ABZ e HCTZ:

- Albendazol Referência suspensão 40 mg/mL
- Albendazol Teste suspensão 40 mg/mL
- Hidroclorotiazida Referência comprimido 50 mg
- Hidroclorotiazida Teste comprimido 50 mg

3.3 Quantificação das amostras

3.3.1 Albendazol

As amostras de plasma contendo o fármaco ABZ foram analisadas usando Tiabendazol como padrão interno. Um total de 50 μ L de plasma foi transferido para tubo de 2 mL e adicionado 50 μ L de solução padrão interno (40 ng/mL em acetonitrila).

A extração foi realizada com 1,4 mL de terc-butil-metil-éter. As amostras foram agitadas por 10 min e centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm sob temperatura de 4 °C. Após centrifugação, a fase orgânica foi separada e evaporada até secagem com nitrogênio em temperatura de 45 °C. O resíduo foi dissolvido em 200 μ L de Fase Móvel. A fase móvel foi constituída de acetonitrila: metanol: ácido fórmico 1% (45:15:40 v/v/v). A análise foi efetuada sob fluxo de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi de 10 μ L.

O sistema de análise utilizado foi a Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massas (CLUP-EM/EM) Waters, modelo *Acquity Quattro Premier XE*[®]. Foi utilizada uma fonte de ionização por *electrospray* no modo positivo com monitoramento de reações múltiplas (MRM), e as transições monitoradas foram de 266,3 > 234,0 m/z para ABZ e 202,3 > 174,9 m/z

para Tiabendazol. O fluxo de gás de cone e de dessolvatação foram de 100 e 700 L/h, respectivamente. As voltagens do capilar, do extrator, do hexapolo, temperatura da fonte e de dessolvatação foram de 4,0 kV, 4 V, 0,1 V, 110 ° e 400 ° C, respectivamente. A voltagem do cone foi de 30 e 40 V, e a energia de colisão 20 e 25 V para ABZ e Tiabendazol, respectivamente. A aquisição de dados das análises foi realizadas utilizando o *software* MassLynx 4.1[®].

3.3.2 Hidroclorotiazida

As amostras contendo HCTZ foram analisadas usando a clortalidona como padrão interno. Um total de 50 µL de plasma foi transferido para tubo de 2 mL e adicionado 50 µL de solução padrão interno (5000 ng/mL em acetonitrila).

Na extração 1,4 mL de acetato de etila foi utilizado. As amostras foram agitadas por 15 min e centrifugadas por mais 5 min a 10.000 rpm, sob temperatura de 4 °C. A fase orgânica foi separada, acondicionada em banho-maria à temperatura de 45 °C e evaporada com nitrogênio. O resíduo foi reconstituído em 200 µL de fase móvel. A fase móvel foi composta de acetonitrila: Ácido Acético Glacial 0,1% (90:10 v/v). A análise foi efetuada sob fluxo de 0,6 mL/min e o volume de injeção foi de 10 µL.

O sistema de análise utilizado foi a Cromatografia Líquida de Ultra Performance acoplada à Espectrometria de Massas (CLUP-EM/EM) Waters, modelo *Acquity Quattro Premier XE*[®]. Foi utilizada uma fonte de ionização por *electrospray* no modo positivo com monitoramento de reações múltiplas (MRM), as transições monitoradas foram de 296,0>269,0 m/z para HCTZ e 339,>192,2 m/z para a clortalidona. O fluxo de gás de cone e de dessolvatação foram de 100 e 600 L/h respectivamente. As voltagens do capilar, do extrator, do hexapolo, temperatura da fonte e de dessolvatação foram de 3,5 kV, 2 V, 0,2 V, 110 ° e 400 ° C, respectivamente. A voltagem do cone foi de 45 e 35 V, e energia de colisão 20 e 18 V para HCTZ e clortalidona, respectivamente. A aquisição de dados das análises foi realizadas utilizando o *software* MassLynx 4.1[®].

3.3.3 Validação

Para a validação da metodologia de ABZ e HCTZ em CLUP-EM/EM foram realizados testes que comprovassem a especificidade, a linearidade de resposta, o limite inferior de quantificação, a recuperação,

a precisão, a exatidão do método e ainda a estabilidade dos fármacos em matriz biológica. Os parâmetros para avaliação da metodologia de análise foram retirados do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003). Os métodos para avaliação de ABZ e HCTZ em plasma humano foram avaliados parcialmente com a matriz de plasma de rato para assegurar que não ocorresse efeito de matriz e garantir que o plasma animal não intervesse na confiabilidade dos resultados obtidos.

3.4 Etapa Clínica

Os ensaios clínicos de bioequivalência foram realizados pela Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos, de acordo com as normas da ANVISA para estudos de bioequivalência em seres humanos no Brasil.

Os estudos de ABZ e HCTZ foram realizados com 70 e 23 voluntários, respectivamente, de ambos os sexos. Os estudos foram abertos, randomizados, cruzados, com 2 administrações, em 2 períodos, e dose única por via oral. As amostras de sangue para determinação de ABZ foram coletadas previamente à administração e até 72 h após e para a HCTZ até 12 h após, em intervalos pré-estabelecidos. As concentrações plasmáticas de ABZ e HCTZ foram determinadas pela Biocinese através de CLUP-EM/EM.

3.5 Etapa pré-clínica

3.5.1 Condições experimentais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas adultas, com peso médio de 274 gramas e entre 60 a 90 dias de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e transportados em carro apropriado, com temperatura controlada até o Biotério Central da Universidade Paranaense (UNIPAR), onde os experimentos foram realizados, após um período de habituação de, pelo menos, 15 dias até o início dos experimentos. Os animais foram alojados em grupos de 6 por caixa, com água e ração *ad libitum*, exceto durante as sessões de experimento onde a alimentação era retirada 8 h antes da realização do mesmo, sendo mantidos em um

ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 h.

3.5.2 Grupos experimentais

O número de animais foi calculado pela fórmula:

$$n = \left[\frac{(Z_{\text{alfa}} + Z_{\text{beta}}) \times S}{\text{delta}} \right] \times 2$$

n: número de indivíduos na amostra

Z alfa: valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado

Z beta: valor crítico que corresponde ao poder do teste desejado

S: desvio-padrão da população

delta: erro máximo da estimativa

O número estimado foi de 6 (seis) animais para cada sub-grupo e foi estimado em função da variabilidade dos dados para o ABZ e a HCTZ em humano já obtidos em estudo de bioequivalência.

Para cada produto foram selecionadas 24 ratas da linhagem Wistar os quais foram divididos em 2 grupos de 12 animais para a formulação teste e 12 animais para a formulação referência. Os 12 animais foram divididos em dois subgrupos A e B para execução da coletas, dos animais A foram realizadas as 5 primeiras coletas e do grupo B foram coletadas as 5 últimas coletas conforme mostrado na figura 03.

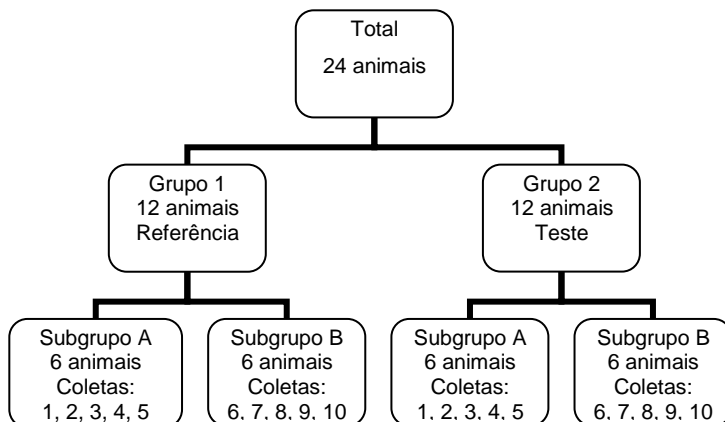


Figura 3: Divisão de grupos e subgrupos experimentais.

3.5.3 Administração da medicação

A definição das doses de ABZ e HCTZ a ser administrada foi calculada a partir de extrapolações alométricas, seguindo a fórmula:

$$TMB = K \times M^{(0,75)}$$

TMB: taxa metabólica basal ou custo mínimo de energia por animal

K: constante que para mamíferos placentários = 70

M: peso metabólico

Foi calculada a TMB para o animal modelo (homem) e para o animal alvo (rato), em seguida é realizado o cálculo para extrapolação da dose:

$$\text{Cálculo da Dose} = \left(\frac{\text{Dose (homem)}}{\text{TMB (homem)}} \right) \text{TMB (rato)}$$

A administração foi feita em dose única, via oral através de gavagem. O medicamento ABZ (suspensão) foi administrado nos animais em dose de 6,70 mg/kg, sendo que a quantidade administrada variou proporcionalmente ao peso dos animais. O comprimido de HCTZ

foi macerado e diluído em água destilada, a dose do medicamento foi de 1 mg/kg. Os animais do grupo 1 receberam a formulação referência e os animais do grupo 2 receberam a formulação teste.

3.5.4 Coletas das amostras

Para os dois experimentos foi realizada uma coleta de sangue previamente à administração da medicação do subgrupo A para controle negativo da medicação e composição de curva de calibração. Para cada subgrupo foram coletadas 5 amostras de 0,2 mL de sangue de cada rato, totalizando 1 mL de sangue por animal.

Para o medicamento ABZ foram coletadas dos animais do subgrupo A as amostras nos tempos 00:20; 00:40; 01:00; 01:30 e 02:00 h. Dos animais do subgrupo B foram coletadas as amostras nos tempos 02:30; 03:00; 04:00; 06:00 e 08:00 h.

Para o medicamento HCTZ foram coletadas as amostras nos tempos 00:15; 00:30; 00:45; 01:00 e 01:30 h do subgrupo A. Dos animais do subgrupo B foram coletadas as amostras nos tempos 02:00; 03:00; 04:00; 06:00 e 08:00 h.

As coletas das amostras foram realizadas na veia caudal do animal, sendo esta dilatada com a exposição a uma lâmpada incandescente de 110 watts por aproximadamente 5 min antes das coletas. Para a realização das coletas foi utilizado um contensor de acrílico (Insight[®]) para imobilização do animal. Para o procedimento de coleta foi realizada uma única e pequena incisão na ponta da cauda do animal, este procedimento se fez necessário pelo motivo de as coletas serem seriadas o que torna inviável o procedimento de punção venosa

O sangue coletado foi transferido para tubos contendo 50 µL de heparina sódica (50UI de heparina por 200 µL de sangue) como anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 min à temperatura de 4°C. Após a centrifugação, as amostras de plasma foram armazenadas em *freezer* à temperatura de -20°C.

3.5.5 Eutanásia dos animais

A eutanásia dos animais foi realizada pela administração intraperitoneal de tiopental 150 mg/kg, o qual age rapidamente e é um método seguro para anestesia animal (UBC, 2005).

3.6 Parâmetros farmacocinéticos

O pico de concentração máxima ($C_{\text{máx}}$) e o tempo para atingir esta concentração ($T_{\text{máx}}$) foram obtidos diretamente dos dados de concentração plasmática *versus* o tempo. A área sob a curva de concentração *versus* tempo, do tempo zero até o tempo da última coleta (ASC_{0-t}) e do tempo zero ao infinito ($ASC_{0-\infty}$), foi obtida pelo método dos trapezóides.

A análise destes parâmetros foi realizada com o emprego dos seguintes *softwares*: Microsoft Excel 2000 Small Business® e WinNonlin Versão 5.0.1®.

