



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
COMPRIMIDOS REVESTIDOS À BASE DE
DICLOFENACO DE POTÁSSIO**

TEREZA RAQUEL PEDROSA FERNANDES

**RECIFE – PE
AGOSTO DE 2003.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA COMPRIMIDOS
REVESTIDOS À BASE DE DICLOFENACO DE POTÁSSIO**

Tereza Raquel Pedrosa Fernandes

Mestranda

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas de área de concentração: Produção de Medicamentos.

Profº Dr. Davi Pereira de Santana

Orientador

Profº Dr. Pedro José Rolim Neto

CO-Orientador

Recife – PE

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

REITOR

Geraldo José Marques Pereira

VICE-REITOR

Yonyr de Sá Barreto Sampaio

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Paulo Roberto Freire Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Silvana Cabral Maggi

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Davi Pereira de Santana

**VICE-COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Dalci José Brandoni

“O temor do Senhor é o princípio da ciência”. Provérbios 1:7a

Ao meu querido vovô Antônio (*in
memorian*) por todo incentivo
e vibração ao longo do curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todo auxílio no meu caminhar.

A Davi Santana meu orientador, que me recebeu no momento de quase desistência no mestrado. Pela confiança depositada em mim e por todo ensino no campo da ciência, como também pelo aprendizado de ética, humanidade, liberdade e responsabilidade, bem como pela amizade.

Ao meu co-orientador Professor Pedro Rolim pela orientação, atenção, incentivo e amizade em todos os momentos.

A Jessivane Oliveira pela amizade, compromisso e grande colaboração neste trabalho.

A Ana Amélia Moreira Lira e Líbia Machado companheiras de laboratório pelo incentivo, apoio, torcida e até mesmo pelos lamentos em nossos encontros e desencontros na pesquisa científica, muito obrigada.

A Leila Bastos e Renato, pela amizade e tudo que me ensinaram. A Dona Neide e André também funcionários do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) por toda ajuda e atenção dados.

A toda equipe do LAFEPE, no desenvolvimento, em especial a Flávia Morais e Fernando por todo desenvolvimento dos comprimidos, bem como a todos do Controle de qualidade por toda atenção.

Aos estagiários Elisângela, Geisiane, Rosali (outrora estagiária), Ana Luiza e Luiz Gustavo por toda ajuda nas análises dos comprimidos.

A todos que formam o Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC) – Prof^a Miracy, Ruth, Rosário, Ana Cristina, Aurenice, André, Márcia (na época), Júnior (Ceará), Danielle Lordão e Breno, por toda colaboração, atenção, esclarecimentos, incentivo e amizade.

A todos da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade.

A coordenação do mestrado, professores Davi e Dalci e a secretária e amiga Iguacy pelos esforços não poupados e toda ajuda na durante este trabalho.

A toda equipe do LTM, Deborah (na época), Zênia, Jobson, Danilo, Luciana, Márcílio e Lamartine e aos demais que formam o grupo de pesquisa.

A José Edson da Silva, Profa Fernanda Pimentel e Profa Valdinete todos do Departamento de Engenharia Química pela parte estatística e por toda ajuda neste trabalho.

A meu amado e amigo Valderes Almeida, que muito me incentivou e apoiou, nos momentos de mudanças e ao longo deste trabalho sempre com muito carinho, atenção e compreensão.

A todos os amigos da minha turma do mestrado Aninha, Chico, Risonildo, Cristiano e Cristiane, Lúcia, Thiago, Duda, Simone, Roseane, Rosiel e demais mestrandos.

A toda minha família, mãe, irmã, pai e padrasto, vovós, tias e tios, primas e primos, sobrinho e Cássio, que muito me incentivaram e sonharam comigo este sonho, agora concretizado. E por toda compreensão nos momentos de ausência nas reuniões familiares. Muito obrigada por todos vocês existirem e deixarem boas lembranças na minha vida.

Aos meus amigos, que cometeria um erro em não citá-los, pois cada um é muito importante pra mim. Muito obrigada pelas mensagens, incentivo e companheirismo, sei que posso sempre contar com todos vocês.

Em fim, a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - A VIA ORAL.....	1
1.2 – COMPRIMIDOS.....	1
1.3 - CLASSES DOS EXCIPIENTES PARA COMPRIMIDOS.....	3
1.4 - TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS.....	5
1.5 - CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO – QUÍMICO.....	6
1.6 - REVESTIMENTO DE COMPRIMIDOS.....	9
1.7 - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA – VALIDAÇÃO.....	11
1.7.1 - Especificidade e Seletividade.....	13
1.7.2 – Linearidade.....	13
1.7.3 - Faixa de Variação.....	14
1.7.4 – Precisão.....	14
1.7.5 – Exatidão.....	15
1.7.6 – Robustez.....	16
1.7.7 - Limite de Detecção.....	17
1.7.8 – Limite de Quantificação.....	18
1.8 – INFLAMAÇÃO.....	18
1.9 – DICLOFENACO DE POTÁSSIO.....	19
1.9.1 – Generalidades.....	19
1.9.2 – Farmacodinâmica.....	20
1.9.3 – Farmacocinética.....	21
1.9.4 – Indicação.....	22
1.9.5 - Contra – Indicação.....	22

1.9.6 - Reações Adversas.....	22
1.9.7 – Posologia.....	23
2.0 – OBJETIVOS.....	24
2.1 – GERAL.....	24
2.2 – ESPECÍFICOS.....	24
3.0 – ARTIGO.....	25
3.1 - DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO E ESTUDO DE ESTABILIDADE DE COMPRIMIDOS REVESTIDOS À BASE DE DICLOFENACO DE POTÁSSIO.....	25
3.2 - ANALYSIS OF DICLOFENAC IN PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND HUMAN PLASMA BY SPECTROPHOTOMETRY AND LIQUID CHROMATOGRAPHY(hplc).....	35
4.0 – CONCLUSÕES.....	52
5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
6.0 – ANEXOS.....	56
6.1 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALITICA.....	56
6.1.1 - Avaliação da precisão do método por Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	56
6.1.2 - Avaliação da precisão do método espectrofotométrico.....	58
6.2 – ANÁLISE DA MATÉRIA – PRIMA.....	60

Lista de Figuras

FIGURA 1.	Molécula de Diclofenaco de Potássio.....	20
FIGURA 2a.	Espectro por infravermelho (amostra).....	62
FIGURA 2b.	Espectro por infravermelho (padrão).....	62
FIGURA 3.	Volume gasto na titulação potenciométrica.....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Sugestão de excipientes primários usados em comprimidos.....	3
Tabela 2.	Variação de peso na forma farmacêutica comprimidos.....	7
Tabela 3.	Classificação das categorias para os testes segundo suas finalidades.....	12
Tabela 4.	Dados necessários para ensaios de Validação segundo sua categoria	12
Tabela 5.	Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.....	17
Tabela 6.	Resultados obtidos com o ensaio de repetibilidade.....	56
Tabela 7.	Resultados da aplicação do teste F para comparação da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2), nos dias 1 e 2 (D1 e D2).....	57
Tabela 8.	Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2), nos dias 1 e 2 (D1 e D2).....	57
Tabela 9.	Resultados da aplicação do teste F para reprodutibilidade, comparação entre laboratórios. Laboratório 1 (Lab 1- NUDFAC) e Laboratório 2 (Lab 2- NCQMC).....	58
Tabela 10.	Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações entre laboratórios.....	58

Tabela 11.	Resultados obtidos com o ensaio de repetibilidade.....	58
Tabela 12.	Resultados da aplicação do teste F para comparação da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2,) nos dias 1 e 2 (D1 e D2).....	59
Tabela 13.	Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2), nos dias 1 e 2 (D1 e D2).....	59
Tabela 14.	Resultados da aplicação do teste F para reprodutibilidade, comparação entre laboratórios Laboratório 1 (Lab 1) e Laboratório 2 (Lab 2).....	60
Tabela 15.	Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações entre laboratórios.....	60
Tabela 16.	Caracterização da matéria-prima.....	60

ABREVIATURAS E SIGLAS

±	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
AINES	Drogas antiinflamatórias não esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm ²	Centímetro quadrado
C _{MÁX}	Concentração máxima
COX	Cicloxigenase
CV	Coeficiente de Variação
DPa	Desvio padrão do intercepto com o eixo Y
DPR	Desvio padrão relativo
F. Bras.	Farmacopéia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
IC	Inclinação da curva
ICH	International Conference of Harmonization
Kgf	Kilograma-força
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
M	Molar
mg	Miligramas
mg/dia	Miligrama por dia
mL/Kg	Mililitro por kilograma
mL/min	Mililitro por minuto
N	Newton
NCQMC	Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos
Nm	Nanômetro
NUDFAC	Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético
p/p	Peso por peso
p/V	Peso por volume
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SQ _{erp}	Soma quadrática de erro puro
SQ	Soma quadrática
SQ _r	Soma quadrática residual
SQ _{reg}	Soma quadrática da regressão linear
SQ _{tot}	Soma quadrática
T	Temperatura
Ton	Toneladas
T _{MÁX}	Tempo máximo
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USP	The United State Pharmacopoea

RESUMO

O diclofenaco de potássio é uma droga antiinflamatória não esteroide (AINES) derivado do ácido benzoacético, designado quimicamente por 2-[(2,6 diclofenil) amino] ácido benzoacético, sal monopotássico. Estudos farmacológicos têm demonstrado atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética para esta droga. O Diclofenaco de potássio tem como produto de referência o Cataflam[®] comercializado pela Novartis Biociências S.A.[®], como drágeas de 50mg. O presente trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos revestidos à base de diclofenaco de potássio 50mg e desenvolver metodologia analítica para quantificação do teor. O desenvolvimento farmacotécnico foi realizado a partir de uma planificação qualitativa e quantitativa em testes de bancada, seguindo as boas normas de fabricação. Os núcleos foram obtidos por compressão direta. Avaliando-se as características físicas dos mesmos, seguindo-se compêndios oficiais, chegou-se a melhor formulação. Na seqüência foram realizados os estudos para obtenção do revestimento. O desenvolvimento farmacotécnico e o revestimento foram realizados numa parceria entre LAFEPE e UFPE. Não estando descrito método de avaliação para o diclofenaco de potássio, produto acabado, em nenhum compêndio oficial, foi necessário desenvolver metodologias analíticas para quantificação do teor nos comprimidos. A técnica por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando cromatógrafo Smadzu (Kyoto, Japão), equipado com uma bomba LC-10AD VP, auto-injetor SIL-10A VP, um detector SPD-10A VP UV e uma unidade de controle SCL 10 A-VP. As análises da droga era adquirida de processada pelo software CLASS-VP (v.6.2) conectado ao Windows 98 num Pentium PC. fase móvel acetonitrila: acetato de sódio 0,01M pH 7,0 (45:55), fluxo de 1,0mL/min e volume de injeção 20 µl. A coluna C18 e tamanho de partícula de 5µm, As amostras foram analisadas no comprimento de onda de 276 nm. Foi desenvolvida no Núcleo de Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (NUDFAC). Já a técnica por espectrofotometria utilizando água destilada como meio de preparo das amostras tendo o mesmo comprimento de onda para as análises. O método desenvolvido se apresentou preciso, exato e de baixo custo tornando-o significativo, podendo assim ser utilizado na rotina do controle de qualidade para este medicamento. Esta última metodologia foi desenvolvida numa parceria com o Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC), que também pertence ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. Em seguida foram realizados estudos de equivalência farmacêutica entre o comprimido desenvolvido e o cataflam[®], e as comparações efetuadas entre os produtos não apresentaram diferenças significativas, como recomenda a ANVISA. Os comprimidos desenvolvidos apresentaram qualidade farmacêutica especificada. Estão em andamento os estudos de estabilidade da forma farmacêutica e bioequivalência.

ABSTRACT

Diclofenac (DIC) is a benzeneacetic [acid](#) derivative, designated chemically as 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino] benzeneacetic acid, monosodium or monopotassium salt. Dic is a potent nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), and is widely used in case of chronic and acute inflammation. The product designated by the national regulatory agency (ANVISA) as reference standard for potassium diclofenac 50mg coated tablets is Cataflam[®] produced by Novartis Biociências S.A.[®]. This study presents the development of a new-coated tablets 50mg potassium diclofenac dosage form and the validation of the analytical methodology for the quantification of diclofenac in pharmaceutical dosage forms. The developed forms was realized by a quantitative and qualitative planning in stand tests, according to good manufacture practices. The core was achieved by direct compression technique. In order to achieve the best formulation, physical and chemical properties of the new form were evaluated according the official compendiums. After that, were performed the coating assays. The form development and the coated development were performed by LAFEPE and UFPE. Diclofenac, in coated tablets form, was not included in the official compendiums, so it became necessary the development of the analytical methodology for the quantitative determination of diclofenac in coated tablets. The HPLC analyses were performed on a Shimadzu chromatographic system (Kyoto, Japan) equipped with a LC-10AD VP pump, a SIL-10A VP auto-sampler, a SPD-10A VP UV detector and a SCL 10 A-VP controller unit. The drug analysis data were acquired and processed with CLASS-VP (v.6.2) software running under Windows 98 on a Pentium PC. The mobile phase was a mixture of acetate buffer (0.01mol/L) with pH adjusted to 7.0 with NaOH (3.0mol/l) and ACN (55:45 v/v), pumped at a flow rate of 1.0ml/min through the column (Luna[®] 10 μ m RP 18, 250 x 4.6mm with a guard column Securityguard[®]; Phenomenex, CA, USA) at room temperature. Peaks were monitored by UV absorbance at 276nm, sensitivity of 0.005AUFS at 27°C. This section of the study was development at the Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC). The spectrophotometric analyses were performed on a Vankel spectrophotometer using 1 cm quartz cells at 276nm. Quantification of DIC was obtained by plotting DIC absorbance as a function of the concentrations. This method was developed at the Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC). NUDFAC and NCQMC are associated to the Department of Pharmaceutical Sciences – UFPE. The developed methods presented acceptable precision, accuracy and proved to be cost effective for the application in quality control routine analyses. Finally, a full pharmaceutical equivalence study between Cataflam[®] and the new diclofenac formulation was performed and was founded that both products met USP XXIII specifications, without significant differences between them. The developed coated tablets diclofenac formulation showed the appropriated quality, as established by the national regulatory agency (ANVISA). The short and long term stability studies are still in course for both pharmaceutical forms and biological fluids.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 - A VIA ORAL

A via oral constitui a rota mais empregada para administração dos medicamentos buscando efeito sistêmico. Os fármacos são administrados por esta via numa grande variedade de formas farmacêuticas, sendo as mais populares: comprimidos, cápsulas, suspensões e soluções. Os comprimidos são muito usados desde o fim do século XIX e sua popularidade persiste. É provável que 90% de todos os fármacos usados na terapia por ação sistêmica sejam administrados por esta via. Dos medicamentos administrados oralmente, as formas sólidas são as preferidas. As razões para tal fato são entre outras: comprimidos e cápsulas constituem formas farmacêuticas unitárias, que permitem a administração de dose única e exata do fármaco, são formas compactas e com boa estabilidade. (LACHMAN, 2001, ANSEL, 2000, REMINGTON, 1987).

1.2 - COMPRIMIDOS

Comprimidos são formas farmacêuticas sólidas contendo princípio(s) ativo(s), normalmente preparados por compressão, com o auxílio de excipientes apropriados ou sem eles. Podem variar o tamanho, forma, peso, dureza, espessura, características de desintegração e outros aspectos, dependendo do uso a que se destina e do método de fabricação, muitos deles são preparados com corantes ou revestimentos de vários tipos (ANSEL, 2000, REMINGTON 1987).

A administração por via oral é a maneira mais comum, os comprimidos são deglutidos da forma como se apresentam, porém em alguns casos, devem ser dissolvidos antes na água, outros devem permanecer na boca, pois exercem uma ação local ou possibilitam a absorção direta do medicamento. Alguns podem ser colocados em alguma cavidade do organismo, ser aplicados sobre a pele, ou ainda, ser adaptados à preparação de soluções injetáveis. Os comprimidos destinados à administração sublingual, bucal ou vaginal em geral não contêm os mesmos excipientes, nem são preparados com as mesmas características dos comprimidos para administração oral (ANSEL, 2000; LE HIR, 1997).

Podem-se citar como principais vantagens dos comprimidos em relação a outras formas farmacêuticas (LACHMAN, 2001; LE HIR, 1997; PRISTA, 1997):

- ✓ Baixo custo quando comparado com outras formas farmacêuticas orais;
- ✓ Boa estabilidade físico-química e microbiológica;
- ✓ Forma compacta que favorece a embalagem e o transporte;
- ✓ Menor percepção do sabor e odor desagradáveis de certos princípios ativos comparados com formas líquidas, além destas características organolépticas serem totalmente mascaradas quando revestido;
- ✓ Apresenta forma unitária de dosagem que oferece maior capacidade, dentre todas as outras formas farmacêuticas, de precisão de dose e menor variabilidade no conteúdo;
- ✓ Mais leves e compactos que todas as formas farmacêuticas orais;
- ✓ Podem ser produzidos mais facilmente em grande escala do que qualquer outra forma oral unitária.
- ✓ Facilmente administrável dispensando a necessidade de pessoal técnico capacitado.

