UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico

Fernando Armani Aguiar

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientado(a): Fernando Armani Aguiar

Orientador(a): Prof^a Dr^a Cristiane Masetto
de Gaitani

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Aguiar, Fernando Armani

Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico. Ribeirão Preto, 2009.
103 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador (a): Gaitani, Cristiane Masetto de.

1. Diclofenaco de sódio.
2. Polimorfismo.
3. CLAE.
4. Validação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Armani Aguiar

Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Cristiane Masetto de Gaitani

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus...

*Aos meus pais, Ademar Mendes e Elza Izabel, e
meus irmãos, Renato Armani Aguiar e Rafael Armani
Aguiar.*

*Aos meus avós, tios (as) e primos (as), por torcerem
por mim.*

*À prof^a Dr^a Cristiane Masetto de Gaitani por ter
confiado em mim.*

AGRADECIMENTOS

À **Profª Drª Cristiane Masetto de Gaitani**, pela orientação, apoio, amizade e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

À **Profª Drª Glória Emília Petto de Souza** e a **Profª Drª Pierina Sueli Bonato**, pelo apoio e contribuição em minha formação científica.

À toda **minha família** por torcer e sempre acreditar em mim.

Ao **Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira** e a **Profª Juliana Marchetti Maldonado**, pelo apoio e sugestões.

À **Profª Drª. Vera Lucia Lanchote**, por disponibilizar espaço físico para a realização de alguns experimentos.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP: **Alyne Fávero Galvão, Ellen Figueiredo, Erick Bertoldi, Ivelise Bajona, Joel Gonçalves, Luiz Fernando, Maíra Peres, Tatiana Ajimura, Thiago Hanna**, pela amizade e apoio em todos os momentos e pelas discussões científicas.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP: **Alexandre Kanashiro, Andréa Carla Pessini, Daniel Fraga, David do Carmo Malvar, Denis de Melo Soares, Juliano Manvailer Martins, Livia Harumi Yamashiro, Maria José Figueiredo, Renes de Resende Machado**, pelas alegrias, pela amizade, paciência e contribuição para o meu crescimento científico e humano.

A **todos** os pós-graduandos, alunos, funcionários e professores do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo apoio e amizade.

A **todos** os pós-graduandos, alunos, funcionários e professores do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, pelo apoio e amizade.

Aos **amigos** do laboratório de Cromatografia e Eletroforese Capilar, pelo convívio e amizade.

As funcionárias do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP: **Miriam Cristina Contin Melo, Juliana Aparecida Vercesi, Marlene Rodrigues da Silva, Maria Aparecida Rose da Silva, Mayara Gomes**, pelo suporte técnico e amizade.

Aos funcionários do Centro de Bioequivalência e Equivalência Farmacêutica da FCFRP-USP, **Adriana Rocha e Eduardo Tozatto**, pelo apoio e amizade.

Ao funcionário do Biotério da FCFRP-USP: **Reinaldo Fernando Batista**, pela atenção e amizade.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, pelo apoio constante.

A **todos os amigos das moradias da pós-graduação**, pela convivência, amizade e pelos momentos de alegria.

A **todos** que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao **CNPq** pelo suporte financeiro.

*"Ninguém poderá jamais aperfeiçoar-se, se não tiver o mundo como
mestre. A experiência se adquire na prática."*

(William Shakespeare)

RESUMO

AGUIAR, F. A. **Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil *in vitro* de dissolução e no efeito farmacológico.** 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2009.

Para se garantir a eficácia, a segurança e a qualidade de um produto farmacêutico é necessário o conhecimento das propriedades físicas e físico-químicas do fármaco e dos excipientes empregados nas formulações, bem como dos procedimentos relacionados aos processos de produção. Conhecer as propriedades do estado sólido é de fundamental importância e relevância na área farmacêutica uma vez que estas propriedades têm um impacto profundo sobre a solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade química dos fármacos. Os dados de difração de raio-X, ressonância quadrupolar nuclear, espectroscopia de infravermelho, análise térmica e microscopia foram usados para a caracterização e identificação das diferentes amostras de diclofenaco de sódio, duas comercializadas no Brasil (DPB1 e DPB3) e uma na Argentina (DPA2). Foi observada a presença das formas anidro, pentahidrato e “desconhecida” nas formulações comerciais DPB3, DPA2 e DPB1, respectivamente. A análise quantitativa do diclofenaco de sódio para os estudos *in vitro* de dissolução foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência empregando uma coluna de fase reversa C-18 e acetonitrila:ácido acético 0,7 mol/L (1:1, v/v) como fase móvel. No meio de dissolução composto por tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L, pH 6,8 foi observada uma dissolução de 100% para as três formulações de diclofenaco de sódio em 1 hora. Para o meio de dissolução composto por tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L, pH 4,5 a porcentagem do fármaco dissolvido foi de apenas 4% nas formulações avaliadas. Entretanto, diferenças na solubilidade entre as formulações avaliadas foram observadas, o que pode ser devido às diferenças na estrutura cristalina do diclofenaco de sódio. Também foram realizados estudos de dissolução apenas nas amostras anidro e hidrato, sem a interferência de revestimentos ou excipientes, nos meios de dissolução descritos acima e em solução de HCl 0,1 mol/L pH 1,2. Foi observado que a amostra anidra apresentou uma diferença estatisticamente significativa no perfil *in vitro* de dissolução comparada a forma hidratada em solução de pH 6,8. Para os demais valores de pH não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos perfis de dissolução. Também foi desenvolvido e validado um método para análise do diclofenaco de sódio em plasma, empregando a coluna RP-18 (125x4,6 mm, partículas de 5 µm) protegida por uma coluna de guarda RP-18 (4,0x4,0 mm) e fase móvel composta por acetonitrila:ácido acético 0,7 mol/L (1:1, v/v). Foi realizada a extração líquido-líquido como procedimento de preparação da amostra usando uma mistura de hexano:éter (1:1, v/v) como solvente extrator. O método foi validado avaliando os parâmetros linearidade, recuperação, precisão e exatidão, limite de quantificação e estabilidade. Todos os parâmetros avaliados apresentaram resultados adequados e aceitos pela literatura. Posteriormente, o método desenvolvido e validado foi aplicado em um estudo piloto para avaliar a concentração plasmática do diclofenaco de sódio em coelhos. Também foi avaliada a influência das diferentes formas cristalinas do diclofenaco de sódio na resposta febril induzida por LPS em coelhos. Neste estudo não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na redução da resposta febril para as diferentes amostras avaliadas.

Palavras-chave: Diclofenaco de sódio, polimorfismo, CLAE, validação.

ABSTRACT

AGUIAR, F. A. **Characterization of solid state properties of the diclofenac sodium and evaluation of these properties in the profile in vitro of dissolution and in the pharmacologic effect** (Master's Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2009.

To assure effectiveness, security and quality of pharmaceutical products, the knowledge of the physical and chemical-physical properties of the drugs and the excipients used in formulations are necessary, as well as the proceeding related to the production processes. To know the properties of the solid state is important and relevant in the pharmaceutical area because they have a deep impact on the solubility, bioavailability and chemical stability of the drugs. Data of X-ray diffraction, nuclear quadrupole resonance, infrared spectroscopy, thermal analysis and scanning electron microscopy have been used for the characterization and identification of the different samples of diclofenac sodium. The presence of anhydrous, pentahydrate and “unknown” forms were observed in commercial formulations DPB3, DPA2 and DPB1, respectively. Quantitative analysis of the diclofenac sodium for studies *in vitro* of dissolution was carried out by high performance liquid chromatography using the column reverse phase C-18 and acetonitrila:acetic acid 0,7 mol/L (1:1, v/v) as mobile phase. Release profiles *in vitro* of dissolution of commercial diclofenac sodium formulations were evaluated using different dissolution medium. In the phosphate buffer solution 0.2 mol/L pH 6.8, it was observed dissolution of 100% for the three formulations of diclofenac sodium in 1 hour while in the phosphate buffer solution 0.2 mol/L pH 4.5, the percentage of drug dissolved was only 4%. However, differences in the solubility between the formulations evaluated were observed, which can be due to the differences in the crystalline structure of diclofenac sodium. Dissolution studies in the samples anhydrous and hydrate were carried out, without the interference of coverings or excipients, in the dissolution medium described above and in the solution 0.1 HCl mol/L pH 1.2. It was observed that the anhydrous sample showed a significant statistical difference in the *in vitro* dissolution profile when compared with hydrate form (pH 6.8). For the others values of pH, significant statistical differences in the dissolution profiles were not observed. It was also developed and validated a method of analysis of diclofenac sodium in plasma using the column RP-18 (125x4.6mm, particle size 5 µm) protected by a column of guard RP-18 (4.0x4.0 mm) and acetonitrila:acetic acid 0,7 mol/L (1:1, v/v) as mobile phase. Sample preparation was performed by liquid–liquid extraction using hexano:ether as extracting solvent after acidification with 2.0 mol/L hydrochloric acid. The method was validated by evaluation of parameters such as linearity, recovery, precision and accuracy, limit of quantification and stability. All the evaluated parameters had presented results adequate and accepted in the literature. Subsequently, the developed and validated method was applied in a pilot study to evaluate the plasmatic concentration of the diclofenac sodium in rabbits. It was also evaluated the influence of the different crystalline forms of the diclofenac sodium in the LPS induced fever in rabbits. In this study no significant statistical difference was observed in the reduction of the febrile response within the different samples evaluated.

Keywords: Diclofenac sodium, polymorphism, HPLC, validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de: (a) reticulado cristalino; (b) célula unitária apresentando comprimentos axiais e ângulos inter-axiais.	3
Figura 2. Representação esquemática dos sistemas cristalinos fundamentais.	4
Figura 3. Representação esquemática da energia livre de Gibbs e Entalpia contra a temperatura absoluta, a pressão constante, para um sistema consistindo de dois polimorfos (1 e 2), T_t é a temperatura de transição e S é a entropia. (adaptado de Grant, 1999).	6
Figura 4. Estrutura química do diclofenaco de sódio.	16
Figura 5. Estrutura do diclofenaco de sódio, seus metabólitos e enzimas que participam do metabolismo (adaptado de Naisbitt et al., 2007).	17
Figura 6. Procedimento de extração do diclofenaco de sódio em amostras de plasma.	31
Figura 7. Espectros de difração de Raio-X dos padrões anidro e pentahidrato de diclofenaco de sódio e das formulações comerciais de comprimidos (DPA2, DPB1 e DPB3). ...	40
Figura 8. Espectros de RQN dos padrões anidro e pentahidrato de diclofenaco de sódio e das formulações comerciais (DPA2, DPB1 e DPB3).	42
Figura 9. Perfil termogravimétrico das diferentes amostras de DS (taxa de aquecimento de 10 °C/min.).	43
Figura 10. Curvas de CDE das diferentes amostras de DS (taxa de aquecimento de 10 °C/min., vazão de N ₂ de 50 mL/min.).	44
Figura 11. Espectro de infravermelho: DS hidrato (A), DS anidro (B).	46
Figura 12. Micrografias do MEV: DS anidro (A e B); DS hidrato (C e D).	47
Figura 13. Efeito da proporção de acetonitrila no fator de retenção do diclofenaco de sódio.	49
Figura 14. Cromatograma referente à análise do diclofenaco de sódio. Condições cromatográficas: Coluna C-18 (250 x 4,6 mm d.i.), Fase móvel: acetonitrila: ácido acético 0,7 mol/L pH 2,5 (1:1, v/v), Vazão: 1,6 mL/min., λ : 282 nm.	49
Figura 15. Gráfico da curva de calibração para análise do diclofenaco de sódio no intervalo de concentração de 10-200 µg/mL, referente à linearidade. Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 14, análises em triplicata.	50
Figura 16. Gráfico da curva de calibração para análise do diclofenaco de sódio no intervalo de concentração de 0,2-80 µg/mL, referente à linearidade. Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 14. Análises em triplicata.	51

- Figura 17.** Avaliação do perfil de dissolução de diferentes formulações de comprimidos de diclofenaco de sódio (DS) em meio de dissolução tampão fosfato de sódio pH 6,8. DPA2 – pentahidrato; DPB1 – desconhecida e DPB3 – anidra. 51
- Figura 18.** Avaliação do perfil de dissolução de diferentes formulações de comprimidos de diclofenaco de sódio (DS) em meio de dissolução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 4,5. DPA2 – pentahidrato; DPB1 – desconhecida e DPB3 – anidra. 52
- Figura 19.** Perfil de dissolução das amostras DSA e DSH. (velocidade de agitação de 50 rpm, temp. 37 ± 0.2 °C). (* $p < 0,05$). 53
- Figura 20.** Seleção do solvente orgânico para extração do diclofenaco de sódio. Condições de análise: tempo de agitação (30 minutos); volume de HCl (300 µL); volume de solvente utilizado (4 mL); concentração das amostras (DS – 2 µg/mL; PI – 10 µg/mL); análises em duplicata. 55
- Figura 21.** Efeito da eficiência de extração do diclofenaco de sódio e padrão interno com diferentes volumes de HCl 2,0 mol/L. Condições de extração: tempo de agitação (30 minutos); volume de solvente (hexano:éter – 1:1) utilizado (4 mL); concentração das amostras (DS – 2 µg/mL; PI – 2 µg/mL); análises em duplicata. 56
- Figura 22.** Estruturas do ibuprofeno, salbutamol e fenopropeno, testados para ser utilizados como padrão interno (* indica centro quiral). 58
- Figura 23.** Cromatograma referente a uma amostra de plasma branco de coelho. Condições cromatográficas: coluna RP-18 LichroCART® - 125-4 (125x4,6 mm), coluna guarda RP-18, fase móvel: acetonitrila:ácido acético 0,7 mol/L, pH = 2,5, vazão de 1,0 mL/min, $\lambda = 282\text{nm}$ 59
- Figura 24.** Cromatograma referente a um branco de plasma humano. Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 23. 59
- Figura 25.** Cromatograma referente a plasma humano fortificado com 500 ng/mL de diclofenaco de sódio (DS) e 10 µg/mL de fenopropeno (padrão interno - PI). Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 23. 59
- Figura 26.** Curva de calibração para análise do diclofenaco de sódio no intervalo de concentração plasmática de 0,1 - 60 µg/mL, referente à linearidade. 60
- Figura 27.** Estabilidade do diclofenaco de sódio, contemplando duas concentrações (1 e 50 µg/mL), após ciclo de congelamento/descongelamento (AC_{CD}), estabilidade de curta duração ($AT_{amb. - 12h}$), estabilidade de longa duração ($AE_{LD - 7^\circ \text{dia}}$), comparada com as amostra frescas (AF-1, AF-2 e AF-3) e amostra da estabilidade de longa duração colhida no primeiro dia ($AE_{LD - 1^\circ \text{dia}}$). Análise realizada pelo teste t-Student com nível de significância de 5%. 66
- Figura 28.** Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ e.p.m.) versus tempo de coleta referente à análise das amostras de plasma de coelhos, após dose oral única de DSA e DSH (12 mg/kg; n = 2). 67

Figura 29. Efeito das diferentes amostras de DS sobre a resposta febril induzida por LPS. Diclofenaco de sódio anidro (DSA) e/ou hidrato (DSH), na dose única de 8 mg/mL, ou placebo (cápsulas vazias) foram administrados por via oral 60 minutos após a aplicação do estímulo pirogênio (LPS – 0,1 µg/kg i.v.) ou salina no volume de 0,5 mL (i.v.). Os animais controle receberam salina e não apresentaram alteração na temperatura basal. Os valores representam a média ± e.p.m. das variações de temperatura de 4 a 5 animais por grupo. A temperatura basal estava entre 38,6 e 39,4 °C. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 comparado com grupo LPS/H₂O. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Polimorfismo e solvatomorfismo em fármacos	9
Tabela 2. Diferentes formas de hidratos do Diclofenaco de Sódio encontradas na literatura.	18
Tabela 3. Métodos para determinação do Diclofenaco de Sódio em material biológico.	20
Tabela 4. Fases móveis utilizadas para análise do diclofenaco de sódio.....	26
Tabela 5. Caracterização das diferentes amostras de diclofenaco por RQN	41
Tabela 6. Procedimento otimizado para extração líquido-líquido.....	57
Tabela 7. Recuperação do diclofenaco de sódio.....	61
Tabela 8. Precisão intra e inter-ensaios para análise do diclofenaco de sódio	63
Tabela 9. Exatidão intra e inter-ensaios para análise do diclofenaco de sódio.....	64
Tabela 10. Limite de quantificação para análise do diclofenaco de sódio	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP- 1	Proteína ativadora 1
cAMP	Adenosina mono fosfatada cíclico
C-Cl	Ligação entre átomo de carbono e cloro
CDE	Calorimetria diferencial exploratória
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DPB1	Diclofenaco de sódio produzido no Brasil – amostra 1
DPB3	Diclofenaco de sódio produzido no Brasil – amostra 3
DPA2	Diclofenaco de sódio produzido na Argentina – amostra 2
DPR	Desvio padrão relativo
DRX	Difração de Raio-X
DS	Diclofenaco de sódio
DSA	Diclofenaco de sódio anidro
DSH	Diclofenaco de sódio hidratado
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
FDA	Food And Drug Administration
HIV-1	Protease-1 do vírus da imunodeficiência adquirida
IL	Interleucina

LPS	Lipopolissacarídeo
LQ	Limite de quantificação
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear- κ B
PE	Pirogênio endógeno
PI	Padrão interno
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RQN	Ressonância Quadrupolar Nuclear
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

$a, b \text{ e } c$	Arestas da célula unitária
$\alpha, \beta \text{ e } \gamma$	Ângulos existentes entre os vértices da célula unitária
λ	Comprimento de onda
θ	Ângulo de incidência de um feixe monocromático
Σ	Somatório
H	Entalpia - grandeza física que descreve a energia interna total de um sistema
k	Fator de retenção
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs - mede o trabalho útil que se obtém num sistema isotérmico e isobárico.
r^2	Coefficiente de correlação ou regressão
s	Desvio padrão
S	Entropia - grandeza física que mede a parte da energia que não pode ser transformada em trabalho

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VII
LISTA DE SÍMBOLOS	IX
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1. POLIMORFISMO	2
1.1.1. Termodinâmica e Cinética no Polimorfismo.....	5
1.1.2. Polimorfismo na Indústria Farmacêutica	8
1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFOS.....	10
1.2.1. Difração de Raio-X	10
1.2.2. Ressonância Quadrupolar Nuclear (RQN).....	12
1.2.3. Técnicas Térmicas de Análise.....	13
1.2.4. Espectroscopia de Infravermelho	14
1.2.5. Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura	15
1.3. DICLOFENACO DE SÓDIO	15
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. OBTENÇÃO DAS FORMAS CRISTALINAS DO DICLOFENACO DE SÓDIO	22
3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO	22
3.2.1. Amostras de comprimidos de diclofenaco de sódio.....	22
3.2.2. Difração de Raio-X	22
3.2.3. Ressonância Quadrupolar Nuclear (RQN).....	23
3.2.4. Análise Térmica	23
3.2.5. Espectroscopia de Infravermelho	24
3.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	24
3.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL IN VITRO DE DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO	24

3.3.1.	Equipamentos	24
3.3.2.	Reagentes e solventes	25
3.3.3.	Soluções-padrão	25
3.3.4.	Coluna cromatográfica	25
3.3.5.	Separação cromatográfica	26
3.3.6.	Perfil in vitro de dissolução do diclofenaco de sódio.....	27
3.4.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DO DICLOFENACO DE SÓDIO EM PLASMA	28
3.4.1.	Equipamentos	28
3.4.2.	Reagentes e solventes	28
3.4.3.	Soluções-padrão	28
3.4.4.	Coluna e condições cromatográficas	29
3.4.5.	Plasmas	29
3.4.6.	Animais	29
3.4.7.	Seleção do Padrão Interno	29
3.4.8.	Procedimento de preparação da amostra	30
3.5.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	31
3.5.1.	Curva Analítica e Linearidade.....	32
3.5.2.	Recuperação	32
3.5.3.	Precisão e Exatidão	33
3.5.4.	Limite de Quantificação (LQ)	34
3.5.5.	Estudo de estabilidade	35
3.6.	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	36
3.6.1.	Protocolo experimental em coelhos	36
3.7.	AVALIAÇÃO NO EFEITO ANTIPIRÉTICO	36
3.7.1.	Esterilização	37
3.7.2.	Administração do estímulo pirogênio	37
3.7.3.	Administração dos fármacos antipiréticos	37
3.7.4.	Determinação da variação da temperatura corporal	37
3.7.5.	Análise estatística	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO	39
4.1.1.	Difração de Raio-X	39
4.1.2.	Ressonância Quadrupolar Nuclear (RQN)	40
4.1.3.	Técnicas Térmicas de Análise	43

4.1.4.	Espectroscopia de Infravermelho	45
4.1.5.	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	47
4.2.	AVALIAÇÃO DO PERFIL IN VITRO DE DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO	48
4.2.1.	Análise cromatográfica.....	48
4.2.2.	Perfil in vitro de dissolução das amostras diclofenaco de sódio	50
4.3.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DO DICLOFENACO DE SÓDIO EM PLASMA	54
4.3.1.	Procedimento de preparação da amostra	54
4.4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	59
4.4.1.	Linearidade.....	60
4.4.2.	Recuperação	61
4.4.3.	Precisão e Exatidão	62
4.4.4.	Limite de Quantificação	64
4.4.5.	Estudo de estabilidade.....	65
4.5.	APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO	66
4.6.	EFEITO DAS DIFERENTES AMOSTRAS DE DS NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS	67
5.	CONCLUSÃO.....	69
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
7.	ANEXO.....	84
7.1.	CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	84

1- INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica implica em vários passos, objetivando-se a criação de um sistema físico que contenha a substância ativa e os requisitos de qualidade que assegurem a sua eficácia e a segurança.