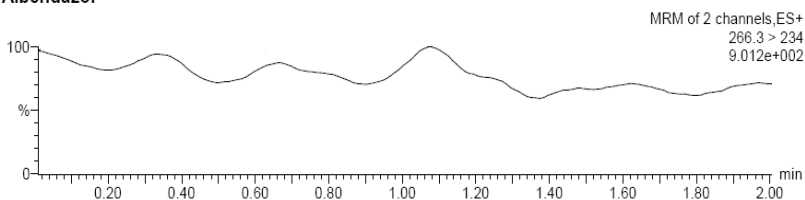
4 RESULTADOS

4.1 Validação de método

4.1.1 Albendazol

A linearidade foi realizada por seis determinações de oito concentrações na faixa de 1 a 400 ng/mL, sendo o limite de quantificação (LQ) de 1 ng/mL. O valor do coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9938$, $y = 0,0272401x + 0,00679643$) indicaram linearidade significativa do curva de calibração para o método. A comparação dos cromatogramas da amostra branco com LQ indicou que o método não apresentou interferências de substâncias endógenas, conforme demonstrado nas figuras 4 e 5.

Albendazol



Tiabendazol

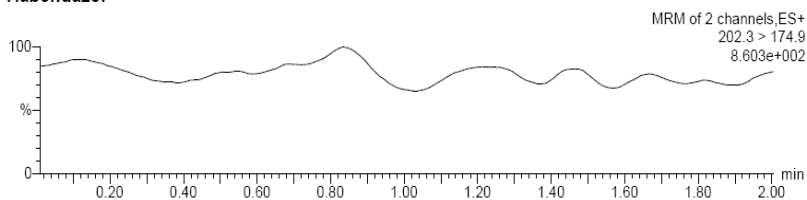


Figura 4: Cromatograma representativo de amostra plasmática branca ABZ analisados por CLUP-EM/EM.

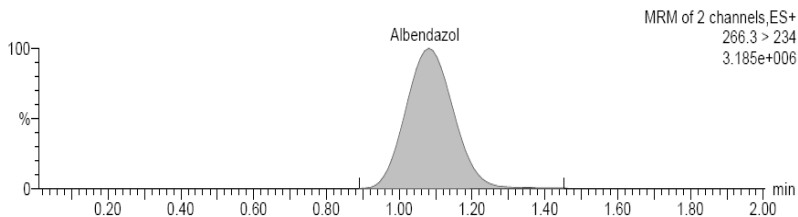
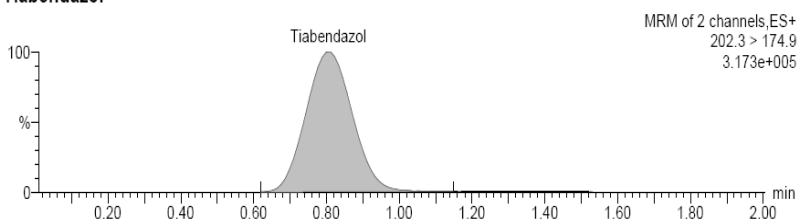
Albendazol**Tiabendazol**

Figura 5: Cromatograma de CLUP-EM/EM representativo de plasma contendo os fármacos ABZ e tiabendazol.

O método de extração líquido-líquido, que foi desenvolvido com terc-butil-metil-éter como solvente de extração, permitiu uma recuperação média de 73% para ABZ e de 81% para padrão interno na concentração especificada níveis. A exatidão do método ficou entre 88,51 e 98,04%, com precisão de 1,62 a 6,27%. As amostras de plasma foram estáveis por 43 dias a -20°C , e depois de cinco ciclos de congelamento e descongelamento. O ABZ se apresentou estável no plasma por 6 h à temperatura ambiente, podendo ser extraídas e mantidas em amostrador automático por até 49 h.

4.1.2 Hidroclorotiazida

A linearidade do produto foi determinada por oito concentrações em sextuplicata na faixa de 1 a 600 ng/mL, sendo o LQ de 1 ng/mL. O valor do coeficiente de determinação ($r^2 = 0,9982$, $y = 0,0390389x + 0,00482716$) indicaram linearidade significativa para o método. A comparação da amostra branco com LQ indicou que o método não apresentou interferências de substâncias endógenas conforme demonstrado nas figuras 6 e 7.

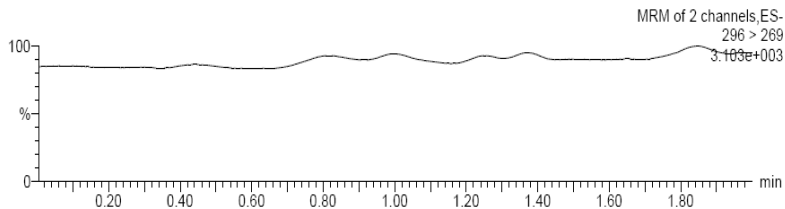
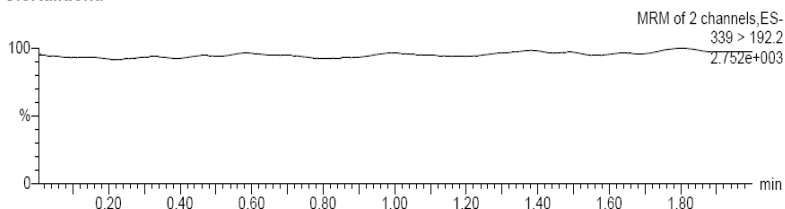
Hidroclorotiazida**Clortalidona**

Figura 6: Cromatograma representativo de amostra plasmática branca de HCTZ analisados por CLUP-EM/EM.

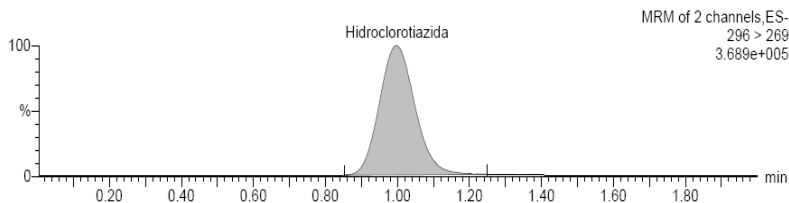
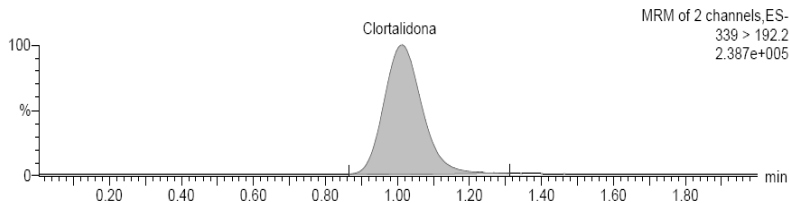
Hidroclorotiazida**Clortalidona**

Figura 7: Cromatograma de CLUP-EM/EM representativo de plasma contendo os fármacos HCTZ e clortalidona.

O método de extração utilizando acetato de etila como solvente permitiu uma recuperação de 93% para a HCTZ e de 97% para o padrão interno na concentração especificada. A exatidão do método ficou entre

93,10 e 97,76%, com precisão de 0,86 a 7,24%. As amostras de plasma foram estáveis por 39 dias a -20°C , e depois de cinco ciclos de congelamento e descongelamento. A HCTZ se apresentou estável no plasma por 5 h à temperatura ambiente e podem ser extraídas e mantidas em amostrador automático por até 32 h.

4.2 Dados clínicos

Os dados clínicos foram cedidos pelo laboratório Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos (Toledo – PR). Seguem relacionados nos itens 4.2.1 e 4.2.2 os parâmetros farmacocinéticos médios usados para avaliar a bioequivalência da formulação teste *versus* referência.

4.2.1 Albendazol

A tabela 1 mostra os parâmetros farmacocinéticos médios para ABZ.

Tabela 1: Medidas farmacocinéticas em seres humanos para o medicamento albendazol (ABZ).

Parâmetros Farmacocinéticos	Medicamento Referência	Medicamento Teste
$C_{\text{máx}}$ (ng/mL)	111,05	83,90
$t_{\text{máx}}$ (h)	2,73	2,91
$T_{1/2}$ (h)	9,38	6,93
ASC_{0-t} (ng/mL.h)	488,49	362,08
$ASC_{0-\infty}$ (ng/mL.h)	513,90	388,75

A figura 8 apresenta a curva média das concentrações plasmáticas do medicamento teste e referência *versus* tempo dos 70 voluntários após administração de cada uma das formulações.

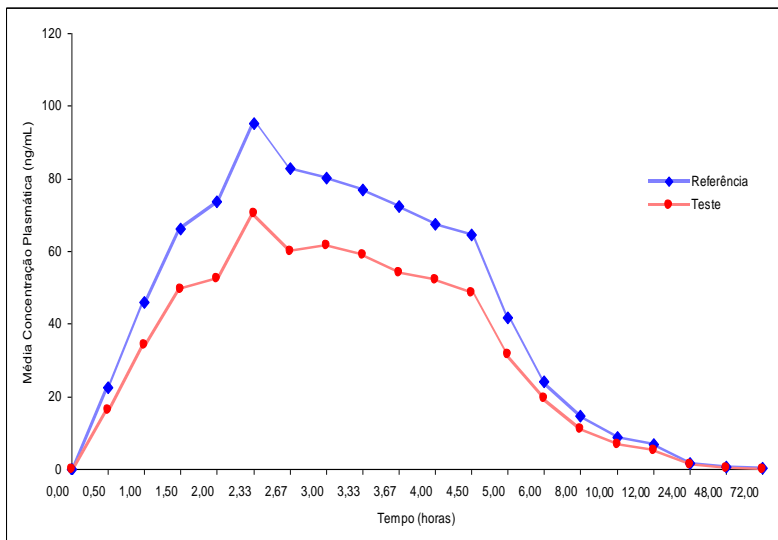


Figura 8: Curva média da concentração plasmática de albendazol (ABZ) *versus* tempo nos voluntários dos medicamentos teste e referência. Fonte: Biocinese (2011).

De acordo com o laboratório responsável pelo estudo de bioequivalência do ABZ, o qual seguiu as recomendações da ANVISA, foi concluído que os medicamentos teste e referência não são bioequivalentes em seres humanos.

4.2.2 Hidroclorotiazida

A tabela 2 mostra a média dos parâmetros farmacocinéticos para a HCTZ.

Tabela 2: Medidas farmacocinéticas em seres humanos para o medicamento hidroclorotiazida (HCTZ).

Parâmetros Farmacocinéticos	Medicamento Referência	Medicamento Teste
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	273,25	268,25
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	2,96	3,40
$T_{1/2}$ (h)	4,16	3,85
ASC_{0-t} (ng/mL.h)	1371,74	1358,48
$ASC_{0-\infty}$ (ng/mL.h)	1633,37	1628,22

A figura 9 apresenta a curva média das concentrações plasmáticas dos medicamentos teste e referência *versus* tempo dos 23 voluntários após a administração de cada uma das formulações.

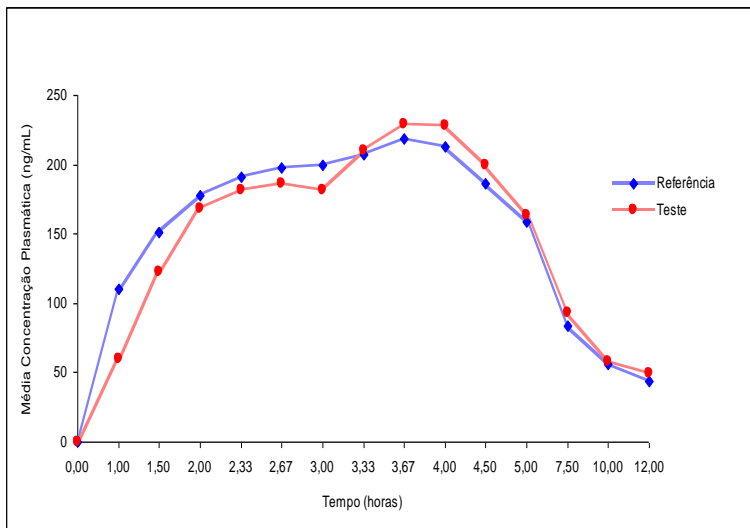


Figura 9: Curva média da concentração plasmática de hidroclorotiazida (HCTZ) versus tempo nos voluntários dos medicamentos teste e referência. Fonte: Biocinese (2011).