Os comprimidos devem possuir uma superfície lisa, boa aparência e brilho, serem coesos e não apresentarem problemas durante a compressão para que a friabilidade seja reduzida, evitando emissão de pó e fraturas na embalagem durante o transporte ou manuseio. A solução encontrada pode ser a adição judiciosa de aglutinante, aumento da força de compressão e do tempo de residência do material na matriz compressora. Por outro lado, tais operações poderiam desencadear um efeito negativo sobre outro conjunto de propriedades, tais como, o tempo de desintegração e velocidade de dissolução do fármaco. Dependendo do grau de compressibilidade do fármaco, da sua dose, da solubilidade, da velocidade de solubilização e local de absorção no trato gastrointestinal, encontrar um comprimido que satisfaça o conjunto de propriedades requeridas, pode ser um processo simples ou extremamente complexo.

O desenvolvimento e a produção de um comprimido visa à administração de uma quantidade correta de fármaco(s) sendo liberado no organismo de forma previsível e reprodutível, apresentando uma estabilidade química ao longo do tempo de modo a não permitir a alteração desse(s) fármaco(s), no local desejado para sua ação no organismo (LACHMAN, 2001).

1.3 - CLASSES DOS EXCIPIENTES PARA COMPRIMIDOS

O sucesso de uma formulação estável e efetiva para uma forma farmacêutica sólida, depende do cuidado na seleção dos excipientes utilizados, de modo a facilitar sua administração, promover uma liberação consistente, protegê-la da degradação e garantir a biodisponibilidade da droga, como exemplificados na tab. 1 (WELLS, 1988).

Tabela 1: Sugestão de excipientes primários usados em comprimidos. (WELLS, 1988).

Excipientes	Função
Lactose monoidratada (e anidra)	Diluyente
Fosfato Dicálcio diidratado e anidro	Diluyente
Celulose microcristalina (Avicel)	Diluyente
Amido (seco \leq 5% H ₂ O)	Agregante e desintegrante
Amido modificado (Starch 1500)	Agregante e desintegrante
Polivinilpirrolidona (PVP K30 e 90)	Agregante
HPMC (3, 6 e 15cP) (Methocel/Pharmacoat)	Agregante
Glicolato de amido sódico (Explotab)	Desintegrante
Croscarmelose sódica (Ac-Di-Sol)	Desintegrante
Estearato de magnésio	Lubrificante
Ácido esteárico	Lubrificante
Sílica coloidal (Aerosil/ Cab-O-Sil)	Deslizante

Diluentes – são substâncias desenvolvidas para conferir volume a preparação, para completar a quantidade necessária de um comprimido quando a dosagem do fármaco é insuficiente para produzir essa quantidade. A lactose é muito usada como diluyente na formulação de comprimidos, é um excipiente que não reage com a maioria dos fármacos, quer seja usada na forma anidra ou na forma hidratada. A lactose seca por aspersão (spray-dried) constitui um, entre vários, tipos de lactose disponível para compressão direta, sendo normalmente misturada com o fármaco e, possivelmente com desintegrante e lubrificante. O amido pode ser obtido do milho, do trigo ou da batata, é usado ocasionalmente como diluyente para comprimidos. O tipo de amido descrito pela USP apresenta quatro características de escoamento e compressão diferentes possuindo um teor de umidade elevado (entre 11-14%). Atualmente existem

vários amidos comercializados para compressão direta como, por exemplo, o amido Sta-Rx 1500, o Emdex[®] e o Celutab[®]. A celulose microcristalina, freqüentemente conhecida pelo seu nome comercial Avicel[®], é um material para compressão direta. Existem principalmente dois tipos: PH101 (pó) e PH 102 (grânulos), escoam e comprimem muito bem. A celulose microcristalina em muitos aspectos constitui, um diluente de propriedades únicas no que diz respeito à produção de comprimidos coesos atuando no material como agente desintegrante. É, no entanto, um material caro quando usado como diluente em concentrações elevadas, sendo normalmente combinada com outros materiais, tal como, amido.

Agregantes – são substâncias adicionadas na forma de pó ou em solução (alcoólica, aquosa ou hidroalcoólica), dependendo dos outros componentes da formulação ou do método de preparo, durante a granulação por via úmida, na formação de grânulos com boa fluidez, dureza e tamanho uniforme dos grânulos obtidos ou para facilitar a produção de comprimidos coesos por compressão direta. A mesma quantidade de agregante, em solução, é mais eficaz na forma disperso que na forma seca. No método de compressão direta é necessário um material que flua livremente e que possua um maior poder de adesão. As gomas tragacanta e adraganta são usadas em solução, em concentrações que variam de 10 a 25%, isoladas ou em combinação. Outras gomas utilizadas são o alginato sódico e acácia, por exemplo. Outras substâncias que podem ser usadas são o amido, os açúcares como lactose, sacarose e dextrose (em solução com 20-50%) ou ainda a carboximetilcelulose e polivinilpirrolidona (concentração em torno de 2%).

Desintegrantes – substâncias adicionadas à formulação para facilitar a desagregação ou desintegração e rápida dissolução após administração do comprimido. Podem ser adicionados e misturados ao princípio ativo e diluente antes da granulação, pode ser vantajoso dividir o desintegrante em duas partes: uma parte se adiciona antes da granulação e o restante é misturado com o lubrificante antes da compressão. Desta forma a porção agregada ao lubrificante desintegra rapidamente e a porção adicionada aos grânulos desintegra os grânulos em partículas menores, tornando mais rápida a perda da forma do comprimido. As principais substâncias que servem como desintegrantes são: amido, celulose, croscarmelose, crospovidona, glicolato de amido sódico.

Lubrificantes – cumprem várias funções na elaboração dos comprimidos. Impedem que a massa adira à superfície das matrizes e punções, reduz a fricção entre

as partículas, facilita a ejeção dos comprimidos das matrizes, melhoram a fluidez do granulado ou da mistura de pós. Os lubrificantes comumente utilizados são o talco, estearato de magnésio, estearato de cálcio e ácido esteárico. A maioria dos lubrificantes é usada em concentração menor que 1%, com exceção do talco que se usa numa concentração média de 5%.

1.4 - TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS

Os comprimidos podem ser obtidos pelas técnicas de compressão direta, granulação por via úmida ou por via seca (dupla compressão). A tendência atual é a compressão direta, onde os pós são misturados e imediatamente comprimidos. Isto só é possível graças a adjuvantes especiais, pois a maioria dos princípios ativos não apresenta características compressivas e lubrificantes, necessárias para tal tecnologia. A granulação por via seca, também chamada de pré-compressão ou dupla compressão é utilizada para princípios ativos que apresentam instabilidade frente ao calor e/ou umidade (LE HIR, 1997; REMINGTON, 1987).

Os comprimidos são obtidos por compressão, em máquinas de comprimir, a partir de uma formulação contendo fármaco(s) e excipientes. As máquinas de comprimir são constituídas pelos seguintes componentes básicos: (1) alimentador que preenche a máquina com granulado(s) ou pó(s) para compressão, (2) matrizes que definem o tamanho e a forma do comprimido, (3) punções para comprimir o granulado dentro da matriz, (4) calhas para orientação do movimento dos punções e (5) um mecanismo de alimentação que conduza o granulado do alimentador para dentro das matrizes (LACHMAN, 2001).

As máquinas de compressão são classificadas de acordo com o número de estações que possuem e a forma de deslocamento das mesmas: excêntrica com única estação ou rotativa de estações múltiplas. As máquinas rotativas e as de alta velocidade são equipadas com múltiplos punções e matrizes que operam por meio de movimentos giratórios contínuos dos punções e pela compressão contínua. Em contraste, as máquinas de punções simples, excêntricas, que geralmente têm capacidade para aproximadamente 100 comprimidos por minuto. Aspectos como a capacidade, velocidade, peso máximo e pressão variam de acordo com o equipamento (LACHMAN, 2001; ANSEL, 2000).

Embora a maquinaria usada na compressão de partículas sólidas tenha sofrido muitas modificações mecânicas ao longo dos anos, constata-se que estas permanecem atreladas principalmente à capacidade de produção do que propriamente aos princípios de funcionamento do processo compressivo. Um melhor controle e uma maior simplificação do processo têm sido objetivo destes desenvolvimentos.

O número de tamanhos, formas ou contornos dos comprimidos é quase ilimitado, dependendo apenas dos limites para o tamanho da matriz. Qualquer máquina produz comprimidos com diversos tamanhos e formas. Por outro lado, os punções podem conter informação que permite produzir um comprimido fácil de identificar visivelmente.

Devido ao movimento dos punções durante a operação de compressão algumas formas de comprimidos ou contornos têm um comportamento melhor do que outros. Preferem-se comprimidos redondos aos de forma irregular uma vez que eles não necessitam que o punção superior seja devidamente orientado com a matriz. Quando a ponta do punção superior não é redonda, o punção não deve rodar ou, bater na borda da matriz no seu movimento descendente.

Com a diminuição do diâmetro dos punções, menor é a força necessária para produzir a mesma pressão à superfície do punção, uma vez que a face representa uma fração menor de uma unidade de área (cm²).

Os comprimidos são classificados de acordo com a via de administração, pela função que desempenham ou pelo sistema de administração do fármaco na via de administração, pela forma e método de produção (LACHMAN, 2001).

1.5 - CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO - QUÍMICO

Os comprimidos desenvolvidos devem possuir qualidades finas que assegurem sua integridade: aspecto, dureza, friabilidade, uniformidade de peso e dosagem, desintegração, dissolução, etc. As especificações do comprimido garantem que não ocorrerão variações das características do mesmo entre lotes (REMINGTON, 1987).

a) Peso Médio

Peso médio é realizado mediante a pesagem de 20 comprimidos pesados individualmente. Obtendo-se informações sobre a homogeneidade por unidade. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites, porém nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas na tab. 2 abaixo (F. BRAS IV, 1988):

Tabela 2: variação de peso na forma farmacêutica comprimidos

Forma Farmacêutica	Peso médio ou valor nominal declarado	Limites de variação
Comprimidos, núcleos, comprimidos efebversentes, sublinguais, vaginais e pastilhas.	Até 80 mg	± 10%
	Entre 80 e 250 mg	± 7,5%
	Acima de 250mg	± 5,0%

a) Dureza

Dureza ou resistência à quebra determina o quanto duros são os comprimidos, de modo a resistir à fratura durante processos de revestimento, embalagem, transporte, armazenagem e a manipulação. No entanto, devem ter características suficientes para dissolver ou desintegrar depois de administrados. Estas determinações são feitas durante a produção para avaliar a necessidade de ajustes de pressão nas máquinas de compactação, exercendo-se uma força que esmagará o comprimido, esta força pode ser exercida por uma mola espiral ou por uma bomba de ar. A dureza mínima aceitável é de 45N ou 4,5Kgf (ANSEL, 2000; F. BRAS IV, 1988).

b) Friabilidade

Friabilidade é a tendência a fragmentar-se, ela é determinada através da pesagem do 20 comprimidos antes e depois de um número especificado de rotações durante cinco minutos (os comprimidos rolam e caem dentro de um receptáculo giratório) determinando-se a perda de peso, que deve ser menor que 1,0%. (ANSEL, 2000; F. BRAS IV, 1988).

c) Desintegração

Desintegração é importante tanto para que o princípio ativo fique totalmente disponível para absorção no trato gastrointestinal como também para os comprimidos

que não precisam ser absorvidos e devem agir localmente no interior do trato gastrointestinal. Esta pode ser aferida por testes *in vitro*, empregando aparelho que consiste de um sistema de cestas e tubos, com recipiente apropriado para o líquido de imersão, termostato para manter o líquido a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e de mecanismo para movimentar verticalmente a cesta e os tubos no líquido de imersão, com frequência constante e percurso específico. O intervalo de tempo do ensaio é determinado pela monografia, o limite de tempo estabelecido como critério geral para o teste de desintegração de comprimidos é de 30 minutos (F. BRAS IV, 1988).

O procedimento para comprimidos com revestimento difere do método anterior, todavia a aparelhagem e a temperatura do banho de imersão permanecem as mesmas. É necessário deixar os comprimidos durante 5 minutos em água a temperatura ambiente, em seguida realizar o ensaio em água destilada. Caso pelo menos um comprimido não se desintegre ao final de 60 minutos, testam-se outros seis em ácido clorídrico 0,1M como líquido de imersão. Para revestimento entérico, repete-se o procedimento anterior, porém neste caso os comprimidos após o ácido clorídrico não devem estar desintegrados, rachados ou amolecidos. O passo seguinte é utilizar solução tampão fosfato pH 6,8 durante 45 minutos. Todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados (F. BRAS IV, 1988).

d) Dissolução

Dissolução é o ensaio que determina a porcentagem ou quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução dentro do período de tempo especificado na monografia de cada produto, quando o mesmo é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas. O aparelho de dissolução consiste de sistema contendo as seguintes partes: um recipiente de forma cilíndrico e fundo arredondado com a parte superior achatada, de vidro, plástico ou qualquer outro material transparente e inerte. Uma haste metálica (de aço inoxidável) para agitar o meio de dissolução podendo ter em seus extremos dois tipos de agitadores: pás ou cestas; um dispositivo que imprima à haste a velocidade de rotação especificada na monografia. Os recipientes são submergidos, num banho com temperatura homogênea de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante o período de teste. O meio de dissolução deve ser o especificado na monografia do produto. Os gases naturalmente dissolvidos no meio de dissolução devem ser retirados antes do início do teste. Quando o meio de dissolução for solução tampão, o pH deve ser ajustado a $\pm 0,05$ unidade do valor do pH especificado. Quando um único tempo de dissolução for

especificado, o mesmo representa o tempo máximo dentro do qual deve ser dissolvida a quantidade mínima em porcentagem, de princípio ativo estabelecida na monografia. Quando mais de um tempo for especificado devem ser tomadas ao final de cada tempo, alíquotas, gerando um perfil de dissolução, que deve conter, no mínimo, cinco pontos de amostragem dos quais, no mínimo três correspondam a valores de porcentagem de fármaco dissolvido menores que 65% (quando possível) e o último ponto seja relativo a um tempo de coleta igual à pelo menos, o dobro do tempo anterior. O perfil deve ser desenvolvido sob várias condições, que podem incluir, no mínimo três meios de dissolução diferentes (pH 1,0 a 6,8), adição de tensoativos e uso de pá ou cesta, variando-se as velocidades de agitação (F. BRAS IV, 1988; ANVISA, 2003).

f) Teor de Princípio Ativo

Os comprimidos foram avaliados pelas metodologias validadas pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico (CLAE), já que não existe em compêndios oficiais, diclofenaco de potássio produto acabado (comprimidos revestidos).

g) Teste de uniformidade de conteúdo

A uniformidade das doses unitárias de formas farmacêuticas pode ser determinada por dois métodos: variação de peso ou uniformidade de conteúdo. A variação de peso pode ser realizada quando o produto contiver 50mg ou mais de um componente ativo, compreendendo 50% ou mais em peso da dose unitária da forma farmacêutica. A uniformidade de conteúdo deve ser avaliada quando se tem percentual menor que 50% ou para qualquer outro fármaco, se presente na formulação, em quantidade menor.

O produto é aprovado se a quantidade do fármaco em cada uma das dez unidades testadas estiver entre 85 e 115% do valor declarado e o desvio padrão relativo (DPR) for menor ou igual a 6% (F. BRAS. IV, 1988).

1.6 - REVESTIMENTO DE COMPRIMIDOS

Nos últimos anos, houve muitas discussões e investigações científicas dedicados ao problema da determinação da equivalência entre produtos farmacêuticos de fabricantes concorrentes. Ficou bem estabelecido que a velocidade e a extensão em que uma forma farmacêutica fica disponível para absorção biológica depende, em

grande parte das matérias primas utilizadas e também do método de fabricação. (Ansel, 2000).

Por que revestir os comprimidos? Esta pergunta deve ser feita antes de proceder ao revestimento, os motivos deste vão desde a estética até o controle da biodisponibilidade da droga e compreendem entre outros (REMINGTON, 1987, CALLIGARIS, 1991, ANSEL, 2000):

- Proteger a droga do ambiente (ar, umidade, luz) durante todo o período de armazenagem e melhorar sua estabilidade;
- Mascaram sabor ou odor desagradável;
- Facilitar a ingestão do produto pelo paciente;
- Melhorar o aspecto do produto;
- Identificar o medicamento;
- Tornar possível o uso de substâncias que atacam as mucosas;
- Melhorar a integridade mecânica do produto porque os produtos revestidos são mais resistentes aos maus tratos e,
- Modificar a liberação da droga, como os produtos com liberação entérica e modificada.

Em relação às formas farmacêuticas revestidas as desvantagens mais comuns são: custo relativamente alto do processo considerando o uso de equipamentos mais sofisticados, normas de segurança e mão-de-obra especializada.

Drageificação é uma operação de revestimento ou cobertura de comprimidos na qual se utilizam materiais inertes como o açúcar ou polímeros filmógenos que conferem aos comprimidos revestidos propriedades gastrossolúveis, gastro-resistentes ou entero-solúveis, e que quando aplicados sobre a superfície do comprimido formam uma camada ou fina película de revestimento com finalidades diversas para o uso farmacêutico (CALLIGARIS, 1991).