Muito embora novas formas farmacêuticas continuem a ser desenvolvidas, muitos fármacos ainda são administrados na forma sólida (BRITAIN, 1997), devido à conveniência e estabilidade, confiabilidade à dose veiculada, proteção ao fármaco e melhor aceitação pelo paciente. (DE CASTRO et al., 2006).

Nos últimos anos, houve muitas discussões e investigações científicas relacionadas à determinação da equivalência farmacêutica. Ficou bem estabelecido que a velocidade e a extensão com que o fármaco torna-se disponível para a absorção, depende, em grande parte, das matérias-primas utilizadas e também do método de obtenção.

Matérias-primas de origem nacional ou importada são utilizadas e, apesar da sua pureza química ser aceitável, frequentemente as matérias-primas apresentam diferenças de características no estado sólido (polimorfismo, tamanho de partículas, hábitos cristalinos, etc.). Características que podem afetar a estabilidade ou a disponibilidade da forma sólida do fármaco devem ser monitoradas e controladas, assim, a caracterização física dos sólidos tem se tornado uma área extremamente importante na indústria farmacêutica (BRITAIN, 1997; HUANG; TONG, 2004).

Aspectos como a biodisponibilidade, solubilidade, procedimentos farmacotécnicos e condições de administração estão intimamente relacionados às propriedades químicas e físico-químicas dos fármacos no estado sólido (CUFFINI et al., 2001a, b). As propriedades físico-químicas dos princípios ativos constituem, sem dúvida, um elemento essencial no desenvolvimento de formulações farmacêuticas destinadas à administração por via oral (DRESSMAN et al., 1998). A absorção gastrointestinal está relacionada à solubilidade, ao caráter ácido/base do fármaco e à sua permeabilidade através de membranas biológicas (ZHAO; ABRAHAM; LEE, 2002), o que irá determinar a biodisponibilidade de uma determinada substância.

De acordo com o exposto acima, a grande importância do controle das características do estado sólido dos fármacos, como o polimorfismo, no desenvolvimento de fármacos está principalmente relacionada às diferenças significativas que podem ser geradas na solubilidade, na processabilidade e na estabilidade física e química. Estas diferenças poderão

modificar o comportamento da molécula quanto ao meio biológico, podendo afetar diretamente a biodistribuição e, portanto, sua eficácia.

1.1. POLIMORFISMO

Um dos aspectos mais importantes do desenvolvimento de formas farmacêutica no estado sólido diz respeito ao estado físico do princípio ativo, já que tem sido amplamente demonstrado que muitos fármacos podem apresentar uma ou mais formas cristalinas (BRITTAİN, 2008; VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001).

A propriedade de um sólido cristalino (substância pura) existir em uma ou mais formas cristalinas com diferentes arranjos e/ou conformações da molécula na rede cristalina é definido como polimorfismo (BRITTAİN, 1997; RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004; VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001).

O termo polimorfismo é usado para designar sistemas cristalinos para o qual uma substância pode existir em estruturas caracterizadas por diferentes unidades de célula, em que cada forma consiste, exatamente, na mesma composição elementar (BRITTAİN, 2007, 2008). O termo solvatomorfismo é utilizado para descrever outras variações do cristal, em que a estrutura do cristal de uma substância difere da composição elementar através da inclusão de uma ou mais moléculas de solvente, que ocupam posições definidas na estrutura, não ligado a rede cristalina, mas ocupando espaços de cavidades e/ou falhas, no interior do cristal (BRITTAİN, 1999, 2008; VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001).

Se a molécula de solvente que ocupa tal posição for a água, este solvatomorfismo é conhecido como hidrato. Quando o hidrato, na forma sólida, é dissolvido na água, a interação que ocorre na fase cristalina reduz a quantidade de energia liberada. Como consequência, cristais hidratados podem apresentar solubilidade menor que suas formas sólidas não hidratadas, podendo levar a uma precipitação do fármaco em solução (AULTON, 2005).

Quando o solvente incorporado não é a água, o solvatomorfismo passa a ser chamado de solvato (BRITTAİN, 1997; VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001). A utilização de solvatos, de um modo geral, é indesejável, pois a presença de vapores orgânicos pode ser vista como impureza e, caso esses vapores forem tóxicos, a substância não será apropriada para uso farmacêutico.

Os compostos amorfos são formas sólidas que não possuem uma cadeia molecular ordenada longa, ou seja, são sólidos com arranjos desordenados das moléculas sem distinção

da rede cristalina, conseqüentemente possuem cristalinidade zero (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

A perspectiva estrutural da rede cristalina está baseada na extensão pela qual as redes moleculares estão ordenadas, de forma que os cristais dos polimorfos sejam construídos, no espaço, por padrões de repetição de unidades idênticas com uma dada periodicidade. Neste caso, a estrutura pode ser descrita em termos de um simples reticulado, enquanto que os amorfos possuem junções moleculares locais e não apresentam cadeia longa ordenada. Assim amorfos e cristais dividem as mesmas forças moleculares, embora os amorfos exibam junções moleculares em que falta periodicidade (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004). O menor grupamento de átomos representativo de uma determinada estrutura cristalina específica é a célula unitária (NETZ; ORTEGA, 2002¹ apud BRANDÃO, 2006).

A célula unitária tem uma orientação e forma definida pelos vetores translacionais a , b e c , e, portanto, possuem um volume V definido, que contem átomos e moléculas necessárias para formarem o cristal (figura 1).

Figura 1. Representação esquemática de: (a) reticulado cristalino; (b) célula unitária apresentando comprimentos axiais e ângulos inter-axiais. (<http://br.geocities.com>)

Cada cristal pode ser classificado como um dos sete possíveis sistemas cristalinos ou classe de cristal (cúbica, tetragonal, ortorrômbica, romboédrica (ou trigonal), hexagonal, monoclinica e triclínica) (figura 2), as quais são definidas pela relação entre as dimensões

¹ Netz, P. A., Ortega, G. G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas.** Artmed. Porto Alegre: 2002;

individuais, ou parâmetros de rede, a , b e c , da célula unitária e entre os ângulos individuais, α , β e γ , que são os três ângulos existentes em um vértice da célula (BRANDÃO, 2006; VIPPAGUNTA; BRITTAIN; GRANT, 2001).

Figura 2. Representação esquemática dos sistemas cristalinos fundamentais.

Os cristais de uma substância podem variar em tamanho, desenvolvimento relativo de uma dada face e no número e tipo de faces (formas) presentes; isto é, os cristais podem apresentar diferentes hábitos cristalinos.

O hábito cristalino é a descrição da aparência externa do cristal desenvolvida sob certas condições de cristalização. A formação das faces de um cristal depende da estrutura atômica interna e da interação da superfície do cristal com outras moléculas durante o crescimento. O hábito cristalino pode corresponder a uma forma simples (ex. octaedro) ou pode ser uma combinação de formas (ex. prisma + pirâmide). Existem vários fatores que determinam o hábito e crescimento de um cristal como, a natureza da solução onde o cristal cresceu, as condições de temperatura e pressão em que a cristalização ocorreu, etc. (GLUSKER; LEWIS; ROSSI, 1994; RASENACK; MÜLLER, 2002).

Embora possa não haver diferenças significativas na biodisponibilidade dos fármacos de diferentes hábitos, a importância refere-se do ponto de vista tecnológico, como a influência na compressão de comprimidos durante a produção (BRANDÃO, 2006; GAREKANI et al., 1999; RASENACK; MÜLLER, 2002). A agregação de cristais da mesma espécie resulta geralmente em hábitos característicos, tais como: foliáceo, acicular, fibroso, radiado, granular,

tabular, dentrítico, lamelar, prismático, entre outros (BRANDÃO, 2006; GLUSKER; LEWIS; ROSSI, 1994).

1.1.1. Termodinâmica e Cinética no Polimorfismo

Quando um composto existe em várias formas cristalinas no estado sólido, dois pontos devem ser considerados: (1) qual é a sua relativa estabilidade termodinâmica ou as condições e direção na qual a transformação pode ocorrer e (2) quanto demorará a alcançar o equilíbrio (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

Por se originarem de diferentes arranjos moleculares ou reticulados iônicos, os polimorfos apresentam diferentes energias de interação no estado sólido sob um dado conjunto de condições (usualmente condições ambientais) e, termodinamicamente, o polimorfo com a mais alta energia potencial converterá, mais cedo ou mais tarde, naquele com uma energia potencial mais baixa (GRANT, 1999).

Termodinamicamente a ausência de energia de estabilização da rede provoca um aumento na energia molar e/ou entalpia (H), da entropia (S) das formas amorfas em relação às formas cristalinas, levando assim a uma menor estabilidade e maior reatividade da forma amorfa, indicando que a energia livre de Gibbs (ΔG) excede a dos sólidos cristalinos (GRANT, 1999).

A relativa estabilidade termodinâmica dos sólidos e a direção da força para uma transformação entre a forma, à temperatura e pressão constantes, é determinada pela diferença na energia livre de Gibbs, e é dada por:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

em que ΔH é a diferença de entalpia entre as formas e reflete a diferença de energia entre as formas estruturais; ΔS é a diferença de entropia, que está relacionada com a desordem da rede cristalina e T é a temperatura em escala absoluta Kelvin (K) (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

As condições termodinâmicas para equilíbrio entre fases e possível direção de transformação à pressão constante para dois diferentes polimorfos é apresentado na figura 3, em que a estabilidade relativa é dada pelo sinal algébrico de ΔG , em que:

- $\Delta G < 0$, a transformação pode ocorrer naturalmente e a mudança tem o potencial de ocorrer até que a energia livre do sistema diminua;
- $\Delta G = 0$, sistema em equilíbrio com respeito à transformação e a energia livre dos dois polimorfos é a mesma;
- $\Delta G > 0$, quando a energia livre aumenta e não é possível a transformação sob as condições especificadas (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

Figura 3. Representação esquemática da energia livre de Gibbs e Entalpia contra a temperatura absoluta, a pressão constante, para um sistema consistindo de dois polimorfos (1 e 2), T_t é a temperatura de transição e S é a entropia. (adaptado de Grant, 1999).

Cineticamente, contudo, a taxa de conversão é variável e pode ser afetada por muitos fatores. Segundo a lei Arrhenius, a taxa de conversão é determinada pela magnitude da energia de ativação, que é essencialmente a barreira de energia entre os dois polimorfos. Contudo, quanto mais alta a barreira de energia e mais baixa a temperatura de armazenamento, mais lentamente se dará a conversão (GIRON, 2005² apud CUI, 2007, p. 9). Uma implicação da cinética de conversão variável do polimorfo é a incerteza associada com a procura dos potenciais polimorfos, em particular, o polimorfo termodinamicamente mais estável (CUI, 2007). No entanto, fases metaestáveis ou amorfas podem ser usadas devido às suas melhores características de solubilidade (GRANT & BYRN, 2004).

Está claro que os polimorfos ocupam diferentes níveis de energia em diferentes coordenações moleculares. Isto acontece quando um tipo de molécula pode ficar em múltiplas coordenações e cada uma das moléculas pode se arranjar em uma unidade de célula diferente

² Giron, D. Polymorphs: thermodynamic and kinetic factors to be considered in chemical development. Part I. *American Pharmacy*, 2005, Rev. 8, 32-37.

(inclusive diferentes dimensões do mesmo tipo de unidade de célula). Todas essas unidades de células podem propagar continuamente em três dimensões, por isso há formação de múltiplas formas cristalinas com níveis de energia diferentes, formando os diferentes polimorfos. Por outro lado, para algumas moléculas só pode haver uma coordenação que permite que ela se encaixe em um dos 14 tipos de células de unidade. Nesses casos, só um estado cristalino pode ser produzido. Assim é fácil entender que o fenômeno do polimorfismo é composto dependente, pois a energia é específica para cada composto (CUI, 2007).

Por causa de suas diferenças estruturais, os polimorfos podem ter diferentes propriedades no estado sólido, tais como: densidade, cor, índice de refração, solubilidade, taxa de dissolução, higroscopicidade, propriedades físicas, propriedades elétricas, termodinâmicas, interfaciais e propriedades mecânicas (GRANT, 1999; VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001). Deste modo, na área farmacêutica, a verificação de alterações na solubilidade de um fármaco pode indicar a existência de polimorfos, e deve ser investigado em função das modificações que possam ocorrer em sua cinética de dissolução e biodisponibilidade (STORPIRTIS, 1999).

Devido à mobilidade molecular, a maioria das reações de degradação acontece em solução. Entretanto, é muito importante o controle das formas no estado sólido durante os vários estágios de desenvolvimento e produção de medicamentos. Interconversão polimórfica, desolvatação de solvatos, formação de hidratos e mudanças no grau de cristalinidade podem alterar a biodisponibilidade de fármacos (NERURKAR, 2000³ apud VIPPAGUNTA; BRITTAİN; GRANT, 2001, p. 5). Vários processos farmacêuticos influenciam significativamente a forma cristalina final do fármaco no medicamento. Processos como liofilização e “spray drying” podem levar a formação de amorfos os quais tendem a ser menos estáveis e mais higroscópicos do que a forma cristalina. Também são descritos que processos como secagem, granulação via úmida e compactação aceleram a transição de fase em sólidos e que o grau desta transição depende da relativa estabilidade da fase em questão e do processo aplicado (BRITTAİN; FIESE, 1999), a moagem normalmente faz o material ficar mais amorfo e também pode modificar a forma polimórfica do material (KARJALAINEN et al., 2005).

---

³ Nerurkar M.J., Duddu S., Grant D.J.W., Rytting J.H., Properties of solids that affect transport, in: G.L. Amidon, P.I. Lee, E.M. Topp (Eds.), **Transport Processes in Pharmaceutical Systems**, Vol. 102, Marcel Dekker, New York, 2000, p. 575–611.

1.1.2. Polimorfismo na Indústria Farmacêutica

A ocorrência de polimorfismo entre as substâncias orgânicas é bastante comum. Deste modo, na área farmacêutica, a verificação de alterações na solubilidade de um fármaco pode indicar a existência de polimorfos, e deve ser investigado em função das modificações que possam ocorrer em sua cinética de dissolução e biodisponibilidade (STORPIRTIS, 1999).

Sendo assim, na indústria farmacêutica, o polimorfismo é considerado um parâmetro de grande importância na fabricação de um medicamento. A obtenção de um fármaco sob uma ou outra forma cristalina implica nas propriedades físico-químicas desta substância, as quais irão afetar diretamente o processamento do medicamento. Além disso, a utilização de formas cristalinas diferentes pode influenciar a biodisponibilidade e a estabilidade física e química do ativo, levando a problemas no desenvolvimento e estabilidade da forma farmacêutica.

Devido ao grande impacto que pode ser gerado na vida da sociedade e na economia das indústrias farmacêuticas, a pesquisa na área de polimorfismo é intensa e bem atual, visto que, fármacos antigos podem apresentar novas formas cristalinas ainda desconhecidas podendo levar a ineficácia de seus efeitos farmacológicos.

O ritanovir, um inibidor de HIV-1 protease, é um exemplo recente do impacto do polimorfismo sobre a solubilidade e taxa de dissolução. Uma nova forma termodinamicamente estável, Forma II, foi descoberta dois anos após o lançamento do produto usando a Forma I. As duas formas cristalinas diferem substancialmente nas suas propriedades físicas como solubilidade e taxa de dissolução, sendo a Forma II menos solúvel que a Forma I. Devido a essas diferenças na solubilidade dos polimorfos, a dose do medicamento que possuía a Forma II deveria ser adequada para atingir o valor de concentração plasmática desejado. Por esta razão o laboratório Norvir Abbott não teve outra opção senão retirar do mercado todos os medicamentos já produzidos tendo, assim, um prejuízo de, aproximadamente, U\$250,000,000.00. (CHEMBURKAR et al., 1998).

A tabela 1 sumariza alguns dos casos de polimorfismo e solvatomorfismo de fármacos que foram encontrados na literatura.

Tabela 1. Polimorfismo e solvatomorfismo em fármacos

Fármaco	Classe Terapêutica	Observações	Referências
Claritromicina	Antibiótico	Processo de conversão da forma I na forma II e preparação da forma II.	Lifshitz et al., 2006
Atorvastatina	Inibidor da HMG-CoA Redutase	Novas formas polimórficas V, VI, VII VIII, IX, X, XI e XII, preparação da forma amorfa.	Byrn et al., 2006; Lidor-Hadas et al., 2006
Rifaximina	Antibiótico	Formas polimórficas cristalinas α e β , e forma de baixa cristalinidade.	Viscomi et al., 2006
Cloridrato de Venlafaxina	Antidepressivo	Formas polimórficas A, B e D, e processo de obtenção	Van der Shaaf et al., 2006
Olanzapina	Antipsicótico	Formas polimórficas III, IV e V.	Hamied et al., 2006
Fluconazol	Antifúngico	Novo processo de obtenção da forma monohidrato. Formas polimórficas I e II.	Kreidl et al., 2006
Nateglinida	Usado no tratamento da Diabetes Tipo 2	Formas polimórficas D, F, G, I, O e T; e processos para suas obtenções.	Yahalomi et al., 2006
Cloridrato de Sertralina	Antidepressivo	Formas polimórficas I, II e V.	Laitinen I., 2006
Mesilato de Imatinibe	Antitumorigênico - tratamento da Leucemia Mielóide Crônica	Fomas H-1, definida por DRX.	Phartasaradhi et al., 2007
Paracetamol	Analgésico	Formas polimórficas I e II.	Yu et al, 2000;
Sulfatiazol	Antibacteriano	Formas polimórficas I, II, II e IV.	Blagden N. et al, 1998.
Carbamazepina	Antiepilético (Estabilizador de Humor)	Formas Cristalinas α , β , γ e forma de Solvato (acetona) e Dihidrato.	Murphy D. et al, 2002
Benzocaina	Anestésico Local	Formas polimórficas I e II.	Schmidt A.C., 2005
Pravastatina Sódica	Inibidor da HMG-CoA Redutase	Formas polimórficas A, D e E.	Martín-Islán A.P. et al, 2006

A pesquisa do polimorfismo em fármacos é, portanto, um dos principais parâmetros a ser considerado antes da produção de um fármaco, pois o desconhecimento de diferentes formas cristalinas pode influenciar no preparo do mesmo e levar a danos à saúde da população e prejuízos financeiros a seus fabricantes.

1.2. TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPREGADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFOS

A caracterização completa de um fármaco e de sua estrutura cristalina tem se tornado, atualmente, uma área de intensa atividade de pesquisa na indústria farmacêutica (CUFFINI et al., 2001a). Isto ocorre, em parte, pelas exigências necessárias para a aquisição de patentes e registros, e visando atender aos regulamentos do FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1998) para a aprovação de novos produtos para o mercado (HARRIS; TREMAYNE; KARIUKI, 2001).

O polimorfismo pode ser evidenciado usando uma variedade de técnicas experimentais, variando da microscopia óptica até as técnicas mais sofisticadas de análise, tais como: calorimetria diferencial exploratória (CDE), difração de raio-X (DRX), difração de cristal único, infravermelho, espectroscopia de Raman e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (DE ARMAS et al., 2007). Apesar do fato de algumas das técnicas acima mencionadas poderem, em princípio, ser usadas para detectar polimorfismo, a existência do polimorfismo (ou formação de solvato) é definitivamente estabelecida por DRX, pois esta possibilita identificar a correta fase cristalina e determinar, quando possível, a estrutura cristalina em três dimensões (BRITTAİN, 1997; DE ARMAS et al., 2007). Técnicas espectrais e termo-analíticas devem ser consideradas como informações de suporte e auxiliar, não podendo ser individualmente empregados como prova definitiva da existência de polimorfismo (BRITTAİN, 1997).

1.2.1. Difração de Raio-X

A difração de raios-X (DRX) é uma técnica largamente mencionada na literatura para a caracterização da estrutura de materiais, identificação de substâncias, identificação de fase, aplicação no controle de qualidade (análises quali e quantitativas) e caracterização de amostras policristalinas (BARTOLOMEI et al., 2006, 2007; MAURIN et al., 2002; SUN; GRANT, 2001; VARIANKAVAL; JACOB; DINH, 2000). Esta técnica permite a identificação e descrição precisa de substâncias cristalinas, como pode ser demonstrada conforme estudos realizados por Marona, Storti e Neto (2004) que determinaram a estrutura cristalina da flutamida.