De acordo com o laboratório responsável pelo estudo de bioequivalência da HCTZ, o qual seguiu as recomendações da ANVISA, foi concluído que os medicamentos teste e referência são bioequivalentes.

4.3 Dados pré-clínicos

A partir das concentrações plasmáticas individuais dos animais tratados com ABZ (ANEXO II) ou HCTZ (ANEXO III) foram construídas as tabelas e gráficos das medidas farmacocinéticas médias (itens 4.3.1 e 4.3.2 para os fármacos ABZ e HCTZ, respectivamente).

Foram obtidas doze curvas de concentração plasmática dos medicamentos, sendo seis do medicamento teste e seis do medicamento referência.

4.3.1 Albendazol

A tabela 3 mostra os parâmetros farmacocinéticos médios para o ABZ em animais.

Tabela 3: Medidas farmacocinéticas obtidas em ratos para o medicamento albendazol (ABZ).

Parâmetros Farmacocinéticos	Medicamento Referência	Medicamento Teste
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	126,66	100,05
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	1,72	1,78
$T_{1/2}$ (h)	2,94	2,50
ASC_{0-t} (ng/mL.h)	450,95	355,54
$ASC_{0-\infty}$ (ng/mL.h)	526,42	396,30

A figura 10 apresenta a curva média das concentrações plasmáticas dos medicamentos referência e teste *versus* tempo, após administração de cada uma das formulações.

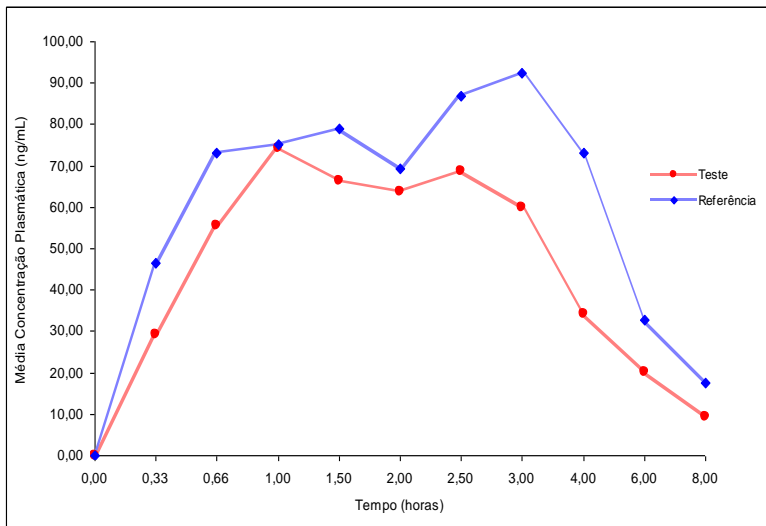


Figura 10: Curva média da concentração plasmática de albendazol (ABZ) versus tempo dos medicamentos teste e referência, em ratos.

De acordo com os cálculos realizados para o medicamento ABZ, os quais seguiram as recomendações da ANVISA, foi concluído que os medicamentos teste e referência não são bioequivalentes em animais.

4.3.2 Hidroclorotiazida

A Tabela 4 mostra a média dos parâmetros farmacocinéticos obtidos dos após a ingestão de HCTZ.

Tabela 4: Medidas farmacocinéticas obtidas em ratos para o medicamento hidroclorotiazida (HCTZ).

Parâmetros Farmacocinéticos	Medicamento Referência	Medicamento Teste
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	447,39	346,91
$t_{m\acute{a}x}$ (h)	2,00	1,66
$T_{1/2}$ (h)	2,22	2,53
ASC_{0-t} (ng/mL.h)	1411,41	1388,95
$ASC_{0-\infty}$ (ng/mL.h)	1620,86	1587,73

A média das concentrações plasmáticas em relação ao tempo, após a ingestão da dose única de HCTZ da formulação teste ou referência é mostrada na figura 11.

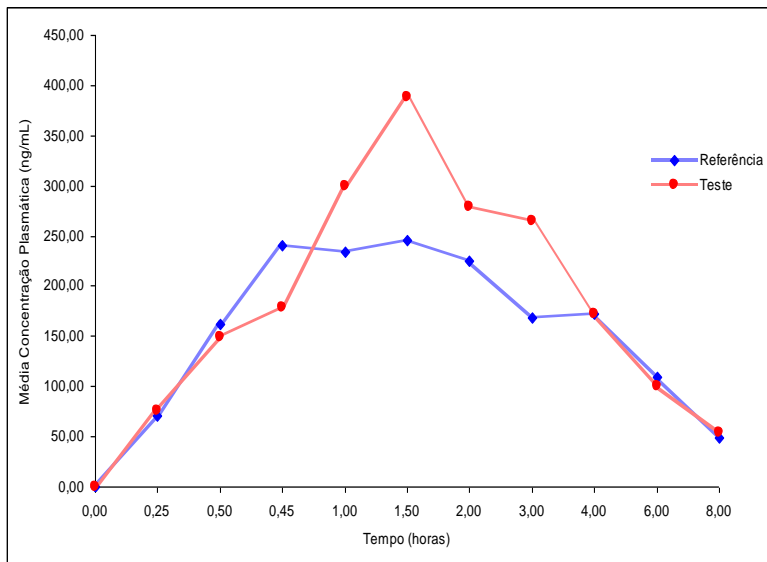


Figura 11: Curva média da concentração plasmática de hidroclorotiazida (HCTZ) *versus* tempo dos medicamentos teste e referência, em ratos.

De acordo com os cálculos realizados para HCTZ, os quais seguiram as recomendações da ANVISA, foi concluído que os medicamentos teste e referência não são bioequivalentes em animais.

4.4 Dados clínicos *versus* pré-clínicos

Foram cruzados os dados oriundos dos resultados médios obtidos em seres humanos e os obtidos em animais para o ABZ e a HCTZ, os quais são mostrados nas figuras 12 e 13, respectivamente.

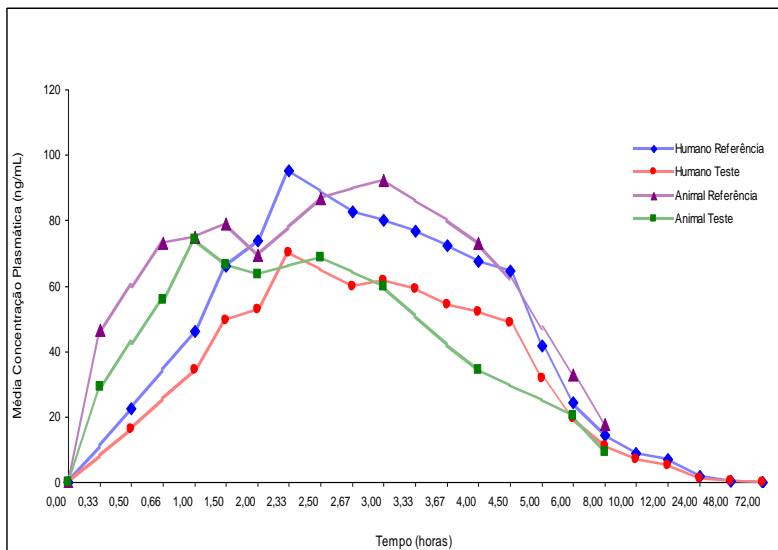


Figura 12: Curva de concentração plasmática média *versus* tempo dos medicamentos teste e referência do medicamento albendazol (ABZ), em seres humanos e ratos.

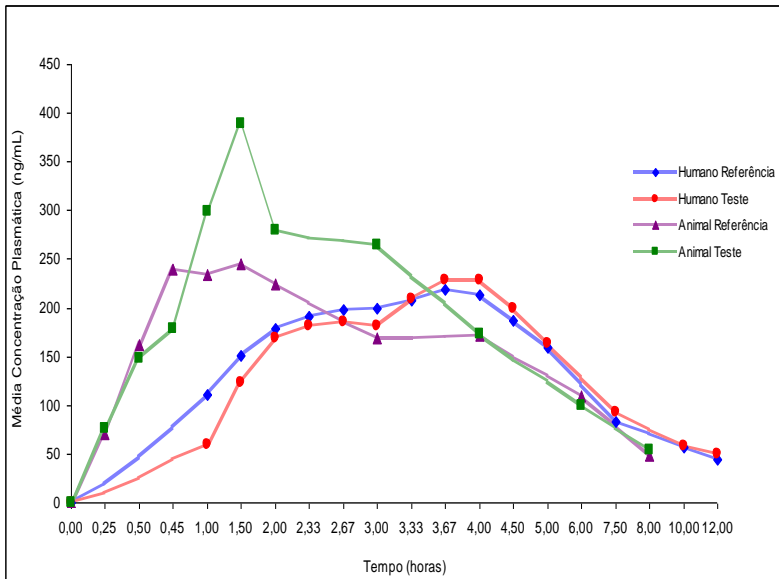


Figura 13: Curva de concentração plasmática média *versus* tempo dos medicamentos teste e referência do medicamento hidroclorotiazida (HCTZ), em seres humanos e ratos.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento e validação de uma metodologia bioanalítica para quantificação de fármacos em matriz biológica é uma ferramenta determinante para gerar dados reprodutíveis e confiáveis na execução de estudos farmacocinéticos.

A validação garante, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas a que se propõe, assegurando assim a confiabilidade dos resultados. Nesse sentido, o método bioanalítico foi validado através da avaliação dos parâmetros de especificidade, recuperação, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e estabilidade do fármaco em matriz biológica. As metodologias validadas foram aplicadas para determinação dos parâmetros farmacocinéticos do albendazol (ABZ) e da hidroclorotiazida (HCTZ) em plasma humano e animal (rato).

A previsão da farmacocinética humana ainda é uma meta importante no desenvolvimento de fármacos para minimizar o risco para os participantes durante os primeiros estudos em humanos. Várias abordagens têm sido levantadas para fornecer previsões quantitativas de farmacocinética humana e esta abordagem tem sido cada vez mais integrada em todas as fases da pesquisa de medicamentos (HOSEAL et al., 2009)

Após administração de ABZ em animais, o valor médio observado para $C_{máx}$ do medicamento referência foi de 126,66 ng/mL e do medicamento teste 100,05 ng/mL. Nos dados em seres humanos foram obtidos os valores de 111,05 ng/mL para o medicamento referência e 83,90 ng/mL para o medicamento teste. Para os dados de $C_{máx}$ de ABZ o medicamento referência se manteve mais alto do que o medicamento teste, tanto para dados em humanos quanto para de animais. Dayan (2003) relatou o estudo de ABZ e seus metabólitos em ratos, onde a $C_{máx}$ foi de 6,6 mg/L para uma dose de 10mg/kg, diferentemente dos dados apresentados no nosso trabalho pelo fato de utilizarmos uma dose menor de 6,70 mg/kg. A dosagem utilizada em nosso estudo foi elaborada de acordo com cálculos alométricos, transpondo a dose de humanos para animais, levando em conta a taxa metabólica e a superfície corporal dos ratos em relação a dos seres humanos. Quando comparamos os resultados das curvas de concentração plasmática de humanos e ratos, obtivemos valores de $C_{máx}$ bem aproximados entre as duas espécies a qual é demonstrado com sucesso na figura 12.