Os revestimentos podem ser dos mais variados tipos e finalidades. Alguns revestimentos, chamados entéricos, são empregados para permitir a passagem segura do comprimido pelo meio ácido do estômago, onde certos fármacos podem ser destruídos, e chegarem ao meio intestinal, onde ocorre a dissolução (ANSEL, 2000).

Os revestimentos podem ser dos tipos:

- a) Revestimento convencional com açúcar;

- b) Revestimento por película;
- c) Revestimento eletrostático e,
- d) Revestimento por compressão.

O revestimento convencional com açúcar utiliza fundamentalmente o açúcar como agente de revestimento, compõem-se, no máximo, de cinco fases e requer técnica especializada. Fase um, camada de isolamento; fase dois, sub-cobertura ou engrossamento; fase três, alisamento; fase quatro, coloração e fase cinco, polimento – brilho.

O revestimento por película é um método rápido em que o polímero selecionado é disperso em solvente adequado e escolhido entre os de grande poder de aderência, produzem, em poucas camadas, uma fina película que, ao arredondar as bordas dos comprimidos o cobrem totalmente e os fazem deslizar.

O revestimento eletrostático é pouco difundido, se fundamenta nos mesmos princípios da pintura a seco ou eletrodeposição.

Revestimento por compressão é uma evolução na compressão de comprimidos, se desenvolveu nas últimas três décadas, um novo processo para aplicação de materiais de cobertura, sem ajuda de soluções de revestimento de qualquer espécie. Este processo consiste em aplicar aos comprimidos determinadas capas, o que se consegue mediante o uso de máquinas de compressão, o método baseia-se na existência de um núcleo (comprimido), que é centrado na matriz de uma máquina rotativa e recebe uma capa de excipiente adequada, na parte inferior e superior, as quais são soldadas por compressão (CALLIGARIS, 1991).

O polímero escolhido para nosso estudo foi o Opadry[®] YS-7006-1 sendo este um polímero orgânico e gastrossolúvel. A escolha baseou-se na facilidade de preparo da dispersão polimérica bem como no manuseio para aplicação (metrização dos parâmetros para revestimento).

1.7 - DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA – VALIDAÇÃO

Uma validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Desta forma deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade,

especificidade, reprodutibilidade e estabilidade adequadas à análise. Para tanto é necessário que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrado e os analistas devidamente qualificados e adequadamente treinados. Segundo a USP 25<1225> e a ANVISA 2003 os diferentes métodos e ensaios são classificados nas seguintes categorias (tab. 3):

Tabela 3: Classificação das categorias para os testes segundo suas finalidades

CATEGORIA I	Métodos analíticos para quantificação do maior componente do lote de substâncias ou princípios ativos (incluindo conservantes) e produto farmacêutico acabado.
CATEGORIA II	Método analítico para determinação das impurezas do lote de substâncias ou compostos de degradação no produto farmacêutico acabado. Este método inclui doseamento quantitativo e ensaio limite.
CATEGORIA III	Método analítico para determinação com característica de performance (ex: dissolução e liberação da droga).
CATEGORIA IV	Testes de identificação

Para cada categoria são necessárias diferentes informações analíticas que estão descritas na tabela 4:

Tabela 4: Dados necessários para ensaios de Validação segundo sua categoria.

Parâmetros de Desempenho Analíticos	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de Detecção (LD)	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação (LQ)	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Faixa de Variação	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim	Não

* Conforme a natureza do teste podem ser necessários

No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, tais como: especificidade e seletividade, linearidade, faixa de variação, precisão, exatidão, resistência, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

1.7.1 - ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE (ANVISA, 2003).

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, podem-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo, metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

Em métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) é interessante para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

1.7.2 - LINEARIDADE

A linearidade do método corresponde à habilidade do mesmo em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma determinada variação. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (ANVISA, 2003; ICH, 1995).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99 (ANVISA, 2003).

1.7.3 - FAIXA DE VARIAÇÃO

A faixa de variação deriva do estudo de linearidade do método e depende do objetivo de sua aplicação, para o doseamento de medicamentos e de fármacos o limite é de 80 a 120%, e deve apresentar linearidade, exatidão e precisão compatíveis (ANVISA, 2003).

1.7.4 - PRECISÃO

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ANVISA 2003; ICH, 1995;).

A repetibilidade corresponde à precisão intra-ensaio, consiste na determinação repetidas vezes de uma amostra sob as mesmas condições de teste em um curto intervalo de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste; (ANVISA 2003; ICH, 1995).

A Precisão intermediária (precisão intercorridas) expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA 2003).

A reprodutibilidade refere-se à precisão entre laboratórios, demonstra a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por

exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. A precisão é expressa em desvio padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro (ICH, 1995; ANVISA 2003).

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), de uma série de medidas, segundo a fórmula **(1)** abaixo (ANVISA 2003).

$$\text{Precisão (cv\%)} = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100\% \quad (1)$$

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

1.7.5 - EXATIDÃO

A exatidão do método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um aceito como referência (SWARTZ & KRULL, 1998).

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis (ANVISA, 2003):

Para o Fármaco - aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência); comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

Para a Forma Farmacêutica - a análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado); nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, se aceita a análise pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

Para as Impurezas - análise pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco; no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, se aceita a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre a média e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente de acordo com a equação **(2)** abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração}_{\text{Média}}}{\text{Concentração}_{\text{Teórica}}} \times 100\%$$

(2)

1.7.6 - ROBUSTEZ

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. A Tabela 5 acima relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 5. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> ·Estabilidade das soluções analíticas ·Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> ·Variação do pH da solução ·Temperatura ·Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> ·Variação do pH da fase móvel ·Variação na composição da fase móvel ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> ·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas ·Temperatura ·Velocidade do gás de arraste

1.7.7 – LIMITE DE DETECÇÃO

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. É estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável;

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação (3),

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (3)$$

Onde: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

1.7.8 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É um parâmetro determinado principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas. É expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação (4):

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (4)$$

Na qual: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

1.8 - INFLAMAÇÃO

As drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES) estão entre as drogas mais comumente usadas no mundo (GARNER, A., 1992).

Elas exercem seus efeitos benéficos antiinflamatório, analgésicos e antipiréticos pela inibição da cicloxigenase (COX), a enzima chave na indução da síntese de prostaglandinas. O mesmo mecanismo, contudo, sustenta alguns efeitos colaterais comuns, como, particularmente a toxicidade gastrointestinal.

Foi recentemente descoberto que a COX apresenta duas isoformas: COX -1 e COX-2. A COX-1 é encontrada na maioria dos tecidos, onde são produzidos prostanoídes, envolvidos nas funções homeostáticas como a citoproteção gástrica, manutenção do fluxo sanguíneo renal e ativação plaquetária. Por outro lado, a COX -2 expressa menores níveis em vários tipos de células, é um indutor enzimático. Esta indução nos sítios da inflamação se dá por estímulo do fator de crescimento, citocinas, e lipopolisacarídeos gerador de prostanoídes, envolvidos no processo de propagação da inflamação dor e febre.

AINES que inibem apenas a COX-1 são conhecidos por serem os principais responsáveis pelos sérios efeitos adversos gastrintestinais. Os que inibem ambas, COX -1 e COX-2, têm demonstrado um relativo potencial contra os efeitos adversos gastrintestinais da COX-1. Já a inibição seletiva da COX-2, possui eficácia antiinflamatória, analgésica e antipirética, porém, com risco substancialmente reduzido de toxicidade gastrointestinal. (ANNE VAN HECKEN et al, 2000 E TOSHIO HIRAI et al 1997).

A maioria destas respostas adversas é relativa à inibição da enzima cicloxigenase e estão freqüentemente envolvidas em reações alérgicas e não alérgicas por drogas. (E. ENRIQUE, 2000).

Estudos de comparação in vitro entre o diclofenaco (inibidor não seletivo) e o meloxicam (inibidor seletivo da COX-2) não demonstraram diferenças significativas no tratamento da osteoartrite (ANNE VAN HECKEN et al, 2000).

1.9 - DICLOFENACO DE POTÁSSIO

1.9.1 - GENERALIDADES

O diclofenaco foi inicialmente lançado no Japão em 1974, e atualmente, pode ser encontrado em cerca de 120 países em todo mundo, tendo sido aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1988, como a primeira droga antiinflamatória não esteroídal (AINES). Pode se apresentar na forma de um sal potássico, derivado do ácido benzenoacético. Designado quimicamente por 2-[(2,6 diclofenil) amino] ácido

benzenoacético, sal monopotássico (Figura 1) (SMALL, R. E., 1989; SKOUTAKIS et al. 1988).

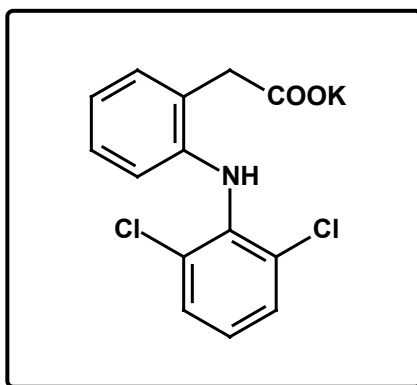


FIGURA 1 – Molécula do Diclofenaco de Potássio

Com fórmula molecular: $C_{14}H_{10}Cl_2KNO_2$ e peso molecular: 334,25. Sua descrição é como um pó cristalino branco ou levemente amarelo, levemente higroscópico, solúvel em água, facilmente solúvel em metanol, solúvel em álcool, pouco solúvel em acetona. (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2001; PHYSICIANS' DESK REFERENCE[®], 1997).

O diclofenaco está presente no mercado na forma de sal livre, sal sódico ou sal potássico. Esta última salificação é mais solúvel, promovendo uma taxa maior de absorção, conseqüentemente um efeito analgésico mais rápido em comparação com as outras formas administradas por via oral. O medicamento de referência para diclofenaco de potássio é Cataflam[®] com apresentação de drágeas 50mg de liberação imediata (REINER V. e col 2001; ANVISA; MARZO A e col. 2000; MCNELLY, W; GOA K.L., 1999).

1.9.2 - FARMACODINÂMICA

Em estudos farmacológicos, diclofenaco tem mostrado atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética. Como outros AINES seu modo de ação não é conhecido, mas sabe-se que é hábil na inibição da síntese de prostaglandinas, pois compete com o ácido araquidônico pela ligação com a cicloxigenase, resultando numa diminuição da produção destas. Por está envolvido na atividade antiinflamatória, tem boa contribuição na eficácia do alívio da dor causada pela inflamação e dismenorréia primária. Liga-se amplamente a albumina plasmática (99%) e de modo reversível (DAVIES, N.M. ANDERSON K.E., 1997; SMALL, R. E., 1989).

1.9.3 - FARMACOCINÉTICA

O diclofenaco de sódio e, também, o de potássio possuem a mesma molécula terapêutica, diferem apenas na porção catiônica do sal. A formulação do cataflam é feita para que sua liberação aconteça no estômago já o voltaren (diclofenaco sódico) tem sua formulação que resiste a dissolução em pH baixo do fluido gástrico, mas perde a forma e tem rápido desprendimento no pH elevado, no meio duodenal.

Possuidora de um rápido início de ação, o diclofenaco de potássio, se torna particularmente adequada para o tratamento de estados dolorosos e/ou inflamatórios agudos.

A absorção do diclofenaco de potássio se dá no trato gastrointestinal 10 minutos após administração por via oral. O pico plasmático foi alcançado após 1h, estes dados foram obtidos após estudo em alguns voluntários sadios.

A extensão da absorção não é significativamente afetada quando o diclofenaco é administrado concomitantemente com alimentos, porém observa-se um atraso no $T_{MÁX}$ e decréscimo do $C_{MÁX}$ de aproximadamente 30%, sob esta condição.

O decaimento do pico plasmático ocorre de modo biexponencial, cuja fase terminal apresenta meia vida de aproximadamente 2 horas. O clearance e o volume de distribuição são de 350mL/min e 550mL/kg, respectivamente. Mais de 99% do diclofenaco se encontra reversivelmente ligado no plasma às albuminas.

É eliminado após ser biotransformado em metabólitos glucoroconjugados e sulfatos sendo excretado pela urina. Uma pequena porção é eliminada inalterada. A excreção dos conjugados pode está relacionada com a função renal. Verificou-se que não há acumulação aparente da droga quando se compara indivíduos jovens e adultos. Ajuste de dosagem para crianças, adultos ou pacientes com variadas enfermidades (hepatites, artrites) não são necessárias (DAVIES, N.M. ANDERSON K.E., 1997; SMALL, R. E., 1989).

O mesmo pode elevar as concentrações plasmáticas de lítio e digoxina. Pode inibir a atividade dos diuréticos, o tratamento concomitante com diuréticos poupadores de potássio pode estar associado à elevação dos níveis séricos de potássio os quais devem ser monitorizados. Existem relatos de uma elevação no risco de hemorragias com o uso combinado do diclofenaco e a terapia anticoagulante. Quando AINES forem

administrados menos de 24 horas antes ou após tratamento com metotrexato, uma vez que a concentração sérica deste fármaco pode ser elevada aumentando assim sua toxicidade. O efeito dos AINES sobre as prostaglandinas renais pode aumentar a nefrotoxicidade da ciclosporina. Relatos isolados de convulsões podem estar associados ao uso concomitante de antibacterianos quinolônicos e AINES (PHYSICIANS' DESK REFERENCE[®], 1997).

1.9.4 - INDICAÇÃO

O Diclofenaco de potássio é indicado para um tratamento de curto prazo para as seguintes condições agudas: estado de dor inflamatória pós-traumática (causadas por entorses) e pós-operatória (cirurgias ortopédicas ou odontológicas); condições inflamatórias e/ou dolorosas em ginecologia (dismenorréia primária); nas crises de enxaqueca, alivia a dor de cabeça e melhora os sintomas de náuseas e vômito; sintomas dolorosos da coluna vertebral; reumatismo não-articular e no tratamento da dor, inflamação e febre que acompanham os processos infecciosos de ouvido, nariz e garganta (faringoamigdalites e otites) (PHYSICIANS' DESK REFERENCE[®], 1997).

1.9.5 - CONTRA – INDICAÇÃO

O medicamento é contra-indicado em casos de pacientes com úlcera gástrica ou intestinal e aos que possuem conhecida hipersensibilidade à substância ativa ou a qualquer outro componente da formulação. Também é contra-indicado a pacientes que têm crises de asma, urticária e rinite aguda quando tomam ácido acetilsalicílico (ex: aspirina) ou outras drogas com atividade inibitória da prostaglandina sintetase (PHYSICIANS' DESK REFERENCE[®], 1997).

1.9.6 - REAÇÕES ADVERSAS

As reações adversas relatadas pelo uso da droga em uso por curto ou longo prazo são (PHYSICIANS' DESK REFERENCE[®], 1997):

- Trato gastrointestinal: epigastralgia, distúrbios gastrintestinais tais como náusea, vômito, diarreia, cólicas abdominais, dispepsia, flatulência, anorexia e irritação local.
- Sistema nervoso central: cefaléia, tontura e vertigem.
- Fígado: elevação dos níveis séricos das enzimas aminotransferases.
- Pele: rash ou erupções cutâneas

1.9.7 - POSOLOGIA

A terapia com Diclofenaco de Potássio comprimidos revestidos é feita administrando-se oralmente, antes da alimentação de preferência com um pouco de água. A dose inicial diária recomendada é de 100-150mg. Em casos mais leves bem como em pacientes acima de 14 anos de idade, 75-100mg/dia são suficiente. A dose diária prescrita deve ser fracionada em duas a três tomadas. No tratamento da dismenorréia primária, a dose diária deve ser individualmente adaptada, geralmente é de 50-150mg. Na enxaqueca, deve-se tomar uma dose inicial de 50mg nos primeiros sinais de uma crise iminente. Em casos em que o alívio da dor não for suficiente dentro de um período de 2 horas após a primeira dose deve-se tomar uma dose adicional de 50mg. Quando necessário pode-se administrar doses adicionais de 50mg em intervalos de 4 a 6 horas, desde que não exceda dosagem total de 200mg por dia (PHYSICIANS' DESK REFERENCE®, 1997).

O diclofenaco de potássio nas doses de 50 e 100mg tem demonstrado alívio efetivo na enxaqueca, foi mais bem tolerado e reduziu os sintomas como náusea e vômitos que acompanha a enxaqueca em comparação ao sumatriptan e ergotamina mais cafeína (Bussone et al, 1999; Dahlöf and Bjönkman, 1993; Mc Neely W, Goa K.L, 1999).

Nas dores de cabeça do tipo ansiedade (tensio-type headache – ETH) baixas doses de diclofenaco de potássio (12,5 e 25 mg) na forma de comprimidos revestidos de liberação imediata são utilizados e são mais eficientes que o ibuprofeno na dose de 400mg (Kubtzek, 2003).

O desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos revestidos a base de diclofenaco de pótassio foi realizado devido à ausência de medicamentos antiinflamatórios produzidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE. A validação da metodologia analítica de doseamento para esta forma farmacêutica se deve ao fato desta droga não está descrita em nenhum dos compêndios oficiais.

2.0 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

Desenvolver formulação de diclofenaco de potássio e validar metodologia analítica para seu doseamento em comprimidos revestidos.