A DRX representa um fenômeno de interação entre o feixe de raios-X incidente e os elétrons dos átomos componentes de um material, relacionado ao espalhamento coerente. A

técnica consiste na incidência da radiação em uma amostra e na detecção de feixes de fótons difratados. Em um material onde os átomos estejam arrançados periodicamente no espaço, característica das estruturas cristalinas, o fenômeno da difração de raios-X ocorre nas direções de espalhamento que satisfazem a Lei de Bragg (equação 2). Admitindo que um feixe monocromático de determinado comprimento de onda (λ) incida sobre um cristal a um ângulo θ , chamado de ângulo de Bragg, tem-se:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad (2)$$

em que, θ corresponde ao ângulo medido entre o feixe incidente e determinados planos do cristal, “d” é a distância entre os planos de átomos e “n” a ordem de difração. Quando este feixe de elétrons choca-se com o material-alvo, os elétrons geralmente perdem velocidade por interações múltiplas com os elétrons do alvo, e a energia perdida se converte numa radiação X contínua, com um comprimento de onda mínimo (frequência máxima) correspondente à energia máxima dos elétrons que não pode ser excedida (EWING, 1996). O limite do comprimento de onda (em angstroms) é dado por:

$$\lambda \text{ min.} = hc / Ve = 12.400 / V \quad (3)$$

em que, “ λ min.” representa o comprimento de onda mínimo, “h” é a constante de Planck, “c” é a velocidade de radiação eletromagnética no vácuo, “e” é a carga eletrônica e “V” é o potencial de aceleração através da válvula de raios X, em volts.

À medida que o potencial cresce, atinge-se um ponto em que a energia é suficiente para remover completamente o elétron para fora do átomo alvo. Então, outro elétron cai no seu lugar e emite-se um fóton de radiação X com um comprimento de onda dependente dos níveis de energia envolvidos, característico do elemento. Como estão envolvidas altas energias, os elétrons mais próximos ao núcleo são os mais afetados. Assim pode-se ejetar um elétron na camada K e o seu lugar é ocupado por um elétron proveniente da camada L. Devido ao fato desses elétrons internos não se relacionarem ao estado de combinação química dos átomos (excetuando-se os elementos mais leves), segue-se que as propriedades de raios X dos elementos são independentes do estado de combinação química ou dos estados físicos. Os comprimentos de onda correspondentes a essas energias elevadas são pequenos, da ordem de 10^{-2} a $10 \text{ \AA}$. O intervalo de 0,7 a $20 \text{ \AA}$ inclui os comprimentos de onda mais úteis para fins analíticos (EWING, 1996).

A técnica de difração de raios-X é muito importante para o monitoramento da forma cristalina de um fármaco durante os vários estágios de desenvolvimento, pois qualquer mudança de fase devido à interconversões polimórficas, dessolvatação de solvatos, formação de hidratos e mudanças do grau de cristalinidade podem alterar a solubilidade do fármaco, além disso, é uma técnica não destrutiva e fornece muitas informações a respeito da estrutura do material (KARJALAINEN et al., 2005).

A difração de raio-X pode ser afetada, até certo ponto, por excipientes que podem completamente obscurecer as áreas de interesse no difratograma (COOPER; PEARCE; PETTS, 2003). Em virtude disto, tem sido utilizada a Ressonância Quadrupolar Nuclear (RQN) para a identificação de polimorfos. Esta técnica permite a obtenção de espectros sem a influência de outros compostos farmacêuticos ativos ou excipientes presentes na amostra, a menos que existam interações químicas entre eles ou eles tenham frequências de ressonância na mesma faixa (PÉREZ et al., 2005).

1.2.2. Ressonância Quadrupolar Nuclear (RQN)

A RQN é baseada na interação do momento quadrupolo nuclear usado como sensor, com o gradiente de campo elétrico gerado pelas cargas ao redor do núcleo. Esta interação dá origem a níveis de energia discretos que podem ser detectados, como ocorre em ressonância magnética nuclear (RMN). A técnica é equivalente a RMN, onde os níveis discretos de energia são gerados pela interação do momento magnético nuclear com o campo magnético estático externo. As frequências de RQN dos átomos de cloro ^{35}Cl em ligações C-Cl estão usualmente na faixa 28-43 MHz, enquanto as frequências de átomos de ^{14}N estão na faixa 0.5-3.5 MHz.

O fato de o gradiente de campo elétrico ser devido à distribuição de cargas elétricas nos cristais faz da RQN uma técnica sensível a variações estruturais ou modificações dinâmicas que ocorrem no cristal. Dessa forma, diferentes polimorfos de um determinado fármaco terão frequências de RQN características e bem definidas. Em virtude da RQN usar como sensor um núcleo quadrupolar do composto em estudo, o espectro não é modificado pela presença de outros compostos farmacêuticos ativos ou excipientes presentes na amostra, a menos que existam interações químicas entre eles ou eles tenham frequências de ressonância na mesma faixa (PÉREZ et al., 2005).

Na RQN, o número de picos é proporcional ao número de núcleos e a área de cada pico é proporcional ao número de núcleos ressonantes em determinada frequência. Além disso, a intensidade do sinal é proporcional ao tipo de amostra. Outra importante característica da RQN é a largura do pico, que pode ser devido a dois fatores. O primeiro deles, conhecido como alargamento homogêneo (da ordem de poucos kHz), tem sua origem em interações dipolares. O segundo, conhecido como alargamento não homogêneo, é devido a vários fatores, como impurezas, deslocamentos, desordem, etc. Por esta razão, a largura dos picos podem variar de 1 kHz a centenas ou milhares de kHz (desordem no sistema, sistemas amorfos, etc.). A estrutura do cristal molecular apresenta um espectro com frequências características, dessa forma, a RQN pode diferenciar diferentes compostos e seus respectivos polimorfos (PÉREZ et al., 2005).

1.2.3. Técnicas Térmicas de Análise

São definidas como aquelas técnicas na qual uma propriedade (física e/ou química) do analito é determinada em função de uma temperatura aplicada externamente. As reações térmicas podem ser endotérmicas (vaporização, dessolvatação, transição de fase sólido-sólido, degradação química, etc.) ou exotérmicas (cristalização, decomposição oxidativa, etc.) (BRITAIN, 1999).

As técnicas térmicas têm seu uso difundido na indústria farmacêutica para a caracterização de polimorfismo, pureza de compostos, solvatação, degradação e compatibilidade de excipiente. Embora um largo número de técnicas tenha sido desenvolvido, as mais comumente aplicadas são a termogravimetria (TG) e a calorimetria diferencial exploratória (CDE) (BRITAIN, 1999; GIRON, 1995).

➤ Termogravimetria

A TG é uma medida da perda de massa de um material induzida termicamente em função da temperatura aplicada. A TG é restrita para transições que envolvam tanto a perda quanto o ganho de massa, e é mais comumente usada para estudos de processo de dessolvatação e decomposição de compostos. É, também, uma técnica útil para a determinação quantitativa de componentes voláteis de um sólido, permitindo a distinção entre formas de solvatos e anidros de um dado composto.

Análises de TG representam uma poderosa ferramenta auxiliar para outras técnicas de análise térmica, pois uma combinação de estudos de TG com a análise térmica diferencial (ATD) ou com a calorimetria diferencial exploratória (CDE) pode ser utilizada na observação de eventos térmicos. O processo de dessolvatação ou reações de decomposição podem ser acompanhados pela variação de massa na mesma variação de temperatura.

➤ Calorimetria Diferencial Exploratória

Nesta técnica, a amostra a ser investigada e um material de referência são aquecidos concomitantemente e submetidos a um programa controlado de temperatura. O princípio básico da técnica é manter a diferença de temperatura da amostra e da referência constante. Qualquer evento físico-químico que ocorra na amostra (fusão, cristalização, transição vítrea) que envolva a troca de calor com o meio deverá ser compensado com o fornecimento ou retirada de energia para que a diferença de temperatura permaneça constante.

As curvas são obtidas como fluxo de aquecimento diferencial *versus* temperatura. A área sobre o pico do CDE é diretamente proporcional a quantidade de calor absorvida ou liberada pelo evento térmico, e a integração deste pico fornece a quantidade de calor envolvida na reação (em J/s.g ou cal/s.g).

A técnica de CDE pode ser usada para determinar a cinética de transformação do estado sólido. A CDE em combinação com técnicas espectrais, como DRX, pode avaliar a cinética associada com a transição de polimorfos e caracterização de solvatos e hidratos. Pode-se ainda avaliar a transição da variação de temperatura na qual a ligação com a água ou solvente pode ser quebrada (BRITAIN, 1999; GIRON, 1995).

1.2.4. Espectroscopia de Infravermelho

Uma das técnicas mais notórias de espectroscopia vibracional para a identificação de polimorfos é o infravermelho. A espectroscopia de infravermelho tem sido muito usada na investigação de polimorfismo, principalmente, por ser uma técnica robusta e disponível em muitos laboratórios (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

Esta técnica é especialmente importante para a caracterização de polimorfos, pois padrões de ligação de hidrogênio frequentemente diferem entre as formas. Além disso, os grupos funcionais afetados mostrarão graus variados de mudança nas posições das bandas dos picos.

A espectroscopia de IV observa os modos vibracionais associados com a absorção de um composto na região do infravermelho do espectro (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004). Como resultado, freqüentemente, há uma severa sobreposição da maioria das características espectrais por diferentes formas dos fármacos. Às vezes, a resolução completa do modo vibracional de um grupo funcional particular é suficiente para diferenciar formas do estado sólido e permitir a quantificação direta. Em outros casos, devido à sobreposição espectral são necessários métodos mais sofisticados para a quantificação (STEPHENSON et al., 2001).

1.2.5. Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura

Geralmente os polimorfos diferem na morfologia do cristal (hábito cristalino), sendo este um importante critério de análise preliminar para a monitoração de cristalização. As formas dos cristais dos polimorfos podem ser observadas por microscópio óptico ou eletrônico de varredura muito rapidamente e em combinação com outros métodos analíticos podem fornecer a diferenciação entre as formas cristalinas (RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

Ambos os microscópios, óptico e eletrônico, tem uso comum para a caracterização de polimorfos e solvatos. Embora o microscópio óptico seja mais limitado (trabalho acima de 600X) em relação ao microscópio eletrônico de varredura (trabalho acima de 90000X, e imagens com elevado grau de informação em três dimensões), os dois são complementares e muito úteis durante os estágios iniciais de desenvolvimento do fármaco (BRITTAIN, 1999).

1.3. DICLOFENACO DE SÓDIO

A proposta de desenvolvimento do fármaco diclofenaco de sódio (figura 4) foi a de sintetizar um antiinflamatório não esteroide (AINE) com elevada atividade e tolerabilidade. Os fatores considerados foram: o transporte do fármaco através da membrana biológica, a estrutura atômica e espacial da molécula que coordena a ligação com o receptor e a estrutura eletrônica, a qual controla as interações específicas entre o fármaco e o receptor (SALLMANN, 1986⁴ apud MARTINS, 2006).

---

⁴ Sallmann, A. R. The history of diclofenac. Am. J. Med., Newton, MA, v.80, p.29-33, 1986. Supplement 4B.

Conforme o preconizado em sua elaboração, o diclofenaco de sódio possui fracas propriedades ácidas (pKa ao redor de 4) e sua solubilidade depende do pH do meio, sendo ligeiramente solúvel em água, muito rapidamente solúvel em tampão fosfato pH 6,8 e praticamente insolúvel em ácido clorídrico pH 1,2 (USP XXXI, 2008).

Baseado no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS), o diclofenaco pode ser classificado como um fármaco de Classe II. Fármacos de Classe II são aqueles com alta permeabilidade, mas com solubilidade em meio aquoso insuficiente para dissolver a dose inteira no trato gastrointestinal (Guidence for Industry, 2000). Para estes fármacos a dissolução é, portanto, o passo limitante na absorção (BERTOCCHI et al, 2005).

Figura 4. Estrutura química do diclofenaco de sódio.

O diclofenaco de sódio é um AINE, da classe do ácido fenilacético, sendo largamente prescrito para o tratamento de doenças inflamatórias tais como artrite reumatóide e osteoartrite (GIAGOUDAKIS; MARKANTONIS, 1998). Porém, seu uso é limitado pela alta incidência de efeitos indesejados, principalmente, sobre o trato gastrointestinal, que incluem irritação, sangramento, ulceração e, eventualmente, perfuração na parede gástrica (MULLER et al., 2004).

O diclofenaco de sódio possui atividade analgésica, antipirética e antiinflamatória, em que sua potência está envolvida na diminuição da atividade da ciclooxygenase (COX) microssomal de células cerebrais prevenindo o acúmulo intracelular de cAMP e Ca^{+2} , na modificação na razão $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ e na atividade dos centros de produção e retenção de calor (TAGIROVA; MUKHUTDINOVA, 2005). Além disso, exerce efeito por vias adicionais, como a inibição da ativação do fator de transcrição nuclear- κB (NF- κB) e proteína ativadora-1 (AP-1) (MARTINS, 2006).

O diclofenaco de sódio possui rápida absorção por via oral, cerca de 99% de ligação às proteínas plasmáticas, com picos de concentração plasmática entre 2-3 horas após a administração oral e meia-vida de 1-2 horas. Há um substancial efeito de primeira passagem, de modo que a disponibilidade sistêmica do diclofenaco é de apenas 50%, acumulando-se no líquido sinovial após a administração, o que pode explicar o efeito terapêutico ser consideravelmente mais longo que a meia-vida plasmática (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006).

O diclofenaco de sódio é eliminado na urina seguindo a metabolização pelo citocromo P450, subfamílias CYP2C9, 3A4 e 3A5, que executam em fase I a hidroxilação e em fase II a conjugação, sendo que seu principal metabólito, em seres humanos, o 4'-hidroxiclofenaco, é metabolizado por CYP2C9 (figura 5). Outros metabólitos (4'-hidroxil metabólitos) têm 30 % de atividade antiinflamatória e antipirética em modelos animais. Os metabólitos do diclofenaco são excretados na urina (65%) e na bile (35%), sendo muito pouco eliminado sem alteração (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006).

Figura 5. Estrutura do diclofenaco de sódio, seus metabólitos e enzimas que participam do metabolismo (adaptado de Naisbitt et al., 2007).

Muito embora largamente mencionado na literatura por causa das propriedades físicas no estado sólido de sua forma anidra, o DS tem sido objeto de algumas investigações a

respeito de suas formas de hidrato. Algumas destas investigações estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Diferentes formas de hidratos do Diclofenaco de Sódio encontradas na literatura.

Forma Cristalina Estudada	Forma de Obtenção	Métodos de Identificação e Caracterização	Solubilidade Intrínseca	Meio Utilizado p/ Dissolução Intrínseca	Referência
Tetrahidrato	Obtido pela solubilização do DS em HCl (0,2 mol/L, pH1,3) por 24h com agitação de 100rpm, sendo o precipitado solubilizado em NaOH (0,2mol/L, pH 12,65), recristalizado sem agitação.	UV-Vis; CDE; DRX-EDS; IV	*	*	Palomo et al., 1999
Pentahidrato	Obtido pela solubilização do DS em solução de ácido acético com quitosana e recristalizado em acetato de etila com evaporação lenta.	Raio -X	*	*	Muangsin et al., 2002
Anidra	Obtido pela desidratação em forno a 100°C por 1 noite;				
Tetrahidrato (18,38% H ₂ O)	Obtida pela dissolução em água aquecida a 100°C, sendo a solução mantida por 1 noite, e o precipitado filtrado e usado.	ATG; MEV	*	*	Fini et al., 2001
Tetrahidrato (18,38% H ₂ O)	Obtida pelo aquecimento a 50°C da solução de DS (meio alcalino) com posterior filtração e armazenagem do solução a 4°C e cristalização em água.	ATG; MEV; DRX	*	*	Fini et al., 2005
Anidra	DS padrão obtido da Sigma-Aldrich		1,98 (mg/min/cm ²)	Fluido intestinal simulado, sem pancreatina (pH 6,8) - USP 28 - a 37°C e 50 rpm.	
Tetrahidrato (20,9% H ₂ O)	Obtida pela armazenagem do DS padrão em câmara saturada (100% UR) por 24h, ou em câmara com 59% de UR por 60 dias, ou a 98% de UR por 4 dias.	FTIR; CDE; DRX; ATG	1,43 (mg/min/cm ²)		Bartolomei et al., 2006
Anidra	DS padrão obtido da Sigma-Aldrich		1,1 (µg/mL)		
DS Hidrato (4,75 moléculas de H ₂ O)	Obtido pela recristalização de 50 mg de DS em 5 mL de etanol armazenado por 1 semana.	ATG; CDE; DRX-cristal único.	1,0 (µg/mL)	Solução de KCl 0,15mol/L a 25°C	Llinàs et al., 2007
Anidra	DS padrão obtido da Sigma-Aldrich		1,1 (mg/min/cm ²)		
Trihidrato (15,9% H ₂ O)	Obtido pelo aquecimento da forma Tetrahidrato a 40°C em forno por 3min, ou pelo armazenamento do DS padrão em incubadora a 40°C e 75% de UR.	FTIR; CDE; DRX; ATG	0,65 (mg/min/cm ²)	Fluido intestinal simulado, sem pancreatina (pH 6,8) - USP 28 - a 37°C e 50 rpm.	Bartolomei et al., 2007
Tetrahidrato (20,9% H ₂ O)	Obtida pela armazenagem do DS padrão em câmara saturada (100% UR)por 24h, ou em câmara com 59% de UR por 60 dias, ou a 98% de UR por 4 dias.		0,46 (mg/min/cm ²)		

* Experimentos de dissolução intrínseca não realizados, preocupando-se apenas com a caracterização do estado sólido.

Vários métodos analíticos têm sido descritos na literatura para determinação do diclofenaco, tanto em fluidos biológicos quanto em formas farmacêuticas.

Na análise de preparações farmacêuticas contendo diclofenaco de sódio são freqüentemente empregados métodos espectroscópicos (MAZUREK; SZOSTAK, 2006), espectrofotométricos, fluorimétricos e potenciométricos, (ABDEL-HAMID; NOVOTNY; HAMZA, 2001; ARANCIBA; BOLDRINI; ESCANDAR, 2000; GARCIA et al., 2001; MATIN; FARAJZADEH; JOUYBAN, 2005; ORTEGA-BANAREZ et al., 1999; PIMENTA; ARAUJO; MONTENEGRO, 2002). A CLAE foi utilizada mais recentemente para análise de diclofenaco em formas farmacêuticas, como: comprimidos (GONZÁLEZ; YULN; VOLONTÉ, 2000; KUBALA, 1993⁵ apud KLIMES, 2001) e adesivos transdérmicos tipo “patch” (KLIMES et al., 2001).

Métodos cromatográficos são mais empregados na monitoração e determinação do DS em fluidos biológicos, incluindo-se a cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons (SCHNEIDER; DEGEN, 1981), cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa com monitoramento de íon selecionado (BORENSTEIN et al., 1996) e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE-FR), utilizando diferentes tipos de detectores (CHMIELEWSKA et al., 2006; SANTOS et al., 2005; SANTOS; APARICIO; ALONSO, 2007).

A CLAE-FR com detector de ultravioleta é um dos mais populares métodos utilizados para quantificação do DS e seus metabólitos em material biológico. Muitos métodos utilizando CLAE foram publicados para a determinação do diclofenaco de sódio e de seus metabólitos em fluidos biológicos. Alguns dos métodos estão apresentados na tabela 3.

---

⁵ Kubala, T., Gambhir, B., Borst, S. I. A specific stability indicating HPLC method to determine diclofenac sodium in raw materials and pharmaceutical solid dosage forms. **Drug Dev. Ind. Pharm.** 19, 749-757, 1993.

Tabela 3. Métodos para determinação do Diclofenaco de Sódio em material biológico.