Para o parâmetro $t_{m\acute{a}x}$ o medicamento ABZ apresentou os seguintes dados para animais: 1,72 e 1,78 h para os medicamentos referência e teste, respectivamente, e os dados de humanos foram: 2,73 e 2,91 h para os medicamentos referência e teste, respectivamente. Então, tanto no modelo humano quanto animal o parâmetro $t_{m\acute{a}x}$ se apresentou mais elevado na formulação teste.

O parâmetro ASC_{0-t} para o ABZ apresentou os valores de 450,95 ng/mL.h para o medicamento referência e 355,54 ng/mL.h para o medicamento teste nos testes realizados em ratos. Os dados obtidos em humanos de ASC_{0-t} foram de 488,49 ng/mL.h para o medicamento referência e 362,08 ng/mL.h para o medicamento teste. A diferença significativa entre os medicamentos referência e teste se manteve tanto nos dados apresentados em animais, quanto nos dados apresentados em humanos, porém a eliminação de ABZ em animais ocorreu cerca de 8 h após a administração da medicação, já em humanos ocorreu após 72 h, o que pode ser devido à diferente taxa metabólica com animais de pequeno porte apresentando taxas metabólicas mais altas e, portanto, eliminação mais rápida que humanos (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Dados da literatura relatam a diferença entre o parâmetro ASC do albendazol entre humanos e ratos. O ABZ forma dois metabólitos sendo um deles o ABZ sulfóxido, e este existe em duas formas de enantiômeros, positiva (+) ou negativa (-), sendo que o homem apresenta o enantiômero (+) como a forma mais abundante, enquanto o rato possui abundância do enantiômero (-). A formação de enantiômero (+) é devida à oxidação do complexo FAD (flavina-adenina-dinucleotídeo) e a formação do enantiômero (-) ocorre através da enzima P450. Diferenças na quantidade ou na atividade dessas enzimas podem também ser a origem das diferenças cinéticas entre as espécies (DELATOUR, 1991).

Os parâmetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ descritos para o ABZ em humanos não estão contidos nos intervalos de confiança de 90% para as razões das médias geométricas. Assim como os parâmetros avaliados em humanos, os dados encontrados em animais também não se encontram nos intervalos de confiança, embora uma limitação de nosso método possa ter sido o pequeno número de animais utilizados, fator que pode ter influenciado para que o intervalo de confiança não fosse alcançado nos animais.

Os fármacos de classe IV – baixa solubilidade e baixa permeabilidade - (Sistema de Classificação Biofarmacêutica), como o albendazol, são fármacos que possuem alta variabilidade na velocidade e extensão de absorção. A probabilidade de correlação para essa classe é

limitada (AMIDON et al., 1995). O ABZ apresenta 5% de biodisponibilidade em humanos. Devido a estes fatos, acreditava-se que seria difícil tentar visualizar os eventos farmacocinéticos (absorção e eliminação) para este medicamento em animais, porém o delineamento do estudo possibilitou que estes eventos fossem percebidos através dos gráficos de concentração plasmática *versus* tempo.

Em relação à HCTZ, após administração de 1 mg/kg v.o. em ratos, o valor médio observado para $C_{m\acute{a}x}$ do medicamento referência foi de 447,39 ng/mL e do medicamento teste 346,91 ng/mL. Nos dados em seres humanos foram obtidos os valores de 273,25 ng/mL para o medicamento referência e 268,25 ng/mL para o medicamento teste. Tanto no modelo humano, quanto no animal, o parâmetro $C_{m\acute{a}x}$ se apresentou mais elevado na formulação referência. No estudo de Takubo e colaboradores (2004), usando ratos, a HCTZ mostrou um $C_{m\acute{a}x}$ médio de 514 ng/mL em uma dose de 3,75 mg/kg diluída em metilcelulose. A HCTZ é um medicamento classe III (baixa permeabilidade, alta solubilidade), e, nos nossos estudos, devido a ser um produto com facilidade de diluição, esta foi realizada em solvente apropriado (água destilada) que provavelmente não interferiu na absorção de HCTZ, ao contrário da solução de metilcelulose usada pelos outros pesquisadores, que é capaz de causar interação com o fármaco em estudo, podendo originar dados não confiáveis para a pesquisa.

O medicamento HCTZ apresentou para o parâmetro $t_{m\acute{a}x}$ em ratos os valores de 2,00 e 1,66 h para os medicamentos referência e teste, respectivamente, e em humanos de 2,96 e 3,40 h para os medicamentos referência e teste, respectivamente. Para os dados de $t_{m\acute{a}x}$ de HCTZ o medicamento referência se manteve levemente mais alto do que o medicamento teste em animais, enquanto o medicamento teste se manteve discretamente mais alto do que o medicamento referência nos humanos.

O parâmetro ASC_{0-t} para HCTZ apresentou os valores de 1411,41 ng/mL.h para o medicamento referência, e 1388,95 ng/mL.h para o medicamento teste nos testes realizados em animais. Os dados obtidos em seres humanos de ASC_{0-t} foram de 1371,74 ng/mL.h para o medicamento referência, e 1358,48 ng/mL.h para o medicamento teste. Takubo e colaboradores (2004) descrevem uma ASC de 1470 ng/mL.h para o HCTZ em ratos, valor este muito próximo ao valor observado no presente trabalho.

Os parâmetros farmacocinéticos de $C_{m\acute{a}x}$, ASC_{0-t} e $ASC_{0-\infty}$ descritos para HCTZ, em humanos, estão contidos nos intervalos de confiança de 90% para as razões das médias geométricas. No entanto, os

parâmetros avaliados em ratos não se encontram dentro dos mesmos intervalos de confiança, não mostrando, portanto, uma predição perfeita da bioequivalência no modelo animal para este fármaco na formulação usada. É possível que o pequeno número de animais utilizados possa ter influenciado para que o intervalo de confiança não fosse alcançado, entre outros fatores, como discutido adiante. Além disso, as drogas de classe III - baixa permeabilidade – alta solubilidade, como a HCTZ, possuem baixa probabilidade de correlação, devido à variação de velocidade e extensão no trânsito intestinal (AMIDON et al., 1995). Entretanto, os gráficos de concentração plasmática *versus* tempo em ratos demonstram os eventos farmacocinéticos (absorção e eliminação) foi adequado para este fármaco, o que corrobora que o delineamento do estudo.

Os fármacos devem estar em solução nos fluídos antes de poderem ser absorvidos, portanto, quanto maior o número de etapas na absorção maior o tempo necessário para este fenômeno. Assim, o tipo de forma farmacêutica também pode influenciar o número de etapas que participam desde o momento da administração até o surgimento do fármaco dissolvido nos fluidos gastrintestinais, ou seja, o tipo de forma farmacêutica poderá influenciar a dissolução do fármaco nos fluidos gastrintestinais (AULTON, 2005). Nos testes realizados em animais, a formulação usada foi a de comprimidos, em contraposição ao ABZ onde uma suspensão foi usada, e os comprimidos de HCTZ necessitaram ser macerados antes da administração oral por cânula intra-gástrica. Entretanto, nos estudos realizados em humanos o medicamento foi administrado de forma íntegra. Assim, a dissolução do comprimido íntegro e do macerado, além do tempo de absorção do fármaco, pode ter influenciado a velocidade de liberação do princípio ativo.

Um modelo animal é um organismo vivo capaz de proporcionar o estudo e entendimento de fenômenos de interesse. Os resultados de um modelo animal podem servir para caracterizar um sistema, ou para prever o comportamento de outra espécie, atuando como uma representação de outro sistema em investigação (WALL, 2008). O efeito biológico do medicamento no homem pode ser associado ao comportamento do animal. Porém não é necessário que o comportamento do fármaco em animais seja o mesmo que em humanos, mas sim que um seja capaz de prever o outro (WARD & SMITH, 2004; MAHMOOD, 2000; ALARIE, 1981).

A partir de dados pré-clínicos, a melhor técnica descrita para prever farmacocinética humana é o dimensionamento alométrico, devido aos tamanhos de órgãos e do peso corporal de animais

(DEDRICK et al., 1973.; MORDENTI, 1986). A escala alométrica utiliza dados *in vivo* obtidos após a administração de compostos a um ou mais espécies de animais. Os métodos de dimensionamento supõem que o processo metabólico das espécies avaliadas estão correlacionados com os observados em seres humanos. Na verdade, as enzimas do citocromo P450 de rato não são as mesmas em seres humanos portanto, podem apresentar alterações nas taxas de metabolismo dos compostos, ou até mesmo produzir metabólitos padrão diferentes. Da mesma forma, a absorção e os transportadores de efluxo nas espécies animais podem diferir em substrato quanto a sua especificidade ou taxa, em relação aos seres humanos e, portanto, podem interferir nas previsões de farmacocinética humana (ZUIDEVELD, 2006).

O estabelecimento de um modelo de predição de bioequivalência em animais pode apresentar grande relevância ética, pois reduz os testes em voluntários, podendo ser utilizada nos processos iniciais de desenvolvimento de medicamentos. Assim, têm sido discutidas recentemente por Mahmood (2005) as controvérsias sobre qual espécie animal utilizar, quais os critérios para sua utilização, avaliação do desempenho de predição e as questões de qualidade dos dados. Segundo Tang (2005, 2007) a farmacocinética humana pode ser prevista em animais de diferentes espécies, porém o rato é rotineiramente utilizado nos testes de primeira linha de estudos farmacocinéticos. Entretanto, apesar do rato ser um modelo rotineiramente utilizado, ele apresenta restrições pelo fato de ser animal de pequeno porte, onde os medicamentos a serem administrados têm de sofrer adaptações que podem influenciar os resultados do estudo, como é o caso da HCTZ que teve de ser macerado para ser administrado, o que não aconteceria com animais de grande porte como o coelho ou o cão, espécies muito utilizadas em estudos farmacocinéticos, ou até mesmo o porco, por possuir características e órgãos semelhantes aos do ser humanos (ROFFEY et.al, 2003).

A predição dos parâmetros farmacocinéticos para humanos tem sido amplamente estudada (INGS, 1990) e é um dos maiores objetivos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento. Os dados farmacocinéticos normalmente fornecidos em ratos, cães e/ou macacos são utilizados para ajudar a prever o comportamento farmacocinético de moléculas em seres humanos (WARD & SMITH, 2004). Embora os estudos farmacocinéticos em humanos sejam mais minuciosos, detalhados e abrangentes, informações preliminares obtidas a partir de ensaios em animais de pequeno porte, como ratos, podem ser aplicáveis para nortear o delineamento de estudos clínicos (KAISER, 2009).

Segundo Mordenti (1985), os estudos pré-clínicos, utilizando apenas os dados de animais, são muito importantes para prever a farmacocinética em humanos no desenvolvimento de novas drogas.

O processo de desenvolvimento de medicamentos novos requer até 20 anos desde o estudo de moléculas promissoras até a introdução do produto no mercado. Muitas moléculas estudadas apresentam problemas nos estudos pré-clínicos e clínicos e, após estes estudos, 46% dos compostos que passam para a fase de desenvolvimento clínico apresentam problemas de eficácia e segurança. Os principais problemas no desenvolvimento de novos medicamentos são, na verdade, baixa biodisponibilidade; ausência de eficácia, detecção de efeitos tóxicos e razões de mercado (ELIOPOULOS et al., 2008; VENKATESH, 2000).

Em 1991, do total de falhas no desenvolvimento de novos fármacos 40% estava relacionado à biodisponibilidade e farmacocinética, já em 2000 esse percentual diminuiu para 30% (KOLA, LANDIS, 2004). Tal fato demonstra que cada vez mais a indústria investe em testes para compreender o perfil dos medicamentos em estudo, principalmente porque quanto mais avançada estiver a fase de descontinuidade do projeto de Pesquisa e Desenvolvimento, maiores serão os prejuízos da empresa.