2.2 - Específicos

- Desenvolver estudo de pré-formulação de comprimidos revestidos à base de diclofenaco de potássio;
- Definir parâmetros físico-químicos;
- Desenvolver e validar a metodologia analítica para matéria prima e produto acabado;
- Realizar estudo de dissolução *in vitro* e equivalência farmacêutica;
- Estudar a estabilidade da forma farmacêutica.
- Equivalência (Estudo Comparativo) – Produto desenvolvido x Referência

3.0 – ARTIGOS

ARTIGO ENVIADO PARA REVISTA **ACTA FARMACEUTICA BONAERENSE**

DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE COMPRIMIDOS REVESTIDOS À BASE DE DICLOFENACO DE POTÁSSIO

Development of coated tablets of potassium diclofenac

Tereza Raquel P. Fernandes*, Jessivane Carvalho de Oliveira, Flávia Patrícia Morais Medeiros, Davi Pereira de Santana & Pedro J. Rolim Neto.

RESUMO – O objetivo deste trabalho é apresentar o desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos revestido a base de diclofenaco de potássio que será produzido pelo LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco S.A., bem como o desenvolvimento do revestimento polimérico. E estudo comparativo de Equivalência Farmacêutica.

PALAVRAS – CHAVE – Diclofenaco de potássio, Desenvolvimento farmacotécnico, Comprimidos revestidos, LAFEPE.

SUMMARY – The objective of this work is to present the development of potassium diclofenac coated – tablets manufactured by LAFEPE – Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco State, as well as, the development of coated technique and the comparative study for pharmaceutical equivalence.

KEY WORDS – Potassium diclofenac, Pharmacothechnic developed, Coated tablets, LAFEPE.

INTRODUÇÃO

As drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES) estão entre as drogas mais comumente usadas no mundo (Garner, A., 1992). Elas exercem seus efeitos benéficos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos pela inibição da cicloxigenase (COX), a enzima chave na indução da síntese de prostaglandinas. O diclofenaco foi inicialmente lançado no Japão em 1974, e atualmente, pode ser encontrado em cerca de 120 países em todo mundo, tendo sido aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1988, como a primeira droga antiinflamatória não esteroidal (AINES).

* Universidade Federal de Pernambuco-NUDFAC-CCS/DCFAR.

Av. Prof. Arthur de Sá, s/n. Cidade Universitária, Recife, Pernambuco-Brazil.

CEP:50740-521. FONE/FAX: 55 81 2126. 85. 11.

E-mail: terezaraquel@hotmail.com.br

Pode-se apresentar na forma de um sal potássico, derivado do ácido benzenoacético. Designado quimicamente por 2-[(2,6 diclofenil) amino] ácido benzenoacético, sal monopotássico (Figura 1) (Small, R. E., 1989; Skoutakis et al. 1988).

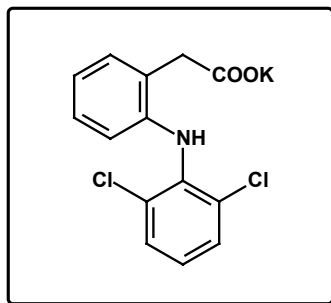


Figura 1 - Molécula do diclofenaco de potássio

O Diclofenaco de potássio é indicado para um tratamento de curto prazo para as seguintes condições agudas: estado de dor inflamatória pós-traumática (causadas por entorses) e pós-operatória (cirurgias ortopédicas ou odontológicas); condições inflamatórias e/ou dolorosas em ginecologia (dismenorréia primária); nas crises de enxaqueca, alivia a dor de cabeça e melhora os sintomas de náuseas e vômito; sintomas dolorosos da coluna vertebral; reumatismo não-articular e no tratamento da dor, inflamação e febre que acompanham os processos infecciosos de ouvido, nariz e garganta (faringoamigdalites e otites) (PHYSICIANS' DESK REFERENCE[®], 1997).

A rota mais empregada para administração dos medicamentos buscando efeito sistêmico é a via oral. Podem-se citar como principais vantagens dos comprimidos em relação a outras formas farmacêuticas: seu baixo custo; sua boa estabilidade físico-química e microbiológica; por ser uma forma compacta, favorece a embalagem e o transporte; promove menor percepção do sabor e odor desagradáveis de certos princípios ativos quando comparados com formas líquidas, além destas características organolépticas serem totalmente mascaradas no caso de comprimidos revestidos e apresenta precisão de dose e menor variabilidade no conteúdo (LACHMAN, 2001; LEHIR, 1997; PRISTA, 1997).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram produzidos Pilotos com 50g para a escolha dos excipientes. Pilotos com 250g para escolha da melhor formulação e piloto de 1000g para revestimento. Tendo cada núcleo o peso médio de 150mg e 50mg de diclofenaco de potássio. Foram realizados doze pilotos (P1 a P12) com a preparação em plano piloto. Foi

desenvolvida uma planificação qualitativa e quantitativa. A fase inicial foi à escolha do diluente. Os pilotos P1, P2, P3 tiveram variação quanto aos diluentes, sendo utilizados Celulose Microcristalina 102 – Microcel 102, Celulose Microcristalina 250 e o Starlac (15% amido e 85% de lactose monohidratada), respectivamente.

A segunda fase foi à escolha do desagregante. O percentual do agente desagregante foi 3%. Os desintegrantes testados foram: croscarmelose (P4), glicolato de amido sódico (P5) e crospovidona (P6).

A terceira fase foi à escolha do lubrificante. O percentual do lubrificante variou entre 0,5 e 1%. Os lubrificantes testados foram: estearato de magnésio, aerosil e talco. Fixando-se a croscarmelose produziu-se P7 com estearato e aerosil, e o P8 com estearato e talco ambos numa proporção de 1% e 0,5% respectivamente. Fixando-se a crospovidona foram produzidos o P9 (estearato e talco) e o P10 (estearato e aerosil) nas mesmas proporções anteriormente citadas. Os lubrificantes escolhidos foram o estearato de magnésio e o aerosil.

Na tentativa de diminuir o custo da formulação, tentou-se ainda variar a proporção de celulose microcristalina, formulando-se mais dois pilotos P11 e P12, com 50% de celulose microcristalina 102 e 250, utilizando como lubrificantes a mistura de estearato de magnésio e aerosil e variando-se no P11 o agente desintegrante a crospovidona e no P12 a croscarmelose. Na tabela 1 encontra-se a planificação qualitativa e quantitativa.

Tabela 1 – Planificação quantitativa e qualitativa para pilotos desenvolvidos

Componentes (%)	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12
Diclofenaco de Potássio	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33	33,33
Celulose Microcristalina 102	66,67										31,085	31,085
Celulose Microcristalina 250		66,67		63,67	63,67	63,67	62,17	62,17	62,17	62,17	31,085	31,085
Starlac			66,67									
Croscarmelose Sódica				3,0			3,0	3,0				3,0
Glicolato de Amido					3,0							
Crospovidona						3,0			3,0	3,0	3,0	
Estearato de Magnésio							1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Dióxido de silício coloidal							0,5			0,5	0,5	0,5
Talco								0,5	0,5			

Após o estudo qualitativo e quantitativo, com concomitante avaliação das propriedades físicas de cada piloto desenvolvido, como: peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, doseamento e uniformidade de conteúdo. Como mostrado na tabela 2.

Tabela 2 – Controle de qualidades Físico-químicos para pilotos desenvolvidos

Parâmetros	Especificação	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12
Peso médio	150mg ± 7,5% (138,75 – 161,25)	141,9	141,4	-	140,0	148,7	146,1	146,7	144,3	143,6	141,9	147,1	149,0
Dureza	≥7,0 Kgf/cm ²	8,95	10,25	-	10,55	12,20	9,85	9,50	8,65	8,0	9,20	9,70	10,72
Friabilidade	≤ 2,0%	0,21	0	-	0,14	0,27	0,41	0,28	0,62	0,35	0	0,41	0,54
Desintegração	≤ 30 minutos	>30	29	-	10	20	11	12	14	13	12	16	14
Doseamento	90,0 – 110%	-	-	-	-	-	-	93,0	91,47	-	89,31	88,16	94,0
Uniformidade de conteúdo	85,0 – 115%	-	-	-	-	-	-	92,72	94,90	-	93,72	92,53	98,72
Dissolução	Q: > 75%	-	-	-	-	-	-	99,36	-	-	90,22	97,0	86,6

Escolheu-se a formulação que em seguida foi produzida numa escala cinco vezes maior, com um piloto de 250g como observamos na tabela 3. Foram feitos dois estudos com os pilotos P7 e P11.

Tabela 3: Formulações e controles de qualidade. Planificação quantitativa, piloto com 250g.

Componentes (%)	Piloto 7	Piloto 11	Parâmetros	Especificação	Piloto 7	Piloto 11
Diclofenaco de Potássio	33,33	33,33	Peso médio	150mg ±7,5%	152,62	147,13
Celulose microcristalina 102	-	31,085	Dureza	≥7,0 Kgf/cm ²	7,70	6,80
Celulose microcristalina 250	62,17	31,085	Friabilidade	≤ 2,0%	0,71	0,56
Croscarmelose	3,0	-	Desintegração	≤ 30 min	5	4
Crospovidona	-	3,0	Doseamento	90,0 - 110%	97,20	98,54
Estearato de magnésio	1,0	1,0	Uniformidade de conteúdo	85,0 - 115%	102,51	97,07
Dióxido de silício coloidal	0,5	0,5	Dissolução	Q: > 75%	95,45	102,70

A formulação escolhida para o revestimento foi a do P7. Produziu-se um piloto com 1000g para o revestimento os ensaios de controle de qualidade para o núcleo está apresentado na tabela 4 abaixo:

Tabela 4: Formulação e ensaios de controle de qualidade do piloto VII com peso total de 1000g.

Componentes (%)	P 7	Parâmetros	Especificação	P7
Diclofenaco de Potássio	33,33	Peso médio	150mg \pm 7,5%	152,8
Celulose microcristalina 102	-	Dureza	\geq 7,0 Kgf/cm ²	8,45
Celulose microcristalina 250	62,17	Friabilidade	\leq 2,0%	0,26
Croscarmelose	3,0	Desintegração	\leq 30 min	9
Crospovidona	-	Doseamento	90,0 - 110%	92,0
Estearato de magnésio	1,0	Uniformidade de conteúdo	85,0 - 115%	96,0
Aerosil	0,5	Dissolução	Q: > 75%	109,3

A técnica para obtenção do núcleo: foi agitação durante 10 minutos. Compressão direta em Máquina excêntrica (pica-pau) Neuberger® Modelo 3135N.

Finalmente foi realizado um estudo comparativo entre o medicamento desenvolvido e o medicamento de referência Cataflam® produzido pelo laboratório Novartis.

Neste estudo se comparou os produtos teste e referência, através dos ensaios de controle de qualidade: peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, doseamento, uniformidade de conteúdo e dissolução, os resultados estão apresentados na tabela 6.

Também foi desenvolvido o perfil de dissolução comparativo, embora não seja necessário, pois os produtos não possuem as características para desenvolver os teste de semelhança e diferença f2 e f1, respectivamente, pois a dissolução é muito rápida, apresentando valor igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos, desta forma, os fatores f1 e f2 perdem o seu poder discriminativo e, portanto, não sendo necessário calculá-los. Como se observa na figura 2, nos resultados.

RESULTADOS

Na primeira fase, escolha do diluente, observou-se que para a Microcel 102 obteve-se uma mistura de pós com escoamento razoável que não alimentava bem a câmara de compressão, tendo uma certa dificuldade em obter o peso médio e a dureza dos núcleos. A força de compressão empregada foi de \pm 5Ton. Para a celulose microcristalina 250 a mistura de pós teve bom escoamento, facilidade em encher a

câmara de compressão e obter o peso médio. Diluente melhor em comparação a Celulose 102. Para o Starlac a mistura de pós possui um escoamento razoável, porém dificuldade em encher a câmara de compressão, o punção inferior fica aderido à câmara provocando grande atrito dificultando o funcionamento da máquina. Com o passar do tempo o escoamento foi dificultado. Não havendo condições de compressão. Contudo não se alcançou a dureza necessária. Dentre os diluentes estudados, a celulose microcristalina 250 se apresentou com melhor fluidez e compatibilidade sendo o diluente escolhido e fixado para variação dos outros constituintes da formulação. Pois como verificado nos ensaios de controle de qualidade (tabela 3) há necessidade da adição de um agente desintegrante, pois o tempo de desintegração está no limite máximo especificado na farmacopéia que é de 30 minutos.

A segunda fase, de escolha do agente desintegrante, utilizou-se a croscarmelose, glicolato e crospovidona. Observou-se a mistura de pós com bom escoamento, facilidade em encher a câmara de compressão, facilidade em obter o peso médio e a dureza. A força de compressão foi também de $\pm 5\text{Ton}$ para todas as formulações. Como o agente desintegrante não interferiu nas condições reológicas da mistura de pós a decisão foi tomada devido aos ensaios físicos de controle de qualidade, que tiveram bom tempo de desintegração, escolhendo-se os desintegrantes croscarmelose e crospovidona para fase seguinte.

Fase três – escolha do lubrificante, os lubrificantes testados foram: estearato de magnésio, aerosil e talco. Os lubrificantes escolhidos foram o estearato de magnésio e o aerosil.

Depois da escolha da formulação, o revestimento foi realizado para o P7. Foi produzido um piloto com 1000g. Os ensaios de controle de qualidade para o núcleo estão apresentados na tabela 4 acima apresentada.

O revestimento desenvolvido foi gastrossolúvel baseado num ganho de peso de 6%. O polímero escolhido foi o Opadry[®] YS 7006 – 1, o pigmento escolhido foi o corante FD&C vermelho 40 (Eskisa S. A Industria e Comércio) e dióxido de titânio.

Os parâmetros para o revestimento foram metrizados (tabela 5) e o revestimento foi realizado numa drageadeira.

Tabela 5 – Parâmetros para o revestimento

Parâmetros	Resultados
Temperatura	40°C
Temperatura na saída do secador	50°C
Revestimento da drageadeira	Solução de PVP 8%
Rotação	32rpm
Tempo de duração	8 minutos
Pressão da Bomba	3 bar
Ganho de peso em polímero nos comprimidos	1,5%

Depois de obtido os produtos acabados, comprimidos revestidos, desenvolveu-se o estudo comparativo levando em consideração a seguinte definição: equivalentes farmacêuticos são medicamentos que contém o mesmo fármaco, isto é, o mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Devem cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira e na ausência desta, com a de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou ainda com outros padrões aplicáveis de qualidade, relacionados à identidade, dosagem, pureza, potência, uniformidade de conteúdo, tempo de desintegração e velocidade de dissolução, quando for o caso (RESOLUÇÃO – RDC n° 135). Os resultados estão apresentados na tabela 6 abaixo:

TABELA 6: Estudo comparativo das características físico-químicas dos comprimidos desenvolvidos e de referência.

Parâmetros	Especificações	LAFEPE	Cataflam®
Peso médio (mg)	80-250mg ± 7,5(%) > 250mg ± 5(%)	154,7	335,9
Dureza (Kgf)	Superior a 7	11,1	12,8
Desintegração	Inferior a 30 min	9	9
Dissolução (%)	Q> 85% em 45 min	109,3	104,5
Teor (%)	90 a 110	94,2	96,1
Uniformidade de conteúdo (%)	85 a 115	105	98,22

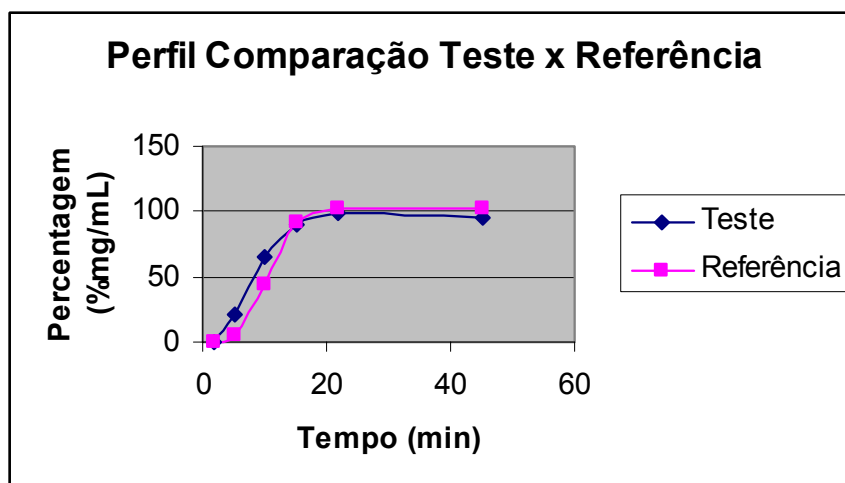


Figura 2 – Perfil de dissolução comparativo entre o medicamento teste e referência

CONCLUSÃO

A técnica empregada, compressão direta, para obtenção dos comprimidos, se mostrou adequada para produção deste medicamento, tendo em vista a qualidade dos núcleos e finalmente dos comprimidos revestidos obtidos quando comparados ao de referência.

O tipo de revestimento Opadry® apresentou-se adequado e de fácil obtenção.