Amostra Biológica	Método de Extração	Método Analítico	Limite de Detecção/Quantificação	% Recuperação	Referência
Urina Humana	Extração Líquido-líquido, com 3 mL de diclorometano	CG-MS com detector por captura de elétrons	30 ng/amostra	*	Schneider et al., 1981
Soro Humano	Extração Líquido-líquido, com 200µL de metanol	HPLC-RP com detecção fluorimétrica	40 ng/mL	98,2 - 102%	Moncrieff, 1992
Plasma Humano	Extração Líquido-líquido, com 7 mL heptano	CG-MS	0,2 ng/mL	95,2 - 98,6%	Borenstain et al., 1996
Urina Humana	Extração em fase sólida	HPLC-RP UV	50 ng/mL	90%	Hirai et al., 1997
Plasma Humano	Extração Líquido-líquido, com 1,5 mL de hexano:álcool isopropílico (80:20)	HPLC-RP UV	1 ng/mL	98,8%	Giagoudakis et al., 1998
Plasma Humano	Extração em fase sólida	HPLC-RP UV	10 ng/mL	90,20%	Lee et al., 2000
Plasma Humano	Extração em fase sólida	HPLC-RP UV	1,2 ng/mL	92 - 95%	Arcelloni et al, 2001
Plasma de Coelho	Precipitação de proteína	HPTLC UV	90ng/mL	78%	Lala et al., 2002
Urina Humana	Extração Líquido-líquido, com 5 mL de diisopropileter	HPLC - RP UV	0,25 mg/L	57%	Dorado et al., 2003
Plasma Humano	Extração Líquido-líquido, com 8 mL de dietileter.	HPLC - RP	5 ng/mL	90%	Van Der Marel et al., 2004
Plasma Humano	Extração em fase sólida	LC-MS/MS	1 ng/mL	100%	Alnouti et al., 2005
Plasma Humano	Extração em fase sólida	HPLC-RP Análise por DAD	0,25µg/mL	75,7 - 104,2%	Gallo et al., 2006
Plasma de Cão	Extração Líquido-líquido, com n-hexano: isopropanol (95:5)	HPLC-RP UV	0,02 µg/mL	96,50%	Jiao et al., 2006
Soro de Rato	Extração em fase sólida	HPLC-RP UV	22,5 ng/mL	80%	Kaphalia et al., 2006
Plasma	Extração em fase sólida	LC/ESI-MS	50ng/mL	90,90%	Vinci et al., 2006
Plasma/CSF de crianças	Extração em fase sólida	CG-MS	5,3 ng/amostra p/ plasma e 0,1 ng/amostra para CSF	70 - 80%	Kooki et al., 2008

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência das propriedades do estado sólido de diferentes amostras de diclofenaco de sódio no perfil *in vitro* de dissolução e atividade antipirética em coelhos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as formas cristalinas do diclofenaco de sódio através das técnicas de DRX, RQN, MEV, CDE, TG e IV;
- Otimizar as condições para análise do diclofenaco de sódio por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar o perfil *in vitro* de dissolução das diferentes amostras de diclofenaco de sódio;
- Desenvolver e validar método para análise do diclofenaco de sódio em material biológico (plasma);
- Aplicar método desenvolvido e validado para quantificação do fármaco em material biológico;
- Correlacionar as propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio com o perfil *in vitro* de dissolução.
- Avaliar o efeito antipirético das diferentes amostras do diclofenaco de sódio em modelo de febre em coelhos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS FORMAS CRISTALINAS DO DICLOFENACO DE SÓDIO

A amostra de diclofenaco de sódio, proveniente da Sigma-Aldrich (USA), foi pesada (cerca de 5,0 g) e colocada dentro de um recipiente de vidro (placa de petri) e em seguida armazenada em um dessecador com solução saturada de nitrato de chumbo, permanecendo neste ambiente por cerca de um mês. A determinação da água incorporada foi feita a cada 3 ou 4 dias. Para isso, uma alíquota da amostra mantida no dessecador foi mantida algumas horas fora deste ambiente com o objetivo de eliminar a água que não participa da hidratação. Ao final de um mês e realização dos cálculos da água incorporada foi obtida a forma hidratada do diclofenaco de sódio (DSH).

Para o preparo da forma anidra do diclofenaco de sódio (DSA) uma parte da amostra na forma hidratada foi mantida em estufa a 40 °C, para eliminação de toda água de hidratação. A amostra foi considerada anidra após realização de várias pesagens até obter peso constante.

3.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO

3.2.1. Amostras de comprimidos de diclofenaco de sódio

Foram avaliadas, além das amostras obtidas no item 3.1, três formulações de comprimidos de diclofenaco de sódio disponíveis comercialmente, duas no Brasil (DPB1 e DPB3) e uma na Argentina (DPA2). A caracterização físico-química do princípio ativo, das formas anidro e hidrato e das formulações de comprimidos de diclofenaco de sódio foi realizada em colaboração com a Dr^a Sílvia Cuffini, pesquisadora da Agencia Córdoba Ciencia – Argentina, especialista em estado sólido de fármacos e difração de raios X.

3.2.2. Difração de Raio-X

Inicialmente foram obtidas as massas individuais das amostra de diclofenaco de sódio puro e dos comprimidos. Posteriormente, os comprimidos foram reduzidos a um pó fino com auxílio de gral, pistilo e de uma peneira de malha de 0,045 mm (325 mesh).

Após a padronização da granulometria para a obtenção da uniformidade cristalina do sólido, as amostras foram submetidas aos ensaios de difratometria num difratômetro Bruker AXS D8 operando em 40 kV, 40 mA com uma fonte $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

Na análise por difratometria foram obtidos difratogramas do pó do princípio ativo, do pó do princípio ativo na forma anidra e hidrato e dos comprimidos comerciais e estudados procedimentos para a análise destes resultados, utilizando informações contidas no banco de dados do International Centre for Diffraction Data (ICDD).

3.2.3. Ressonância Quadrupolar Nuclear (RQN)

Para a análise das amostras por RQN os containeres de matéria-prima foram cilindros de vidro de comprimento de 2 cm e de 1 cm de diâmetro, sendo necessário um método não – específico de preparação das amostras. Os comprimidos comerciais foram introduzidos diretamente dentro da câmara de análise envolvidos por uma fita de Teflon.

As medições de RQN ^{35}Cl foram feitas usando espectrômetro de pulso com Transformada de Fourier e com uma unidade de observação multi-núcleos Tecmag NMRkit II e uma estação de RMN em Tempo Real Macintosh Tecmag. A forma de linha foi obtida usando mapeamento de espectro com transformada de Fourier Spin–Echo (Bussandri; Zuriaga, 1998). As medições foram feitas sobre uma sequência de eco de dois pulsos padrão $\pi/2 - 100 \mu - \pi$. O número da média foi 5000 e $\pi/2 = 15\text{us}$.

3.2.4. Análise Térmica

Para estudos de caracterização das estruturas polimórficas do diclofenaco de sódio (DSA e DSH) por CDE foi utilizado o equipamento SHIMADZU DSC 50 (Japão). O peso das amostras variou de 4 a 5 mg. Os perfis do CDE foram registrados a uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, sob um fluxo de nitrogênio de $50 \text{ mL}/\text{min}$, na faixa de aquecimento de 10 a $330 \text{ }^\circ\text{C}$. Os experimentos foram conduzidos utilizando cadinhos de alumínio com tampa ($40 \mu\text{L}$). As temperaturas e respostas calorimétricas do equipamento foram realizadas com padrões metálicos de alta pureza: índio ($156,6 \pm 0,2$) e zinco ($419,5 \pm 0,3$). As curvas da termogravimetria foram registradas em um equipamento SHIMADZU TGA 50 (Japão) nas mesmas condições mencionadas anteriormente, porém com faixa de aquecimento de 10 a $300 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.5. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho das amostras do diclofenaco de sódio foram obtidos no equipamento Perkin Elmer FTIR System 2000 spectrometer (Perkin Elmer, EUA). Cada amostra (DSA e DSH) foi triturada em gral de vidro e, ao pó resultante adicionou-se brometo de potássio. Posteriormente, essa mistura foi transferida para uma mini-prensa manual para a produção de uma pastilha por meio de compressão, a qual foi colocada no porta-amostra do espectrofotômetro previamente calibrado com brometo de potássio (branco), e procedeu-se a análise. Os espectros foram registrados de 4500 a 400 cm^{-1} .

3.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Neste estudo utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura Zeiss - EVO50, detector de elétrons secundários (SE), alto vácuo ($\sim 10^{-6}$ Torr), utilizando o programa SmartSEM User Interface para obtenção das imagens.

As amostras foram aderidas a um pedaço de fita adesiva de carbono apoiada sobre uma placa de metal, colocada sob vácuo antes de ser revestida com uma fina película de ouro em um metalizador Sputter, da marca Bal-Tec modelo SDC-050 sob corrente de 40 mA por um tempo de 100s e observadas com uma aceleração de 15 e 20 KV.

3.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL *in vitro* DE DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO

3.3.1. Equipamentos

Para realização dos ensaios *in vitro* de dissolução das amostras dos comprimidos (DPB1, DPB3 e DPA2) foi utilizado um dissolutor modelo Sotax AT7 (Suíça), utilizando o aparato USP II (cesto), método da cesta, sendo o pH do meio de dissolução medido em peagômetro modelo PHS-3B da PHTEK (Brasil)

Para a realização dos ensaios de dissolução das amostras DSA e DSH foi utilizado um dissolutor modelo SR8 PLUS da marca Hanson Research (EUA), utilizando aparato USP I (pás), e para a contenção das amostras (pós) utilizou-se membranas de diálise.

A análise do diclofenaco de sódio foi realizada em um cromatógrafo SHIMADZU (Japão), composto por uma bomba modelo LC10AS, um injetor Rheodyne modelo 7125 com amostrador de 20 µL, um detector por absorção no UV-Vis, modelo SPD-10A, operando em 282 nm e um integrador SHIMADZU modelo C-R6A (Japão).

Para medir o pH das soluções aquosas utilizadas como fases móveis foi utilizado um peagômetro modelo PHS-3B da PHTEK. A degaseificação da fase móvel foi realizada em um ultrassom QUIMIS® modelo Q-335D (Brasil) e um sistema de vácuo.

Para a realização da pesagem do padrão de diclofenaco de sódio foi utilizada uma balança analítica OHAUS modelo Adventure™ (EUA).

3.3.2. Reagentes e solventes

Os reagentes (grau analítico) utilizados no preparo das soluções tampão dos meios de dissolução foram fosfato dissódico anidro (LabSynth, Brasil) e fosfato monossódico monohidratado (Nuclear, Brasil). Para o preparo da fase móvel foi empregado ácido acético glacial (Nuclear, Brasil) e o solvente acetonitrila, grau cromatográfico (J.T.Baker, Phillipsburg, USA). A água empregada na preparação das soluções foi obtida do sistema de purificação MILLI-Q-PLUS® (Millipore Corporation, EUA).

3.3.3. Soluções-padrão

A solução estoque de diclofenaco de sódio, adquirido junto a Sigma-Aldrich (EUA), foi preparada em metanol, grau cromatográfico (J.T.Baker, EUA), na concentração de 1,0 mg/mL. A partir desta solução estoque foram obtidas as soluções de trabalho, também diluídas em metanol, nas concentrações de 20, 40, 100, 200 e 400 µg/mL. Todas as soluções foram estocadas a -20 °C e ausência de luz.

3.3.4. Coluna cromatográfica

Foi empregada uma coluna C-18 (250 x 4,6 mm d.i., partículas de 5µm) SHIM-PACK CLC-ODS (SHIMADZU, Tóquio), coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecil-silano (C18), mantida à temperatura ambiente (21 °C ± 2).

3.3.5. Separação cromatográfica

Cinquenta microlitros (50 µL) da solução-padrão de diclofenaco de sódio em diferentes concentrações foram adicionados a 50 µL da fase móvel e, em seguida, realizada a análise cromatográfica. As soluções aquosas utilizadas para o preparo das fases móveis foram filtradas em membranas Millipore (poros de 0,45 µm). Após adição do solvente orgânico, as fases móveis foram degaseificadas no ultrassom e no vácuo, concomitantemente, durante 10 min., a fim de eliminar gases dissolvidos que possam interferir na análise. Para estas análises foi utilizada uma vazão de fase móvel de 1,6 mL/min.

Para obtenção de resolução satisfatória do fármaco, em menor tempo de análise, diferentes composições de fases móveis foram avaliadas (tabela 4).

Tabela 4. Fases móveis utilizadas para análise do diclofenaco de sódio.

Fase móvel	Composição
1	Ácido Acético 0,7 mol/L pH 2,5: Metanol (7:3, v/v)
2	Ácido Acético 0,7 mol/L pH 2,5: Metanol (6:4, v/v)
3	Ácido Acético 0,7 mol/L pH 2,5: Metanol (4:6, v/v)
4	Ácido Acético 0,7 mol/L pH 2,5: Acetonitrila (4:6, v/v)
5	Ácido Acético 0,7 mol/L pH 2,5: Acetonitrila (1:1, v/v)

A partir dos resultados referentes à análise do diclofenaco de sódio foi calculado o fator de retenção (k) dos sinais obtidos nos cromatogramas:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

em que: t_R = tempo de retenção do analito de interesse.

t_M = tempo de retenção de um composto não retido, considerado como sendo a primeira inflexão de linha de base em cada cromatograma.

3.3.6. Perfil *in vitro* de dissolução do diclofenaco de sódio

Conhecendo-se a cinética de liberação do fármaco em uma formulação é possível determinar a quantidade do fármaco dissolvido, a velocidade de liberação e os possíveis problemas que possam ocorrer durante a dissolução. Para os ensaios *in vitro* de dissolução foram utilizados três comprimidos (n=3) de diclofenaco de sódio de diferentes origens (DPA2, DPB1, DPB3). O meio de dissolução utilizado foi tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 6,8 e 4,5, preparados de acordo com a Farmacopéia Americana 31ª edição (2008) e foram asseguradas as condições “*sink*”. Os comprimidos foram colocados em cestas (USP aparato II) e mergulhadas em cubas contendo 900 mL do meio de dissolução à temperatura controlada, correspondente a 37 °C, e velocidade de agitação de 50 rpm.

Para o meio de dissolução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 6,8, foram retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos de 10, 20, 40 e 60 minutos, sendo este volume repostado com o meio de dissolução. Para o meio de dissolução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 4,5, foram retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos de 30, 60, 120 e 240 minutos. As alíquotas foram colocadas em frascos eppendorf e armazenadas em geladeira a 4 °C para posterior realização do procedimento de filtração e análise cromatográfica.

Para a realização dos ensaios de dissolução das amostras DSA e DSH os meio de dissolução utilizados foram tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 6,8 e 4,5 e solução HCl 0,1 mol/L pH 1,2, preparados de acordo com a Farmacopéia Americana 31ª edição (2008) e foram asseguradas as condições “*sink*”. As amostras foram colocados no dissolutor dentro de membranas de diálise, tendo as extremidades amarradas e inserido dentro de suportes de metal, em seguida sendo mergulhadas em cubas contendo 150 mL do meio de dissolução à temperatura controlada, correspondente a 37 °C, e velocidade de agitação de 50 rpm.

Para o meio de dissolução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 6,8, foram retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos 10, 20, 30, 40, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos, sendo este volume repostado com o meio de dissolução. Para os meio de dissolução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 4,5 e HCl 0,1 mol/L pH 1,2 foram retiradas alíquotas de 1 mL nos tempos 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180, 195, 210, 225 e 240 minutos. As alíquotas foram colocadas em frascos eppendorf e armazenadas em geladeira a 4 °C para posterior realização do procedimento de filtração e análise cromatográfica.

3.4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DO DICLOFENACO DE SÓDIO EM PLASMA

3.4.1. Equipamentos

A análise do diclofenaco de sódio foi realizada utilizando um cromatógrafo SHIMADZU (Japão), composto por uma bomba modelo LC10AD-VP, um injetor Rheodyne modelo 7725i com amostrador de 20 μ L, um detector de arranjo de diodo modelo SPD-M10AVP e integrador modelo SCL-10AVP, utilizando o programa Class-VP para obtenção e análise dos dados.

Foram utilizadas uma centrífuga Fanem, Excelsa Baby I, modelo 206 (Brasil), um agitador pendular Pachane, modelo PA241 (Brasil) e um agitador de tubos Phoenix, modelo AP56 (Brasil).

3.4.2. Reagentes e solventes

Os solventes empregados (grau cromatográfico) foram acetonitrila e metanol (Fischer Scientific, EUA), hexano 60% e acetato de etila (Mallinckrodt Chemical, EUA), tolueno (Mallinckrodt Baker, EUA), álcool isopropílico (Burdick-Jackson, B&J ACS/HPLC, EUA) e éter etílico anidro (grau analítico) (Mallinckrodt Chemical, EUA). Também foi utilizado ácido clorídrico (LabSynth, Brasil).

Para o preparo da fase móvel foi empregado ácido acético glacial (Nuclear, Brasil). A água empregada na preparação das soluções foi obtida do sistema de purificação MILLI-Q-PLUS® (Millipore Corporation, EUA).

3.4.3. Soluções-padrão

Para análise do diclofenaco de sódio foi preparada uma solução estoque, em metanol, na concentração de 1,2 mg/mL. A partir desta solução estoque foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 2, 10, 20, 40, 100, 200 e 400 μ g/mL. Todas as soluções foram estocadas a -20 °C e ausência de luz.

3.4.4. Coluna e condições cromatográficas

Para o desenvolvimento e validação do método de análise do diclofenaco de sódio em amostras de plasma utilizou-se uma coluna RP-18 (125x4,6 mm, partículas de 5 µm) (LichroCART® - 125-4, MERK, EUA) protegida por uma coluna de guarda RP-18 (4,0x4,0 mm) capeada (MERK, EUA).

Vinte e cinco microlitros da solução-padrão de diclofenaco de sódio foram evaporados à secura sob fluxo de ar comprimido. Os resíduos foram dissolvidos em 100 µL da fase móvel, os tubos foram agitados durante 60 segundos e 20 µL foram analisados. A fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila:ácido acético 0,7 mol/L (1:1, v/v), pH 2,5, e vazão de 1,0 mL/min.

3.4.5. Plasmas

As amostras de plasma humano (branco de referência) utilizadas no desenvolvimento e validação do método, livres de diclofenaco de sódio, sorologia negativa para hepatite B e C, chagas, HIV, foram gentilmente cedidas pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP, armazenadas a -20 °C até o momento das análises. Antes do uso, as amostras de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas a 1800g para remoção de partículas suspensas.

3.4.6. Animais

Foram utilizados coelhos (New Zealand White), machos, pesando entre 2,0 – 2,5 kg. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (19 °C ±2,0) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h) com livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram conduzidos entre 08 e 18h em animais não-alimentados (jejum de 12h).

3.4.7. Seleção do Padrão Interno

Para a análise do diclofenaco de sódio em matriz biológica utilizou-se a padronização interna. O padrão interno é uma substância adicionada às amostras a serem analisadas,

geralmente com características estruturais similares ao analito, acondicionado aos padrões de calibração e amostras de concentrações conhecidas e constantes, com o objetivo de minimizar possíveis perdas durante a extração e erros de injeção (ANVISA, 2003).

Vários foram os testes realizados para a escolha do padrão interno ideal. Foram utilizados fármacos como: ibuprofeno, fenoprofeno e salbutamol.

Para a realização dos ensaios de escolha do padrão interno, 50 µL de uma solução do fármaco a ser avaliado como padrão interno foram transferidos para tubos cônicos. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e ressuspenso em 100 µL na fase móvel e, em seguida, realizada a análise cromatográfica nas mesmas condições utilizadas para a análise do diclofenaco de sódio.

3.4.8. Procedimento de preparação da amostra

A extração líquido-líquido (ELL) é uma das técnicas preferidas para preparação de amostras, pois fornece extratos mais limpos, além de ser uma técnica simples que utiliza diferentes solventes disponíveis comercialmente e apresenta elevada taxa de recuperação (JI; REIMER; EL-SHOUBAGY, 2004; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Para a otimização do método empregando ELL, foi utilizado 500 µL de plasma livre do fármaco, previamente centrifugado e fortificado com 25 µL de solução-padrão de diclofenaco 2 µg/mL e 25 µL de padrão interno na concentração de 10 µg/mL. Amostras de plasmas livres do analito foram processadas da mesma maneira para verificar a possível presença de interferentes endógenos do plasma.

Parâmetros importantes na descrição do método analítico, como pH e solvente, foram avaliados e serão discutidos detalhadamente. O procedimento de extração encontra-se descrito na figura 6.

Figura 6. Procedimento de extração do diclofenaco de sódio em amostras de plasma.

3.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

Após a otimização das condições de análise e extração do diclofenaco de sódio realizou-se a validação do método desenvolvido, que inclui todos os procedimentos

requeridos para demonstrar que o método é confiável para a aplicação desejada (ANVISA, 2003; SHAH et al., 2000).

A validação do método foi realizada avaliando-se os principais parâmetros propostos (ANVISA, 2003; SHAH, et al., 2000) para análise de fármacos em fluidos biológicos: linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, recuperação e estabilidade.

3.5.1. Curva Analítica e Linearidade

A linearidade do método foi avaliada de acordo com a construção da curva analítica de amostras de plasma branco enriquecidas com soluções-padrão de diclofenaco de sódio (25 µL) nas concentrações plasmáticas de 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 60,0 µg/mL e 25 µL de solução-padrão de padrão interno na concentração plasmática de 2 µg/mL. As amostras enriquecidas foram submetidas ao processo de preparação de amostras conforme descrito na figura 6.

Devido à padronização interna as curvas analíticas de calibração foram traçadas plotando-se a razão de área dos picos diclofenaco de sódio e padrão interno no eixo das ordenadas (eixo y) e a concentração plasmática do diclofenaco de sódio no eixo das abcissas (eixo x).

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, em que a relação razão/concentração é expressa pela equação da reta ($y = ax + b$), sendo *a* o coeficiente angular e *b* o intersepto da reta com o eixo y. Também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (*r*), parâmetro este que é uma estimativa da linearidade da curva analítica, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos obtidos.

3.5.2. Recuperação

Amostras de plasma enriquecidas com solução-padrão de diclofenaco de sódio em três níveis de concentração, 0,5 µg/mL (concentração baixa), 5,0 µg/mL (concentração média) e 20,0 µg/mL (concentração alta), em triplicata, foram preparadas de acordo com a figura 6, exceto pela adição do padrão interno feita nos tubos usados para coleta do solvente orgânico após a extração.