A previsão de farmacocinética humana é um desafio importante durante o desenvolvimento da droga, em termos de custo e tempo, além da diminuição de risco para os participantes durante os primeiros estudos em humanos. Os resultados de animais apresentados neste trabalho podem fornecer previsões farmacocinéticas em humanos para os fármacos ABZ e HCTZ.

Mesmo assim, o desenvolvimento de técnicas pré-clínicas eficientes, como o proposto no presente trabalho, para se obter um método de avaliação que mais se aproxime do resultado que poderá ser gerado em humanos é de extrema importância, uma vez que irá contribuir para o desenvolvimento de formulações que apresentem a mesma biodisponibilidade que o produto de referência, preferencialmente com menor custo e, provavelmente, em menor tempo.

6 CONCLUSÕES

- As comparações estatísticas dos parâmetros farmacocinéticos obtidos da concentração dos produtos na corrente sanguínea dos ratos foram realizadas com sucesso.
- Os dados obtidos no modelo animal para o albendazol (classe IV - suspensão), em maior extensão, e para a hidroclorotiazida (classe III – comprimidos), em menor extensão, foram capazes de prever o comportamento farmacocinético de humanos, sendo o modelo animal uma ferramenta importante da predição de estudos de biodisponibilidade comparativa.
- Perante os dados analisados, o modelo animal utilizado foi capaz de correlacionar os resultados de dados já existentes de estudos realizados em seres humanos.
- O modelo experimental em ratos Wistar pode ser aplicável como ferramenta no desenvolvimento de fármacos para avaliar o comportamento farmacocinético dos medicamentos que serão submetidos à Bioequivalência Farmacêutica.
- A limitação do uso do modelo animal encontrada não parece ser devida à espécie animal empregada, protocolo de estudo ou às diferentes classes dos fármacos aqui estudados (III e IV), mas sim à sua formulação (comprimido e suspensão, respectivamente), pois a formulação comprimido tem de ser macerada para poder ser administrada por via oral em animais de pequeno porte como os roedores. Este fato pode alterar sua dissolução e absorção, levando a não predição de alguns parâmetros farmacocinéticos.

7 REFERÊNCIAS

AARSONS, L. Assessment of rate of absorption in bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 76, p. 853-855, 1987.

ABDOU, H.M. Dissolution, bioavailability and bioequivalence. Easton: Mack Printing, 1989. 554p.

ALARIE, Y. Dose-response analysis in animal studies: prediction of human responses. *Environmental Health Perspectives*. v. 42, p. 9-13, 1981.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Brasília, Diário Oficial da União, 1999a.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 391, de 9 de agosto de 1999. Dispõe sobre Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Brasília, Diário Oficial da União, 1999b.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência, v. 1, Brasília, 2002.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 135, de 29 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência de medicamentos. Brasília, Diário Oficial da União, 2006.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 16, de 2 de março de 2007. Aprova o Regulamento técnico para medicamento genérico. Brasília, Diário Oficial da União, 2007.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

AULTON, M.E. Delineamento de formas farmacêuticas. 2.ed. Porto Alegre: Artmed; p. 677, 2005.

BALIMANE, P.V.; CHONG, S.; MORRISON, R.A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, p. 301-312, 2000.

BENNETT, J.E. Antimicrobial agents: antifungal agents. In: Hardman, J. G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R. W., Gilman, A.G., eds. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9^a. ed. New York: McGraw-Hill, v. 49, p, 1183-1184, 1996.

BOXENBAUM H. Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. v. 10, p. 201-227, 1982.

BUENO, M.M. Implantação, evolução, aspectos técnicos e perspectivas da regulamentação técnica da biodisponibilidade relativa e bioequivalência de medicamentos genéricos e similares no Brasil. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. 193p., 2005.

ÇELIK, M. The past, present, and future of tableting technology. Drug Development and Industrial Pharmacy, v. 22, n. 1, p. 1-10, 1996.

CHEN, M.L. An alternative approach for assessment of rate of absorption in bioequivalence studies. Pharmaceutical Research, v. 9, n. 11, p. 1380-1385, 1992.

CID, C.E. Introducción a la farmacocinética. Washington: OEA, 114 p. 1982.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S.; FERRAZ, H.G. Aspectos farmacotécnicos relacionados a biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 21, n. 1, p. 23-41, 2000.

CUTLER, D.J.; BEYSSAC, E.; AIACHE, J.M. Level B and C *in vivo/in vitro* correlations: statistical considerations. International Journal of Pharmaceutics, v. 158, p. 185-193, 1997.

DAYAN, A.D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. Acta Tropica, v. 86, p. 141-159, 2003.

DEDRICK, R.L. Animal scale-up. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, v. 1, p. 435-461, 1973.

DELATOUR, P.; BENOIT, E.; BESSE, S.; BOUKRAA, A. Comparative enantioselectivity in the sulphoxidation of albendazole in man, dogs and rats. Xenobiotica, v. 21, p. 217-221, 1991.

DESESSO, J.M.; JACOBSON, C.F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. Food and Chemical Toxicology, v. 39, p. 209-228, 2001.

DIGHE, S.V. A review of the safety of generic drugs. Transplantation Proceedings, v. 31, suppl. 3A, p.23-24, 1999.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 1, p. 11-22, 1998.

DUNE, A.; DEVANE, J.; O'HARA, T. The relationship between *in vitro* drug dissolution and *in vivo* absorption. *Statistician*, v. 48, p. 125-133, 1999.

ELIOPOULOS, H.; GIRANDA, V.; CARR, R.; TIEHEN, R.; LEAHY, T.; GORDON, G. Phase O Trials: an industry perspective. *Clinical Cancer Research*, v.14, n.12, p. 3683–3688, 2008.

EDDINGTON, N.D.; MARROUM, P.; UPPOOR, R.; HUSSAIN, A.; AUGSBURGER, L. Development and internal validation of an *in vitro-in vivo* correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. *Pharmaceutical Research*, v. 15, p. 466-473, 1998.

EMA. Committee for veterinary medicinal products. Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species. *Evaluation of Medicines for Veterinary Use*. 2000.

EMA. Committee for veterinary medicinal products. Guidelines for the conduct of bioequivalence studies for veterinary medicinal products. *Veterinary Medicines and Information Technology*. 2001.

ENDRENYI, L.; TOTHFALUSI, L.; ZHA, J. Metrics assessing absorption rates: Principles, and determination of bioequivalence in the steady state. In: BLUME, H.H.; MIDHA, K.K., eds. *Bio-International: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies*. Stuttgart: Medpharm Publications, p.77-85, 1995.

ERK, N. Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 784, p. 195–201, 2003.

FARINHA, A.R.; BICA, A.; TOSCANO, C.; BARRETO, M.; CAMPOS, R. Utilização de áreas parciais como métrica alternativa na avaliação de bioequivalência – Um caso prático. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, p. 335-340, 2001.

FLACH, A.O.P.; COSTA, T.D. Avaliação dos critérios de isenção de estudos de bioequivalência *in vivo* para medicamentos orais em forma farmacêutica sólida de liberação Imediata. *Cadernos de Farmácia*, v. 15, n. 2, p. 49-58, 1999.

FDA - Food and Drug Administration. GUIDANCE for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. 13p., 2000.

FDA - Food and Drug Administration. Bioavailability and bioequivalence requirements. Code of Federal Regulations. v. 5, Part 320, 2009.

GIBALDI, M. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 352 p., 1991.

GINSKI, J.M.; POLLI, J.E. Prediction of dissolution/absorption relationships from a dissolution/Caco-2 system. International Journal of Pharmaceutics, v. 177, p. 117-125, 1999.

GLEITER, C.H.; KLOTZ, U.; KUHLMANN, J.; BLUME, H.; STANISLAUS, F.; HARDER, S.; PAULUS, H.; POETHKO-MULLER, C.; HOLZ- SLOMCZYK, M. When are bioavailability studies required? A German proposal. Journal of Clinical Pharmacology, v. 38, n. 10, p. 904-911, 1998.

GOODMAN, A. G.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Editora McGraw-Hill, 2006.

GRONERT, G. A.; FUNG, D. L; JONES J. H.; SHAFER S. L.; HILDEBRAND, S. V.; DISBROW, E. A. Allometry of pharmacokinetics and pharmacodynamics of the muscle relaxant metocurine in mammals. American Journal of Physiology. V. 268, p.85-91, 1995.

HERCHUELZ, A. Bioequivalence assessment and the conduct of bioequivalence trials: a European point of view. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, v. 21, n. 2, p. 149-152, 1996.

HITZ, J. The absorption window: fact or fiction? Pharmaceutical International, p. 175-178, 1984.

HOSEA, N.A.; COLLARD, W.T.; COLE, S.; MAURER, T.S.; FANG, R.X.; JONES, H.; KAKAR, S.M.; NAKAI, Y.; SMITH, B.J.; WEBSTER, R.; BEAUMONT, K. Prediction of human pharmacokinetics from preclinical Information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches. Journal of Clinical Pharmacology, v. 49, p. 513, 2009.

HOUSTON, J.B. Utility of *in vitro* drug metabolism data in predicting *in vivo* metabolic clearance. Biochemical Pharmacology, v. 47, p. 1469-1479, 1994.

INGS, R. M. J. Interspecies scaling and comparisons in drug development and toxicokinetics. v. 20, p. 1201-1231, 1990.

IWATSUBO, T.; HIROTA, N.,; OOIE T. Prediction of *in vivo* drug metabolism in the human liver from *in vitro* metabolism data. Pharmacology & Therapeutics, v. 73, p. 147-171, 1997.

JACKSON, A.J.; CHEN, M.L. Application of moment analysis in assessing rates of absorption for bioequivalence studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 76, n. 1, p. 6-9, 1987.

JONES, H.M.; PARROTT, N.; JORGA, K.; LAVE, T. A novel strategy for physiologically based predictions of human pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 45, p. 511-542, 2006.

KAISER, M. Avaliação pré-clínica em roedores do perfil farmacocinético do benzaldeído semicarbazona livre e complexado em β -ciclodextrina. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 90p., 2009.

KASSIN, N.A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNAS, H.; HUSSAIN, A.S.; JUNGINGER, H.E.; STAVICHANSKY, S.A.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmacology*, v. 1, p. 85-96, 2003.

KATORI, N.; AOYAGI, N.; TERAQ, T. Estimation of agitation intensity in the GI tract in humans and dogs based on *in vitro/in vivo* correlation. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 2, p. 237-243, 1995.

KHOQ, K.; GIBALDI, M.; BRAZZELL, R.K. Comparison of statistical moment parameters to C_{max} and t_{max} for detecting differences in *in vivo* dissolution rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 74, n. 12, p. 1340-1342, 1985.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 711-715, 2004.

LAU, Y.Y.; CHEN, Y.H.; LIU, T.T; LI, C.; CUI, X.; WHITE, R.E.; CHENG, K.C. Evaluation of a novel *in vitro* Caco-2 hepatocyte hybrid system for predicting *in vivo* oral bioavailability. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 32, n. 9, 2004.

LAVE, T.; DUPIN, S.; SCHMITT, C.; CHOU, R.C.; JAECK, D.; COASSOLO, P. Integration of *in vitro* data into allometric scaling to predict hepatic metabolic clearance in man: application to 10 extensively metabolized drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, p. 584-590, 1997.

LAVE, T.; COASSOLO, P.; REIGNER, B. Prediction of hepatic metabolic clearance based on interspecies allometric scaling techniques and *in vitro-in vivo* correlations. *Clinical Pharmacokinetics*, v. 36, p. 211-231, 1999.

Liu, F.; Xu, Y.; Gao, S.; Zhang, J.; GUO, Q. Determination of hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography/

tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 1187-1191, 2007.