No estudo comparativo entre os comprimidos desenvolvidos e o de referência observou-se que estes são semelhantes diferindo apenas no peso médio e sutilmente no início do perfil de dissolução.

Na seqüência deste trabalho, estão sendo realizadas: transposição de escala dos comprimidos revestidos, teste de estabilidade, biodisponibilidade e bioequivalência em relação ao produto de referência Cataflam® do laboratório Novartis, assim como testes de estabilidade de longa duração, com a formulação obtida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANSEL, H.C. POPOVICH, N.G., ALLEN, Jr. L.V. Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos. 6ª ed. Baltimore: Editorial PREMIER, 2000., p. 90-91; 201-236.

2. Bussone G, Grazzi L, D'Amico D, et al. Acute treatment of migraine attacks: efficacy and safety of a non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac-potassium, in comparison to oral sumatriptan and placebo. *Cephalalgia* 1999;19(4):232–40.
3. CALLIGARIS, Darcio, *Farmacotécnica–Revestimento de formas farmacêuticas sólidas*, 1ª Edição, São Paulo, 1991.
4. Dahlöf C, Björkman R. Diclofenac-K (50 and 100 mg) and placebo in the acute treatment of migraine. *Cephalalgia* 1993;13:117–23.
5. Davies, N. M., Anderson, K. E. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls *Clinical Pharmacokinetics* Vol 33, Iss 3, Sep 1997, pp 184-213.
6. E. Enrique, A. Cistero Bahima, R. Alonso, P. Bravo, A. Fenollosa, I Torre. Diclofenac-induced fever *Allergy* 2000: 55:418-419.
7. Elisabeta Ionescu, Low-dose diclofenac potassium in the treatment of episodic tension-type headache. *European Journal of Pain* 7 (2003) 155–162.
8. *European Pharmacopoeia - Supplement* 2001. p 715-715.
9. *FARMACOPÉIA BRASILEIRA*, 4ªed. São Paulo: Atheneu, 1988.
10. G. Dorta, M. Nicolet, D. Vouillamoz, D. Margalith, E. Saraga, H. Bouzourene, W. H. Häcki, M. Stolte, A. L. Blum & D. Armstrong. The effects of omeprazole on healing and appearance of small gastric and duodenal lesions during dosing with diclofenac in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000; vol 14, p 535-541.
11. Garner, A., Adaptation in the pharmaceutical industry, with particular reference to gastrointestinal drugs and disease, *Scand. J. Gastroenterol*, 1992, vol 27 (Suppl. 193), p 83.
12. LACHMAN. H.A.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v2.
13. LE HIR, A. *Noções de Farmácia galênica*, 6ªed. São Paulo: Organização Andrei, 1997, p.273-323.
14. Marzo A., Dal Bo L., Verga F., Monti NC., Abbondati G., Tettamanti R.A., Crivelli F., Uhr M.R., Ismaili S. Pharmacokinetics of diclofenac after oral administration of its potassium salt in sachet and tablets formulation. *Arzneimittel – Forschung – Drug Research*, 2000, vol 50 Iss 1 pp 43-47.
15. Mc Neely W, Goa K.L, *Drugs* 57, Is 6, Jun 1999. p 991-1003.
16. *PHYSICIANS' DESK REFERENCE®*, 1997.
17. PRISTA, L.N., ALVES, A. C., MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 4ªed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1997. v1 p. 776.
18. PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 4ªed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1997. v1 p. 776.

- 19.Reiner V; Reiner A; Reiner G; Conti M. Increased absorption rate of diclofenac from fast acting formulations containing its potassium salt. *Arzneimittel – Forschung – Drug Research*, 2001, vol 51 Iss 11 pp 885-890.
- 20.REMINGTON, et al. *Farmácia*. 17ªed. Panamericana, 1987, v2 p. 2178-2239.
- 21.Resolução RE nº 901, de 29 de maio de 2003, Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI).
- 22.Skoutakis V.A., Carter C.A., Mickle T.R., et al. *Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent*. *Drug Intell Clin Pharm* 1988, 22, 850-59.
- 23.Skoutakis V.A., Carter C.A., Mickle T.R., et al. *Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent*. *Drug Intell Clin Pharm* 1988, 22, 850-59.
- 24.Small, R.E. Diclofenac Sodium, *Clinical Pharmacy*, Aug 1989, vol 8, Iss 8, p 545 – 558.
- 25.THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 25ed. Rockville: The United Pharmacopeia Convencional, 2001.
- 26.Toshio Hirai*, Shozo Matsumoto, Ikuo Kishi Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 692 (1997) 375-388.
- 27.WELLS, James I., *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances*, First published. England: Ellis Horwood Limited, 1988, p. 80-83; 215-217.

**Analysis of diclofenac in pharmaceutical dosage forms and
human plasma by UV spectrophotometry and liquid
chromatography (HPLC).**

Luis Renato Pires de Abreu¹, Tereza Raquel Pedrosa Fernandes, Jessivane Carvalho de Oliveira, Davi Pereira de Santana.

NUDFAC, Department of Pharmaceutical Sciences-CCS, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

1. Abstract

The main aim of this study was to develop accurate, precise and sensitive assay methods for the determination of Diclofenac - DIC in human plasma and pharmaceutical dosage forms. These methods were applied into the development of a new 50 mg diclofenac potassium coated tablet formulation, which will be marketed as a generic brand. To reach that aim, two HPLC assays were developed for the determination of diclofenac in human plasma samples and in pharmaceutical dosage forms. Also, an alternative spectrophotometric assay of diclofenac in formulations was also developed. HPLC and the spectrophotometric methods were suitable techniques for the determination of DIC in multi-component formulations. The spectrophotometric method was rapid, simple and sensitive and could be used as a cost effective alternative to the other available formulation quality control assays. The validated HPLC method employed here proved to be simple, fast, reliable, selective and sensitive enough to be used in clinical pharmacokinetic studies of diclofenac in humans. A bioavailability study involving the reference diclofenac formulation was then conducted to verify the usefulness of the developed method. Diclofenac concentrations were analyzed by combined reversed phase liquid chromatography and U.V. detection ($\lambda=276$ nm). From the diclofenac plasma concentration vs. time curves the following pharmacokinetic parameters were obtained: AUC_{0-24h} , $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} .

Keywords: *Diclofenac, HPLC, Bioavailability, Formulation, Spectrophotometry*

¹ Universidade Federal de Pernambuco-NUDFAC-CCS/DCFAR.
r. Prof. Arthur de Sá, s/n. Cidade Universitária, Recife, Pernambuco-Brazil.
CEP:50740-521. FONE/FAX: 55 81 3271 8510.
E-mail: lrpabreu@uol.com.br

2. Introduction

Diclofenac (DIC) is a benzeneacetic acid derivative, designated chemically as 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino] benzeneacetic acid, monosodium or monopotassium salt (FIGURE 1). DIC is a potent nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), and is widely used in case of chronic and acute inflammation (1).

DIC was first used in Japan (1974). Actually, DIC is marketed in about 120 countries around the world. DIC was approved by FDA (Food and Drug Administration) in 1988 for use in the treatment of arthritis (1-3). The exact mechanism of action still is not explained, but most of their actions are associated to the blockade of the prostaglandin synthesis, through the inhibition of the cycle-oxygenases (4-7).

DIC, as the sodium or potassium salt, is a faintly yellowish white to light beige, virtually odorless, slightly hygroscopic crystalline powder. Molecular weights of the sodium and potassium salts are 318.14 and 334.25, respectively. DIC is freely soluble in methanol, soluble in ethanol, and practically insoluble in chloroform and in dilute acid. DIC sodium is sparingly soluble in water while DIC potassium is soluble in water. The n-octanol/water partition coefficient is, for both DIC salts, 13.4 at pH 7.4 and 1.5 at pH 5.2. Both salts have a single dissociation constant (pKa) of 4.0 ± 0.2 at 25°C in water. The potassium salt of DIC has been marketed mainly in Latin America and has been prescribed for acute conditions to provide fast analgesic and anti-inflammatory effects. The main adverse effect associated with NSAID therapy is the ability of these drugs to induce gastrointestinal injury, most notably gastric ulceration, bleeding and perforation, as well as an increased risk of bleeding from preexisting peptic ulcers. Food administrations reduce the absorption of DIC and change the absorption pattern (8-15).

DIC is marketed as tablets, capsules, coated tablets, suspension, gel, suppository, flasks and eye drops (2,4). DIC shows high absorption after oral administration, reaches C_{MAX} (1.0 – 1.5 µg/ml) at about 2 hours after administration, presents high binding with plasma proteins (>99%), is quickly distributed through the body, and presents a half-life of elimination ranging from 1.2 to 1.6 hour. DIC is extensively metabolized in the liver and only 50-60% of the dose reaches the circulation. The elimination of the drug occurs preferentially by excretion in the urine (50-70%) and feces (30-35%); with about only 1% of an orally administered dose being excreted unchanged (16-22). DIC is well absorbed orally and dissolves in intestinal fluid (1,2).

Several high-performance liquid-chromatographic (HPLC) assays, using UV detection, have been reported over the last 16 years for the determination of DIC in serum/plasma (23) either alone (24-35), or together with their metabolites (36,37). However, the need for a time and cost-saving method meeting the actual GLP guidelines for the analyses of DIC in both human plasma and pharmaceutical dosage forms, stimulated us to investigate the usefulness of one new simple and fast method with sensitivity appropriated to perform the quantification of DIC in human plasma and in pharmaceutical dosage forms.

The aim of this study was to develop an accurate precise and sensitive HPLC assay for the determination of DIC in human plasma and pharmaceutical dosage forms. An alternative fast and cost effective spectrophotometric assay of DIC in formulations was also developed and validated. These methods will be applied into the development of a new potassium diclofenac coated tablet formulation.

3. Material and methods

3.1. Drugs and chemicals

Acetonitrile (ACN) was purchased from EM Science (Gibbstown, NJ, USA); methanol (MeOH), sodium hydroxide (NaOH), acetic acid (CH₃COOH) and sodium acetate (CH₃COONa) were purchased from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The HPLC grade solvents ACN and MeOH were used as received. All other reagents were analytical grade. Diclofenac and Indometacin (internal standard) were purchased from US Pharmacopeia (New York, NY, USA). The deionized water was prepared using Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

3.2. Standard solutions

3.2.1 HPLC assay

In order to perform the DIC analysis in formulations a stock solution of DIC was prepared in deionized water (500 µg/ml). Working standard solutions were prepared from the stock solution

by sequential dilution with deionized water to yield final concentrations of 5, 8, 10, 12, 15 and 18 μ g/ml. The solutions were protected from light and stored at -20°C until used.

For the analyses of DIC in human plasma a stock solution of DIC was prepared in MeOH (1mg/ml). Working standard solutions were prepared from the stock solution by sequential dilution with MeOH to yield final concentrations of 1, 10 and 100 μ g/ml. Stock solution of indomethacin (internal standard) was prepared in ACN (1mg/ml). Working internal standard solutions were prepared from the stock solution by sequential dilution with ACN to yield final concentrations of 20 and 100 μ g/ml. Stock and working standard solutions were protected from light and stored at -20°C until used. Calibration standards were obtained by adding known amounts of DIC to drug-free plasma to achieve the concentrations of 50, 100, 400, 800, 1000 and 3000ng/ml. Three quality controls of low (50ng/ml), middle (150ng/ml) and high (1500ng/ml) concentrations were prepared by adding known amounts of DIC to drug-free plasma. Plasma solutions were protected from light and stored at -20°C until used.

3.2.2. Spectrophotometric assay

In order to perform the DIC analysis in formulations a stock solution of DIC was prepared in deionized water (500 μ g/ml). Working standard solutions were prepared from the stock solution by sequential dilution with deionized water to yield final concentrations of 1, 5, 10, 15 and 18 μ g/ml. The solutions were protected from light and stored at -20°C until used.

3.3. Sample preparation

3.3.1 In vitro assay

In order to perform the DIC analysis in both formulations 20 commercial tablets and the contents of 20-tablet ingredients were separately weighted and powdered. A portion of the powder equivalent to about one tablet (50mg) of DIC was transferred to a 50 ml calibrated flask and dissolved with deionized water. The solution was filtered through a 0.45 μ m membrane filter, and then further diluted to suit the calibration curves (spectrophotometric and HPLC methods), i.e., to give a final concentration corresponding approximately to the mean value of the calibration range (10 μ g/ml).

An *in vitro* dissolution assay involving the two brands, according to the USP XXIII specifications, was also performed to verify the usefulness of the developed method.

3.3.2 In vivo assay

A bioavailability study involving the reference DIC formulation was initially conducted to verify the usefulness of the developed method. In order to perform the DIC analysis in human plasma, DIC and indomethacin (internal standard) were extracted from human plasma samples by protein precipitation. A 200 μ l aliquot of each plasma sample was transferred to a 1.5 ml polypropylene tube. Then, 20 μ l of 20 μ g/ml internal standard solution and 400 μ l of cold ACN (kept on ice) were added. After a brief vortex mixing, the tubes were centrifuged (14000 rpm at 4°C for 15 min). A 100 μ l aliquot of the supernatant was transferred to the injection vials and 20 μ l were injected into the chromatographic system. The quality controls were performed in duplicate for each batch. All samples from a single volunteer were analyzed on the same day in order to avoid inter-assay variation.

3.4. Instruments and chromatographic conditions

The HPLC analyses were performed on a Shimadzu chromatographic system (Kyoto, Japan) composed by a LC-10AD VP pump, a SIL-10A VP auto-sampler, a SPD-10A VP UV detector and a SCL 10 A-VP controller unit. The drug analysis data were acquired and processed with CLASS-VP (v.6.2) software running under Windows 98 on a Pentium PC. The mobile phase was a mixture of acetate buffer (0.01mol/L) with pH adjusted to 5.0 with NaOH (3.0mol/l) and ACN (55:45 v/v), pumped at a flow rate of 1.5ml/min through the column (Luna[®] 10 μ m RP 18, 250 x 4.6mm with a guard column Securityguard[®]; Phenomenex, CA, USA) for the *in vivo* assay. To perform the *in vitro*

HPLC assay a reversed phase Luna[®] 15 μ m RP 18, 250 x 4.6mm with a guard column Securityguard[®] (Phenomenex, CA, USA). The mobile phase used was a mixture of acetate buffer (0.01mol/L) with pH adjusted to 5.0 with NaOH (3.0mol/l) and ACN (60:40 v/v). Peaks were monitored by UV absorbance at 276nm, sensitivity of 0.005AUFS at 27°C. Quantification of DIC was obtained by plotting DIC to internal standard peak height ratios as a function of the concentrations.

The spectrophotometric analyses were performed on a Vankel spectrophotometer using 1 cm quartz cells at 276nm. Quantification of DIC was obtained by plotting DIC absorbance as a function of the concentrations.

3.5. Stability

Standard solutions were stored at room temperature and at 4°C. Those samples were used to investigate the stability of DIC over a period of 1 week. Drug-free plasma was spiked with known amounts of the drug to achieve the concentrations, 50, 150 and 1500ng/ml (n=3) and stored at -20°C. Those samples were used to investigate the long-term stability of DIC over a period of 4 weeks. In addition, short-term stability studies of plasma samples spiked with DIC were performed for 24h period at room temperature storage and for three freeze-thaw cycles. No internal standard was added prior to the analysis.

3.6. Specificity

The specificity of the method was determined by comparing the chromatograms obtained from the plasma and formulation samples containing DIC with those obtained from blank samples. Possible interference from other drugs was investigated by examining their peak separation from DIC using the same HPLC conditions.

3.7. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

LOD is a parameter that provides the lowest concentration of analyte in a sample that can be detected, but not quantified, under the stated experimental conditions. LOD was determined using the signal-to-noise ratio by comparing test results from samples with known concentrations of analyte to blank samples. The analyte concentration that produced a signal-to-noise ratio of 3:1 was accepted as the LOD. LOQ is defined as the lowest concentration of analyte that can be determined with acceptable precision and accuracy under the stated experimental conditions.

3.8. Recovery

To perform the analyses of DIC in human plasma, the analytical recovery of dic was determined at concentrations of 50, 100, 400, 800, 1000 and 3000ng/ml (n=3). Drug-free plasma was spiked with known amounts of the drug to achieve the concentration previously specified. These samples were processed by the analytical method described above and peak heights were compared with the peak heights obtained by direct injection of the drugs in the mobile phase.

3.9 Linearity

To perform, the analyses of DIC in formulations, the linearity study was carried out in the range of 5 to 18 μ g/ml. To access linearity, the stock solution (500 μ g/ml) was diluted to achieve the concentrations of 5, 8, 10, 12, 15 and 18 μ g/ml.

For the analyses of dic in human plasma, the linearity study was carried out in the range of 50 to 3000ng/ml. To access linearity, drug-free plasma was spiked with known amounts of the drug to achieve the concentrations of 50, 100, 400, 800, 1000 and 3000ng/ml.

3.10. Precision and accuracy

To perform the analyses of DIC in formulations, the precision and accuracy data were obtained by analyzing three aliquots at low (50µg/ml) middle (100µg/ml) and high (150µg/ml) concentration levels of DIC. Intra-day reproducibility was determined by analyzing 5 samples and inter-day reproducibility was determined over a 3-day period. To perform the analyses of DIC in human plasma, the precision and accuracy data were obtained by analyzing aliquots of three-spiked plasma at low (150ng/ml) middle (1500ng/ml) and high (2500ng/ml) concentration levels of DIC. Intra-day reproducibility was determined by analyzing 5 aliquots of spiked human plasma and inter-day reproducibility was determined over a 5-day period.