Para avaliar a eficiência do procedimento de extração foi feita uma curva de calibração no intervalo de concentração plasmática de 0,5 a 60 µg/mL omitindo-se a etapa de extração. Para isto, 25 µL de solução-padrão de diclofenaco de sódio e 25 µL da solução de padrão interno foram transferidos para tubos cônicos e o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido. A seguir, os resíduos foram ressuspensos em 100 µL de fase móvel, os tubos foram agitados durante 60 segundos e 20 µL foram analisados.

A concentração do diclofenaco de sódio em cada amostra de plasma foi calculada empregando-se a curva de calibração que não foi submetida ao procedimento de extração. A recuperação (R) foi calculada empregando a equação 4:

$$\text{Recuperação absoluta} = \frac{\text{concentração calculada}}{\text{concentração real}} \times 100 \quad (4)$$

3.5.3. Precisão e Exatidão

Precisão do método é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas. A precisão é expressa em termos de desvio padrão (s), equação (5), e desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), equação (6), determinados de acordo com a metodologia padronizada:

$$s = \sqrt{\sum (x_1 - \bar{x})^2 / n - 1} \quad (5)$$

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (6)$$

Em que: $\bar{x}$ é a concentração média das medições, x_1 é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A exatidão é o grau de concordância de um valor determinado com o valor nominal ou valor verdadeiro conhecido sob condições determinadas (SHAH et al., 2000).

A exatidão normalmente é calculada em função da porcentagem do erro relativo, de acordo com a equação 7:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \times 100 \quad (7)$$

Na avaliação da precisão e exatidão foram preparadas amostras de plasma branco fortificadas com solução-padrão de diclofenaco de sódio nas concentrações de 0,5; 5,0 e 50,0 µg/mL. Para preparar estas amostras, 3 mL das soluções-padrão de diclofenaco de sódio nas concentrações de 2, 20 e 200 µg/mL, foram transferidos para tubos com tampa esmerilhada. O solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e, a seguir, foram adicionados 12 mL de plasma branco previamente centrifugado. Após a adição do plasma, os tubos foram vedados e agitados durante 30 minutos, a seguir o volume total foi distribuído em tubos de extração da seguinte maneira: uma alíquota de 3 mL em um tubo para a realização da precisão e exatidão intra-ensaio e quatro alíquotas de 2 mL para avaliação da precisão e exatidão inter-ensaios. Todas as alíquotas foram estocadas à -20 °C até o momento da análise. O padrão interno foi adicionado antes da realização do processo de extração.

Para avaliar a precisão e exatidão inter e intra-ensaio foi feita uma curva analítica, em duplicata, no intervalo de concentração plasmática de 0,5 a 60 µg/mL de diclofenaco de sódio. Na precisão e exatidão intra-ensaio foram analisadas amostras (0,5 mL de plasma) nas concentrações acima especificadas em quintuplicata de cada concentração. A precisão e exatidão inter-ensaios foram avaliadas em cinco dias consecutivos, utilizando 0,5 mL das amostras de plasma fortificado com as três diferentes concentrações. Este ensaio foi feito em triplicata. O procedimento de extração foi semelhante ao descrito na figura 6.

3.5.4. Limite de Quantificação (LQ)

O LQ foi determinado enriquecendo-se amostras de plasma branco com solução-padrão de diclofenaco de sódio na concentração plasmática de 0,1 µg/mL, em quintuplicata. Para isto, 25 µL da solução-padrão de diclofenaco de sódio na concentração de 2,0 µg/mL e 25 µL de padrão interno foram transferidos para tubos de extração. A seguir, o solvente foi evaporado sob fluxo de ar comprimido e foi adicionado 500 µL de plasma branco previamente centrifugado. Estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração descrito na figura 6. O limite de quantificação foi calculado baseado em uma curva de calibração nas concentrações plasmáticas de 0,1; 0,5; 2,0 e 10,0 µg/mL de diclofenaco de sódio, em duplicata.

3.5.5. Estudo de estabilidade

A estabilidade de um fármaco em matriz biológica depende de inúmeros fatores: propriedades químicas do fármaco, da matriz biológica e do material de acondicionamento (ANVISA, 2003; SHAH, et al., 2000). Sendo assim, devem ser realizados estudos para se avaliar a estabilidade do fármaco durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento), curta duração (à temperatura ambiente) e após ciclos de congelamento e descongelamento. Tais ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise da amostra (ANVISA, 2003).

Para a avaliação da estabilidade do diclofenaco de sódio durante o ciclo de congelamento/descongelamento, foram utilizadas amostras de plasma enriquecidas com solução-padrão de diclofenaco de sódio nas concentrações plasmáticas de 1,0 µg/mL (concentração baixa) e 50,0 µg/mL (concentração alta), em triplicata. Após o enriquecimento das amostras, estas foram congeladas a -20 °C por 24h, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas as amostras foram novamente congeladas a -20 °C por 12 a 24h e, assim sucessivamente, até completar os três ciclos, quando estas foram analisadas⁶ de acordo com o esquema da figura 6 e os resultados foram comparados com amostras recém-preparadas e também submetidas ao procedimento de extração conforme descrito na figura 6.

Para a avaliação da estabilidade do diclofenaco de sódio durante o ensaio de estabilidade de curta duração, foram utilizadas amostras de plasma enriquecidas com solução-padrão nas concentrações plasmáticas de 1,0 µg/mL (concentração baixa) e 50,0 µg/mL (concentração alta), em triplicata. Após o enriquecimento das amostras, estas foram congeladas a -20 °C por 24 h, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente e mantidas na bancada de trabalho por um período de 12 h e em seguida analisadas e comparadas com amostras recém-preparadas e também submetidas ao procedimento de extração, conforme descrito na figura 6.

Para a estabilidade de longa duração, amostras de plasma foram fortificadas com solução-padrão de diclofenaco de sódio nas mesmas concentrações descritas anteriormente. Neste estudo as amostras foram congeladas a -20 °C por sete dias e descongeladas à temperatura ambiente. Após o estudo de estabilidade de longa duração, as amostras foram analisadas de acordo com o esquema da figura 6 e os resultados foram comparadas com

---

⁶ O padrão interno foi adicionado após o término do ciclo de congelamento/descongelamento e quantificação calculada pela razão da área dos picos do diclofenaco de sódio e do padrão interno.

amostras recém-preparadas e também submetidas ao procedimento de extração conforme descrito na figura 5.

Os resultados obtidos no ensaio de estabilidade foram comparados utilizando o teste *t* de Student com nível de significância de 5%.

3.6. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

3.6.1. Protocolo experimental em coelhos

Os animais foram mantidos em jejum de 12 h, recebendo apenas água e, ao final do período, foi administrado por via oral, as diferentes formas cristalinas do DS (DSA e DSH) em cápsulas na dose única de 12 mg/kg, juntamente com cerca de 20 mL de água. A alimentação foi oferecida aos animais duas horas após a administração do fármaco.

As amostras de sangue (2,5 mL) foram coletadas da veia marginal da orelha esquerda dos animais nos tempos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h após a administração das cápsulas (*n* = 2 para cada tempo de coleta). Para a realização das coletas utilizou-se seringas de 3 mL e agulhas hipodérmicas 24G heparinizadas. Em seguida o sangue foi centrifugado (1800g) e o plasma separado e armazenado a -20 °C para posterior análise conforme procedimento descrito no item 3.4.7.

Após cada coleta de sangue o volume retirado era resposto com solução de salina 0,9 %, para manutenção da volemia dos animais.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto, conforme certificado no Anexo A.

3.7. AVALIAÇÃO NO EFEITO ANTIPIRÉTICO

Os ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) em colaboração com a Prof^a Dr^a Glória Emília Petto de Souza.

3.7.1. Esterilização

Todos os materiais utilizados nos experimentos foram autoclavados a 127 °C por 30 min. (material plástico e soluções), esterilizados por calor seco a 180 °C por duas horas (material de vidro e metal), ou ainda por luz ultravioleta.

3.7.2. Administração do estímulo pirogênio

O estímulo pirogênio (LPS) foi administrado com injeção intravenosa (i.v.) na veia marginal da orelha, no volume de 0,5 mL, utilizando agulhas 13 x 4,5 e seringas de 1 mL.

3.7.3. Administração dos fármacos antipiréticos

As amostras DSA e DSH foram administradas em cápsulas por via oral na dose única de 8 mg/kg, juntamente com cerca de 20 mL de água. Essas amostras foram administradas 60 minutos após a administração do estímulo pirogênio.

3.7.4. Determinação da variação da temperatura corporal

Durante o experimento a temperatura ambiente foi controlada a 23 ± 1 °C. Após o transporte dos coelhos para a sala onde os experimentos foram realizados, os animais ficaram em repouso por 1 hora e só então suas temperaturas basais foram determinadas por no mínimo 4 medidas, em intervalos de 15 min., antes da administração do estímulo pirogênico. Somente os animais com temperatura estável na faixa de 38,6 a 39,5 °C foram utilizados.

A medida da temperatura corporal dos animais foi realizada por telemetria, através da suave inserção de uma sonda (YSI 401, EUA) conectada a um teletermômetro (modelo 46 TUC, YSI, EUA) a seis centímetros de profundidade no reto dos animais, sem retirá-los de suas caixas. Os animais foram adaptados as condições experimentais por meio da realização desse procedimento no dia anterior ao experimento, a fim de minimizar variações de temperatura induzidas por estresse decorrente do manuseio.

A temperatura corporal foi continuamente registrada em intervalos de 15 min. durante as seis horas após a administração de lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas (LPS; 0,1 ng/kg; E.coli 011:B4, Sigma-Aldrich, Chemical Co., St. Louis, Mo, EUA).

Os animais foram separados em grupos que receberam apenas salina mais água, LPS mais água, salina mais DS (DSA ou DSH) e LPS mais DS (DSA ou DSH). Cada grupo foi composto por, no mínimo, quatro animais.

3.7.5. Análise estatística

Todas as variações na temperatura dos animais foram expressas com variação em relação à média do valor basal (i.e. ΔT em °C). Todos os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). As comparações estatísticas (tratamento e tempo) foram efetuadas por análise de variância critério ANOVA Two-way seguida por teste de Bonferroni com utilização do programa estatístico prisma 3.0. O limite para o nível de significância foi um valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO

4.1.1. Difração de Raio-X

Após a análise por difratometria, foram obtidos os difratogramas do pó do princípio ativo, dos padrões nas formas anidra e hidratada e dos medicamentos comerciais (figura 7).

Nas análises por difratometria a fase de preparação das amostras é bastante importante, sendo possível a análise de amostras no estado sólido cristalino como pós, cristais isolados ou fibras.

Os diferentes difratogramas, apresentados pela técnica de difração de Raio-X, indicaram diferentes planos das moléculas do diclofenaco de sódio na rede cristalina das formas de hidrato e anidro, possibilitando, assim, distinguir suficientemente os padrões anidro e pentahidrato do diclofenaco de sódio, como previamente reportado (BARTOLOMEI et al., 2006; FINI et al., 2005; MUANGSIN et al., 2002).

Nas formulações comerciais (DPB1, DPB3 e DPA2) pode ser observada a existência de diferentes formas cristalinas. Na formulação DPB3 foi encontrada a forma anidra, para a formulação DPA2 foi encontrada a forma pentahidrato e na formulação DPB1 uma forma nomeada “desconhecida” foi encontrada. Esta forma foi nomeada desconhecida por não ser comparável a nenhum dos padrões por nós estudados.

Figura 7. Espectros de difração de Raio-X dos padrões anidro e pentahidrato de diclofenaco de sódio e das formulações comerciais de comprimidos (DPA2, DPB1 e DPB3).

4.1.2. Ressonância Quadrupolar Nuclear (RQN)

Os espectros de RQN dos comprimidos de diclofenaco de sódio e do padrão estão apresentados na figura 8. Podem ser observadas diferentes estruturas cristalinas em um mesmo comprimido e diferentes estruturas cristalinas entre as formulações comerciais.

A partir dos espectros de RQN das amostras comerciais de diclofenaco de sódio, identificaram-se três fases diferentes, apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Caracterização das diferentes amostras de diclofenaco por RQN

Medicamento	Fase	Identificação	Frequência de RQN	Impureza ⁷
DPB1	III	Desconhecida	35.472	----
			35.547	
DPB3	I	Anidra	34.972	----
			35.252	
			35.429	
DPA2	II	Pentahidrato	35.459	III
			35.496	

Nos espectros da figura 8 referente à forma anidra e formulação DPB3 observa-se leves variações nas frequências. Embora nenhuma informação estrutural esteja disponível, é possível inferir a existência de duas moléculas de diclofenaco de sódio não-equivalentes na célula. Cada molécula tem dois átomos de cloro, portanto seria de se esperar que ela tivesse duas frequências ressonantes, ou seja, quatro picos no espectro. Entretanto o espectro apresentou apenas três picos, isto significa que dois átomos de cloro estão contribuindo para uma ressonância, e os outros dois picos associam-se a átomos de cloro diferentes (PÉREZ et al., 2005).

⁷ Por impureza, entende-se outra fase presente em quantidades detectáveis por RQN. Em alguns casos as impurezas estão no limite de detecção das medidas que são realizadas.

Figura 8. Espectros de RQN dos padrões anidro e pentahidrato de diclofenaco de sódio e das formulações comerciais (DPA2, DPB1 e DPB3).

Nas formulações dos comprimidos DPB1, verifica-se que o princípio ativo está na forma desconhecida. Esta forma pode ser uma consequência do processo de produção ou talvez seja um solvato ou interação com algum excipiente.

A presença da forma hidratada (fase II) como majoritária nos comprimidos DPA2 deve-se ao fato de que a formulação foi feita por via úmida de acordo com a informação dada pelo laboratório.

4.1.3. Técnicas Térmicas de Análise

O DSC e TG são técnicas especialmente úteis no estudo de hidratos com passos de desidratação e/ou dessolvatação em baixa temperatura (GIRON, 1995).

A termogravimetria é uma técnica, que em conjunto com a calorimetria diferencial exploratória, fornece informações a respeito de processos de dessolvatação/desidratação, sendo complementar à caracterização de solvatomorfismo.

Os perfis das curvas de TG (figura 9) mostram a diminuição de massa como uma consequência da perda das moléculas de água de cristalização para a amostra hidrato, fato que não se observa na forma anidra. Este comportamento de perda de água de, aproximadamente, 19,8 % $\pm 0,25$ de 30 para 90 °C na curva de TG está de acordo com a forma tetrahidrato encontrada na literatura (BARTOLOMEI et al., 2006, 2007; FINI et al., 2001, 2005).

Figura 9. Perfil termogravimétrico das diferentes amostras de DS (taxa de aquecimento de 10 °C/min.).

A análise de TG evidencia, também, a decomposição térmica das amostras, que ocorre no intervalo de 280 a 300 °C, o que foi confirmado pelas análises de CDE.

Como demonstrado pelas análises de TG e Karl Fisher (dados não apresentados) a amostra hidratada corresponde a um tetrahidrato, sendo diferente em uma molécula de água da forma pentahidrato, forma esta utilizada inicialmente nos ensaios de RQN e DRX, e

presente nas formas comerciais. Esta diferença, porém, não inviabiliza as demais análises realizadas por ser mostrado que a forma tetrahidrato possui um comportamento similar ao da forma pentahidrato e um comportamento diferenciado da forma anidra.

A calorimetria diferencial exploratória é uma técnica que permite, além de determinar a temperatura de fusão, em amostras cristalinas, verificar a ocorrência de transição de fase e a presença de solvatos e/ou hidratos.

As curvas de CDE das amostras de DS (figura 10) mostram picos endotérmicos na faixa de 40 – 100 °C para a amostra hidrato que é devido à desidratação, visto que, a amostra foi recristalizada em meio aquoso. A primeira endoterma foi devido a uma primeira perda de água (água menos ligada), a segunda endoterma representou a evaporação da porção principal de água ligada. (BARTOLOMEI et al., 2006; PASQUALI et al., 2007).

A dessolvatação ou a desidratação ocorrem no estado sólido com um pico endotérmico. A posição e a energia deste pico endotérmico dependem da fase do diagrama dos dois componentes, do fármaco em questão, do solvente e da estabilidade do cristal formado (GIRON, 1995).

Para a forma anidra essas endotermas desaparecem (FINI et al., 2005; BARTOLOMEI et al., 2006; TUDJA et al., 2001), uma vez que estas amostras não apresentam água em sua estrutura.

Figura 10. Curvas de CDE das diferentes amostras de DS (taxa de aquecimento de 10 °C/min., vazão de N2 de 50 mL/min.).

Observa-se também uma endoterma ao redor de 280°C, seguida por uma exoterma. Este resultado é indicativo de aquecimento seguido por decomposição, indicando o ponto de fusão da amostra que pode variar entre 265 - 295 °C (PALOMO et al., 1999; PASQUALI et al., 2007).

4.1.4. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento de vibração. Deste modo, grupos funcionais distintos apresentaram absorção com intensidade e em regiões distintas do espectro, fazendo da espectrometria de infravermelho, uma metodologia bastante útil na identificação de compostos orgânicos e na identificação de polimorfos (SKOOG, 2002; RODRIGUEZ-SPONG et al., 2004).

As duas formas cristalinas apresentaram diferenças significativas nas transições vibracionais observadas (figura 11). Ambas foram facilmente diferenciadas pelas suas bandas de absorção de IV entre 4000 – 2000 cm^{-1} , sendo possível distinguir, também, outros pontos na faixa de frequência analisada (4050 – 350 cm^{-1}).

Conforme a figura 11-B, entre 4000 e 2000 cm^{-1} foi possível observar dois picos para a forma anidra, o primeiro em 3386 cm^{-1} , que representa a ligação NH com intensidade média e o segundo pico em 3358 cm^{-1} representando a ligação NH---O. Já para a forma hidrato (figura 11-A) uma banda larga de maior intensidade na faixa frequência 3365 e 3000 cm^{-1} foi observada, o qual corresponde ao grupo hidroxila realizando pontes de hidrogênio (BARTOLOMEI et al., 2006, 2007; PALOMO et al., 1999; RODOMONTE et al., 2008).

Figura 11. Espectro de infravermelho: DS hidratado (A), DS anidro (B).

A partir dos resultados obtidos dos picos referentes aos grupos funcionais mais susceptíveis do DS, observa-se que não houve deslocamento significativo nas posições dos picos e das bandas do DS em ambas as formas cristalinas, exceto para a função amina que foi encoberta pela banda larga do grupo hidroxila realizando pontes de hidrogênio, evidenciando, assim, a existência de hidrato.

4.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica importante para a caracterização de polimorfos, pois através dela pode observar o hábito cristalino de um composto e o tamanho do cristal (BRITTAİN, 1999).

Conforme as micrografias obtidas para caracterização do diclofenaco de sódio nas suas formas hidrato e anidro (figura 12), pode-se observar que, como ambas as amostras foram cristalizadas em meio aquoso, ambas apresentam hábito cristalino na forma de placas estratificadas, com visível separação entre as camadas, resultado que é corroborado por Fini et al. (2001, 2005).

Figura 12. Micrografias do MEV: DS anidro (A e B); DS hidrato (C e D).

Observam-se, também, pequenas diferenças na morfologia das estruturas das formas cristalinas. A forma hidrato apresenta pequenos cristais em sua superfície (figuras 12c e 12d), o que não é observado para a forma anidra, que apresenta uma superfície mais limpa e lisa (figuras 12a e 12b). Estes pequenos cristais podem ser devido a água de hidratação, pois foi

observada uma ligeira diminuição no tamanho dos cristais à medida que se aumentava a focalização, o que não ocorria na forma anidra.

4.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL *in vitro* DE DISSOLUÇÃO DAS AMOSTRAS DE DICLOFENACO DE SÓDIO

Testes *in vitro* de dissolução são uma importante ferramenta no estágio de desenvolvimento de medicamento de forma sólida, sendo usados para ajudar a desenvolver e avaliar novas formulações pela taxa de liberação do fármaco (BROWN et al., 2004). Pois, sabe-se que para um fármaco ser absorvido e atingir seu local de ação, ligar-se a seu receptor, apresentar seu efeito terapêutico, há a necessidade de antes ser dissolvido no líquido do local de absorção e superar várias barreiras (ANSEL, 2000).

A absorção intestinal de um fármaco administrado em forma farmacêutica sólida oral é determinada por quatro fatores: área superficial disponível, trânsito intestinal disponível, permeabilidade da membrana e perfil de concentração do fármaco por tempo no lúmen (MARTÍNEZ; NAVARRO, 2001). A concentração do fármaco livre disponível para transporte através da mucosa intestinal é determinada pela solubilidade, velocidade de dissolução, degradação, metabolismo e ligação do fármaco.

4.2.1. Análise cromatográfica

O princípio da separação em cromatografia ocorre pela distribuição do soluto (amostra) entre duas fases: uma móvel e outra estacionária. Alguns parâmetros da fase móvel como pH, concentração molar, tipo e proporção de solvente foram avaliados para otimizar a análise em relação à eficiência e fator de retenção (k). Utilizando fase móvel composta por ácido acético 0,7 mol/L pH 2,5 e metanol (4:6, v/v), obteve-se um fator de retenção de 12,7 caracterizando uma análise muito longa, o que representa uma grande desvantagem durante a rotina no laboratório.