MACHERAS, P.; ARGYRAKIS, P. Gastrointestinal drug absorption: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity? *Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 842-847, 1997.

MAHMOOD, I. Can absolute oral bioavailability in human be predicted from animals? A comparison of allometry and different indirect methods. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, v. 16, p. 143-155, 2000.

MEREDITH, P.A. Generic drugs: therapeutics equivalence. *Drug Safety*, v. 15, n. 4, p. 233-242, 1996.

METZLER, C.M. Bioavailability: a problem in equivalence. *Biometrics*, v. 30, p. 309-317, 1974.

MORDENTI, J. Forecasting cephalosporin and monobactam antibiotic half-lives in humans from data collected in laboratory animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 27, p. 887-891, 1985.

MORDENTI, J. Man *versus* beast: pharmacokinetic scaling in mammals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 75, p. 1028-1040, 1986.

NAGILLA, R. WARD, K.W. A comprehensive analysis of the role of correction factors in the allometric predictivity of clearance from rat, dog, and monkey to humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, p. 2522-2534, 2004.

NATION, R.L.; SANSOM, L.N. Bioequivalence requirements for generic products. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 62, n. 1/2, p. 41-55, 1994.

NIAZI, S.K., SYED, M.A., SYED, I.A. Partial-area method in bioequivalence assessment: naproxen. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 18, n. 2, p. 103-116, 1997.

OBACH, R.S.; BAXTER, J.G.; LISTON, T.E. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and *in vitro* metabolism data. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 283, p. 46-58, 1997.

PEARCE, G.A.; MCLACHLAN, A.J.; RAMZAN, I. Bioequivalence: how, why and what does it really mean? *Journal of Pharmacy Practice and Research*, v. 34, n. 3, p. 195-200, 2004.

PITTA, L.R. Estudo dos métodos estatísticos na análise da biodisponibilidade relativa/bioequivalência para o registro de medicamentos no Brasil. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

POLLI, J.E.; CRISON, J.R.; AMIDON, G.L. Novel approach to the analysis of *in vitro-in vivo* relationships. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 85, p. 753-761, 1996.

PORTA, V. Avaliação da bioequivalência de formulações do Mercado nacional contendo fluconazol. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. 129p., 1999.

RITSCHER, W.A. Handbook of basic pharmacokinetics. 4. ed. Hamilton: Drug Intelligence, 588 p., 1992.

ROFFEY, S. J.; COLE, S.; COMBY, P.; GIBSON, D.; JEZEQUEL, S. G.; NEDDERMAN, A. N. R.; SMITH, D. A.; WALKER, D. K.; WOOD, N. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 31, p. 731–741, 2003.

ROSENBAUM, S.E.; RHODES, C.T.; BON, C. Area under the curve estimation in bioequivalence studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 16, n. 1, p. 157-163, 1990.

ROUGE, N.; BURI, P.; DOELKER, E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site specific delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 136, p. 117-139, 1996.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Metabolismo energético. In:_____. *Fisiologia animal – Adaptação e meio ambiente*. 5 ed, São Paulo: Santos Editora, 2002. 611p.

SKELLY, J.P.; AMIDON, G.L.; BARR, W.H.; BENET, L.Z.; CARTER, J.E.; ROBINSON, J.R.; SHAH, V.P.; YACOBI, A. *In vitro* and *in vivo* testing and correlation for oral controlled/modified-release dosage forms. *Pharmaceutical Research*, v. 7, p. 975-982, 1990.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7 ed. Editora Guanabara Koogan S.A. 2006.

SOMMER C. Estudo de bioequivalência entre duas formas farmacêuticas (comprimidos) contendo 40 mg de pantoprazol em voluntários sadios de ambos os sexos. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas. 119p., 2005.

STAVCHANSKY, S.; PADE, V. Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, n. 12, p. 1604-1607, 1998.

STORPIRTIS, S. Biofarmacotécnica. Fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos. *Infarma*, 78p., 1999.

TANG, H.; MAYERSOHN, M. A novel model for prediction of human drug clearance by allometric scaling. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 33, p. 1297-1303, 2005.

TANG, H.; HUSSAIN, A.; LEAL, M.; MAYERSOHN, M.; FLUHLER, E. Interspecies prediction of human drug clearance based on scaling data from one or two animal species. *Drug Metabolism and Disposition*. v. 35, p. 1886-1893, 2007.

UBC Committee on Animal Care - Euthanasia. *SOP 009E1 - Euthanasia - overdose with pentobarbital*. The University of British Columbia, 2005.

WAGNER, J.G. Pharmacokinetic data: pharmacokinetic parameters estimated from intravenous data by uniform methods and some of their uses. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, v. 5, n. 1, p. 161-182, 1977.

WALL, R.J, SHANI, M. Are animal models as good as we think? USA, Agricultural Research Service, 2008.

WARD, K.W.; SMITH, B.R. A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans: I. Clearance. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 32, p. 603-611, 2004.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, p. 192-204, 2003.

VENKATESH, S.; LIPPER, R.A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89(2), p. 145-154, 2000.

ZUIDEVELD, K. P.; VAN DER GRAAF, P. H.; PELETIER, L. A.; DANHOF, M. Scaling pharmacodynamics from *in vitro* and preclinical animal studies to man: application the 5-HT1A agonists. In M. Danhof, D. R.Stanski, and P. Rolan (eds.). 6th International Symposium on Measurement and Kinetics of *In Vivo* Drug Effects v. 8, p. 32-39, 2006.

8 ANEXOS

ANEXO I - Aprovação pelo Comitê de Ética

Resultado de Solicitação de Protocolo**Protocolo**

PP00422

Título

Estudo preditivo da bioequivalência de aciclovir, hidroclorotiazida, tetraciclina e fluconazol em ratos.

Data de Entrada

15/07/2010

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

03/09/2010

Considerações

Ofício nº 165/CEUA/PRPE/2010

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Thereza Christina Monteiro de Lima, Departamento de Farmacologia – CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de noventa e seis ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.023787/2010-11

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)
Data 10/12/2012

Data 10/09/2010

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE

ANEXO II – Concentração Plasmática Individuais dos Animais para ABZ

Tabela 5: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Referência ABZ

Tempo	Animal					
	1	2	3	4	5	6
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,33	36,83	19,32	30,62	23,93	51,44	41,97
0,67	55,00	64,54	74,02	37,46	76,49	82,32
1,00	61,21	103,78	64,16	128,65	72,55	89,48
1,50	46,77	97,79	56,62	118,24	70,60	75,57
2,00	33,75	77,29	43,46	107,76	98,53	84,48
2,50	33,95	61,59	40,30	135,93	113,76	95,59
3,00	25,87	53,41	26,47	151,95	98,67	63,35
4,00	37,11	40,37	37,52	70,27	38,30	16,46
6,00	15,33	25,44	10,88	56,15	20,63	12,54
8,00	10,06	11,28	2,80	22,55	9,02	10,07