3.11. Ruggedness

Ruggedness of the HPLC method was determined by varying the analyst and the equipment. Precision data obtained from two different analysts, as the coefficient of variation (CV), were obtained by analyzing aliquots of three-spiked plasma at low (150ng/mL) middle (1500ng/mL) and high (2500ng/mL) concentration levels of DIC. Intra-day variability was determined by analyzing 3 aliquots of spiked human plasma and inter-day variability was determined over a 3-day period (n=3).

3.12. Robustness

Robustness of the HPLC method was determined by varying the pH of the acetate buffer between 4.8 and 5.2, the temperature ranging from 25 to 30°C and performing the analysis at 53, 55, and 58% of acetonitrile, then the effect on retention time and peak parameters was evaluated.

3.13. Formulations

The following reference potassium diclofenac formulation was employed: Cataflam[®] coated tablets 50mg produced by Novartis S/A. Also, a new potassium diclofenac test formulation from Brazil was assayed: Diclofenaco coated tablets 50mg produced by LAFEPE[®].

3.14. Formulation development

The main aim of this study was to develop accurate, precise and sensitive assay methods for the determination of DIC in human plasma and pharmaceutical dosage forms. These methods were applied into the development of a coated potassium diclofenac core and tablet formulation, which will be marketed as a generic brand. The first stage of the formulation development was the diluent and the disintegration agent selection. Then, the amount of each component of the formulation was determined. The core was achieved by direct compression technique in a FABBE[®] punch-tableting machine using 7mm concave punches. Following the analytical control specifications, the coating was developed by using Opadry Clear 7006-1 polymer, titanium dioxide and red pigmentation 40 (Aluminium Iaka), while the suspension was prepared in methylene chloride and 96°GL alcohol (1:1). The diluents Microcel and Starlac (102 and 250), and the disintegration agents Explosol and Crospovidone were then evaluated. The post mixture was analyzed regarding both granulometry and distribution uniformity of the active.

3.14. Clinical protocol

Twenty-four adult volunteers, aged between 21 and 47 years, weighing between 55 and 95 kg and within 15% of the ideal body weight, were selected for the study. The volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, gastrointestinal, neurological and hematological disease as determined within four weeks before the beginning of the study, by medical history, physical examination and laboratory screenings: fasting blood glucose, urea, creatinine, SGOT (AST), SGPT (ALT), total bilirubin, total protein, serum albumin, alkaline phosphatase, sodium, potassium, chloride, uric acid, urinalysis, hemoglobin, hematocrit and total differential white blood cells count. All volunteers gave written informed consent and the Ethics Committee of the related hospital approved the clinical protocol.

The volunteers were hospitalized had a regular meal, and they received a 50mg coated tablet of the formulation. After administration of the coated tablet, the volunteers were asked to drink 200ml of tap water. Blood samples for serum drug assay were taken from a forearm vein before and at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12 and 24 hours after DIC administration. On each occasion, one 5ml sample was taken via "butterfly" into a clean tube. After blood clotting at room temperature, the blood samples were centrifuged at 2000g for ten minutes and the plasma removed and stored at -20°C until assayed. The volunteers received 200ml of tap water drink three hours after dosing. Six hours after dose administration a standard lunch was available and an evening meal was provided twelve hours after dosing. Liquids were allowed *ad libitum* after lunch, but xanthine containing beverages, such as tea, coffee and cola were not permitted.

3.15. Pharmacokinetic and statistical analysis

Maximum observed plasma concentration (C_{max}) and time taken to reach it (T_{max}) were obtained from drug concentration vs. time curves. The areas under the DIC concentrations vs. time curves from 0-24 hours ($\text{AUC}_{0-24\text{h}}$) were calculated by using the trapezoidal method and the first order elimination rate constant (K_e) was estimated by the least square regression of the points describing the terminal log-linear decaying phase. $T_{1/2}$ were derived from K_e ($T_{1/2} = \ln 2/K_e$). C_{max} and $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ data were analyzed statistically using both parametric (one-way ANOVA) and non-parametric methods (Wilcoxon's signed ranks test).

4. Results

The alternative HPLC-UV method described, validated and used here for drug quantification provides suitable sensitivity, specificity and high sample throughput required for pharmacokinetic studies.

FIGURE 2 shows that under described chromatographic conditions, the retention times for DIC and internal standard were about 5.9 and 7.0min, respectively. As also shown in FIGURE 2, no endogenous interfering peaks appeared at the retention times of the compounds of interest. All the investigated OTC drugs including paracetamol, caffeine, aspirin and ibuprofen showed no interference in the assay.

The mean absolute recovery of DIC in plasma was 85.2%. The LOQ for DIC was 50ng/ml and the LOD was set at a concentration of 10ng/ml. The calibration curve was linear over the range 50ng/ml to 3000ng/ml, with a regression coefficient ≥ 0.999 and intercept not significantly different from zero (FIGURE 3).

The obtained analytical precision and accuracy for intra-day and inter-day assays of three quality controls (150, 1500 and 2500ng/ml) are presented in TABLE 1. The overall variability of the quality controls (150, 1500 and 2500ng/ml; n=48) was 4.9, 1.5 and 1.9% respectively; the accuracy was 100.6, 104.2 and 103.5% respectively. no significant degradation of DIC was observed during this period under the storage conditions. The proposed method was found to be rugged when the analyst and the equipment were varied and robust when the pH,

temperature and amount of acetonitrile in the mobile phase composition were varied.

DIC was well tolerated at the administered dose, and no adverse effects were reported. FIGURE 4 shows mean DIC plasma concentrations as a function of time after the oral administration of Cataflam® 50mg.

The major mean pharmacokinetic parameters derived from the serum concentration vs. time curves are presented in TABLE 2.

In order to perform the quantitative determination of DIC in pharmaceutical dosage forms, the sample solutions were subjected to the described spectrophotometric and HPLC analysis, and the drug contents in each sample was calculated by comparison with an appropriate standard solution of the drug.

The reversed phase HPLC method developed for the analysis of pharmaceutical dosage forms provided a specific procedure for the rapid quality control analysis of DIC in tablets. At a flow rate of 1.0 ml/min, the retention time of DIC was 4.0 min. To find the appropriated HPLC conditions for the quantitative determination of the drug, various reversed phase columns, isocratic and gradient mobile phase systems were tried. Successful attempts were performed using a reversed phase Luna® 15µm RP 18, 250 x 4.6mm with a guard column Securityguard® (Phenomenex, CA, USA). The mobile phase used was a mixture of acetate buffer (0.01mol/L) with pH adjusted to 5.0 with NaOH (3.0mol/l) and ACN (60:40 v/v). Under the described experimental conditions, the graphic obtained by plotting the peak areas versus concentration for the quantitative analysis of DIC in tablets, is showed in FIGURE 3. The correlation coefficients were > 0.99 indicating good linearity. Five replicate determinations at different concentration levels carried out to test intra-day and inter-day precision and accuracy of the method. The obtained analytical precision and accuracy for intra-day and inter-day assays of three concentration levels (5, 10 and 15µg/ml) were lower than 5% (TABLE 3). Several test formulations were prepared and assayed and best results were obtained when the formulation number 7 was employed (TABLE 4). The two brands were found to be similar in weight variation and content uniformity and both met the BP requirements of disintegration for coated tablets. The in vitro dissolution assay (FIGURE 5), according to the USP XXIII specifications, revealed that both brands reached the US pharmacopeia specifications as demonstrated in TABLE 5.

The UV spectra of the drug standard solution was performed (FIGURE 6), recorded against the solvent blank and plotted against the corresponding concentration to obtain the calibration graph (FIGURE 3). The obtained analytical precision and accuracy for intra-day and inter-day assays of three concentration levels (5, 10 and 15µg/ml) are shown in TABLE 6.

5. Discussion

Several methods have been described for the quantification of DIC in plasma based on different extraction procedures (38) and coupled to gas chromatography with electron-capture (20, 39), gas chromatography–mass spectrometry (40, 41) or high-performance liquid chromatography (HPLC) either with UV (23, 25, 28, 29, 31), fluorimetric (45) or electrochemical detection (38, 46). HPLC fluorimetric and GC methods, although sensitive and selective, require extensive sample work-up, including derivatization. (32).

Chan et al. (44) described a simple and sensitive HPLC method, with single-step extraction and direct UV detection without derivatization. The overall recovery in the range 5-1000 ng/ml was $94.8 \pm 7.8\%$, indicating good precision and accuracy. However, the data reported suggest that the reproducibility at low levels was not fully satisfactory. The coefficient of variation of the peak height ratio was 20% for 5 ng/ml (three replicates) and 21.7% for 10 ng/ml (four replicates). The recovery for samples spiked with 9 ng/ml ranged from 67% to 144% (36).

El-Sayed et al. (25) described a rapid procedure consisting of protein precipitation with acetonitrile and HPLC analysis with UV detection at 280 nm, with a LOQ of 25 ng/ml. however, the total run time was about 10 min. and the flow rate was 2.0ml/min, increasing the amount mobile phase expended and, consequently, the total cost of the study, once a large number of samples were analyzed. The use of electrochemical detection, besides decreasing the limit of quantification to 10 ng/ ml, permitted one to use a low amount of whole blood sample (100 μ l) (46). Unfortunately, when plasma samples were analyzed, the need of the electrode cell cleanup increase, which discouraged us to apply this technique in bioavailability and bioequivalence studies where a large number of sample are required. In 1998 Giagoudakis (23) proposed a HPLC method with liquid–liquid extraction and UV detection at 278 nm, reaching a sensitivity of 20 ng/ ml. (47). However, these kind methods require the use of relatively large volumes of plasma (0.5 to 1.0 ml) and volatile extraction solvents are used, which can be disadvantageous from the perspective of laboratory safety and occupational health.

These difficulties prompted us to investigate the usefulness of one new simple and fast method with sensitivity and selectivity appropriated to perform the quantification of DIC in human plasma, meeting GLP guidelines for bioavailability and bioequivalence studies (48-51).

The HPLC method described here was accurate, precise, sensitive and capable to determining concentrations of dic in small volumes of human plasma. The HPLC method proposed here also showed some other significant advantages with respect to those previously published, once the pre-analytical procedure was cost and timesaving and easy to perform.

The extraction procedure was simple and a commercially available internal standard (indomethacin) was employed. However, different extraction procedures were tested. Initially a silica-based solid phase extraction cartridge was used, which gave clean chromatograms. Unfortunately, the method was not reproducible and the extraction efficiency was less than 50%. Consequently, C₁₈ extraction cartridges were employed. DIC was eluted with different organic solvents from solid phase. The assay was reproducible and the extraction efficiency was higher than 80%. However, manual SPE is laborious and automated SPE systems are expensive and not readily available. Furthermore the costs related to the SPE cartridges are prohibitive to our laboratory. Liquid phase extraction methods using low amounts of different organic solvents were also tried, but no clean blank chromatograms were obtained. Clean blank chromatograms were obtained only when we used large amounts of volatile organic solvents, which is disadvantageous from the occupational healthy point of view. Acetonitrile was then used for denaturing of plasma proteins. Denaturation with acids reduced the assay extraction ratio, perhaps due to decomposition of the drug. Denaturation method using acetonitrile yielded the best results, shown good extraction efficiency (>85%) and clean blank chromatograms. This assay method was rapid, once the preparation of 70 samples took less than 1h from initial protein precipitation to final placement of samples in the HPLC autosampler vials. Furthermore, the chromatographic run time was less than 8 min.

This method with single step sample preparation permitted to process at least samples from 3 volunteers a day, and was successfully applied to about 350 samples collected for a bioavailability study. The stability results indicated that DIC is quite stable in both plasma and solutions, therefore no special precautions are needed during sample treatment and storage.

Considering the fact that the present method involves a shorter running time, a simple sample preparation process and 0.2ml sample requirement, it may be used in similar pharmacokinetics, bioavailability and bioequivalence studies as a time and cost effective alternative to other available methods.

The reversed phase HPLC method and the spectrophotometric method developed for the analysis of pharmaceutical dosage forms provided a specific procedure for the rapid quality control analysis of DIC in tablets. To find the appropriated HPLC conditions for the quantitative determination of the drug, various reversed phase columns, isocratic and gradient mobile phase systems were tried. Successful attempts were performed using a reversed phase Shimpack ODS (250 x 4.6 mm, 5µm) column. The mobile phase used was a mixture of acetate buffer (0.01mol/L) with pH adjusted to 5.0 with NaOH (3.0mol/l) and ACN (60:40 v/v). The experiments carried out to test intra-day and inter-day precision and accuracy of the HPLC and spectrophotometric methods presented coefficients of variation lower than 5%, indicating the reasonable repeatability of the proposed methods.

6. Conclusions

HPLC and the spectrophotometric methods are suitable techniques for the determination of DIC in multi-component formulations without interference of each other. The spectrophotometric method is rapid, simple and sensitive and could be used as a cost effective alternative to the other available methods. The validated HPLC method employed here proved to be simple, fast, reliable, selective and sensitive enough to be used in clinical pharmacokinetic studies of DIC in humans. A bioavailability study involving the reference diclofenac formulation was initially conducted to verify the usefulness of the developed method. Once the methods were successfully applied, a full bioequivalence study will be performed.

7. References

1. SMALL, E.R. *Clinical Pharmacy* **8**, 545 (1989)
2. TODD, A.P.; SORKIN, E.M. *DRUGS* **35**, 244 (1988)
3. SKOUTAKIS, V.A.; CARTER, C.A.; MICKLE, T.R.; ET AL. *DRUG INTELL CLIN PHARM* **22**, 850 (1988)
4. KU, E.C.; LEE W.; KOTHARI, H.V.; et al. *Sem in Arthritis Rheum*, **15**, 36 (1988)
5. SCHOLER, D.W.; KU E.C.; BOETTCHE, I.; et al. *Am J Med*; **80**, 34 (1986)
6. KU, E.C.; LEE, W.; KOTHARI, H.V.; et al. *Am J Med* 1986; **80**, 18 (1986)
7. PERIANIN, A.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; GIROUD, J.P.; et al. *Biochem Pharmacol*; **34**, 3433 (1985)
8. FRIMAN, C.; JOHNSTON, C.; CHEW, C.; ET AL. *SCAND J RHEUMATOL*; **15**, 41 (1986)
9. ATKINSON, D.C.; COLLIER, H.O.J. *ADV PHARMACOL CHEMOTHER*, **233** (1980)
10. FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M.A. *Eur J. Pharmacol*; **53**, 39 (1978)
11. GOODMAN and GILMAN. *The pharmacological basis of therapeutics*. Macmillan Publishing Company, NY; 1985
12. MARTINI, A.; BONDILOTTI, G.P.; SACERDOTE, P. et al. *J Int Med Res*; **12**, 92 (1984)
13. SACERDOTE, P.; MONZA, G.; MANTEGAZZA, P.; ET AL. *PHARMACOL RES COMMUN*; **17**, 679 (1985)
14. GEIGY. *Voltaren prescribing information*. Ardsley, NY; 1988.
15. OSNES, M.; LARSEN, S.; EIDSAUNET, W. ET AL. *Clin pharmacol Ther*; **3**, 399 (1979)
16. RIESS, W.; STIERLIN, H.; DEGEN, P.; ET AL. *RHEUMATOL REHABIL*; **18**, 22 (1979)

17. WILLIS, J.V.; KENDALL, M.J.; FLINN, R.M. ET AL. EUR J CLIN PHARMACOL, 16, 405 (1979)
18. KENDALL, M.J.; THORNHILL, D.P.; WILLIS, J.V. RHEUMATOL REHABIL, 18, 38 (1979)
19. JOHN, VA. Rheumatol Rehabil; 2, 22 (1979)
20. GEIGER, U.P.; DEGEN, P.H.; SIOUFI, A. J Chromatogr; 111, 293 (1975)
21. WILLIS, J.V.; JACK, D.B.; KENDALL, M.J.; JOHN, V.A. Eur J Clin Pharmacol, 19, 39 (1981)
22. CHAMOUD, J.M.; BARRE, J.; URIEN, S.; et al. Biochem Pharmacol; 34, 1695(1985)
23. GIAGOUDAKIS, G.; MARKANTONIS, S.L. J Pharm and Biom Anal; 17, 897 (1998)
24. OWEN, S.G.; ROBERTS, M.S.; FRIESEN, W.T. J Chromatogr. 416, 293 (1987)
25. EL-SAYED, Y.M.; ABDEL-HAMEED, M.E.; SULEIMAN, M.S.; NAJIB, N.M. J. Pharm. Pharmacol. 40, 727 (1988)
26. GRANDJEAN, D.; BEOLOR, J.C.; QUINCON, M.T.; SAVEL, E. J Pharm Sci. 78, 247 (1989)
27. LANSDORP, D.; JANSSEN, T.J.; GUELEN, P.M.J.; VREE, T.B. J Chromatogr. 528, 487 (1990)
28. BRUNNER, L.A.; LUDERS, R.C. J Chromatogr. Sci. 29, 287 (1991)
29. SIOUFI, A.; RICHARD, J.; MANGONI, P.; GODBILLON, J. J Chromatogr. 565, 401 (1991)
30. SANTOS, S.R.; DONZELLA, H.; BERTOLINE, M.A. et al. J Med Biol Res. 25, 125 (1992)
31. BLAGBROUGH, I.S.; DAYKIN, M.M.; DOHERTY, M.; et al. J. Chromatogr. 578, 251 (1992)
32. MILLER, R.B. J. Chromatogr. 616, 283 (1993).
33. AVGERINOS, A.; KARIDAS, TH.; MALAMATARIS, S. J. Chromatogr. 619, 324 (1993)
34. ZHANG, S.Y.; ZOU, H.Q.; ZHANG, Z.Y.; et al. Yao Hsueh Hseuh Pao. 29, 228 (1994)
35. HANSES, A.; SPAHN-LANGGUTH, H.; MUTSCHLER, E. Arch Pharm. 328, 257 (1995)
36. GODBILLON, J.; GAURON, S.; METAYER, J.P. J Chromatogr. 338, 151 (1985)
37. SCHMITZ, G.; LEPPER, H.; ESTLER, C.J. J Chromatogr. 620, 158 (1993)
38. ZECCA, L.; FERRARIO, P. J Chromatogr B. 495, 303 (1989)
39. SCHNEIDER, W; DEGEN, P H. J Chromatogr. 217, 263 (1981)
40. KADOWAKL, H; SHMO, M; UEMURA, I; KOBAYASHL, K. J Chromatogr. 308, 329 (1984)
41. SEGURA, J.; MESTRES, M.; AUBETS, J.; et al. Blamed Environ Mass Spectrom. 16, 361 (1988)
42. WIESE, B.; HERMANSSON, J. J. Chromatogr., 567, 175 (1991).
43. NAJIB, N. M. J Pharm Pharmacol. 40, 727 (1988)
44. CHAN, K. K. H.; VYAS, K. H.; WNUCK, K. Anal. Lett., 15, 1649(1982)
45. MONCRIEFF, J. J. Chromatogr. 577, 185 (1992)
46. TORRES-LOPEZ, J.E.; ROBLES, M.B.; PEREZ-URIZAR, J. Arzneim-Forsch Drug Res. 47, 1040 (1997).
47. ARCELLONI, C.; LANZI, R.; PEDERCINI, S.; et al. J Chromatogr B. 763, 195 (2001)
48. Food and Drug Administration. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. Fed. Regist. 1985; 320: 154-173

49. Food and Drug Administration. Bioavailability and Bioequivalence Requirements; abbreviated applications; proposed revisions. Proposed rules. Fed. Regist. 1998; 63: 64222-64228
50. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, bioanalytical methods validation for human studies; Food and Drug Administration Web-site. Available at: <http://www.fda.gov/cder/guidance/>, 1998 b. August/1998.
51. Food and Drug Administration. In vivo bioequivalence guidances. Pharmacopeial Forum. 1993; 19: 6501-6508.

FIGURES AND TABLES

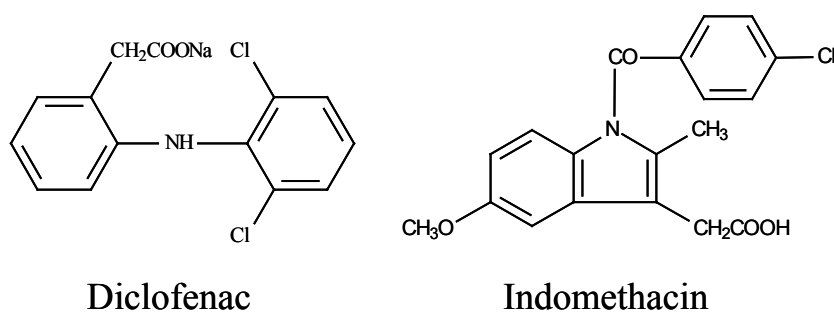


FIGURE 1. Structures of diclofenac and indomethacin (internal standard).

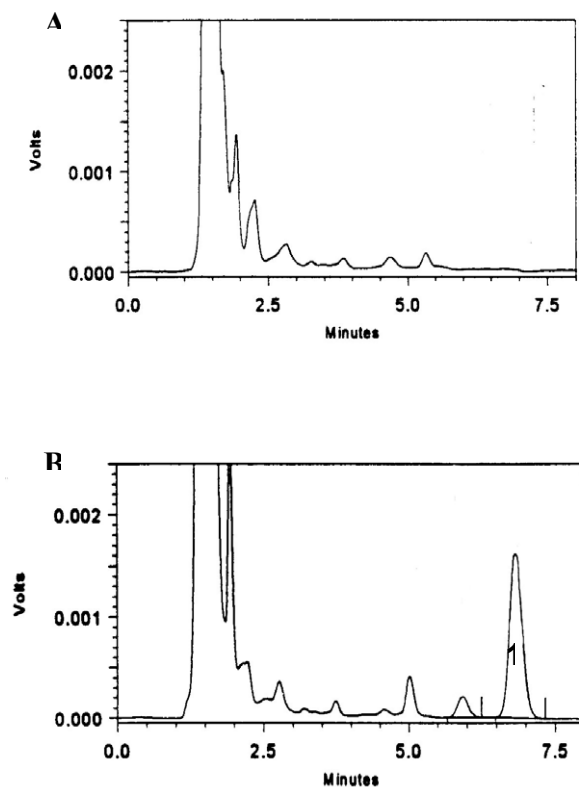


FIGURE 2. Chromatographic analysis of diclofenac A) plasma blank; B) plasma + diclofenac (250ng/ml) -1 and internal standard (indomethacin 400ng/ml) - 2.

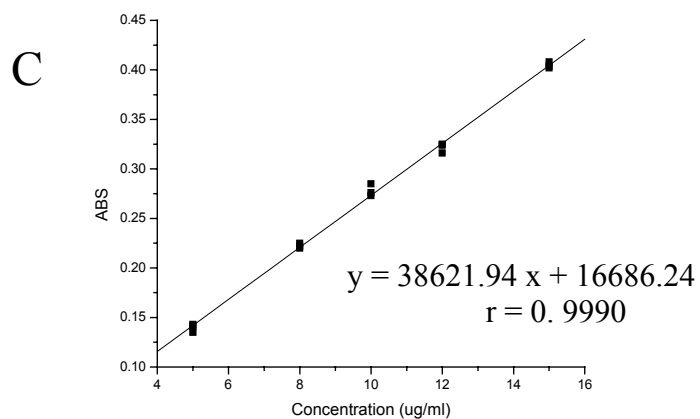
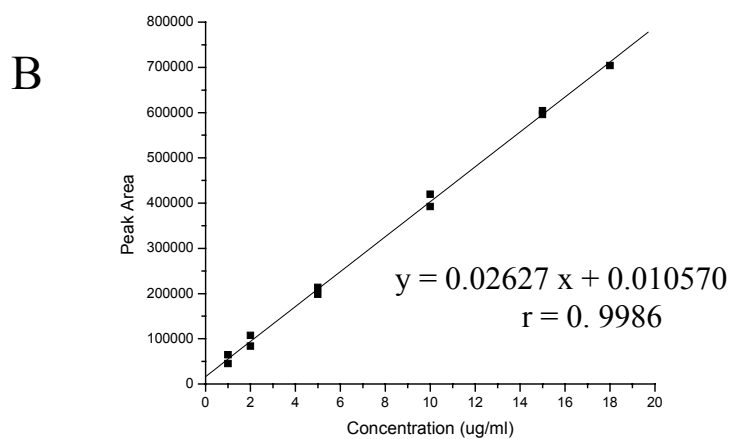
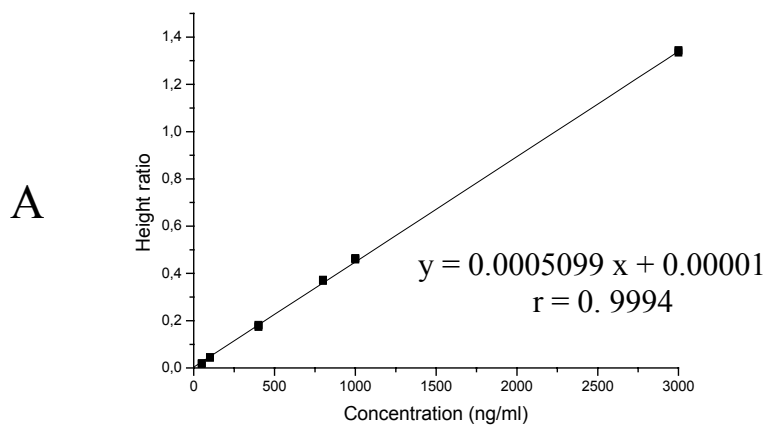


FIGURE 3. Calibration curves of diclofenac: A- Obtained from the HPLC analysis of diclofenac plasma samples; B- Obtained from the HPLC analysis of diclofenac standard solutions; C- Obtained from the spectrophotometric analysis of diclofenac standard solutions.

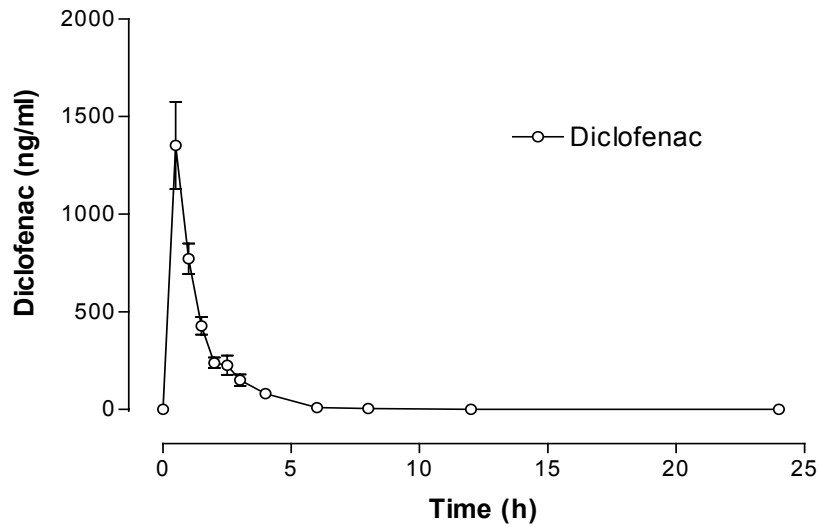


FIGURE 4. Curve of the mean plasma concentration of the diclofenac (\pm SEM) of 24 volunteers vs. Time (h).

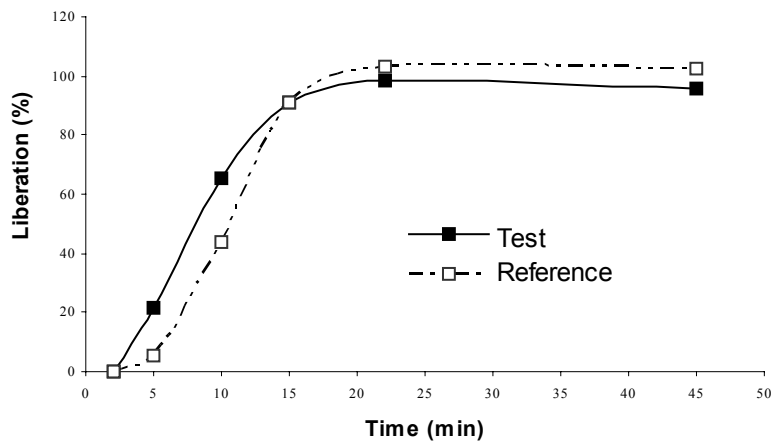


FIGURE 5. Dissolution profile of both diclofenac 50 mg coated tablets formulations (Diclofenaco LAFEPE-Test and Catflam[®]-Reference).

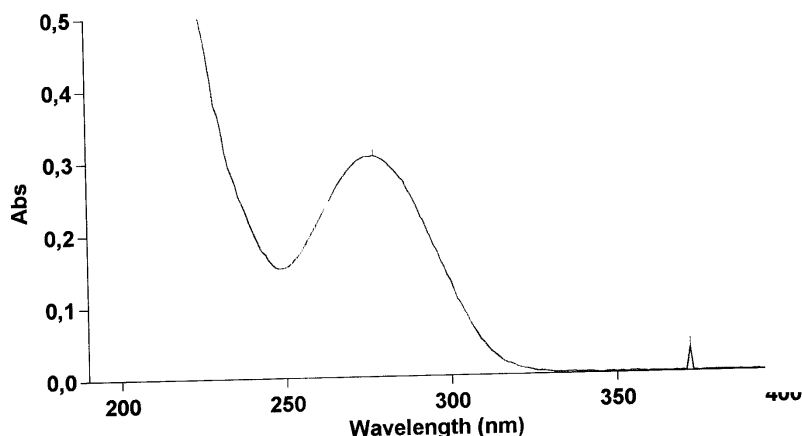


FIGURE 6. UV spectra of diclofenac in distilled water.

TABLE 1. Analytical precision and accuracy of the HPLC determination of diclofenac from spiked plasma samples (n=5).

CONCENTRATION ADDED (NG/ML)	CONCENTRATION OBTAINED (NG/ML)	CV (%)	RELATIVE ERROR (%)
<i>INTRA-DAY</i>			
150.0	152.6	2.6	101.7
1500.0	1561.5	1.6	104.8
2500.0	2584.8	1.2	103.4
<i>INTER-DAY</i>			
150.0	152.0	0.5	101.3
1500.0	1554.2	0.4	103.6
2500.0	2575.6	1.5	103.2

TABLE 2. Mean pharmacokinetic parameters obtained in 24 healthy volunteers after the administration of both diclofenac 50mg formulations.

Parameters	Cataflam®
AUC _{0-8h} (µg.h.ml ⁻¹)	1.7
Geometric mean (IC 90%)	(1.5-1.9)
AUC _{0-∞} (µg.h.ml ⁻¹)	1.9
Geometric mean (IC 90%)	(1.8-2.0)
C _{max} (µg.ml ⁻¹)	1.6
Geometric mean (IC 90%)	(1.3-1.9)
t _{1/2} (h)	1.3
Geometric mean (IC 90%)	(1.1-1.5)
t _{max} (h)	0.8
Geometric mean (IC 90%)	(0.6-1.0)

TABLE 3. Analytical precision and accuracy of the HPLC determination of diclofenac from standard solutions (n=3).

CONCENTRATION ADDED (MG/ML)	CONCENTRATION OBTAINED (MG/ML)	CV (%)	RELATIVE ERROR (%)
<i>INTRA-DAY</i>			
5.0	5.2	4.0	104.0
10.0	10.5	0.5	105.0
15.0	14.8	1.9	98.7
<i>INTER-DAY</i>			
5.0	5.1	1.9	102.0
10.0	9.8	0.8	98.0
15.0	14.7	1.2	98.0

TABLE 4. Composition and results from the physical experiments of the selected coated tablets test formulation.

Component	Test Formulation n.7 composition (%)	Experiment	Specification	Results
Potassium Diclofenac	33.33	Average Weight (mg)	150 ± 7.5 (%)	152.8
Microcel 102	-	Hardness (kgf/cm ²)	> 7.0	8.4
Microcel 250	62.17	Friability (%)	≤ 2.0	0.2
Croscarmellose Sodium	3.0	Desintegration (min)	< 30	9.0
Crospovidone	-	Uniformity (%)	85-115	96.0
Magnesium Stearate	1.0	Assay (%)	90-110	92.0
Aerosil	0.5	Dissolution	Q > 75 %	Q = 109.3%

TABLE 5. Results from the physical experiments of the coated tablets formulations.

Experiment	Specification	Diclofenac	Cataflam [®]
Average Weight (mg)	80-250 ± 7.5 and >250± 5.0	154.7	335.9
Hardness (kgf/cm ²)	> 7.0	11.1	12.8
Desintegration (min)	< 30 min	9.0	9.0
Uniformity (%)	80-115	95.6	98.22
Assay (%)	90-110	94.2	96.1
Dissolution	Q > 85 %	Q = 109.0 %	Q = 104.5 %

TABLE 6. Analytical precision and accuracy of the spectrophotometric determination of diclofenac from standard solutions (n=3).

CONCENTRATION ADDED (MG/ML)	CONCENTRATION OBTAINED (MG/ML)	CV (%)	RELATIVE ERROR (%)
<i>INTRA-DAY</i>			
5.0	5.0	0.8	100.6
10.0	10.5	0.5	105.0
15.0	15.7	1.2	104.6
<i>INTER-DAY</i>			
5.0	5.0	0.3	100.0
10.0	9.7	1.0	97.0
15.0	14.9	1.3	99.3

4.0 - CONCLUSÕES

O desenvolvimento dos comprimidos revestidos à base de Diclofenaco de Potássio foi realizado segundo as Boas Normas de Fabricação e apresentaram qualidade farmacêutica.

Em estudo comparativo, os comprimidos revestidos de Diclofenaco de Potássio desenvolvidos, apresentaram-se semelhantes ao medicamento de referência.

As metodologias analíticas de doseamento da matéria-prima e do produto acabado pelos métodos de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência foram validadas como reprodutíveis, exatas, sensíveis e precisas, de acordo com a resolução RE nº 899 de 31 de maio de 2003.