Na tentativa de diminuir o fator de retenção do composto foi utilizado um solvente orgânico mais apolar, no caso a acetonitrila. A figura 13 mostra a influência da proporção de acetonitrila na retenção do diclofenaco de sódio. Pode-se observar que à medida que aumenta a proporção de acetonitrila há uma diminuição no fator de retenção, comportamento compatível com o mecanismo de fase reversa.

Figura 13. Efeito da proporção de acetonitrila no fator de retenção do diclofenaco de sódio.

Após a substituição do metanol pela acetonitrila obteve-se um menor tempo de retenção ($t_R \approx 10,0$ min) e um fator de retenção (k) de 7,2, condições estas que foram aceitas para realização dos trabalhos posteriores.

A figura 14 apresenta o cromatograma referente à análise do diclofenaco de sódio nas condições otimizadas.

Figura 14. Cromatograma referente à análise do diclofenaco de sódio. Condições cromatográficas: Coluna C-18 (250 x 4,6 mm d.i.), Fase móvel: acetonitrila: ácido acético 0,7 mol/L pH 2,5 (1:1, v/v), Vazão: 1,6 mL/min., λ : 282 nm.

4.2.2. Perfil *in vitro* de dissolução das amostras diclofenaco de sódio

A velocidade de dissolução é um parâmetro que expressa a maior ou menor rapidez com que um fármaco se dissolve em um meio, em determinadas condições de agitação e temperatura. A velocidade de dissolução está diretamente relacionada com a solubilidade, pois a velocidade de dissolução representa a quantidade ou concentração de fármaco que se dissolve por unidade de tempo, enquanto a solubilidade se refere a um estado de equilíbrio termodinâmico (MARTÍNEZ; NAVARRO, 2001).

A quantificação do diclofenaco de sódio no meio de dissolução (tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L, pH 6,8) foi feita baseada em uma curva de calibração na faixa de concentração de 10-200 µg/mL (figura 15), pois neste valor de pH o diclofenaco de sódio apresenta alta solubilidade. A curva de calibração foi feita colocando-se no eixo das abscissas as concentrações de diclofenaco de sódio e, no eixo das ordenadas, as respectivas áreas obtidas.

Figura 15. Gráfico da curva de calibração para análise do diclofenaco de sódio no intervalo de concentração de 10-200 µg/mL, referente à linearidade. Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 14, análises em triplicata.

Para a quantificação das amostras de diclofenaco de sódio nos meios de dissolução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 4,5 e HCl 0,1 mol/L pH 1,2, devido à baixa solubilidade do princípio ativo neste valor de pH, a quantificação foi baseada em uma curva de calibração na faixa de concentração de 0,2 a 80 µg/mL (figura 16).

Figura 16. Gráfico da curva de calibração para análise do diclofenaco de sódio no intervalo de concentração de 0,2-80 µg/mL, referente à linearidade. Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 14. Análises em triplicata.

A figura 17 representa o perfil de dissolução das diferentes amostras de comprimidos de diclofenaco de sódio em meio de dissolução constituído por tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 6,8.

Figura 17. Avaliação do perfil de dissolução de diferentes formulações de comprimidos de diclofenaco de sódio (DS) em meio de dissolução tampão fosfato de sódio pH 6,8. DPA2 – pentahidrato; DPB1 – desconhecida e DPB3 – anidra.

Observa-se que todas as formulações apresentaram uma alta velocidade de dissolução, pois em 1 hora todas já haviam liberado, para o meio de dissolução, 100% de seu conteúdo. Isso se deve à alta solubilidade do diclofenaco de sódio neste pH.

A figura 18 apresenta o perfil de dissolução das diferentes amostras de comprimidos diclofenaco de sódio em meio de dissolução constituído por tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 4,5.

Figura 18. Avaliação do perfil de dissolução de diferentes formulações de comprimidos de diclofenaco de sódio (DS) em meio de dissolução tampão fosfato de sódio 0,2 mol/L pH 4,5. DPA2 – pentahidrato; DPB1 – desconhecida e DPB3 – anidra.

Observa-se que as formulações DPA2 e DPB1 apresentaram uma baixa porcentagem de fármaco dissolvido no meio, embora ambos comprimidos tenham sido completamente desintegrados. Isso se deve à baixa solubilidade do diclofenaco de sódio em pH 4,5 (BARTOLOMEI et al., 2006; BERTOCCHI et al., 2005). A diferença de solubilidade verificada entre as diferentes formulações pode estar associada à presença de diferentes fases detectadas por RQN e raio-X. As formulações DPA2 e DPB1 apresentam as formas pentahidrato (fases II) e desconhecida (fase III), respectivamente. Já na formulação DPB3 (forma anidra - fase I) não foi observada a desintegração do comprimido neste meio de dissolução (revestimento intacto) não sendo possível avaliar a solubilidade dos cristais de diclofenaco de sódio nesta formulação.

Os perfis de dissolução do DS nos meios de dissolução pH 6,8 e 4,5 obtidos a 50 rpm foram comparados com dados da literatura. Segundo observado por Bartolomei et al., 2006 e Llinàs et al. 2005, a forma anidra apresenta uma maior dissolução, pois quando o hidrato, na forma sólida, é dissolvido em meio aquoso, a interação que ocorre entre a água de hidratação e a fase cristalina reduz a quantidade de energia liberada. Como consequência, cristais hidratados podem apresentar solubilidade menor que suas formas sólidas não hidratadas, podendo levar a uma precipitação do fármaco em solução (AULTON, 2005). Porém, de acordo com os dados apresentados na figura 17 observa-se uma diferença nos perfis de dissolução, em que as formas hidrato e desconhecida apresentam uma maior porcentagem de dissolução do que a forma anidra. Este fato pode ser explicado pela camada de revestimento

de cada amostra, visto que, em pH 4,5, a amostra DPB3 foi a única que resistiu intacta ao meio de dissolução.

Diante destes resultados, foram realizados testes de dissolução apenas da matéria-prima, nas formas DSA e DSH⁸, sem a presença de revestimento ou excipientes que possam interferir na velocidade de dissolução.

A figura 19 apresenta o perfil de dissolução das amostras anidra e hidrato do DS em três diferentes valores de pH.

Figura 19. Perfil de dissolução das amostras DSA e DSH. (velocidade de agitação de 50 rpm, temp. 37 ± 0.2 °C). (* $p < 0,05$).

Observa-se que a amostra anidra (DSA) apresenta uma dissolução um pouco mais rápida que a forma hidratada (DSH) em solução de pH 6,8. Esta diferença durante a dissolução ocorre, provavelmente, devido às diferenças de molhabilidade do pó de cada uma

⁸ Não foi possível a realização dos testes de dissolução com a amostra “desconhecida” devido à impossibilidade de sua obtenção.

das formas cristalinas (BARTOLOMEI et al., 2006). Isto pode levar a diferenças na biodisponibilidade quando a dissolução for o passo limitante, caso do diclofenaco de sódio.

Para os demais valores de pH (figura 19B e 19C) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos perfis de dissolução. Deste modo, os estudos de dissolução confirmaram a solubilidade pH dependente do DS.

4.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PARA ANÁLISE DO DICLOFENACO DE SÓDIO EM PLASMA

O método proposto e desenvolvido será utilizado para quantificar o diclofenaco de sódio em plasma de coelho. Entretanto, para o desenvolvimento e validação do método foi utilizado plasma humano, devido à maior facilidade em se conseguir este plasma e evitar o sacrifício desnecessário de um grande número de coelhos, visto a grande quantidade de plasma utilizado nesta etapa.

4.3.1. Procedimento de preparação da amostra

A extração líquido-líquido (ELL) constitui-se em uma das técnicas mais utilizadas em laboratórios analíticos para fins de preparação de amostras. A ELL é caracterizada pela transferência de solutos entre duas fases que formam um sistema heterogêneo tendo como principais objetivos, assim como as outras técnicas de extração: a melhora na seletividade da técnica de detecção, separando o elemento de interesse dos constituintes majoritários de uma matriz ou somente separar os interferentes mais significativos e a elevação na sensibilidade, concentrando o analito ou isolando-o numa fase, onde é observado aumento de sinal analítico (LAMBROPOULOU; ALBANIS, 2007; FACCHIN; PASQUINI, 1997; JI; REIMER; EL-SHOUBAGY, 2004).

A ELL apresenta a vantagens de ser uma técnica simples e pode utilizar uma grande variedade de solventes, que pode fornecer uma ampla faixa de solubilidade e seletividade. Outra vantagem é a desnaturação protéica, que promove a eliminação da contaminação da coluna cromatográfica (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

Por ser uma técnica em que se efetua a transferência dos solutos contidos numa solução aquosa para a fase orgânica, mediante o contato intensivo entre as duas fases imiscíveis e a concomitante formação de espécies neutras como quelatos ou compostos de associação iônica (FACCHIN, PASQUINI, 1997; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001),

alguns parâmetros importantes no processo de extração devem ser avaliados como seleção do solvente orgânico, tempo de extração e pH da fase aquosa.

4.3.1.1. Seleção do solvente orgânico

Dentre os parâmetros importantes que influenciam a extração, encontra-se o solvente orgânico, além disso, ele deve ter baixa volatilidade, para se evitar perdas durante a extração, ser compatível com o detector empregado, ser de baixa solubilidade ou insolúvel em água e solubilizar adequadamente o analito de interesse (RASMUSSEN; PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Vários solventes orgânicos tem sido reportados na literatura para extração de diclofenaco de sódio presente em amostras biológicas, tais como: diclorometano (CHMIELEUSKA, 2006; SCHNEIDER, DEGEN, 1981), heptano (BORENSTAIN et al., 1996), éter dietílico (KAPHALIA et al., 2006) e mistura de solventes, hexano:álcool isopropílico (80:20) (GIAGOUDAKIS, MARKANTONIS, 1998).

Vários solventes e misturas de solventes foram utilizados no procedimento de preparação de amostra. A figura 20 apresenta os resultados obtidos, referente à recuperação do diclofenaco de sódio, para os diferentes solventes ou misturas de solventes utilizados no procedimento de extração.

Figura 20. Seleção do solvente orgânico para extração do diclofenaco de sódio. Condições de análise: tempo de agitação (30 minutos); volume de HCl (300 µL); volume de solvente utilizado (4 mL); concentração das amostras (DS – 2 µg/mL; PI – 10 µg/mL); análises em duplicata.

De acordo com a maior área do pico obtida para o diclofenaco de sódio, a mistura do solvente hexano:éter (1:1) foi selecionada como o solvente de extração. Foi verificada também que, para o padrão interno, a porcentagem de recuperação foi semelhante para todos os solventes testados.

4.3.1.2. pH e Tempo de extração

Por se fundamentar na partição do analito entre as fases aquosa e orgânica, o pH da fase aquosa é importante para fármacos que possuem grupos dissociáveis e que, portanto, somente na forma não dissociada serão extraídos (LORD; PAWLISZYN, 2000). O diclofenaco de sódio é um fármaco que possui propriedades ácidas fracas ($pK_a \approx 4$) e sua solubilidade depende do pH do meio.

Embora muitos outros ácidos tenham sido mencionados na literatura, tal como o ácido fosfórico (BORENSTAIN et al., 1996; GIAGLOUDAKIS, MARKANTONIS, 1998; KAPHALIA et al., 2006), foi utilizado o ácido clorídrico (HCl), conforme mencionado por KAPHALIA et al. (2006), para acidificação da fase aquosa. Para modificar o pH da fase aquosa volumes de 100, 200 e 300 μ L de uma solução de HCl 2,0 mol/L foram adicionados à fase aquosa. Os resultados obtidos após avaliação dos diferentes valores de pH da fase aquosa em relação à recuperação do diclofenaco de sódio estão apresentados na figura 21.

Figura 21. Efeito da eficiência de extração do diclofenaco de sódio e padrão interno com diferentes volumes de HCl 2,0 mol/L. Condições de extração: tempo de agitação (30 minutos); volume de solvente (hexano:éter – 1:1) utilizado (4 mL); concentração das amostras (DS – 2 μ g/mL; PI – 2 μ g/mL); análises em duplicata.

Pode ser observado que diferenças significativas ($p < 0,05$) na extração do diclofenaco de sódio foram obtidas com diferentes volumes de ácido utilizados, porém não houve uma diferença significativa na extração do padrão interno. Além disso, uma maior precipitação de proteínas foi verificada com o aumento do volume do ácido. Portanto o volume de 300 μ L de HCL 2,0 mol/L foi escolhido para acidificação da fase aquosa.

A eficiência da extração líquido-líquido depende da afinidade do soluto pelo solvente, da razão entre as fases, do número de extrações (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001) e do tempo. Tempos longos fornecem melhores recuperações, porém, na prática são inviáveis para análise de um grande número de amostras (PSILLAKIS; KALOGERAKIS, 2003). O tempo que proporcionou melhor recuperação do diclofenaco de sódio foi de 30 min.

Na tabela 6 encontra-se sumarizada todas as condições de extração otimizadas.

Tabela 6. Procedimento otimizado para extração líquido-líquido

Parâmetro	Variável
Ajuste de pH	Adição de 300 μ L de HCl 2,0 mol/L
Solvente Orgânico	Éter Etilico: Hexano (1:1)
Tempo de Extração	30 minutos
Velocidade de agitação (pendular)	70 ciclos por minutos

4.3.2. Seleção do padrão interno

A técnica de padronização interna é largamente usada em análises cromatográficas de fármacos em amostras biológicas. Antes das análises, uma quantidade exata de padrão interno é adicionada às amostras que, então, são preparadas para a análise. Pela utilização do padrão interno, erros na preparação da amostra e medição analítica podem ser reduzidos, pois qualquer perda do fármaco na amostra pelo processo analítico será compensada por perda semelhante ou proporcional do padrão interno (PENG; CHIOU, 1990, RIBANI et al., 2004). Por isso o uso de um padrão interno em ensaios pode corrigir a imprecisão e melhorar a exatidão analítica, precisão esta que tem sido, substancialmente, melhorada com modernos instrumentos analíticos (PENG; CHIOU, 1990).

Vários outros anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) tem sido usados como padrão interno para a análise do diclofenaco de sódio em matriz biológica (GIAGOUDAKIS;

MARKANTONIS, 1998; ARCELLONI et al., 2001; CHMIELEWSKA et al., 2006). No método desenvolvido foram testados como padrão interno o ibuprofeno e o fenoprofeno, ambos AINES, e o salbutamol, um agonista de receptor β_2 -adrenérgico (Figura 22).

Figura 22. Estruturas do ibuprofeno, salbutamol e fenoprofeno, testados para ser utilizados como padrão interno (* indica centro quiral).

Os resultados obtidos com o ibuprofeno mostraram que este fármaco não é adequado como padrão interno, pois, como mencionado por Kaphalia et al (2006), apresenta uma pobre resolução em relação ao diclofenaco de sódio e baixa absorção no comprimento de onda de 282 nm. O salbutamol também não apresentou resultados satisfatórios uma vez que sua análise ficou comprometida pelos interferentes endógenos do plasma. O fenoprofeno, ao contrário dos fármacos anteriormente mencionados, apresentou um tempo de retenção diferente dos interferentes endógenos e do diclofenaco de sódio nas condições de análise, é estável na fase móvel utilizada e pode ser utilizado em concentrações similares às usadas para o diclofenaco de sódio. Assim sendo, o fenoprofeno foi empregado como padrão interno para quantificação do diclofenaco de sódio.

Para avaliar a seletividade do método proposto não houve a preocupação em avaliar a interferência de outros fármacos, visto que, o método será aplicado em amostras de plasma de coelhos de procedência conhecida e nenhum outro medicamento será administrado simultaneamente. Porém, a seletividade em relação a compostos endógenos do plasma é necessária. As figuras 23, 24 e 25 mostram os cromatogramas referentes a uma amostra de plasma branco de coelho, plasma branco humano e uma amostra de plasma humano fortificado com o diclofenaco de sódio e padrão interno (fenoprofeno), respectivamente, após o procedimento de preparação das amostras. Pode ser observado que não há eluição de interferentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse, tanto em plasma humano quanto de coelho.

Figura 23. Cromatograma referente a uma amostra de plasma branco de coelho. Condições cromatográficas: coluna RP-18 LichroCART® - 125-4 (125x4,6 mm), coluna guarda RP-18, fase móvel: acetonitrila:ácido acético 0,7 mol/L, pH = 2,5, vazão de 1,0 mL/min, λ = 282nm.

Figura 24. Cromatograma referente a um branco de plasma humano. Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 23.

Figura 25. Cromatograma referente a plasma humano fortificado com 500 ng/mL de diclofenaco de sódio (DS) e 10 µg/mL de fenoprofeno (padrão interno - PI). Condições cromatográficas: semelhante à descrita na figura 23.

4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e

exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

Na avaliação de métodos de quantificação de analitos em matrizes biológicas como plasma, o FDA determina a avaliação dos seguintes parâmetros: linearidade, recuperação, precisão, exatidão, seletividade/especificidade, limite de quantificação e estabilidade.

4.4.1. Linearidade

As curvas de calibração/linearidade representam a relação entre a resposta do instrumento analítico e a concentração do analito (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

Embora somente dois pontos definam uma reta, a linearidade dever ser demonstrada pela inclinação da reta (estatisticamente diferente de zero e reprodutível), o intercepto (não estatisticamente diferente de zero) e o coeficiente de correlação (não estatisticamente diferente de 1). A curva analítica deve ser construída usando-se de 5 a 8 valores de concentração que devem abranger aquelas normalmente encontradas para o composto em estudo (BRESSOLLE; BROMET-PETIT; AUDRAN, 1996; SHAH et al., 2000). Linearidade com coeficientes de correlação acima de 0,95 são aceitáveis para a maioria dos métodos bioanalíticos, porém, a ANVISA (2003) define como valores aceitáveis de linearidade coeficientes de correlação iguais ou superiores a 0,98, estabelecendo-se também que desvios de valores nominais não podem ser superiores a 15%.

Figura 26. Curva de calibração para análise do diclofenaco de sódio no intervalo de concentração plasmática de 0,1 - 60 µg/mL, referente à linearidade.

Os dados apresentados na figura 26 mostram linearidade satisfatória no intervalo de concentração plasmática avaliada (0,1 a 60,0 µg/mL) e coeficiente de correlação superior ao recomendado pela literatura (ANVISA, 2003), evidenciando-se ainda desvios nominais inferiores a 15% nas concentrações avaliadas.

4.4.2. Recuperação

A recuperação avalia a capacidade do processo de preparação da amostra em extrair o analito da matriz, etapa esta onde podem ocorrer perdas do mesmo. Portanto, é necessária que se faça a avaliação da recuperação, relacionada à eficiência de extração do método proposto (SHAH et al., 2000).

Muito embora sejam desejáveis recuperações altas (próximas a 100%), baixas recuperações também são aceitáveis, desde que, sejam precisas e exatas ao método proposto (ANVISA, 2003; BANSAL; DESTEFANO, 2007).

O procedimento de extração empregado é uma técnica que apresenta elevada taxa de recuperação (JI; REIMER; EL-SHOUBAGY, 2004; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). Estudos realizados por Cheremina, Brune e Hinz (2006) e Dorado et al. (2003), utilizando a extração líquido-líquido, demonstraram recuperações acima de 80% para vários compostos analisados, inclusive o diclofenaco de sódio. Valores de recuperação muito bons foram obtidos em nossos estudos para o DS, aproximadamente, 100,3%, com coeficientes de variação inferiores a 15% (Tabela 7).

Tabela 7. Recuperação do diclofenaco de sódio

Concentração Plasmática Nominal (µg/mL, n = 3)	Diclofenaco de Sódio	
	Recuperação Média (%)	CV %
0,5	96,0	10,4
5,0	104,6	3,3
20,0	100,4	6,0
Média intervalo	100,3	4,3

n = número de amostras; CV = coeficiente de variação.

4.4.3. Precisão e Exatidão

Quando os resultados do estudo de linearidade são aceitáveis pode-se começar a avaliar a precisão e exatidão. Ambas são características importantes usadas para se decidir a aceitação de um método (HARTMANN et al., 1998).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas, sendo a precisão, em validação de métodos, considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

A repetibilidade (precisão intra-ensaio) representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição em um curto intervalo de tempo. Já a precisão intermediária (precisão inter-ensaio) indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores, tendo como objetivo verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, sendo por isso, a precisão mais aconselhável de ser adotada. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas e refere-se a resultados de estudos de colaboração entre laboratórios (RIBANI et al., 2004).

Como as variações de concentração das amostras são normalmente grandes em bioanálises, é necessário, ao documentar a precisão, pelo menos três níveis de concentração, sendo considerado nível baixo, médio e alto (ANVISA, 2003; HARTMANN et al., 1998).

A análise das precisões intra e inter-ensaio foi realizada de acordo com o item 3.5.3, seguindo normas referenciadas na literatura (FDA, 2001; ANVISA, 2003), e foram obtidos valores de coeficientes de variação (CV) inferiores a 15,0% na avaliação da precisão em todas as concentrações analisadas, valores estes aceitáveis para análises em fluidos biológicos (tabela 8).