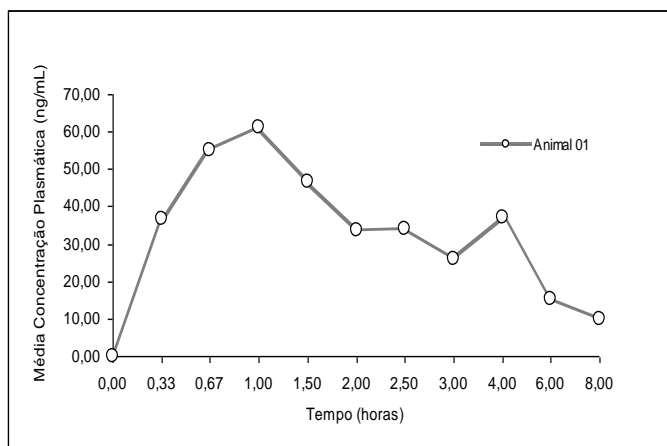


Figura 14: Animal 1 – Medicamento Referência ABZ

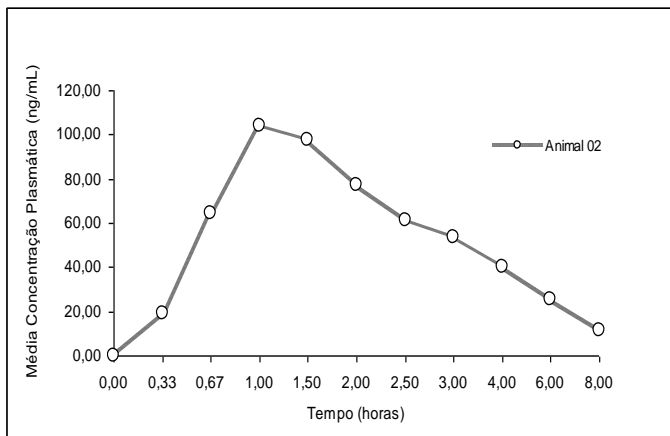


Figura 15: Animal 2 – Medicamento Referência ABZ

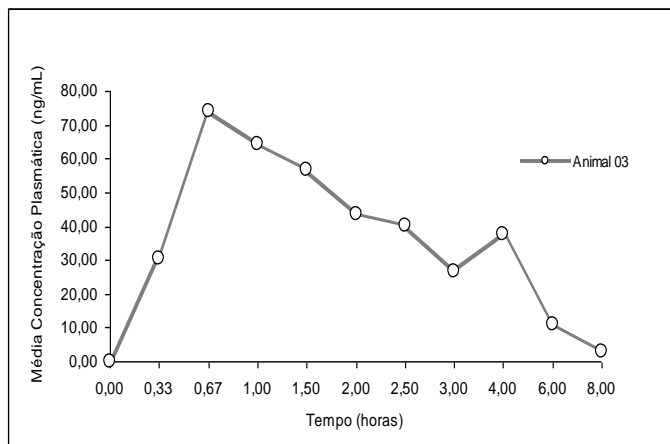


Figura 16: Animal3 – Medicamento Referência ABZ

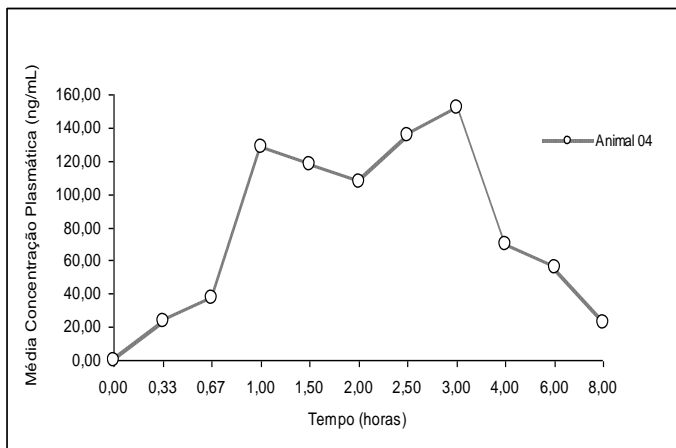


Figura 17: Animal 4 – Medicamento Referência ABZ

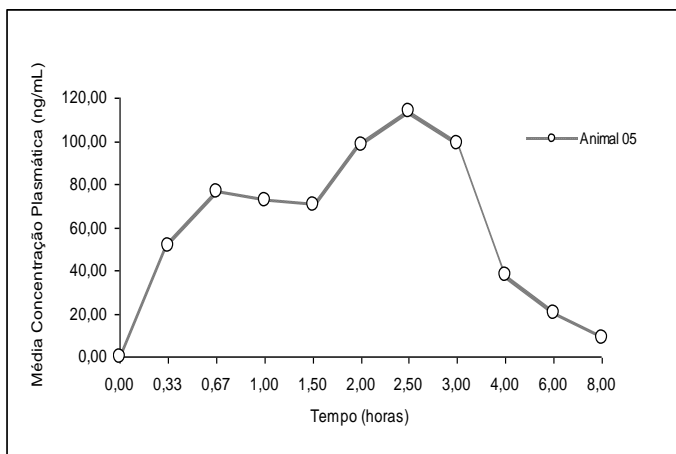


Figura 18: Animal 5 – Medicamento Referência ABZ

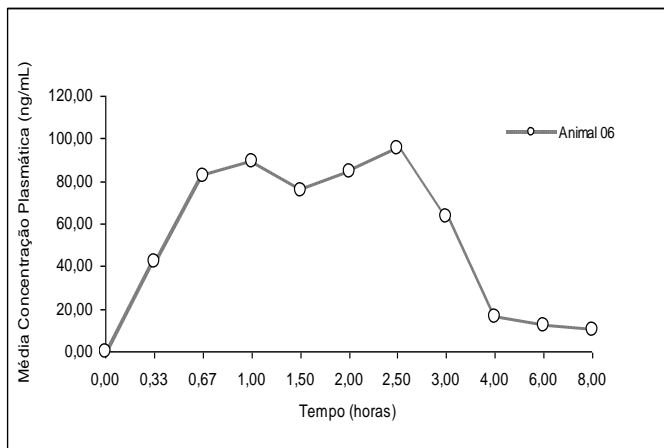


Figura 19: Animal 6 – Medicamento Referência ABZ

Tabela 6: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Teste ABZ

Tempo	Animal					
	7	8	9	10	11	12
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,33	82,36	69,26	32,35	45,96	20,23	27,92
0,67	98,45	137,21	64,76	75,21	18,44	43,71
1,00	92,50	106,18	81,14	58,27	55,64	56,52
1,50	89,87	93,42	98,68	61,90	37,18	93,12
2,00	61,24	70,40	59,82	54,68	81,41	88,43
2,50	49,06	73,34	63,28	143,19	46,55	145,48
3,00	57,50	68,05	45,87	124,98	56,33	201,01
4,00	56,69	26,23	37,20	94,03	37,98	186,84
6,00	26,02	22,36	23,07	25,84	40,53	59,29
8,00	6,41	18,09	9,37	19,07	14,92	37,67

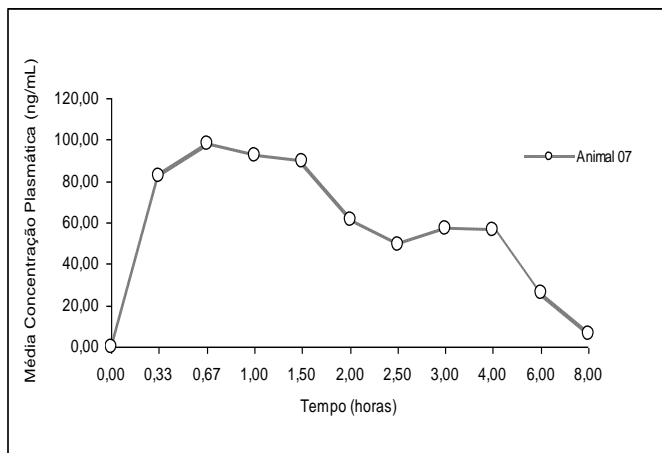


Figura 20: Animal 7 – Medicamento Teste ABZ

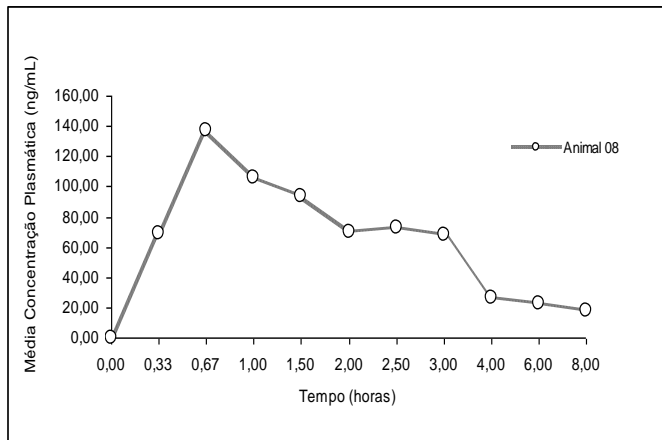


Figura 21: Animal 8 – Medicamento Teste ABZ

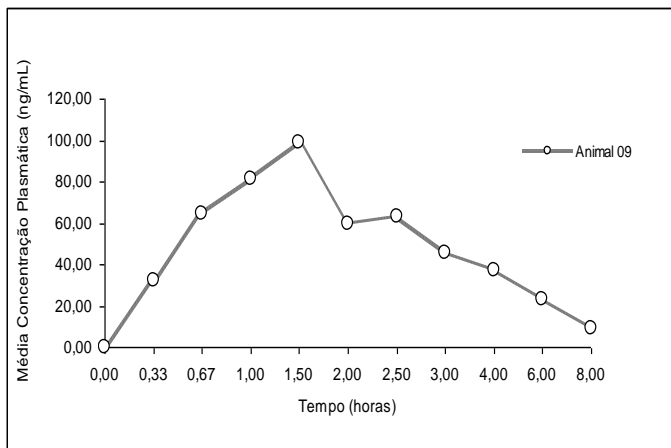


Figura 22: Animal 9 – Medicamento Teste ABZ

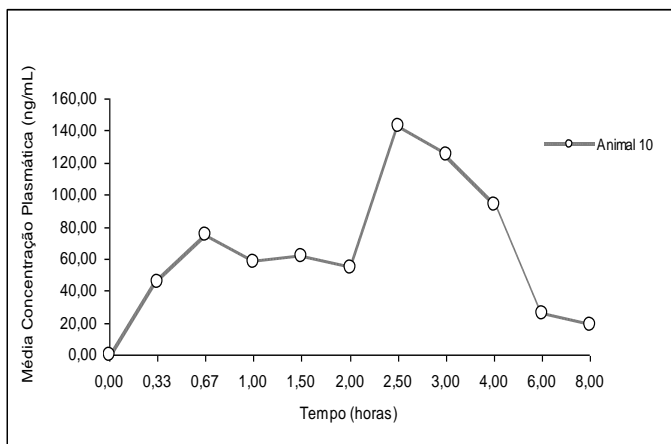


Figura 23: Animal 10 – Medicamento Teste ABZ

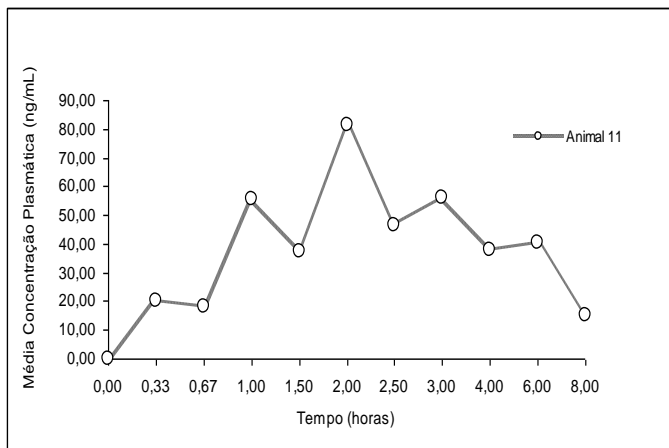


Figura 24: Animal 11 – Medicamento Teste ABZ

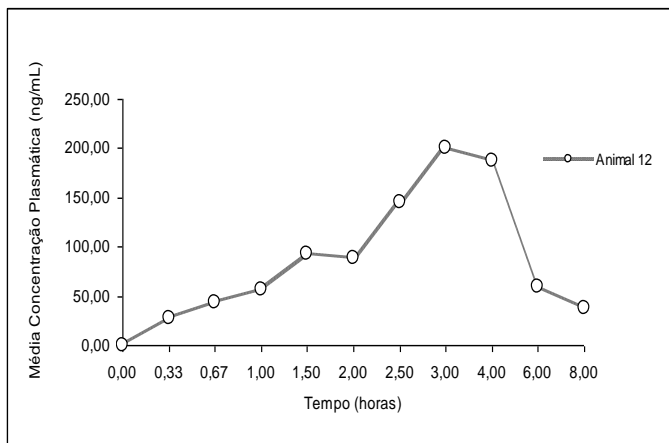


Figura 25: Animal 12 – Medicamento Teste ABZ

ANEXO III – Concentração Plasmática Individuais dos Animais para HCTZ

Tabela 7: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Referência HCTZ

Tempo	Animal					
	1	2	3	4	5	6
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	56,16	34,10	75,31	113,23	65,15	151,47
0,50	277,94	207,03	165,10	109,85	179,15	195,54
0,45	266,18	223,51	315,58	226,78	227,31	419,31
1,00	266,70	307,41	198,42	174,34	260,74	428,29
1,50	278,19	249,05	166,83	199,54	372,93	448,25
2,00	236,41	208,66	202,33	258,11	264,02	402,92
3,00	131,30	186,03	199,31	241,68	269,82	149,62
4,00	186,49	205,73	91,20	359,11	217,54	143,86
6,00	61,30	158,32	102,98	239,13	97,19	103,21
8,00	43,44	36,06	43,89	99,98	65,78	48,66