Os testes de estabilidade em câmara climática e em prateleira já estão iniciados.

Será realizada transposição para escala industrial, sendo produzidos os biolotes necessários para realização do estudo de bioequivalência para os comprimidos Diclofenaco de potássio LAFEPE.

O protocolo para estudo de bioequivalência e biodisponibilidade está sob avaliação do comitê de ética.

5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANNE VAN HECKEN, JULES I. SCHWARTZ, MARLEEN DEPRÉ, INGE DE LEPELEIRE, AIMEE DALLOB, WESLEY TANAKA, KATHLEEN WYNANTS, AGNES BUNTINX, JEF ARNOUT, PEGGY H. WONG. *Comparative Inhibitory Activity of Rofecoxib, Meloxicam, Diclofenac, Ibuprofen, and Naproxen on COX-2 versus COX-1 in Healthy Volunteers*. J Clin Pharmacol 2000;40:1109-1120p.
2. ANSEL, H.C., POPOVICH, N.G., ALLEN, Jr. L.V. *Farmacotécnica - Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos*. 6ª ed. Baltimore: Editorial PREMIER, 2000, 90-91; 201-236p.
3. BARROS NETO, B., SCARMÍNIO, I.S., BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 105-112p. 2001.
4. BUSSONE G, GRAZZI L, D'AMICO D, et al. *Acute treatment of migraine attacks: efficacy and safety of a non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac-potassium, in comparison to oral sumatriptan and placebo*. Cephalalgia 1999;19(4):232-40p.
5. CALLIGARIS, DARCIO, *Farmacotécnica - Revestimento de formas farmacêuticas sólidas*, 1ª Edição, São Paulo - SP, 1991.
6. DAHLÖF C, BJÖRKMAN R., *Diclofenac-K (50 and 100 mg) and placebo in the acute treatment of migraine*. Cephalalgia 1993;13:117-23p.
7. DAVIES, N. M., ANDERSON, K. E., *Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls* Clinical Pharmacokinetics Vol 33, Iss 3, Sep 1997, p.184-213.
8. E. ENRIQUE, A. CISTERO BAHIMA, R. ALONSO, P. BRAVO, A. FENOLLOSA, I TORRE., *Diclofenac-induced fever*, Allergy 2000: 55:418-419.
9. ELISABETA IONESCUD, *Low-dose diclofenac potassium in the treatment of episodic tension-type headache*. European Journal of Pain 7 (2003) 155-162.
10. European Pharmacopoeia - Supplement 2001. p 715-715
11. FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ªed. São Paulo: Atheneu, 1988.
12. G. DORTA, M. NICOLET, D. VOUILLAMOZ, D. MARGALITH, E. SARAGA, H. BOUZOURENE, W. H. HÄCKI, M. STOLTE, A. L. BLUM & D. ARMSTRONG. *The effects of omeprazole on healing and appearance of small gastric and duodenal lesions during dosing with diclofenac in healthy subjects*. Aliment Pharmacol Ther, 2000; vol 14, p 535-541.
13. GARNER, A., *Adaptation in the pharmaceutical industry, with particular reference to gastrointestinal drugs and disease*, Scand. J. Gastroenterol., 1992, vol 27 (Suppl. 193), p 83.

14. GRANJEIRO, Jr. SEVERINO. *Desenvolvimento farmacotécnico, validação da metodologia analítica, estudo de estabilidade e equivalência farmacêutica da nevirapina*. 2002.100 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
15. ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use Q2A. "Text Validation of Analytical Procedures" Genebra, March 1995.
16. LACHMAN. H.A.; LIEBERMAN,H.A.;KANIG, J.L. *Teoria e Prática na Industria Farmacêutica*. Lisbos: Calouste Gulbekian, 2001. v 2.
17. LE HIR, A. *Noções de Farmácia galênica*, 6ªed. São Paulo: Organização Andrei, 1997, p.273-323.
18. MARZO A., DAL BO L., VERGA F., MONTI NC., ABBONDATI G., TETTAMANTI R.A., CRIVELLI F., UHR M.R., ISMAILI S., *Pharmacokinetics of diclofenac after oral administration of its potassium salt in sachet and tablets formulation*. *Arzneimittel - Forschung - Drug Research*, 2000, vol 50 Iss 1 pp 43-47.
19. MC NEELY W, GOA K.L, *Drugs* 57, Is 6, Jun 1999. p 991-1003.
20. MONTEIRO, D. B. *Tecnologia de obtenção de comprimidos revestidos de Lamivudina, transposição de escala, validação da metodologia analítica, estudo de estabilidade e equivalência farmacêutica*. 2000.145 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
21. PRISTA, L.N., ALVES, A. C., MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 4ªed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1997. v 1 p. 776.
22. PHYSICIANS' DESK REFERENCE®, 1997.
23. REINER V; REINER A; REINER G; CONTI M. *Increased absorption rate of diclofenac from fast acting formulations containing its potassium salt*. *Arzneimittel - Forschung - Drug Research*, 2001, vol 51 Iss 11 pp 885-890.
24. REMINGTON, et al. *Farmácia*. 17ªed. Panamericana, 1987, v2 p. 2178-2239.
25. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS.
26. Resolução RE nº 901, de 29 de maio de 2003, GUIA PARA ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO PARA FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS DE LIBERAÇÃO IMEDIATA (FFSOLI).
27. SMALL, R.E. *Diclofenac Sodium*, *Clinical Pharmacy*, Aug 1989, vol 8, Iss 8, p 545 - 558.

28. Skoutakis V.A., Carter C.A., Mickle T.R., et al. *Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent.* Drug Intell Clin Pharm 1988, 22, 850-59.
29. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 24ed. Rockville: The United Pharmacopeia Convencional, 2000.
30. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 25ed. Rockville: The United Pharmacopeia Convencional, 2001.
31. TOSHIO HIRAI, SHOZO MATSUMOTO, IKUO KISHI *Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction.* Journal of Chromatography B, 692 (1997) 375-388.
32. WADKE, D. A., SERAJUDIN, A.T. M., JACOBSON, H. *Preformulation testing.* In LIEBERMAN, H. A., LACHMAN, L., SCHWARTZ, J. B. (Ed) *Pharmaceutical dosage forms tablets*, New York: Marcel Dekker, 1989. v. 1, p – 1-73.
33. WELLS, JAMES I., *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances*, First published. England: Ellis Horwood Limited, 1988, p. 80-83; 215-217.

6.0 - ANEXOS

6.1 - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

As validações das metodologias analíticas desenvolvidas, para análise do diclofenaco de potássio, espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguiram as normas descritas na Resolução N° 899 da ANVISA e da USP 25<1225>. Dessa forma, foram avaliados os parâmetros de precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade, validados também, através da aplicação de testes estatísticos (comparação de médias, Análise de Variância (ANOVA) e planejamento fatorial).

6.1.1 - Avaliação da precisão do método por Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.

A precisão foi avaliada em três níveis: repetibilidade; precisão intermediária e reprodutibilidade.

a) Estudo da Repetibilidade

Foram preparadas seis amostras com 100% da concentração teste (10µg/mL). Os resultados se encontram na tabela 6, onde se pode observar que a variação dos resultados para concentração determinada foram menor que 5%, como especificado na Resolução n° 899.

Tabela 6: resultados obtidos com o ensaio de repetibilidade

Amostra	Diclofenaco ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	10,67
2	10,52
3	10,35
4	10,49
5	10,62
6	10,43
Média	10,52
Desvio Padrão	0,12
CV (%)	1,12

b) Estudo da Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos para análises realizadas em dias diferentes e diferentes analistas.

Comparando-se os valores de F_{tab} com F_{cal} , num nível de 95% de confiança. Foi observado que não houve diferença, na precisão entre analistas num mesmo dia, nem entre dias diferentes, bem como entre os valores médios (tabelas 7 e 8).

Foram utilizadas as equações abaixo para calcular o F (equação 5) e t equações (6 e 7).

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (5)$$

onde s é a variância do método/analista

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \quad (6)$$

onde \bar{X} é média dos resultados e n é o número de medidas realizadas; a equação (6) é usada após confirmada precisão igual, já a equação (7) é usada depois de verificada precisão diferente.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad (7)$$

Tabela 7: Resultados da aplicação do teste F para comparação da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2), nos dias 1 e 2 (D1 e D2).

Comparação	F_{cal}	F_{tab}	Diferença
A1 e A2 (D1)	1,93	5,19	Não
A1 e A2 (D2)	1,42	5,41	Não
D1 e D2 (A1)	3,00	5,05	Não
D1 e D2 (A2)	2,21	6,59	Não

Tabela 8: Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2), nos dias 1 e 2 (D1 e D2).

Comparação	t_{cal}	t_{tab}	Diferença
A1 e A2 (D1)	0,007	2,262	Não
A1 e A2 (D2)	1,28	2,306	Não
D1 e D2 (A1)	0,106	2,228	Não
D1 e D2 (A2)	1,423	2,365	Não

c) Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi estudada numa parceria entre o Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) e o Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC), sendo as amostras preparadas por diferentes analistas, seguindo-se as mesmas etapas em cada laboratório.

Os resultados podem ser observados nas tabelas 9 e 10. Através do teste F pode-se notar que houve diferença na precisão, com 95% de confiança. Esta se deve provavelmente ao desvio padrão muito pequeno obtido nas análises feitas no laboratório 2 (NCQMC) e ao fato de terem sido realizadas poucas repetições. Entretanto, não foi observada diferença com 95% de confiança entre os resultados médios. (tabela 16).

Tabela 9: Resultados da aplicação do teste F para reprodutibilidade, comparação entre laboratórios Laboratório 1 (Lab 1- NUDFAC) e Laboratório 2 (Lab 2- NCQMC)

Comparação	F_{cal}	F_{tab}	Diferença
Lab1 e Lab2	55,70	19,0	Sim

Tabela 10: Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações entre laboratórios.

Comparação	t_{cal}	t_{tab}	Diferença
Lab1 e Lab2	0,016	2,776	Não

6.1.2 - Avaliação da precisão do método espectrofotométrico

a) Estudo da Repetibilidade

Foram preparadas seis amostras com 100% da concentração teste (10 μ g/mL). Os resultados se encontram na tabela 11, onde se pode observar que a variação dos

resultados para concentração determinada foram menor que 5%, como especificado na Resolução n° 899.

Tabela 11: resultados obtidos com o ensaio de repetibilidade

Amostra	Diclofenaco ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	9,79
2	10,15
3	10,18
4	10,36
5	10,08
6	10,36
Média	10,15
Desvio Padrão	0,21
CV (%)	2,07

b) Estudo da Precisão Intermediária

A Precisão intermediária foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos para análises realizadas em dias diferentes e diferentes analistas.

Os resultados obtidos no estudo da precisão foram avaliados através da aplicação dos testes F (equação 5) e t (equação 6). Foi observado que não houve diferença, com 95% de confiança, entre os analistas e nem entre dias diferentes, como apresentado nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12: Resultados da aplicação do teste F para comparação da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2,) nos dias 1 e 2 (D1 e D2).

Comparação	F_{cal}	F_{tab}	Diferença
A1 e A2 (D1)			Não
A1 e A2 (D2)	1,12	6,39	Não
D1 e D2 (A1)	1,52	6,39	Não
D1 e D2 (A2)	17,40	19,25	Não

Tabela 13: Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações da precisão entre analistas 1 e 2 (A1 e A2), nos dias 1 e 2 (D1 e D2).

Comparação	t_{cal}	t_{tab}	Diferença
A1 e A2 (D1)			Não
A1 e A2 (D2)	1,387	2,306	Não
D1 e D2 (A1)	2,227	2,306	Não
D1 e D2 (A2)	0,788	2,447	Não

c) Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi estudada numa parceria entre o Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) e o LAFEPE – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, sendo as amostras preparadas por diferentes analistas, seguindo-se as mesmas etapas em cada laboratório.

Os resultados podem ser observados nas tabelas 14 e 15, através do teste F pode-se notar que não houve diferença na precisão, com 95% de confiança. E também, não foi observada diferença com 95% de confiança entre os resultados médios.

Tabela 14: Resultados da aplicação do teste F para reprodutibilidade, comparação entre laboratórios Laboratório 1 (Lab 1) e Laboratório 2 (Lab 2)

Comparação	F_{cal}	F_{tab}	Diferença
Lab1 e Lab2	8,71	19,0	Não

Tabela 15: Resultados da aplicação do teste t para comparação das médias das concentrações entre laboratórios.

Comparação	t_{cal}	t_{tab}	Diferença
Lab1 e Lab2	0,769	2,776	Não

6.2 – ANÁLISE DA MATÉRIA - PRIMA

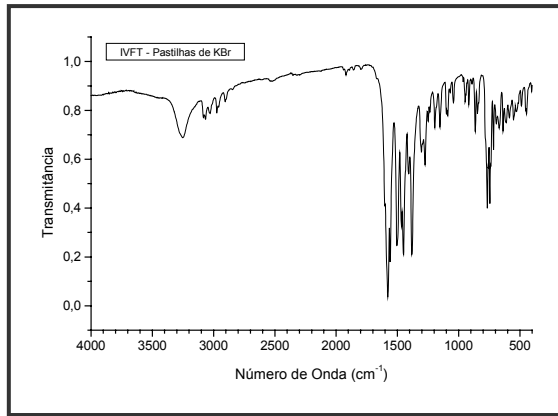
A matéria-prima usada para obtenção dos comprimidos foi obtida do fornecedor Pharma Nostra na quantidade de 0,5Kg de lote: 20011216-1.

O padrão secundário utilizado foi obtido da Nortec lote CPD – 0021 (15g).

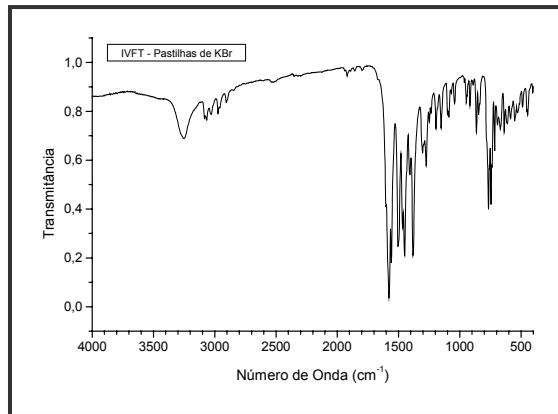
Os ensaios realizados para caracterização da matéria-prima foram: caracterização, solubilidade, perda por dessecação, identificação, aparência da solução e doseamento. Os resultados das análises estão apresentados na tabela 19 abaixo:

Tabela 16: Caracterização da matéria-prima

Ensaio	Especificação	Resultado
Caracterização	Pó cristalino branco ou ligeiramente amarelado, ligeiramente higroscópico	Pó cristalino branco
Solubilidade	Livremente solúvel em metanol e álcool, levemente solúvel em acetona e solúvel em água. Solubilizar 0,05g em 50ml	Insolúvel em éter, solúvel em água e acetona e facilmente solúvel em metanol e etanol
Perda por dessecação	Não mais que 0,5% determinado em 1,0g por secagem entre 100-105°C por 3 horas	0% em 3 horas
Identificação	Exame por absorção espectrofotométrica por infravermelho	Figura 2
Aparência da solução	Dissolver 1,25g em metanol e diluir para 25mL. A solução é límpida. A absorbância é medida em 440nm e não pode ser maior que 0,05.	0,04
Doseamento	Dissolver 250mg em 30 mL de ácido acético glacial. Titular com ácido perclórico 0,1M. Determinar o ponto final potenciometricamente. 1mL de ácido perclórico corresponde a 33,42mg de diclofenaco	101,19(%) Figura 3



2a



2b

Figura 2a (amostra) e 2b (padrão) – espectrofotometria por infravermelho

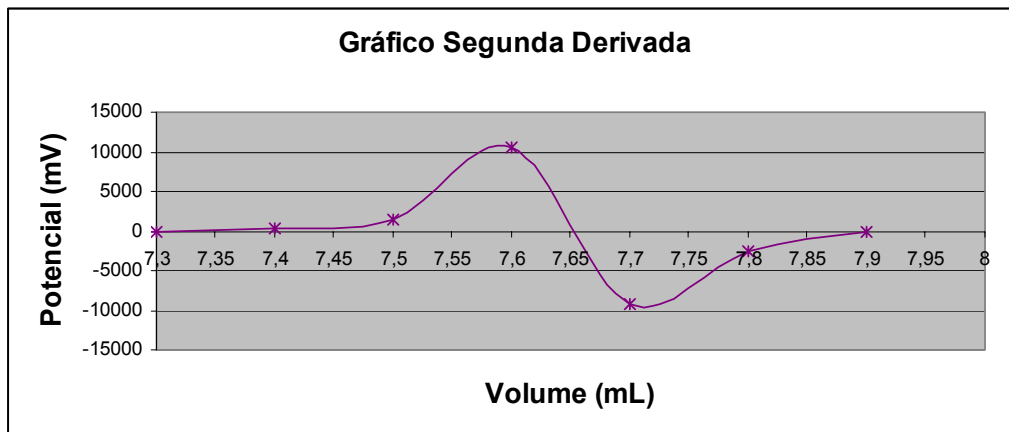


Figura 3 – Volume gasto na titulação potenciométrica