Tabela 8. Precisão intra e inter-ensaios para análise do diclofenaco de sódio

Concentração Plasmática Nominal (µg/mL)	DICLOFENACO DE SÓDIO	
	Média das concentrações avaliadas (µg/mL)	Precisão (% CV)
Intra-ensaio (n = 5)		
0,5	0,504	12,00
5,0	5,370	2,80
50,0	54,635	7,40
Interensaio (d = 5)		
0,5	0,483	7,80
5,0	5,117	4,38
50,0	51,624	4,50

CV- coeficiente de variação; n- número de amostras; d- número de dias

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (RIBANI et al., 2004; SHAH et al., 2000).

A exatidão pode sofrer influência de várias situações em sua avaliação. A estimativa do cálculo da exatidão analisada durante só um dia pode ser fortemente influenciada pelo efeito da curva de calibração daquele dia. Por isso, recomenda-se avaliar a exatidão da mesma forma que a precisão, com análises intra e inter-ensaios (ANVISA, 2003; HARTMANN et al., 1998).

Para as três concentrações analisadas, tanto no estudo intra quanto inter-ensaios, os resultados foram expressos em porcentagem do erro relativo, ficando a média dos erros relativos inferiores a 10%, sendo estes valores aceitáveis para análises em fluidos biológicos (tabela 9).

Tabela 9. Exatidão intra e inter-ensaios para análise do diclofenaco de sódio

Concentração Plasmática Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	DICLOFENACO DE SÓDIO	
	Média das concentrações avaliadas ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%E)
Intra-ensaio (n = 5)		
0,5	0,504	+0,80
5,0	5,370	+7,40
50,0	54,635	+9,30
Interensaio (d = 5)		
0,5	0,483	-2,44
5,0	5,117	+2,28
50,0	51,624	+3,27

E- erro relativo; n- número de amostras; d- número de dias

4.4.4. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão (ANVISA, 2003; BRAGGIO et al., 1996; SHAH et al., 2000;) em um determinado método, sendo que o LQ é normalmente o padrão de calibração mais baixo no estudo real (BRAGGIO et al., 1996).

Para o método proposto, a menor concentração avaliada do analito, como precisão e exatidão, foi de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, valor este que se encontra acima de alguns trabalhos mencionados na literatura (ARCELLONI et al., 2001; JIAO et al., 2006; LEE et al., 2000) para determinação de diclofenaco de sódio em fluidos biológicos, porém, este valor encontra-se em acordo com outros trabalhos citados na literatura (DORADO et al., 2003; KAPHALIA et al., 2006).

A tabela 10 apresenta os valores da precisão e exatidão para o limite de quantificação.

Tabela 10. Limite de quantificação para análise do diclofenaco de sódio

Concentração Plasmática Nominal ($\mu\text{g/mL}$) (n= 5)	DICLOFENACO DE SÓDIO		
	Média das concentrações avaliadas ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (%E)	Precisão (%CV)
0,1	0,117	+17,7	5,67

E- exatidão; CV- coeficiente de variação; n- número de amostras.

Pode ser observado que estes valores estão de acordo com o preconizado pela literatura (ANVISA, 2003).

4.4.5. Estudo de estabilidade

Muitos fármacos e seus metabólitos são relativamente instáveis e podem degradar durante a coleta e processamento das amostras frescas e no armazenamento, subsequente a preparação e análise das amostras (PENG; CHIOU, 1990). Para se evitar que os experimentos de validação acima descritos sejam afetados por soluções de reagente instáveis e/ou por possível instabilidade das soluções prontas, os experimentos de estabilidade devem ser executados o mais cedo possível (HARTMANN et al., 1998).

Diferentes fatores podem afetar a estabilidade de fármacos em amostras biológicas (suas propriedades químicas, a matriz biológica, material de acondicionamento utilizado e condições de armazenamento) e devem ser avaliados de acordo com o fármaco estudado (PENG; CHIOU, 1990). A estabilidade do fármaco é muitas vezes crítica em matrizes biológicas, mesmo durante curtos períodos de tempo. A degradação é muito habitual até quando todas as precauções são tomadas para se evitar problemas de estabilidade, causados por fatores conhecidos como incidência direta de luminosidade (HARTMANN et al., 1998).

Na maior parte dos estudos de farmacocinética, raramente as amostras biológicas são analisadas imediatamente após a coleta, e são, por isso, armazenadas para posterior análise. O armazenamento a longo prazo eleva a probabilidade de degradação de fármacos e metabólitos nas amostras biológicas (PENG; CHIOU, 1990).

Com o objetivo de estudar a degradação do diclofenaco de sódio nas amostras biológicas, a estabilidade foi determinada em ciclos de congelamento e descongelamento, estabilidade no tempo e condições de análise e ensaio de longa duração.

Figura 27. Estabilidade do diclofenaco de sódio, contemplando duas concentrações (1 e 50µg/mL), após ciclo de congelamento/descongelamento (AC_{CD}), estabilidade de curta duração (AT_{amb}-12h), estabilidade de longa duração (AE_{LD}-7º dia), comparada com as amostras frescas (AF-1, AF-2 e AF-3) e amostra da estabilidade de longa duração colhida no primeiro dia (AE_{LD}-1º dia). Análise realizada pelo teste t-Student com nível de significância de 5%.

Após concluídos os estudos de estabilidade, pode-se observar pelos resultados apresentados na figura 27 que o DS é estável quando submetido a ciclos de congelamento e descongelamento, armazenado à temperatura ambiente e armazenado congelado por longo período de tempo, o que vem confirmar outros estudos que mostraram que o diclofenaco de sódio é estável por não menos do que duas semanas após o congelamento (EL-SAYED et al., 1988).

4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO

O método desenvolvido foi aplicado em um estudo-piloto para a verificação da concentração plasmática em coelhos. Para tal aplicação, as diferentes formas cristalinas do DS foram administradas por via oral em cápsulas em dose única (12 mg/kg). A média dos perfis de concentração plasmática *versus* tempo para as duas amostras (DSA e DSH) estão mostradas na figura 28.

Mediante os resultados apresentados não se pode retirar conclusões a cerca da concentração plasmática das diferentes formas cristalinas do DS, pois houve uma grande variação dentro um mesmo grupo e no mesmo animal, não permitindo a realização de análises estatísticas ou de cinética.

Novos estudos serão realizados para a avaliação da concentração plasmática em animais, para que se possa, realmente, verificar se há uma correlação no perfil *in vivo* com o perfil *in vitro* de dissolução.

Figura 28. Gráfico da concentração plasmática (média $\pm$ e.p.m.) versus tempo de coleta referente à análise das amostras de plasma de coelhos, após dose oral única de DSA e DSH (12 mg/kg; n = 2).

4.6. EFEITO DAS DIFERENTES AMOSTRAS DE DS NA RESPOSTA FEBRIL INDUZIDA POR LPS

A febre, uma importante resposta mediada pelo encéfalo que ocorre como parte de uma resposta de fase aguda, é tradicionalmente definida como uma elevação na temperatura corporal em resposta a injúrias, traumas, ou a invasão por agentes infecciosos (ROTH; SOUZA, 2001). Pirogênios exógenos, tal como, lipopolissacarídeo (LPS) isolado da parede de bactérias Gram-negativas, estimulam as células de defesa do hospedeiro a liberar vários pirogênios endógenos (PE), tais como: interleucina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α , RANTES e endotelina 1. Os PEs alteram a atividade dos neurônios termoregulatórios da área pré-óptica do hipotálamo anterior deslocando o termostato hipotalâmico induzindo o aumento controlado da temperatura corporal (ROTH; SOUZA, 2001; FABRICIO et al., 2005; MACHADO et al., 2007; HUANG et al., 2008).

A febre é, geralmente, considerada benéfica e representa uma parte integral de uma resposta de defesa (ROTH, 2006). Dentre os benefícios da febre podemos mencionar aceleração da quimiotaxia de neutrófilos e da secreção de substâncias antibacterianas (peróxidos, superóxidos, lisozima e lactoferrina) (VOLTARELLI, 1994) e a diminuição da disponibilidade de ferro, a qual limita a proliferação bacteriana (ROTH, 2006).

Embora haja diversos argumentos que suportam a visão de que a febre é benéfica para o hospedeiro infectado, a febre pode tornar-se perigosa quando acima de certa temperatura (ROTH, 2006).

O DS tem sido alvo de diversos estudos a respeito de suas atividades farmacológicas, incluindo seu efeito antipirético (MARTINS, 2006; TAGIROVA; MUKHUTDINOVA,

2005). Tais ações foram referidas à sua capacidade de inibir a síntese de PGs bloqueando a enzima COX (MARTINS, 2006; TAGIROVA; MUKHUTDINOVA, 2005). Porém, não se encontrou disponível na literatura estudos sobre as possíveis diferenças que poderiam ocorrer nos efeitos farmacológicos ocasionado pelas diferentes formas cristalinas do DS.

Sendo assim, mostramos aqui que as diferentes formas cristalinas do DS (DSA e DSH), administradas oralmente em cápsulas (8 mg/kg), inibiram de forma similar a resposta febril induzida por injeção sistêmica de LPS (figura 29). As duas formas cristalinas do DS, tiveram o início de ação no mesmo tempo (120 min.), correspondendo a uma hora após a administração do fármaco.

Figura 29. Efeito das diferentes amostras de DS sobre a resposta febril induzida por LPS. Diclofenaco de sódio anidro (DSA) e/ou hidrato (DSH), na dose única de 8 mg/mL, ou placebo (cápsulas vazias) foram administrados por via oral 60 minutos após a aplicação do estímulo pirogênico (LPS – 0,1 µg/kg i.v.) ou salina no volume de 0,5 mL (i.v.). Os animais controle receberam salina e não apresentaram alteração na temperatura basal. Os valores representam a média ± e.p.m. das variações de temperatura de 4 a 5 animais por grupo. A temperatura basal estava entre 38,6 e 39,4 °C. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 comparado com grupo LPS/H₂O.

Mediante resultados observados, a diferença no perfil de dissolução das diferentes formas cristalinas não afetou o efeito antipirético do fármaco. Como demonstrado na figura 19A e demonstrado por outros autores (BARTOLMEI et al., 2006, 2007), os perfis de dissolução são similares até os 20 min., e sendo o DS um fármaco de alta permeabilidade, isso leva a inferir que todo fármaco solubilizado, até os primeiros 20 min., é absorvido. Deste modo, o DS já absorvido pode atuar na inibição da enzima COX, culminando na redução da temperatura corporal dos animais.

5. CONCLUSÃO

Ao final das atividades desenvolvidas e à luz dos objetivos traçados na concepção deste estudo, pode-se concluir que:

- Todas as técnicas empregadas na caracterização das diferentes amostras de DS mostraram-se muito úteis, fornecendo informações que confirmaram a existência das diferentes formas cristalinas (anidro e hidrato). Os resultados gerados por cada técnica utilizada na caracterização demonstraram, com exceção das técnicas de DRX e RQN, que é importante e necessário a utilização de um conjunto de técnicas para assegurar a ocorrência de polimorfismo;
- Os testes de dissolução *in vitro* mostraram diferenças na solubilidade entre as formulações avaliadas nos diferentes meios de dissolução. Como os resultados encontrados não coincidiram com os preconizados pela literatura, o que pode ter sido causado pela presença de revestimento nas formulações comerciais, foram realizados testes de dissolução apenas das matérias-primas, onde foi constatado a real diferença no perfil de dissolução em pH 6,8 e a solubilidade pH dependente do DS;
- O método utilizado para a análise do DS em plasma é simples, rápido, confiável e apropriada para a quantificação de DS em plasma, visto que todos os parâmetros utilizados para avaliar a confiabilidade do método estão de acordo com o preconizado pela literatura;
- Na avaliação do efeito antipirético das duas formas cristalinas (DSA e DSH), foi constatado que ambas as formas inibiram de forma similar a resposta febril induzida por injeção sistêmica de LPS, tendo seu início de ação uma hora após a administração do fármaco.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, M.E.; NOVOTNY, L.; HAMZA, H. Determination of diclofenac sodium, flufenamic acid, indomethacin and ketoprofen by LC-APCI-MS. **Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 24, p. 587-594, fev. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899-03.htm>>. Acesso em 08 de Fevereiro de 2007.

ALNOUTI, Y.; SRINIVASAN, K.; WADDELL, D.; BI, H.; KAVETSKAIA, O.; GUSEV, A.I. Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, vol. 1080, p. 99-106, abr. 2005.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, J.L.V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª Ed. São Paulo: Premier, 2000, 568p.

ARANCIBA, J.A.; BOLDRINI, M.A.; ESCANDAR G.M. Spectrofluorimetric determination of diclofenac in the presence of α -cyclodextrin. **Talanta**, Amsterdam, vol. 52, p. 261-268, fev. 2000.

ARCELLONI, C.; LANZI, R.; PEDERCINI, S.; MOLTENI, G.; FERMO, I.; PONTIROLI, A.; PARONI, R. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, vol. 763, p. 195-200, ago. 2001.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Trad. George G. Ortega, Porto Alegre, Ed. Artmed, 2005.

BANSAL, S.; DESTEFANO, A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. **The AAPS Journal**, Nova York. vol. 9 (1), p. E109-E114, mar. 2007.

BARTOLOMEI, M.; RODOMONTE, A.; ANTONIELLA, E.; MINELLI, G.; BERTOCCHI, P. Hydrate modifications of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium: Solid-state characterisation of a trihydrate form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 45, p. 443-449, jul. 2007.

BARTOLOMEI, M.; BERTOCCHI, P.; ANTONIELLA, E.; RODOMONTE, A. Physico-chemical characterization and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 40, p. 1105-1113, out. 2006.

BERTOCCHI, P.; ANTONIELLA, E.; VALVO, L.; ALIMONTI, S.; MEMOLI, A. Diclofenac sodium multisource prolonged release tablets - a comparative study on the dissolution profiles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, vol. 37, p. 679-685, abr. 2005.

BONIFACIO, F.; CRESCENZI, C.; DONNARUMMA, M.; IPPOLITI, D. Methods for preparing sertraline hydrochloride polymorphs. United States Patent 7,189,876: 13 Mar. 2007.

BLAGDEN N.; DAVEY, R. J.; LIEBERMAN, H. F.; WILLIAMS, L.; PAYNE, R.; ROBERTS, R.; ROWE, R.; DOCHERTY, R. Crystal chemistry and solvent effects in polymorphic systems Sulfathiazole. **Journal of Chemistry Society, Faraday Transformation**, Londres, vol. 94, p. 1035-1044, jan. 1998.

BORENSTEIN, R.M.; XUE, Y.; COOPER, S.; TZENG, T.B. Sensitive capillary gas chromatographic-mass spectrometric-selectes-ion monitoring method fot the determination of diclofenac concentrations in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, vol. 685, p. 59-66, mar. 1996.

BRAGGIO, S.; BARNABY, R.J.; GROSSI, P.; CUGOLA, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 14, p. 375-388, fev. 1996.

BRANDÃO, A.L.A. Influência do Polimorfismo na Farmacotécnica de Cápsulas no Setor Magistral. **Revista Racine**, São Paulo, vol. 91, p. 1-28, 2006.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, vol. 686, p. 3-10, nov. 1996.

BRITTAIN, H.G. Structural methods for the characterization of polymorphs and solvates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, vol. 86, nº 4, p. 405-412, abr. 1997.

BRITTAIN, H.G. Methods for the Characterization of Polymorphism and Solvates, in: H.G. Brittain (Ed.), **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. vol. 95, New York, Marcel Dekker, 1999, Cap. 6, p. 227-278.

BRITTAİN, H.G. Polymorphism and Solvatomorphism 2007. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, vol. 97, p. 3611-3636, set. 2008.

BRITTAİN, H.G.; BYRN S.R. Structural aspects of polymorphism, in: H.G. Brittain (Ed.), **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. vol. 95, New York, Marcel Dekker, 1999, Cap. 3, p. 73-124.

BRITTAİN, H.G.; FIESE, E.F. Effects of pharmaceutical processing on drug polymorphs and solvates, in: H.G. Brittain (Ed.), **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**. v.95, New York, Marcel Dekker, 1999, Cap. 8, p. 331-361.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R.; SHAH, P.A. Dissolution testing of poorly soluble compounds. **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, dez. 2004.

BURKE. A.; SMYTH. E.; FITZGERALD. G.A. Analgésicos – Antipiréticos; Farmacoterapia da Gota. In: BRUNTON. L. L.; LAZO. J. S.; PARKER. K. L. A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ª edição, São Paulo, Mc Graw Hill, 2006, Cap. 26, p. 601-638.

BUSSANDRI, A.; ZURIAGA, M. Spin-echo mapping spectroscopy applied to NQR. **Journal of Magnetic Resonance**, Londres, vol. 131, p. 224-231, 1998.

BYRN, S.R.; COATES, D.A.; GUSHURST, K.S.; KRZYZANIAK, J.F.; LI, Z.J.; MORRISON, H.G.; PARK, A.; VLAHOVA, P.I. Crystalline forms of [R-(R*, R*)]-2-(4-fluorophenyl)-beta, delta-dihydroxy-5-(1-methyl-lethyl)-3-phenyl-4-[(phenilamino)carbonyl]-1H-pyrrole-1-heptanoic acid calcium salt (2:1). Unite State Patent 7,144,915. 5 dez. 2006.

CHEMBURKAR, S.R.; BAUER, J.; DEMING, K.; SPIWEK, H.; PATEL, K.; HENRY, R.; SPANTON, S.; DZIKI, W.; PORTER, W.; QUICK, J.; BAUER, P.; DONAUBAUER, J.; NARAYANAM, B.A.; SOLDAN, M.; RILEY, D.; McFARLAND, K. Dealing with the impact of ritonavir polymorphs on the late Stage of bulk drug process development. **Organic Process Research & Development**, Londres, vol. 4, p.413-417, mai. 2000.

CHEREMINA, O.; BRUNE, K.; HINZ, B. A validated high-performance liquid chromatographic assay for determination of lumiracoxib in human plasma. **Biomedical Chromatography**, Londres, vol. 20, p. 1033-1037, out. 2006.

CHMIELEWSKA, A.; KONIECZNA, L.; PLENIS, A.; BIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Determination of Diclofenac in plasma by high performance liquid-chromatography with electrochemical detection, **Biomedical Chromatography**, Londres, vol. 20, p. 119-124, jan. 2006.

COOPER, V. B.; PEARCE, G.E.S.; PETTS C.R. Quantification of crystalline forms in active pharmaceutical ingredient and tablets by X-ray powder diffraction. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, vol. 55, p. 1323-1329, set. 2003.

CUFFINI, S.L.; FAUDONE, S.; DABBENE, V.; BADINI, R.; RUBIO, M. Polymorphism and pseudopolymorphism in pharmaceutical drugs. In: SARX2002 (VII SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE ANÁLISES POR TÉCNICAS DE RAIOS X)", 2002, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil, **Resumos. VIII Seminário Latino-Americano de Análises por Técnicas de Raios X**, 2001, p.75.

CUFFINI, S.L.; PALACIO, M.; FERRAYOLI, C.; PALACIOS, S.; PAGOLA, S.; STEPHENS, W. Application of powder X-ray diffraction for monitoring the crystallization process and the crystal structure determination of enantiomeric pharmaceutical drug R(-)-Albuterol sulfate. In: SARX2002 (VII SEMINÁRIO LATINO-AMERICANO DE ANÁLISES POR TÉCNICAS DE RAIOS X)", 2002, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil, **Resumos. VIII Seminário Latino-Americano de Análises por Técnicas de Raios X**, 2001, p.100.

CUI, Y., A material science perspective of pharmaceutical solids. **International Journal of Pharmaceutics**, Londres, vol. 339, p. 3-18, jul. 2007.

DE ARMAS, H. N.; PEETERS, O. M.; MOOTER, G. V. D.; BLATON, N. Polymorphism of Alprazolam (Xanax): A review of its crystalline phase and identification, crystallographic characterization, and crystal structure of a new polymorph (Form III). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, vol. 96, p. 1114-1130, mai. 2007.

DE CASTRO, W.V.; PIRES, M.A.S.; OLIVEIRA, M.A.; VIANNA-SOARES, C.D.; NUNAN, E.A.; PIANETTI, G.A.; MOREIRA-CAMPOS, L.M.; DE CASTRO, W.V.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; DERENDORF, H. Dissolution Profile of Diclofenac Sodium Tablets. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Londres, vol. 32, p. 1103-1109, out. 2006.

DORADO, P.; BERECH, R.; CACERES, M. C.; LLERENA, A. Analysis of diclofenac and its metabolites by high-performanceliquid chromatography: relevance of *CYP2C9* genotypes in diclofenac urinary metabolic ratios. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, vol. 789, p. 437-442, jun. 2003.

DRESSMAN, J.B.; AMIDON, G.L.; REPPAS, C.; SHAH, V.P. Dissolution testing as a prognostics tool for oral absorption immediate dosage forms. **Pharmaceutical Research**, Hingham, vol. 15, p. 11-22, jan. 1998.

EL-SAYED Y.M.; ABDEL-HAMEED, M.E.; SULEIMAN, M.S.; NAJIB, N.M. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in serum and its use in pharmacokinetic studies. **Journal of Pharmaceutical and Pharmacology**, Londres, vol. 40 (10), p. 727-729, out. 1988.

EWING, G.W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. Ed. Edgard Blucher Ltda. São Paulo, 1996.