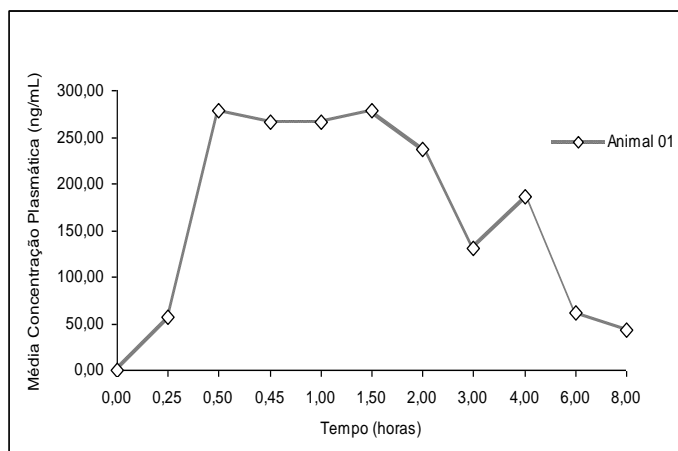


Figura 26: Animal 01 – Medicamento Referência HCTZ

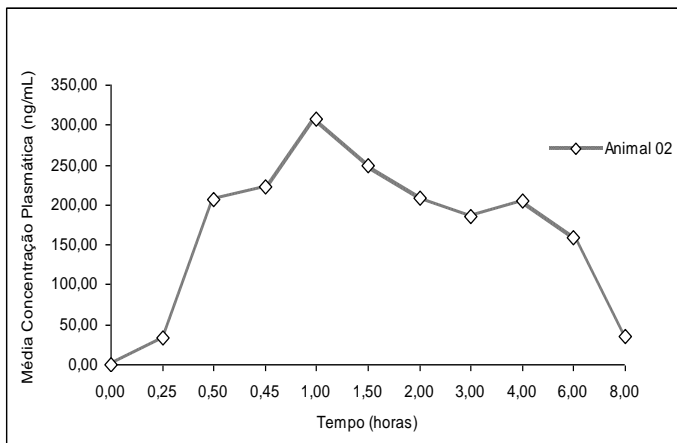


Figura 27: Animal 2 – Medicamento Referência HCTZ

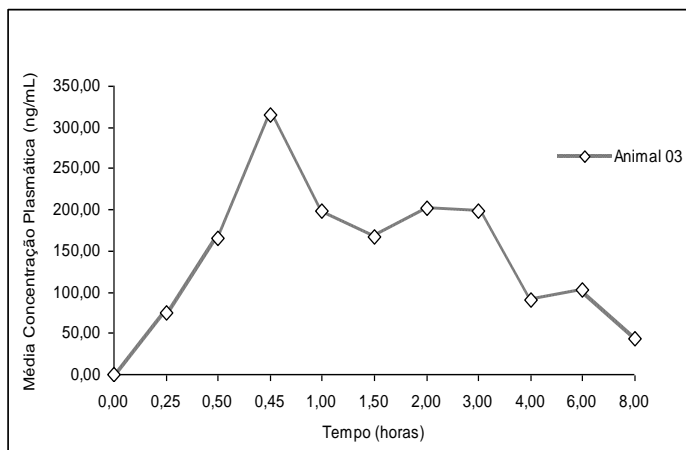


Figura 28: Animal 3 – Medicamento Referência HCTZ

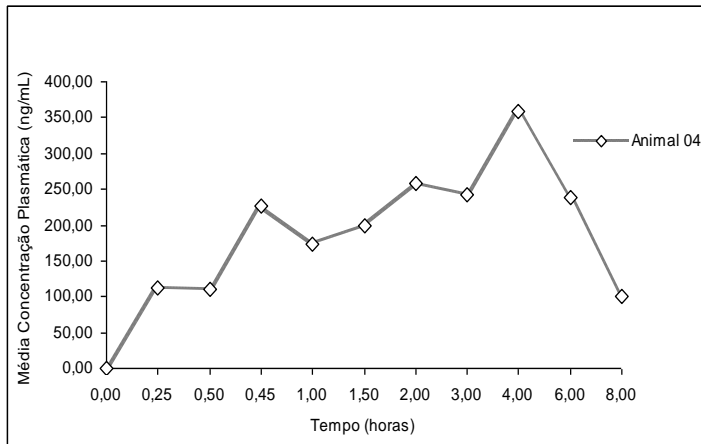


Figura 29: Animal 4 – Medicamento Referência HCTZ

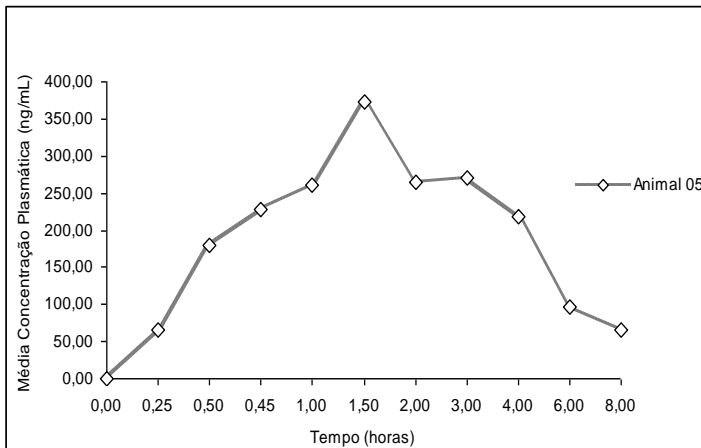


Figura 30: Animal 5 – Medicamento Referência HCTZ

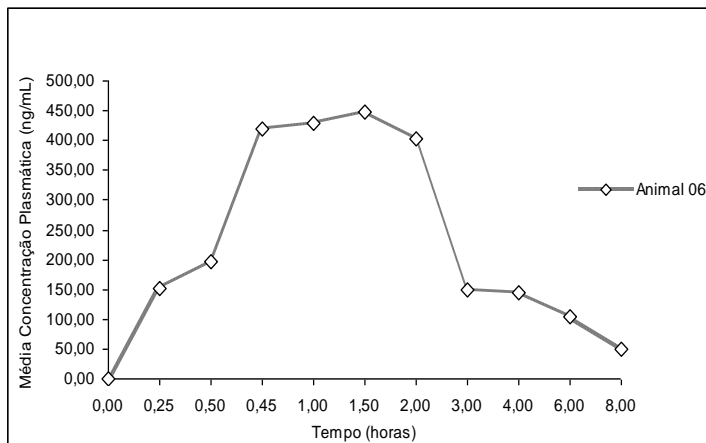


Figura 31: Animal 6 – Medicamento Referência HCTZ

Tabela 8: Concentração Plasmática (ng/mL) ao longo do tempo (horas) do medicamento Referência HCTZ

Tempo	Animal					
	7	8	9	10	11	12
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	115,36	9,83	42,65	149,65	127,61	10,70
0,50	162,57	41,58	178,37	140,05	206,86	163,20
0,45	144,36	88,41	239,65	136,12	157,79	303,48
1,00	393,41	98,77	560,49	309,02	172,93	262,02
1,50	250,15	528,85	518,77	593,10	184,43	255,34
2,00	215,14	253,80	323,46	367,75	212,20	304,89
3,00	198,04	228,73	135,05	418,72	257,51	348,62
4,00	163,41	154,52	116,37	213,84	259,86	128,89
6,00	85,11	42,60	38,73	180,69	175,50	78,52
8,00	77,80	12,57	10,56	94,18	89,96	35,76

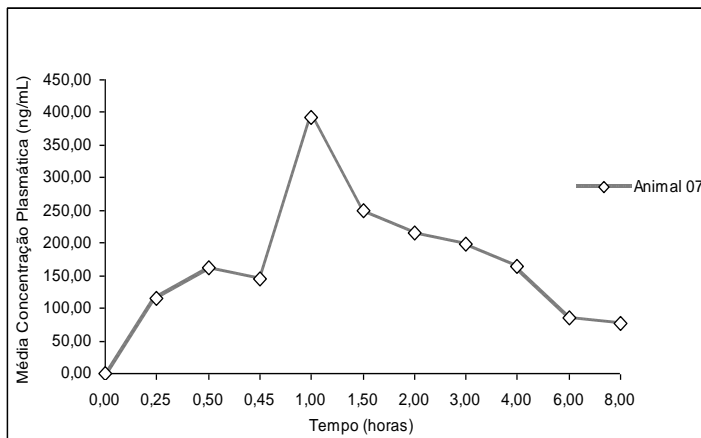


Figura 32: Animal 7 – Medicamento Teste HCTZ

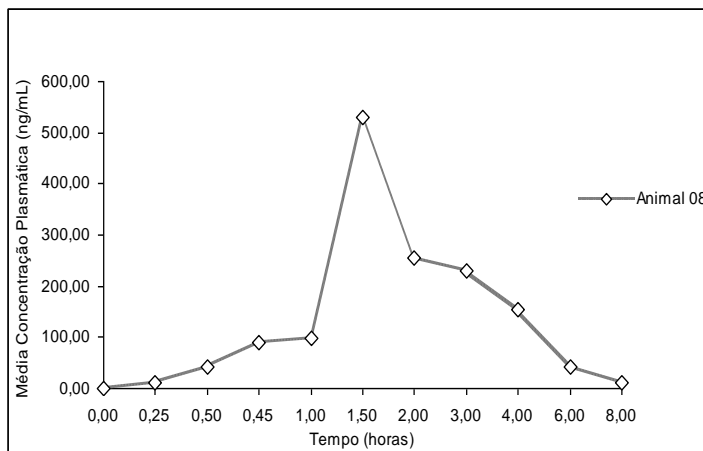


Figura 33: Animal 8 – Medicamento Teste HCTZ

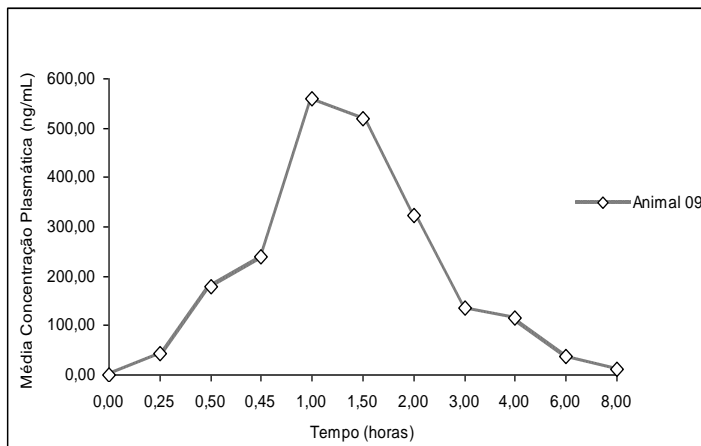


Figura 34: Animal 9 – Medicamento Teste HCTZ

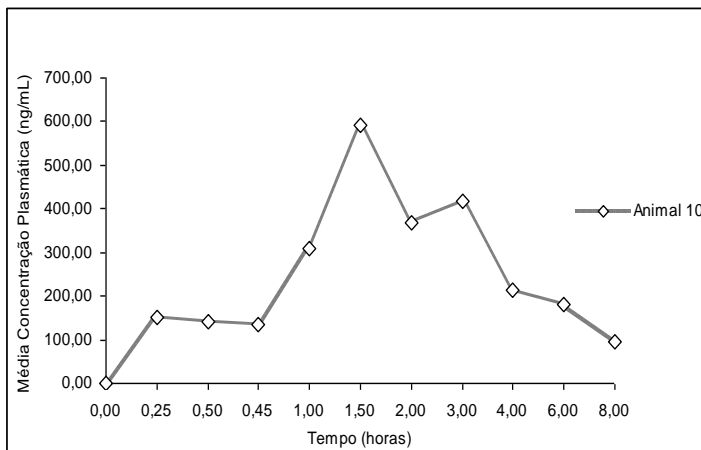


Figura 35: Animal 10 – Medicamento Teste HCTZ

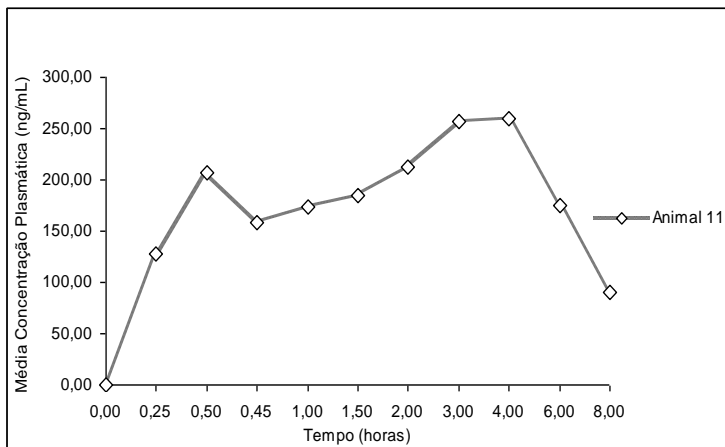


Figura 36: Animal 11 – Medicamento Teste HCTZ

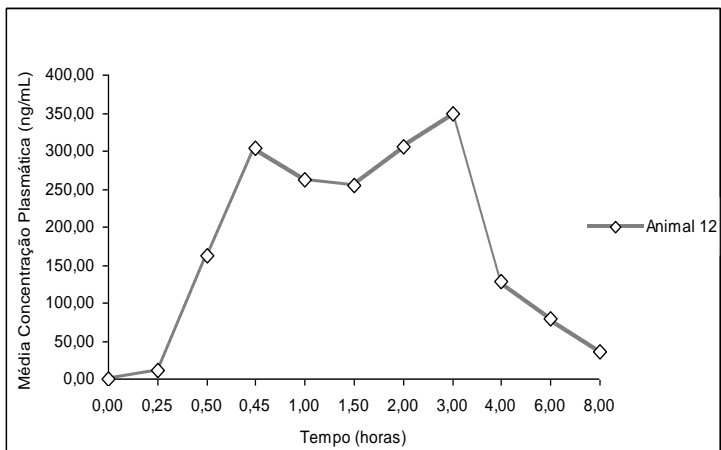


Figura 37: Animal 12 – Medicamento Teste HCTZ