FABRICIO, A.S.C.; RAE, G.A.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; SOUZA, G.E. Endothelin-1 as a central mediator of LPS-induced fever in rats. **Brain Research**, Londres, vol. 1066, p. 92-100, dez. 2005.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistema de fluxo. **Química Nova**, São Paulo, vol. 21, nº1, p. 60-68, mar. 1998.

FDA - U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center of Drug Evaluation and Research, Rockville, 1998. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder/foi/label/1998/20785lbl.pdf>>. Acesso em 25 de junho de 2007.

FINI, A.; FAZIO, G.; ROSETTI, F.; HOLGADO, M.A.; IRUÍN, A.; ALVAREZ-FUENTES, J. Diclofenac Salts. III. Alkaline and earth alkaline salts. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, vol. 94, p. 2416-2431, nov. 2005.

FINI, A.; GARUTI, M.; FAZIO, G.; ALVAREZ-FUENTES, J.; HOLGADO, M.A. Diclofenac Salts. I. Fractal and thermal analysis of sodium and potassium diclofenac salts. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, vol. 90, p. 2049-2057, dez. 2001.

GALLO, P.; FABBROCINO, S.; VINCI, F.; FIORI, M.; DANESE, V.; NASI, A.; SERPE, L. Multi-Residue Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Residues in Animal Serum and Plasma by HPLC and Photo-Diode Array Detection. **Journal of Chromatographic Science**, Amsterdam, vol. 44, p. 585-590, nov/dez. 2006.

GARCIA, S.; SANCHEZ-PEDRENO, C.; ALBERO, I.; GARCIA, C. Flow-injection spectrophotometric determination of diclofenac or mefenamic acid in pharmaceuticals, **Mikrochimica Acta**, Austria, vol. 136, p. 67-71, jun. 2001.

GAREKANI, H.A.; FORD, J.L.; RUBINSTEN, M.H.; RAJABI-SIAHBOOMI, A.R. Formation and compression characteristics of prismatic polyhedral and thin plate-lake crystals of paracetamol. **International Journal of Pharmaceutics**, Londres, vol. 187, p. 77-89, set. 1999.

GEOCITIES. Estrutura de Sólidos Cristalinos e Não-Cristalinos. <http://br.geocities.com/clebersial/mcm/cap3_p1.ppt> Acesso em 25 de Janeiro de 2008.

GIAGLOUDAKIS, G.; MARKANTONIS, S.L. An alternative high-performance liquid-chromatographic method for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol.1, p. 897-901, ago. 1998.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, Londres, vol. 248, p.1-59, jan. 1995.

GLUSKER, J.P.; LEWIS, M; ROSSI, M. Crystals, In: GLUSKER, J.P.; LEWIS, M; ROSSI, M. **Crystals Structure Analysis for Chemists and Biologists**. 1º edição. New York, VCH Publishers, 1994. Cap. 2, p. 33-72.

GONZÁLEZ, L.; YULN, G.; VOLONTÉ, M.G. Determination of cyanocobamin, betamethasone, and diclofenaco sodium in pharmaceutical formulations, by high performance liquid chromatographic. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 20, p. 487-492, jan. 2000.

GRANT, D.J.W. Theory and origin of polymorphism. In: Brittain, H.G. (Ed.), **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**, New York, Marcel Dekker, 1999, cap. 1, p. 1-32.

GRANT, D.J.W.; BYRN, S.R. A timely re-examination of drug polymorphism in pharmaceutical development and regulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Londres, v.56, p.237-239, fev. 2004.

GUIDANCE FOR INDUSTRY. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage formas based on a biopharmaceutics classification system. **FDA**, Rockville, 2000, 13p.

HAMIED, Y.K.; KANKAN, R.N.; RAO, D.R. Pharmaceutical compositions containing new polymorphic forms of olanzapine and uses thereof. United States Patent 7,022,698, 4Abr. 2006.

HARRIS, K.D.M.; TREMAYNE, M.; KARIUKI, B.M. Contemporary Advances in the Use of Powder X-Ray Diffraction for Structure Determination. **Angewandte Chemie International**, Berlin, vol. 40, p.1626-1651, mai. 2001.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D.L.; MCDOWALL, R.D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, vol. 17, p. 193-218, jun. 1998.

HIRAI, T.; MATSUMOTO, S.; KISHI, I. 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**, Amsterdam, vol. 692, p. 375-388, mai. 1997.

HUANG, L.F.; TONG, W.Q. Impact of solid-state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Londres, v.56, p.321-334, fev. 2004.

HUANG, W.-T.; NIU, K.-C.; CHANG, C.-K.; LIN, M.-T.; CHANG, C.-P. Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. **European Journal of Pharmacology**, Londres, vol. 593, p. 105-111, jul. 2008.

JI, Q.C.; REIMER, M.T.; EL-SHOUBAGY, T. A. 96-Well liquid-liquid extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of ABT-578 in human blood samples. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, vol. 805, p. 67-75, jun. 2004.

JIAO, H.; XU, F.; ZHANG, Z.; TIAN, Y.; JIANG, Z.; ZHANG, L. Simultaneous determination of ZLR-8 and its active metabolite diclofenac in dog plasma by high-performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, Londres, vol. 21, p. 382-388, abr. 2007.

KAPHALIA, L.; KAPHALIA, B.S.; KUMAR, S.; KANG, M.F.; TREINEN-MOSLEN, M. Efficient high performance liquid-chromatography/ultraviolet method for determination of diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac in rat serum. **Journal of Chromatography B**. Amsterdam, vol. 830, p. 231-237, jan. 2006.

KARJALAINEN, M.; AIRAKSINEN, S.; RATANEN, J.; AATONEN, J.; YLIRRUSI, J. Characterization of polymorphic solid-state changes using variable temperature X-ray powder diffraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Oxford, vol. 39, p. 27-32, set. 2005.

KATO, Y.; KOHKETSU, M. Relationship between polymorphism and bioavailability of amobarbital in the rabbit. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. Tóquio, vol.29, p.268-272, jan. 1981.

KLIMES, J.; SOCHOR, J.; DOLEZAL, P.; KÖRNER, J. HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations. **International Journal of Pharmaceutics**. Londres, vol. 217, p. 153-160, abr. 2001.

KOKKI, H.; KUMPULAINEN, E.; LAISALMI, M.; SAVOLAINEN, J.; RAUTIO, J.; LEHTONEN, M. Diclofenac readily penetrates the cerebrospinal fluid in children. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Londres, vol. 65, p. 879-884, mar. 2008.

KREIDL, R.H.; CZIBULA, L.; SZANTAY, C.; FARKAS, J.; JUHASZ, I.D.; HEGEDUS, I.; PAPP, E.W.; BAGDY, J.N.; PILLER, A.; KREIDL, J. Process for preparing monohydrate and crystal modifications of fluconazole. Unite State Patent 7,094, 904. 22 ago. 2006.

LAITINEN I. 2006. Process for preparing sertraline hydrochloride polymorphic form II. United States Patent 7,067,700. 27 Jun. 2006.

LALA, L.G.; D'MELLO, P.M.; NAIK, S.R. HPTLC determination of diclofenaco sodium from serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 29, p. 539-544, jun. 2002.

LAMBROPOULOU, D. A.; ALBANIS, T. A. Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. Londres, vol. 70, p. 195-228, mar. 2007.

LEE, H. S.; JEONG, C. K.; CHOI, S. J.; KIM, S. B.; LEE, M. H.; KO, G. I.; SOHN, D. H. Simultaneous determination of aceclofenac and diclofenac in human plasma by narrowbore HPLC using column-switching. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 23, p. 775-781, out. 2000.

LIDOR-HADAS, R.; NIDDAM, V.; LIFSHITZ, R.; KOVALEVSKI-IAHAI, N. Criystal forms of atorvastatin hemicalcium and process for their preparation as well as novel process for preparing other forms. Unite State Patent 6,992,194. 31 jan. 2006.

LIFSHITZ, I.; AVRUTOV, I.; SCHWARTZ, E.; MASARWA, B. Process for preparing clarithromycin polymorphs. Unite State Patent 6,987,175. 17 jan. 2006.

LLINÁS, A.; BURLEY, J.C.; BOX, K.J.; GLEN, R.C.; GOODMAN, J.M. Diclofenac solubility: independent determination of the intrinsic solubility of three crystal forms. **Journal of Medicinal Chemistry**, Nova York, vol. 50, p. 979-983, mar. 2007.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, vol. 902, p. 17-63, dez. 2000.

MACHADO, R.R.; SOARES, D.M.; PROUDFOOT, A.E.; SOUZA, G.E. CCR1 and CCR5 chemokine receptors are involved in fever induced by LPS (*E. coli*) and RANTES in rats. **Brain Research**, Londres, vol. 1161, p. 21-31, ago. 2007.

MARONA, H. R. N.; STORTI, M. P. B.; NETO, V. A. L. Flutamida: Revisão de suas propriedades farmacológicas e físico-químicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, São Paulo, vol. 50 (1), p. 37-44, mar. 2004.

MARTÍN-ISLN, A.P.; CRUZADO, M.C.; ASENSIO, R.; SAINZ-DAZ, C.I. Crystalline Polymorphism and Molecular Structure of Sodium Pravastatin **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, vol. 110, p. 26148-26159, nov. 2006.

MARTÍNEZ, P.B.; NAVARRO, M.G. Disoluciones. In: Vila Jato, J.L. (ed.). **Tecnología Farmacêutica: Aspectos Fundamentales de los Sistemas Farmacéuticos y Operaciones Básicas**, vol. 1, 1º ed., Madrid: Síntesis, 2001, p. 69-142.

MARTINS, J. M. **Avaliação da atividade antipirética do diclofenaco de sódio**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado – Farmacologia) Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MATIN, A.A.; FARAJZADEH, M.A.; JOUYBAN, A. A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations. **Il Farmaco**, Pavia, vol. 60, p.855-858, out. 2005.

MAURIN, M. B.; VICKERY, R. D.; RABIL, S. R.; ROWE, S. M.; EVERLOF, J. G.; NEMETH, G. A.; CAMPBELL, G. C.; FORIS, C. M. Polymorphism of roxifiban. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, vol. 91, p. 2599-2604, dez. 2002.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 40, p. 1235-1242, mar. 2006.

MELO-SOARES, D.; VEIGA-SOUZA, F.H.; FABRICIO, A.S.C.; MINANO, F.J.; SOUZA, G. E. CCL3/macrophage inflammatory protein-1 alpha induces fever and increases prostaglandin E2 in cerebrospinal fluid of rats: effect of antipyretic drugs. **Brain Research**, Londres, vol. 1109, p. 83-92, set. 2006.

MONTCRIEFF J. Extractionless determination of diclofenac sodium in serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, vol. 577, p. 185-189, mai. 1992.

MORRIS, K.R. Structural aspects of hydrates and solvates. In: BRITAIN, H.G. **Polymorphism in Pharmaceutical Solids**, New York, Marcel Dekker, 1999, cap. 4, p. 125-182.

MUANGSIN, N.; PRAJUABSOOK, M.; CHIMSOOK, P.; CHANTARASIRI, N.; CHAICHIT, N.; and suport HANNONGBUA. Crystal Structure of a unique sodium distorted linkage of diclofenaco sodium pentahydrate. **Analytical Sciences**, Tóquio, vol. 18, p. 967-968, ago. 2002.

MULLER, C.P.; HASS, S.E.; BASSINI, V.L.; GUTERRES, S.S. Degradação e Estabilização do Diclofenaco em nanocapsulas poliméricas, **Química Nova**, São Paulo, vol. 27, p. 555-560, jul. 2004.

MURPHY, D.; RODRÍGUEZ-CINTRÓN, F.; LANGEVIN, B.; KELLY, R.C.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. Solution-mediated phase transformation of anhydrous to dihydrate carbamazepine and the effect of lattice disorder. **International Journal of Pharmaceutics**, Londres, vol. 246, p. 121-34, out. 2002.

NAISBITT, D.; SANDERSON, L. S.; MENG, X.; STACHULSKI, A. V.; CLARKE, S. E.; PARK, B. K. Investigation of the immunogenicity of diclofenaco and diclofenaco metabolites. **Toxicology Letters**, Londres, vol. 168, p. 45-50, jan. 2007.

ORTEGA-BARBAREZ, P.; RUIZ-MEDIA, A.; FERNANDEZ-DE CORDOVA, M.L.; MOLINA-DIAZ, A. Sensitive and simple determination of diclofenaco sodium by use of a continuous flow-injection procedure with solid-phase spectroscopic detection. **Analytical Science**, Tóquio, vol. 15, p. 985-989, out. 1999.

PALOMO M. E.; BALLESTEROS, M. P.; FRUTOS P. Analysis of diclofenac sodium and derivatives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.21, p.83-94, out. 1999.

PANDIT, J.K.; GUPTA, K.D.; GODE, B.; MISHRA, B. Effect of crystal form on the oral absorption of phenylbutazone. **International Journal of Pharmaceutics**, Londres, v.21, p.129-132, 1984.

PARTHASARADHI, R.B.; RATHNAKAR, R.K.; RAJI, R.R.; MURALIDHARA, R.D.; CHANDER, R.K.S. Polymorphs of imatinib mesylate. United States Patent 7,300,938. 27 Nov. 2007.

PASQUALI, I.; BETTINI, R.; GIORDANO, F.; Thermal behavior of diclofenac, diclofenaco sodium and sodium bicarbonate compositions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, vol. 90, p. 903-907, fev. 2007.

PATEL, H.V.; RAY, A.K.; PATEL, P.B.; PATEL, M.R. Process of preparation of olanzapine form I. United States Patent 7,297,789: 20 nov. 2007.

PANUSA, A.; MULTARI, G.; INCARNATO, G.; GAGLIARDI, L. High-performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 43, p. 1221-1227, mar. 2007.

PENG, G.W.; CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. **Journal of Chromatograph**, Amsterdam, v.531, p.131-180, out. 1990.

PÉREZ S.C., CERIONI L., WOLFENSON A.E., FAUDONE S., CUFFINI S.L. Utilization of pure nuclear quadrupole resonance spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Londres, vol. 298, p. 143-152, jul. 2005.

PIMENTA, A.M.; ARAUJO, A.N.; MONTENEGRO M.C.B.S.M. Simultaneous potentiometric and fluorimetric determination of diclofenac in a sequential injection analysis system. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, vol. 470, p. 185-194, out. 2002.

PSILLAKS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends Analytical Chemistry**, Amsterdam, vol. 22, p. 565-574, out. 2003.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, vol. 24, p. 68-76, jan. 2001.

RASENACK, N.; MÜLLER, B. W.; Crystal habit and tableting behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, Londres, vol. 244, p. 45-57, set. 2002.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Developments in hollow fiber-based, liquid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, vol. 23, p. 1-10, jan. 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p.771-780, set. 2004.

RODOMONTE, A.; ANTONIELLA, E.; BERTOCCHI, P.; GAUDIANO, M.C.; BARTOLOMEI, M. Different crystal morphologies arising from different preparation methods of a same polymorphic form may result in different properties of the final materials: The case of diclofenaco sodium trihydrate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, vol. 48, p. 477-481, mai. 2008.

RODRÍGUEZ, J.A.; BARRADO, E.; CASTRILLEJO, Y.; SANTOS, J.R.; LIMA, J.F.L.C. Validation of a tubular bismuth film amperometric detector. Determination of diclofenac sodium by multisyringe flow injection analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.45, p.47-53, set. 2007.

RODRÍGUEZ-SPONG, B.; PRICE, C.P.; JAYASANKAR, A.; MARZGER, A.J.; RODRÍGUEZ-HORNEDO, N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspectiva. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Londres, vol. 56, p. 241-274, fev. 2004.

ROTH, J. Endogenous antipyretics. **Clinica Chimica Acta**, Londres, vol. 371, p. 13-24, mar. 2006.

ROTH, J.; SOUZA, G.E.P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, São Paulo, vol. 34, p. 301-314, mar. 2001.

SANTOS, J.L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain) **Environment International**, Londres, vol. 33, p. 596-601, mai. 2007.

SANTOS, J.L.; APARICIO, I.; ALONSO, E.; CALLEJÓN, M. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, vol. 550, p. 116-122, set. 2005.

SCHMIDT, A.C. The Role of Molecular Structure in the Crystal Polymorphism of Local Anesthetic Drugs: Crystal Polymorphism of Local Anesthetic Drugs, Part X. **Pharmaceutical Research**, Hingham, vol. 22, p. 2121-2133, dez. 2005.

SCHNEIDER, W.; DEGEN, P.H. Simultaneous determination of diclofenaco sodium and its hydroxyl metabolites by capillary column gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, vol. 217, p. 263-271, 1981.

SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; FINDLAY, J.W.A.; HILL, H.M.; HULSE, J.D.; MCGILVERAY, I.J.; MCKAY, G.; MILLER, K.J.; PATNAIK, R.N.; POWELL, M.L.; TONELLI, A.; VISWANATHAN, C.T.; YACOBI, A. Bionalytical method validation – A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, Hingham, Vol. 17, p. 1551-1557, dez. 2000.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, 5ª. ed. Porto Alegre: Editora Bookman - SBQ, 2002.

STEPHENSON, G.A.; FORBES, R.A.; REUTZEL-EDENS, S.M. Characterization of the solid state: quantitative issues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Londres, vol. 48, p. 67-90, jan. 2001.

STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos**. São Paulo: ed. USP, 78p, 1999.

SUN, C.; GRANT, D.J.W. Influence of crystal structure on the tableting properties of Sulfamezarine polymorphs. **Pharmaceutical Research**, Hingham, vol. 18, p. 274-280, mar. 2001.

TAGIROVA, D.R.; MUKHUTDINOVA, F.I. Effect of Sodium Diclofenac on Microcirculation and Composition of the Lymph during Fever Reaction. **General Pathology and Pathophysiology**. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Nova York, vol. 139, nº 3, p. 264-266, mar. 2005.

TUDJA, P.; KHAN, M.Z.I.; MESTROVK, E.; HORVAT, M.; GOLJA, P. Thermal behaviour of diclofenaco sodium: Decompositiom and Melting characteristics. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, vol. 49, p. 1245-1250, out. 2001.

TULADAR, M.D.; CARLESS, J.E.; SUMMERS, M.P. Thermal behavior and dissolution properties of phenylbutazone polymorphs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v.35, p. 208-214, abr. 1983.

VAN DER MAREL, C.D.; ANDERSON, B.J.; FJFICM, F.; RØMSING, J.; JACQZ-AIGRAIN, E.; TIBBOEL, D. Diclofenac and metabolite pharmacokinetics in children. **Pediatric Anesthesia**, Oxford, vol. 14, p. 443-451, jun. 2004.

VAN DER SCHAAF, P.A.; MARCOLLI, C.; SZELAGIEWICZ, M.; FREIERMUTH, B. Crystalline forms of venlafaxine hydrochloride. Unite State Patent 7,045,661. 16 mai. 2006.

VARIANKAVAL, N.E.; JACOB, K.I.; DINH, S.M. Characterization of crystal form of β -estradiol – thermal analysis, Raman microscopy, X-ray analysis and solid-state NMR. **Journal of Crystal Growth**, Madson, vol.217, p. 320-331, ago. 2000.

VINCI, F.; FABBROCINO, S.; FIORI, M.; SERPE, L.; GALLO, P. Determination of fourteen non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal serum and plasma by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, Londres, vol. 20, p. 3412-3420, nov. 2006.

VIPPAGUNTA, S.R., BRITTAI, H.G., GRANT. D.J.W., Crystalline Solids, **Advanced Drug Delivery Reviews**, Londres, vol. 48, p. 3-26, mai. 2001.

VISCOMI, G.C.; CAMPANA, M.; BRAGA, D.; CONFORTINI, D.; CANNATA, V.; SEVERINI, D.; RIGHI, P.; ROSINI, G. Polymorphous forms of rifaximin, processes for their production and the use thereof in medical preparations. Unite State Patent 7,045, 620. 16 mai. 2006.

VOLTARELLI, J.C. Febre e Inflamação. **Medicina**, Ribeirão Preto, vol. 27, p. 7-48, jan./jun. 1994.

YAHALOMI, R.; SHAPIRO, E.; DOLITZKY, B.-Z.; GOZLAN, Y.; GOME, B. Polymorphic forms of nateglinide. United States Patent 7,148,376. 12 Dez. 2006.

YU, L.; REUTZEL-EDENS, S.M.; MITCHELL, C.A. Crystallization and polymorphism of conformationally flexible molecules: Problems, patterns, and strategies. **Organic Process Research & Development**, Londres, vol. 4, p.396-402, mai. 2000.

ZHAO, Y.H., ABRAHAM, M.H., LEE, J. Rate limited steps on human oral absorption and QSAR studies. **Pharmaceutical Research**, Hingham, vol.17, p. 1446-1457, out. 2002.

7. ANEXO

7.1. CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.221.53.7), intitulado: "Determinação da Influência das Propriedades Físicas e Físico-Químicas das Diferentes Formas Cristalinas do Diclofenaco de Sódio nos seus Efeitos Farmacológicos", de autoria de **Cristiane Masetto de Gaitani**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07.05.2008.

Ribeirão Preto, 8 de maio de 2008

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro