UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Validação de correlação *in vitro-in vivo* para comprimidos de
liberação modificada de diclofenaco de sódio

Rafael da Silva Melo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Valentina Porta

São Paulo
2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Melo, Rafael da Silva
M528v Validação de correlação *in vitro-in vivo* para comprimidos de
liberação modificada de diclofenaco de sódio / Rafael da Silva
Melo. -- São Paulo, 2012.
135p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Porta, Valentina

1. Medicamento : Dissolução : Química farmacêutica 2.
Biofarmacotécnica I. T. II. Porta, Valentina, orientador.

615.19 CDD

Rafael da Silva Melo

Validação de correlação *in vitro-in vivo* para comprimidos de
liberação modificada de diclofenaco de sódio

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Valentina Porta
Orientador/presidente

Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim
1º examinador

Prof. Titular José Carlos Saraiva Gonçalves
2º Examinador

São Paulo, 15 de março de 2012.

**Aos meus pais, João e Ana,
pelo amor e carinho incondicional.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida.

Especial agradecimento à Profa. Valentina Porta pela orientação, esforço, constante motivação, ética, profissionalismo e, sobretudo, pelos formidáveis ensinamentos.

Aos meus pais, João e Ana, pelo apoio, amor e carinho; e por estarem presentes em todos os momentos.

As minhas irmãs Estelita e Rosana e à suas famílias, pelo apoio, torcida e exemplos de vida.

Às minhas sobrinhas, Marina e Laura, pelas alegrias contagiantes.

Aos amigos Francinalva, Mariane, Marina, Rafael Paraíso, Eduardo, Marc Strasser, Guilherme, André e Thaisa pela agradável companhia no decorrer dessa caminhada.

Aos amigos de infância e da graduação, pelos eternos momentos de felicidade.

Aos voluntários que participaram da etapa clínica deste estudo.

Aos técnicos do Laboratório, Claudinéia, Eremita e Edgar, pela amizade e disponibilidade em todos os momentos.

Aos funcionários da pós-graduação da FCF- USP, Beth, Elaine, Marjô, David, e Jorge pelo excelente trabalho que realizam sempre com atenção e carisma.

Aos Farmacêuticos do Hospital Universitário, em especial à Farmacêutica Cristina Akiko Takagi, pelos aprendizados e ensinamentos no programa de Monitoria em Saúde.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que me apoiaram direta ou indiretamente, no decorrer desta caminhada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE QUADROS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA.....	16
3.2 Correlação <i>In Vitro</i> – <i>In Vivo</i>	20
3.3 Considerações no desenvolvimento de CIVIV	31
3.4 DISSOLUÇÃO	33
3.5 DICLOFENACO	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Aspectos Gerais	45
4.2 Aperfeiçoamento da Correlação <i>In Vitro-In Vivo</i>	46
4.2.1 Ensaio de dissolução	46
4.2.2 Estabelecimento da CIVIV	52
4.3 Validação Interna da Correlação <i>In Vitro-In Vivo</i>	52
4.3.1 Dados.....	52
4.3.2 Métodos	53
4.4 Validação Externa da Correlação <i>In Vitro-In Vivo</i>	56
4.4.1 Aspectos Gerais.....	56
4.4.2 Ensaio de Dissolução.....	57
4.4.3 Ensaio de biodisponibilidade relativa	59
4.4.4 Obtenção dos parâmetros de validação externa da correlação in vitro-in vivo	82
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.1 Aperfeiçoamento da Correlação <i>In Vitro-In Vivo</i>	86
5.1.1 Ensaio de dissolução.....	86
5.1.2 Estabelecimento da CIVIV	90
5.2 Validação Interna da Correlação <i>In Vitro-In Vivo</i>	91
5.3 Validação Externa da Correlação <i>In Vitro-In Vivo</i>	94
5.3.1. Ensaio de dissolução	94

5.3.2	Ensaio de biodisponibilidade relativa.....	96
5.3.3	Obtenção dos parâmetros de validação externa da correlação in vitro-in vivo	108
6.	Discussão.....	113
7.	Conclusões	123
8.	Referências bibliográficas	124
ANEXO A – Cópia do documento de informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado.		136
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética.....		138
ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....		142
ANEXO D – Ficha do Aluno		146

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Amostras de plasma padrão da curva de calibração para quantificação do DFS.	70
Tabela 4.2 – Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de DFS.	71
Tabela 5.1 - Fração dissolvida e fração absorvida (Mourão, 2009) das formulações nos tempos de 0-8 horas.	90
Tabela 5.2 - Frações absorvidas extrapoladas pela CIVIV e concentrações plasmáticas de DFS previstas para as formulações F1, F2 e F3, de 0-8 horas.	92
Tabela 5.4 - Coeficiente de determinação linear obtido pela correlação entre os dados de fração dissolvida e fração absorvida.....	94
Tabela 5.5 - Determinação do limite de quantificação inferior.	98
Tabela 5.6 - Desvios da curva de calibração do diclofenaco de sódio em plasma branco.....	99
Tabela 5.7 - Resultados de precisão e exatidão intradia de amostras de plasma de controle de qualidade em três níveis de concentração.	100
Tabela 5.8 - Resultados de precisão e exatidão interdia de amostras de plasma de controle de qualidade em 3 níveis de concentração.	101
Tabela 5.9 - Recuperação média do procedimento de extração por precipitação de proteínas plasmáticas, das amostras de plasma para DFS (padrão) e para nimesulida (padrão interno).....	102
Tabela 5.10 - Resultados do estudo de estabilidade do DFS em amostras analisadas após processamento, e mantidas em temperatura ambiente por 24 horas após o processamento.	103
Tabela 5.11 - Resultados do estudo de estabilidade do DFS em amostras analisadas após processamento, e mantidas em temperatura ambiente por 48 horas.	103
Tabela 5.12 - Parâmetros farmacocinéticos após a administração da formulação comercial R.....	107
Tabela 5.13 - Parâmetros farmacocinéticos após a administração da formulação comercial G.	107
Tabela 5.14 - Parâmetros farmacocinéticos após a administração da formulação comercial S.....	108
Tabela 5.15 - Dados de fração dissolvida (%) e frações absorvidas extrapoladas pelo modelo de CIVIV desenvolvido.	109
Tabela 5.16 - Estimação do EP% para C_{max} e ASC, para as formulações R, G e S.....	112
Tabela 5.17 - Coeficiente de determinação linear obtido pela correlação entre os dados da curva de concentração plasmática de DFS e de fração dissolvida	112

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Classificação de fármacos de acordo com o SCB e o fator limitante da absorção (AMIDON et al., 1995)	29
Quadro 1.2 - Composição dos meios biorrelevantes Fassif e Fessif (MARQUES, 2004).....	39
Quadro 4.1 Relação de excipientes contidos nas formulações farmacêuticas contendo 100mg de diclofenaco de sódio, analisadas nos ensaios de dissolução. <i>Informações retiradas das bulas dos medicamentos</i>	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fórmula estrutural do diclofenaco ($M^+ = Na$)	41
Figura 5.1 - Espectro de absorção no UV da solução padrão DFS (30 µg/mL), e solução amostra (Voltaren Retard® - 28,86 µg/mL) em tampão fosfato 0,05M-pH 6,8.....	87
Figura 5.2 - Curva analítica do diclofenaco de sódio em tampão fosfato pH 6,8 (276 nm), n=6.....	88
Figura 5.3 - Perfil de dissolução das formulações F1, F2 e F3 (Mourão, 2009) obtidas em aparato II, a 25 rpm, em meio tampão fosfato pH 6,8, com âncoras (n=6).....	89
Figura 5.4 - Correlação entre os dados de dissolução e absorção.....	91
Figura 5.5 - Perfil de dissolução das formulações R, G1 e S1 obtidas em aparato II, a 25 rpm, em meio tampão fosfato pH 6,8, com âncoras.....	95
Figura 5.6 – Cromatograma da amostra de plasma branco.	97
Figura 5.7 – Cromatograma do diclofenaco de sódio (0,5 µg/mL – tempo de retenção de 6,81 minutos) e nimesulida como padrão interno (4 µg/mL – tempo de retenção 4,95 minutos) extraído de plasma branco.	97
Figura 5.8 - Curva de calibração do método analítico para quantificação de diclofenaco de sódio em plasma humano por CLAE, na faixa de concentração de 0,05 a 2,0µg/mL.	99
Figura 5.9 - Curvas plasmáticas após a administração das formulações comerciais R, G e S (1= voluntário 1; 2= voluntário 2 e 3= voluntário 3).....	105
Figura 5.10 - Curvas plasmáticas após a administração das formulações comerciais R, G e S (4= voluntário 4; 5= voluntário 5 e 6= voluntário 6).....	106
Figura 5.11 - Fração absorvida percentual (média dos 6 voluntários).....	110
Figura 5.12 - Curva de concentração plasmática prevista versus tempo da formulação comercial de Referência (média dos 6 voluntários). Obs=observada; Prev.=prevista.	111
Figura 5.13 - Curva de concentração plasmática prevista versus tempo da formulação comercial de medicamento Genérico (média dos 6 voluntários). Obs=observada; Prev.=prevista.	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE = Antiinflamatório não-esteroidal

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC = Área sob a curva

ASC_{0-t} = área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco *versus* tempo

CIVIV = Correlação In vitro-In vivo

C_{max} = Concentração máxima

DFS = diclofenaco de sódio

DP= Desvio padrão

DPR= Desvio padrão relativo

FDA = *Food and Drug Administration*

HPMC = hidroxipropilmetilcelulose

EP% = Erro de predição

FaSSIF = *fasted state intestinal fluid*

FeSSIF = *fed state intestinal fluid*

SCB = Sistema de Classificação Biofarmacêutica

T_{max} = Tempo máximo em que se atinge a concentração máxima

TMD_{in vitro} = Tempo médio de dissolução *in vitro*

TMD_{in vivo} = Tempo médio de dissolução *in vivo*

TMD = Tempo médio de dissolução

TMR = Tempo médio de residência

$\text{TMR}_{in vivo}$ = Tempo médio de residência *in vivo*

TGI = Tratógastrintestinal

RESUMO

MELO, R.S. **Validação de correlação *in vitro-in vivo* para comprimidos de liberação modificada de diclofenaco de sódio**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

A dissolução de fármacos administrados por via oral é pré-requisito para sua absorção e eficácia clínica. Esta constatação fornece a base para as tentativas de estabelecer correlações entre a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de medicamentos, denominadas correlações *in vitro - in vivo* (CIVIV). As correlações *in vitro-in vivo* referem-se ao estabelecimento de uma relação racional entre propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica, e suas propriedades ou características físico-químicas. O estabelecimento desse tipo de correlação de dados pode possibilitar a substituição dos estudos *in vivo*, necessários para avaliação da biodisponibilidade de medicamentos, por estudos *in vitro*, com grandes vantagens éticas e econômicas. A probabilidade de obtenção de correlação *in vitro-in vivo* é maior quando o processo limitante da absorção do fármaco é a dissolução, o que ocorre para medicamentos contendo fármacos de classe biofarmacêutica II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e para sistemas de liberação controlada de fármacos. O diclofenaco de sódio (DFS) é um fármaco que possui ampla absorção através do intestino (próximo a 100%) e baixa solubilidade em pH abaixo de 6,0, o que o inclui na classe II do SCB. Caracteriza-se como antiinflamatório não esteroide, com atividades analgésica e antipirética. Considerando as características físico-químicas e farmacológicas do DFS, é objetivo deste trabalho desenvolver e realizar uma validação interna e externa de correlação CIVIV para formulações contendo este fármaco. Para o desenvolvimento e validação interna de CIVIV, foram empregados comprimidos matriciais de DFS contendo o excipiente hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como agente controlador da liberação do fármaco. Três formulações de DFS contendo HPMC em diferentes concentrações (com diferentes taxas de liberação do fármaco) foram avaliadas em estudo de dissolução. Os dados de fração absorvida, obtidas pelo método de deconvolução (MOURÃO, 2009), foram plotados diretamente com os dados de fração dissolvida, obtendo um CIVIV com determinação linear de 0,9738. Para a validação externa, o modelo de CIVIV obtido (intercepto e inclinação) foi utilizado para prever os dados de fração absorvida a partir dos dados de dissolução, empregando três formulações comerciais de DFS. Os resultados de absorção foram extrapolados pelo método de convolução para a obtenção da curva plasmática prevista. Os dados da curva plasmática prevista foram comparados aos dados da curva real de DFS, obtidas no estudo de biodisponibilidade, e os erros de predição (EP%) entre as curvas, foram estabelecidos para a validação externa. Uma CIVIV de nível C foi estabelecida entre diversos parâmetros, empregando as formulações matriciais de DFS e as formulações comerciais. De acordo com os resultados de nível C obtidos, a metodologia de dissolução proposta pode ser empregada para o desenvolvimento de novas formulações contendo o fármaco DFS.

Palavras chave: correlação *in vitro-in vivo*, biodisponibilidade, dissolução, diclofenaco de sódio

ABSTRACT

MELO, R.S. **Validation of in vivo-in vitro correlation for modified release tablet containing sodium diclofenac.** 2012. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

The dissolution of drugs administered orally is a pre-requisite for its absorption and clinical effectiveness. This finding provides the basis for attempts to establish correlations between *in vitro* dissolution and *in vivo* bioavailability of drugs, called correlations *in vitro-in vivo* (IVIVC). The correlation between *in vitro-in vivo* refers to the establishment of a rational relationship between biological properties, or parameters derived from those produced by a pharmaceutical form and its properties or physicochemical characteristics. The establishment of this type of correlation data may allow the replacement of *in vivo* studies necessary to evaluate the bioavailability of drugs, for *in vitro* studies with high ethical and economic advantages. The probability of obtaining correlation *in vitro-in vivo* is greater when the process of limiting drug absorption is dissolution, which occurs for drug products containing drugs biopharmaceutical class II (low solubility and high permeability) and controlled release systems drugs. Diclofenac sodium (DFS) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug with analgesic and antipyretic properties. The objective of this work is to develop and implement an internal and external validation correlation IVIVC for formulations of DFS. For the development and internal validation of IVIVC were employees of DFS matrix tablets containing the excipient hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) as a controlling agent drug release. Three formulations containing DFS in HPMC at different concentrations (with different rates of drug release) were evaluated in a study of dissolution. The absorbed fraction data obtained by the deconvolution method (MOURÃO, 2009), were plotted directly with the dissolved fraction data, obtaining a linear IVIVC with determination of 0.9738. For external validation, the obtained IVIVC model (intercept and slope) was used to predict the fraction absorbed data from dissolution data using three commercial formulations of DFS. The absorption results were extrapolated by the method of convolution to obtain the expected plasma curve. The plasma curve data were compared to data provided in real DFS curve, obtained in the bioavailability study, and the prediction error (PE%) between the curves were established for external validation. A level C IVIVC has been established between various parameters, using the matrix formulations of DFS and commercial formulations. According to the results obtained from C-level, the methodology proposed dissolution can be used to develop new drug formulations containing the DFS drug.

Keywords: *in vitro-in vivo* correlation, bioavailability, dissolution, diclofenac sodium.

1. INTRODUÇÃO

A via de administração oral de medicamentos vem sofrendo grandes inovações nas últimas décadas, principalmente para novas formas de liberação de fármacos. Essas novas formas farmacêuticas são concebidas para modular a liberação do fármaco, retardando ou prolongando a sua dissolução. Ao contrário das formas farmacêuticas de liberação imediata, onde a liberação do fármaco ocorre rapidamente após a administração oral, as formas farmacêuticas orais de liberação modificada são desenvolvidas com o objetivo de liberar o fármaco após um período definido de tempo ou em um sítio específico, podendo prolongar o efeito farmacológico e reduzir sua frequência de administração; além de tornar as formas farmacêuticas resistentes ao conteúdo gástrico (PEZZINI, SILVA, FERRAZ, 2007). Desse modo, a via de administração oral de fármacos continua sendo a rota preferencial para a administração de medicamentos, devido à conveniência, ao baixo custo e à alta adesão quando comparada com outras vias de administração (KELDENICH, 2009). Entretanto, os fármacos desenvolvidos para a administração oral devem apresentar adequada solubilidade em água e permeabilidade intestinal, para serem efetivamente absorvidos através do epitélio intestinal, e desse modo, atingir concentrações plasmáticas satisfatórias para exercer o efeito terapêutico esperado (BALIMANE, CHONG, MORRISON, 2000). Assim, para formas farmacêuticas sólidas, a dissolução dos medicamentos torna-se fator igualmente imprescindível na biodisponibilidade, a qual indica a velocidade e a extensão de absorção de um fármaco em uma forma farmacêutica, a partir da sua curva de concentração

versus tempo na circulação sistêmica ou sua excreção na urina (BRASIL, 2007). Dessa forma, pode-se admitir que a dissolução de medicamentos em meios fisiológicos, esteja diretamente relacionada com a sua eficácia clínica, sustentando teoricamente as tentativas de estabelecer correlações entre a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de medicamentos, denominadas correlações *in vitro* - *in vivo* (CIVIV).

As correlações *in vitro-in vivo* referem-se ao estabelecimento de relação racional entre propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica, e suas propriedades ou características físico-químicas. As propriedades biológicas mais comumente utilizadas são um ou mais parâmetros farmacocinéticos, tais como área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco versus tempo (ASC) ou concentração plasmática máxima (C_{max}), obtidos após a administração da forma farmacêutica. A característica físico-química mais empregada é o comportamento de dissolução *in vitro* (isto é, porcentagem do fármaco dissolvido sob condições experimentais determinadas). A relação entre as duas propriedades, biológica e físico-química é, então, expressa quantitativamente (BRASIL, 2002; RECIO et al, 1999).

Na prática, os estudos de CIVIV são desenvolvidos e validados com o objetivo de se obter métodos de dissolução capazes de servir como um substituto de medida da biodisponibilidade *in vivo*. O desenvolvimento de uma CIVIV pode também ser útil para a seleção das melhores condições de um teste de dissolução, garantindo sua confiabilidade como método de controle de qualidade e de desempenho do produto (EMANI, 2006; SIRISUTH & EDDINGTON, 2004).

Além disso, para o registro de medicamentos genéricos, a intercambiabilidade entre o medicamento teste e seu referência, necessita ser comprovada com base na equivalência terapêutica entre ambos. A comprovação da bioequivalência é realizada por meio de ensaios *in vivo* que empregam voluntários sadios, e incluem as etapas clínica, analítica e estatística (BRASIL, 2006). Considerando a complexidade e os elevados custos dos ensaios de biodisponibilidade, a CIVIV pode ser desenvolvida e aplicada, no sentido de minimizar os testes de bioequivalência desnecessários em humanos. O estabelecimento desse tipo de correlação de dados pode possibilitar a substituição dos estudos *in vivo*, necessários à demonstração da bioequivalência, pelos estudos *in vitro*; principalmente no caso de alterações no processo de fabricação pós-registro, tais como mudanças na composição na formulação, no processo ou local de produção (EMANI, 2006; UPPOOR, 2001; BRASIL, 2003). Uma CIVIV é usualmente desenvolvida quando a dissolução do fármaco é a etapa limitante da absorção *in vivo*. Desse modo, é possível esperar uma CIVIV para fármacos cuja etapa limitante do processo de absorção do fármaco é a dissolução, como aqueles pertencentes à classe II, de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (baixa solubilidade e alta permeabilidade). Este sistema permite estimar a contribuição dos parâmetros dissolução, solubilidade e permeabilidade na velocidade e na extensão de absorção de um determinado fármaco. Assim, o conceito do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) estabelece quatro classes de fármacos de acordo com suas características de solubilidade e permeabilidade. Os fármacos da classe I são aqueles que apresentam alta solubilidade e alta permeabilidade, os da classe II apresentam baixa solubilidade e alta

permeabilidade e os da classe III, alta solubilidade e baixa permeabilidade, enquanto os de classe IV apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade (AMIDON et al., 1995).

Além disso, a dissolução também se apresenta como fator limitante para a absorção nos sistemas de liberação controlada de fármacos, para os quais a CIVIV é igualmente esperada.

O diclofenaco de sódio (DFS) é um fármaco que possui completa absorção através do intestino (próximo a 100%) e baixa solubilidade em pH abaixo de 6,0; o que o inclui na classe II do SCB (CHUASUWAN et al., 2008). Para formas farmacêuticas de DFS com revestimento entérico (no caso de comprimidos de liberação modificada), a liberação do fármaco acontece no duodeno, com rápida dissolução e consequente absorção no local, o que faz com que o fármaco se comporte como classe I no SCB, nessas condições (CHUASUWAN et al., 2008).

Este fármaco é um potente antiinflamatório não esteroide (AINE), e possui propriedades farmacológicas antiinflamatória, analgésica e antipirética. É utilizado no tratamento sintomático da artrite reumatóide, da osteoartrite e da espondilite anquilosante. Também é útil no tratamento, a curto prazo, da dor musculoesquelética aguda e dismenorreia (GILMAN; GOODMAN; BRUNTON, 2006; CHUASUWAN et al., 2008).

O DFS possui ampla ligação às proteínas plasmáticas (99%) e meia-vida curta de eliminação (1-2 horas). Quimicamente, é um derivado ácido fenilacético com valor de pKa de 3,8 (a 25°C), praticamente insolúvel em soluções ácidas, mas solúvel em soluções básicas, no fluido intestinal e água. O DFS é 100% absorvido após administração oral, comparado com a

administração intravenosa do fármaco, com base em estudos de recuperação do fármaco na urina. Porém, apenas 60% do fármaco atinge a circulação plasmática, devido à biotransformação pré-sistêmica. (SAVASER; OZKAN; ISSYMER, 2005; CHUASUWAN et al., 2008).

Devido às propriedades biofarmacêuticas do DFS e da necessidade de busca de uma metodologia de dissolução que possa ser efetivamente correlacionada com as propriedades biológicas da forma farmacêutica de liberação modificada; esse trabalho se propõe a realizar estudos de dissolução e biodisponibilidade para o fármaco, com o objetivo de desenvolver e validar uma correlação *in vivo* – *in vitro*, com diferentes formulações de liberação modificada contendo 100mg de DFS.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar uma correlação *in vitro- in vivo* para comprimidos de liberação modificada, contendo o fármaco de diclofenaco de sódio.

2.2. Objetivos específicos

- ⇒ Desenvolver e validar internamente uma CIVIV entre dados de fração absorvida e dados de fração dissolvida, a partir de comprimidos matriciais de liberação modificada contendo o fármaco diclofenaco de sódio.
- ⇒ Avaliar o perfil de dissolução de comprimidos de liberação modificada, contendo 100 mg diclofenaco de sódio comercializadas no Brasil (estudo *in vitro*), e obter o perfil de absorção *in vivo* a partir dos dados de dissolução, utilizando o modelo de CIVIV desenvolvido.
- ⇒ Avaliar a biodisponibilidade (*in vivo*) de três formulações comerciais de liberação modificada, contendo o fármaco diclofenaco de sódio.
- ⇒ Realizar a validação externa através da comparação dos dados de concentração plasmática de diclofenaco de sódio (obtidas no estudo de biodisponibilidade) com os dados da curva de concentração plasmática de diclofenaco de sódio, extrapolada a partir dos dados de fração absorvida, aplicando o método de convolução.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIODISPONIBILIDADE E BIOEQUIVALÊNCIA

Com exceção da via intravenosa, na qual o fármaco é introduzido diretamente na corrente sanguínea, todas as demais vias de administração, para as quais seja requerida uma ação sistêmica, implicam na absorção do fármaco para a corrente sanguínea a partir da via de administração (AULTON, 2005). O processo de absorção de um fármaco no trato gastrointestinal (TGI) começa com o mesmo contido em uma forma farmacêutica, de onde é liberado e sofre dissolução nos líquidos do TGI. As moléculas do fármaco na superfície das partículas são as primeiras a entrar em solução, criando uma camada de difusão do fármaco, que envolve a superfície da partícula sólida. Esse processo de dissolução é limitado pela solubilidade dos fármacos nas condições do TGI, além de outros fatores, como tamanho da partícula, molhabilidade e forma do fármaco (isto é, sal, forma livre, estado amorfo ou cristalino).

A extensão na qual a dissolução ocorre é chamada de solubilidade, podendo ser definida como a quantidade de soluto que pode ser dissolvido em um volume específico de solvente. O fator predominante para a dissolução de um fármaco nos líquidos do TGI é a sua solubilidade aquosa. No entanto, a solubilidade no TGI também pode ser influenciada por variações de pH (faixa de pH de 1,2 a 7,5), efeito dos surfactantes dos sais biliares, presença de alimentos, formação de complexos insolúveis com componentes naturais do TGI e mesmo alimentos (OLIVEIRA & MANZO, 2009).

Uma vez que o fármaco se encontra em solução, atravessa as membranas das células do TGI. Este processo está limitado pela permeabilidade. A permeabilidade, por sua vez, é baseada indiretamente na extensão da absorção (fração absorvida e não fração sistêmica) de um fármaco em humanos, e diretamente através de medida da velocidade de transferência de massa através da membrana intestinal humana (BONAMICI, 2009). Finalmente, o fármaco é absorvido e passa para a circulação sistêmica. (ABDOU, 1989; AMIDON et al., 1995). Desse modo, a dissolução no TGI e a permeabilidade de um fármaco através da membrana, são os parâmetros-chave para sua absorção.

A velocidade e a extensão com que um fármaco é absorvido a partir de um produto farmacêutico e se torna disponível no sítio de ação, conceituam o termo biodisponibilidade (UNITED STATES, 2010; ABDOU, 1989). A legislação brasileira define biodisponibilidade como medida de velocidade e extensão de absorção de um princípio ativo em uma forma farmacêutica, a partir da sua curva concentração/tempo na circulação sistêmica ou da sua excreção na urina (BRASIL, 1999). O cálculo da biodisponibilidade é realizado pelos seguintes parâmetros farmacocinéticos: área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco *versus* tempo (ASC_{0-t}), a concentração plasmática máxima atingida após a administração da dose (C_{max}), e o tempo em que esta concentração é atingida (T_{max}) (ABDOU, 1989).

A absorção de fármacos é um processo que pode ser influenciado por fatores relacionados à formulação, além das propriedades físico-químicas dos fármacos e dos fatores fisiológicos. Entre os fatores relacionados à formulação incluem-se o tipo e a quantidade de excipientes utilizados, o tempo de mistura

e secagem, a técnica de granulação e compressão, entre outras (AULTON, 2005).

Dentre os fatores relacionados às propriedades físico química dos fármacos têm-se os aspectos que influenciam na velocidade de dissolução e permeabilidade dos fármacos, tais como, natureza química do fármaco, tamanho da partícula, solubilidade e polimorfismo (SHARGEL; KANFER, 2005).

Entre os fatores fisiológicos, incluem-se a velocidade de esvaziamento gástrico, a motilidade intestinal, o pH do trato gastrointestinal, a biotransformação pré-sistêmica, entre outros (AULTON, 2005).

No contexto do medicamento genérico, um produto farmacêutico deve ser terapeuticamente equivalente ao produto inovador, o qual teve sua eficácia e segurança bem comprovadas por meio dos estudos clínicos. A comprovação da equivalência terapêutica, base para a intercambiabilidade, é a demonstração de que o medicamento genérico possui o mesmo perfil de eficácia e segurança que o produto inovador. Desse modo, a bioequivalência substitui a comparação direta (ensaio clínicos) pela comparação indireta (farmacocinética), baseada no princípio de que a similaridade dos perfis de concentração-tempo no sangue (ou plasma) proporciona resultados similares quanto à eficácia e segurança (GLEITER et al., 1998). Assim, a bioequivalência é o estudo comparativo das biodisponibilidades entre os produtos farmacêuticos teste e o inovador.

Segundo a lei nº 9.787/99 (BRASIL, 1999), a bioequivalência consiste na demonstração de equivalência farmacêutica entre produtos apresentados sob a mesma forma farmacêutica, contendo idêntica composição qualitativa e quantitativa de princípio(s) ativos(s), e que tenham comparável

biodisponibilidade, quando estudados sob um mesmo desenho experimental. Essa definição implica em que, no desenvolvimento farmacotécnico de um medicamento genérico, seja obtido um equivalente farmacêutico, ou seja, um medicamento que contenha o mesmo fármaco, na mesma dosagem e forma farmacêutica em relação ao medicamento de referência, cumprindo as mesmas especificações *in vitro* (quanto à equivalência farmacêutica) (BRASIL, 2006). Os excipientes e as técnicas de fabricação não devem ser obrigatoriamente idênticos, mas as diferenças não devem comprometer a equivalência terapêutica. Além disso, é importante considerar a influência de excipientes e técnicas de fabricação na biodisponibilidade dos medicamentos, uma vez que os equivalentes farmacêuticos serão submetidos a ensaios de bioequivalência para que possam ser registrados como medicamentos genéricos (SHARGEL et al., 2005).

Os estudos de bioequivalência de medicamentos envolvem as etapas clínica, analítica e estatística. Os estudos convencionais são do tipo aberto, aleatório e cruzado, em que os voluntários recebem os medicamentos teste e referência em ocasiões separadas. O intervalo entre os períodos deverá ser de, no mínimo, sete vezes a meia-vida de eliminação do fármaco (BRASIL, 2006).

A realização dos estudos de bioequivalência prevê a administração dos produtos teste (genérico) e referência (inovador) aos voluntários sob as mesmas condições experimentais, e a coleta de amostras biológicas de sangue, plasma ou urina em tempos pré-definidos. Posteriormente, estas amostras são analisadas em relação à concentração de fármaco e eventuais metabólitos e os parâmetros farmacocinéticos concentração plasmática máxima (C_{max}) e área sob a curva de concentração plasmática versus tempo

(ASC) dos medicamentos teste e referência são calculados e comparados estatisticamente (CONSIGLIERI, STORPIRTIS, 2000). Dois medicamentos serão considerados bioequivalentes se os valores extremos dos intervalos de confiança 90% das razões das médias geométrica ($ASC_{0-t \text{ teste}}/ASC_{0-t \text{ referência}}$ e $C_{max \text{ teste}}/C_{max \text{ referência}}$) forem maiores que 0,8 e menores que 1,25 (BRASIL, 2006).

Desse modo, para um medicamento ser registrado como genérico, é necessário que se comprove equivalência farmacêutica e bioequivalência em relação ao medicamento de referência. (BRASIL, 2007). Após o registro, a empresa deve seguir as boas práticas de fabricação e controle de qualidade, de forma a garantir a uniformidade da produção dos lotes sucessivos. As alterações pós-registro devem ser avaliadas criteriosamente antes de serem realizadas, seguindo as normas preconizadas pelas autoridades regulatórias (BRASIL, 2003). Após essas constatações, o medicamento genérico pode ser considerado equivalente terapêutico ao de referência e, portanto, ser com ele intercambiável, apresentando o mesmo desempenho no organismo, com a mesma eficácia clínica e segurança

3.2 CORRELAÇÃO IN VITRO – IN VIVO

Na década de 1960, Levy, Leonards & Pocknal (1965) começaram a observar possibilidades de existência de relação entre dados de estudos de dissolução (*in vitro*) e de estudos de biodisponibilidade (*in vivo*), e conseguiram relatar uma significativa correlação entre tais dados, para a comprimidos de

ácido acetilsalicílico. Em 1973, Wagner e colaboradores demonstraram existir correlações entre dados *in vitro* e *in vivo* para várias formas farmacêuticas de digoxina, o qual foi confirmado por estudos posteriores (LINDENBAUM, et al., 1973; JOHNSON, B.F, et al., 1973). A partir daí surgiram diversos trabalhos na literatura com o objetivo de estabelecer correlação entre os parâmetros da dissolução *in vitro* e os parâmetros relativos aos estudos de biodisponibilidade *in vivo* (GRDINIC, 1979; AOYAGI, 1982; YAU, MEYER, 1983; DEY, et al. 1989; LIN; KAO; CHANG, 1990; DREWE; GUITARD, 1993; HAYASHI; OGURA; TAKAGISHI, 1995).

Os conhecimentos adquiridos sobre o processo mecanístico da absorção de fármacos, como no desempenho das formulações, permitiram prever e assegurar a bioequivalência. Se dois produtos apresentam o mesmo perfil de dissolução *in vitro* nas mesmas condições do TGI, então apresentariam o mesmo perfil de concentração na superfície da membrana intestinal ao passar do tempo, o que conduziria às mesmas velocidades e extensão de absorção (SHARGEL; YU, 1992; AMIDON et al., 1995).

As correlações entre dados *in vitro* e *in vivo* (CIVIV) para formas farmacêuticas sólidas orais passaram a receber considerável atenção por parte da indústria farmacêutica, agências regulatórias e academia, principalmente nas últimas décadas, após a publicação pela Agência Regulatória Americana, o FDA (*Food and Drug Administration*), do *Guia para desenvolvimento, avaliação e aplicação de CIVIV para formulações farmacêuticas orais de liberação modificada* (FDA, 1997).

Nesse guia, o FDA define CIVIV como “um modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma propriedade *in vitro* de uma forma

farmacêutica, e uma resposta relevante *in vivo*. Geralmente, a propriedade *in vitro* é a velocidade ou extensão de dissolução ou liberação, enquanto que a resposta *in vivo* é a concentração plasmática ou a quantidade de fármaco absorvido” (FDA, 1997).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define a CIVIV como sendo “o estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica e suas propriedades ou características físico-químicas. As propriedades biológicas mais comumente utilizadas são um ou mais parâmetros farmacocinéticos tais como área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco versus tempo (ASC) ou concentração plasmática máxima (C_{max}), obtidos após a administração da forma farmacêutica. A característica físico-química mais empregada é o comportamento de dissolução *in vitro* (isto é, porcentagem do fármaco dissolvido sob condições experimentais determinadas). A relação entre as duas propriedades, biológica e físico-química é, então, expressa quantitativamente (BRASIL, 2002).

A palavra correlação pode ser definida do ponto de vista matemático ou do ponto de vista biofarmacêutico (CARDOT, BEYSSAC, 2007). Resumidamente, o fundamento para o desenvolvimento de uma CIVIV é baseado em um modelo matemático que relaciona a fração do fármaco liberado *in vitro* com a fração do fármaco absorvido através do trato gastrointestinal *in vivo*. Matematicamente, a correlação é relação existente entre duas ou mais variáveis quantitativas. Uma correlação linear é caracterizada pela inclinação e pelo intercepto da reta, e a proximidade da relação é determinada em termos de coeficiente de correlação. Do ponto de vista

biofarmacêutico, a correlação simplesmente relaciona as médias observadas entre os parâmetros derivados dos estudos *in vitro* e *in vivo*, independente da definição matemática do termo (CARDOT, BEYSSAC, 2007).

A validação de uma CIVIV é necessária para atestar que os dados de dissolução *in vitro* possam ser utilizados para prever o perfil plasmático do fármaco *in vivo*, assumindo que a absorção do fármaco *in vivo* aproxima-se da liberação *in vitro* do fármaco, a partir da forma farmacêutica oral de liberação modificada (MODI, 2007).

Os dados de dissolução que podem ser empregados na construção de uma CIVIV podem ser obtidos diretamente da curva de concentrações dissolvidas em função do tempo ou a partir de dados como o tempo médio de dissolução *in vitro* ($TMD_{in vitro}$) ou pontos de tempos de dissolução ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$, etc). Por outro lado, os dados farmacocinéticos empregados são obtidos de cálculos realizados a partir das concentrações plasmáticas *versus* tempo, tais como fração absorvida (obtida por meio de deconvolução ou dos métodos de Wagner-Nelson ou Loo-Rigelman), tempo médio de residência *in vivo* ($TMR_{in vivo}$), tempo médio de dissolução *in vivo* ($TMD_{in vivo}$), área sob a curva (ASC) e concentração máxima C_{max} (EMANI, 2006).

Para o desenvolvimento de uma CIVIV, são definidos quatro níveis de correlação, classificados em ordem decrescente de importância: A, B, C e C múltiplo.

O nível A de correlação é o mais alto que pode ser obtido e representa uma relação ponto a ponto entre a dissolução *in vitro* do fármaco, a partir de

forma farmacêutica, e a velocidade de entrada do mesmo no organismo *in vivo*. Esta relação é freqüentemente linear, apresentando coeficiente angular maior que 0,95. Neste nível as curvas de dissolução *in vivo* e *in vitro* são sobreponíveis (FDA, 1997; BRASIL, 2002). Quando, no desenvolvimento da correlação, essas curvas não forem sobreponíveis, algumas estratégias podem ser adotadas, como a otimização do ensaio de dissolução através da variação das condições experimentais (DUNNE; O'HARA; DEVANE, 1999).

A obtenção de uma correlação nível A, permite a previsão do desempenho biológico de um medicamento a partir de estudos de dissolução. Desse modo, os estudos de dissolução podem ser utilizados como ferramentas confiáveis nos ensaios de controle de qualidade, podendo evidenciar pequenas alterações no processo de produção dos medicamentos, bem como algumas alterações na composição da forma farmacêutica e alterações nas especificações das matérias primas utilizadas na produção das formas farmacêuticas orais. Nesses casos, não haveria a necessidade de novos estudos de biodisponibilidade em seres humanos para avaliar o impacto de tais mudanças no comportamento do fármaco *in vivo* (MODI, 2007).

Essa correlação é geralmente estabelecida em duas etapas: primeiro a deconvolução da curva de concentração plasmática *versus* tempo para obtenção da curva da fração de fármaco absorvida *versus* tempo (curva de velocidade de absorção), seguida da comparação entre a fração de fármaco absorvido e dissolvido *in vitro*, para os mesmos tempos (BRASIL, 2004). Geralmente, para estimar a fração de fármaco absorvido, podem também ser utilizadas técnicas de equilíbrio de massa modelo-dependentes, tais como os métodos de Wagner-Nelson, caso a curva se ajuste a um modelo

monocompartimental, ou de Loo-Riegelman se o ajuste é significativo para um modelo de dois compartimentos. A deconvolução numérica é uma técnica de modelo-independente (EMANI, 2006; MODI, 2007).

O método modelo-dependente de Wagner-Nelson não utiliza dados de administração intravenosa e pode estar sujeito a uma interpretação errônea na fase terminal onde a velocidade de absorção é menor que a velocidade de eliminação (EMANI, 2006). A fração absorvida é calculada de acordo com a equação (1).

$$F_T = \frac{C_T + K_E \int_0^T C dt}{K_E \int_0^\infty C dt} \quad (1)$$

Onde C_T é a concentração no tempo T , K_E é a constante de velocidade de eliminação.

O método de Loo-Rielgeman também é modelo-dependente, mas é aplicado a modelos cinéticos multicompartimentais. Necessita de dados de concentração plasmática de absorção oral e intravenosa de um mesmo sujeito. A fração absorvida é de acordo com a equação (2):

$$F_T = \frac{C_T + K_{10} \int_0^T C dt + (X_p)_T / V_c}{K_{10} \int_0^\infty C dt} \quad (2)$$

Onde C_T é a concentração plasmática no tempo T ; $(X_p)_T$ é a quantidade de fármaco no compartimento periférico; V_c é o volume aparente do compartimento central; K_{10} é a constante de primeira ordem de velocidade de eliminação do compartimento central.

O modelo de deconvolução utiliza dados de uma formulação de absorção instantânea e da formulação oral de um mesmo voluntário. Não considera o número de compartimentos e assume a distribuição e eliminação linear (EMANI, 2006). A fração absorvida é calculada de acordo com a equação (3).

$$C_{VO_{tn}} = \frac{1}{D_{IV}} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta A_i}{\Delta t_i} \bullet \Delta AUC_{IV}^{(tn-ti-1)}_{(tn-ti)} \quad (3)$$

Onde $C_{VO_{tn}}$ = concentração no tempo t após a administração por via oral do produto teste; D_{IV} = dose administrada do produto de referência; $\Delta A_i / \Delta t_i$ = velocidade de absorção; ΔAUC_{IV} = fração da área sobre a curva após administração intravascular (IV).

Atualmente são encontrados na literatura diversos trabalhos que desenvolveram estudos de CIVIV nível A para formas farmacêuticas (RAO, et al., 2001; DALTON et al., 2001; OCHOA, et al., 2010; SOULIMAN, et al. 2006; GHOSH, et al., 2008, LI, et al., 2011).

A correlação de nível B utiliza os princípios da análise estatística de momentos. O tempo médio de dissolução *in vitro* é comparado ao tempo médio de residência (TMR) ou ao tempo médio de dissolução (TMD) *in vivo*. Diferentemente da correlação de nível A, a de nível B não é aceita pelas agências reguladoras para avaliar modificações da formulação, alteração do local de fabricação, alteração do fornecedor ou dos excipientes, entre outras (BRASIL, 2002).

A correlação de nível C relaciona um ponto de dissolução *in vitro*, como o tempo necessário para dissolução de 50% ($t_{50\%}$) ou 90% ($t_{90\%}$) do fármaco presente na forma farmacêutica, a um parâmetro farmacocinético *in vivo*, como a área sob curva de concentração plasmática em função do tempo (ASC), o pico de concentração máxima ($C_{\max}$) ou o tempo para atingir $C_{\max}$ ($T_{\max}$). Consiste, portanto, de uma correlação de um único ponto. Uma vez que este tipo de correlação não permite prever o real desempenho do produto *in vivo*, ela é útil somente como orientação no desenvolvimento de formulações ou como um método de controle de qualidade da rotina de produção do medicamento (BRASIL, 2002). Mesmo assim, é possível encontrar diversos estudos que desenvolveram e validaram correlações como a de nível C, para formulações farmacêuticas (SIRISUTH; AUGSBUERGER; EDDINGTON, 2002; BALAN et al., 2000; BALAN et al., 2001); incluindo formulações de implantes

subcutâneos biodegradáveis, contendo o fármaco acetato de buserelina (SCHLIECKER et al., 2004).

A correlação nível C múltipla relaciona um ou vários parâmetros farmacocinéticos (C_{max} , ASC ou outro parâmetro de interesse) com quantidade de fármaco dissolvida em vários pontos do perfil de dissolução. Esse nível de correlação pode ser avaliado a cada tempo, para um mesmo parâmetro farmacocinético, de modo que as alterações no perfil de dissolução podem refletir no comportamento *in vivo* de uma determinada formulação. Assim, quando uma correlação de nível C múltipla é estabelecida, o desenvolvimento de CIVIV nível A também é possível (MODI, 2007).

Para o estabelecimento de uma CIVIV é necessário conhecer as características físico-químicas dos fármacos, principalmente referente à sua solubilidade em líquidos biológicos e a permeabilidade no trato gastrointestinal.

Em 1995, Amidon e colaboradores, propuseram um sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) baseado nas propriedades fundamentais que governam a absorção de fármacos, solubilidade e permeabilidade e avaliaram a possibilidade de obtenção de CIVIV para fármacos de cada classe biofarmacêutica com base no fator limitante da absorção (AMIDON et al., 1995) (Quadro 1.1)

Quadro 1.1 - Classificação de fármacos de acordo com o SCB e o fator limitante da absorção (AMIDON et al., 1995)

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Fator limitante da absorção
I	Alta	Alta	Esvaziamento gástrico/Nenhuma relação com velocidade de dissolução
II	Baixa	Alta	Dissolução <i>in vivo</i>
III	Alta	Baixa	Permeabilidade/Esvaziamento gástrico
IV	Baixa	Baixa	Dissolução <i>in vivo</i> /Problemas de absorção oral

Para o desenvolvimento de uma CIVIV, é esperado que a dissolução do fármaco seja o ponto limitante de sua absorção, e que o mesmo possua alta permeabilidade. Fármacos pertencentes à classe biofarmacêutica I (que possuem alta solubilidade e alta permeabilidade) quando incorporados a formas farmacêuticas orais de liberação imediata, irão liberar o fármaco no estômago, e provavelmente a velocidade do esvaziamento gástrico será o passo limitante para sua absorção. Quando o processo de dissolução (ou liberação do fármaco) é mais rápido em relação ao esvaziamento gástrico, e o fármaco possui alta permeabilidade, o estudo de dissolução não irá refletir adequadamente o processo de absorção *in vivo*. Deste modo, uma CIVIV para fármacos classe I em formas farmacêuticas que liberam o fármaco rapidamente não poderá ser esperada.

Para fármacos pertencentes à classe II do SCB (baixa solubilidade e alta permeabilidade), a absorção será influenciada pela dissolução (ou liberação do

fármaco da forma farmacêutica), deste modo, é esperado que tais fármacos sejam candidatos ao desenvolvimento de CIVIV.

Para fármacos pertencentes à classe III do SCB, que possuem alta solubilidade e baixa permeabilidade, assim como fármacos da classe I, a dissolução do fármaco não é o fator limitante do processo de absorção. Deste modo, o desenvolvimento de uma CIVIV para tais fármacos é improvável, a menos que a dissolução seja mais lenta que a permeabilidade intestinal.

Fármacos pertencentes à classe IV do SCB, por possuírem baixa solubilidade e baixa permeabilidade, acabam sendo improváveis ao desenvolvimento de CIVIV (AMIDON et al., 1995; MODI, 2007).

No aspecto regulatório, as CIVIV podem ser aplicadas no caso das bioisenções. No sentido de minimizar testes de bioequivalência desnecessários em humanos, é importante a obtenção de parâmetros que indiquem através dos testes *in vitro* o comportamento *in vivo* de determinado fármaco incorporado a uma formulação. O estabelecimento desse tipo de correlação de dados pode possibilitar a substituição dos estudos *in vivo* necessários à demonstração da bioequivalência pelos estudos *in vitro*, principalmente no caso de alterações no processo de fabricação pós-registro, tais como mudanças de composição na formulação, mudanças no processo ou local de produção (UPPOOR, 2001).

3.3 CONSIDERAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DE CIVIV

Uma correlação inicial é estabelecida quando formulações com diferentes velocidades de dissolução são avaliadas considerando-se as seguintes etapas: (1) construção de perfis de dissolução; (2) construção de perfis de absorção; (3) correlação dos dados *in vitro* e *in vivo*; (4) avaliação da aplicabilidade da correlação (EMANI, 2006).

Após o estabelecimento da CIVIV, é necessário avaliar se a tal ferramenta matemática é capaz de prever o comportamento dos dados *in vivo* a partir dos dados *in vitro* de dissolução com precisão e exatidão.

O guia do FDA (1997) recomenda que a validação da correlação seja realizada pela medida do erro de predição (EP%); determinando valores de diferenças entre os resultados obtidos da curva de concentração plasmática do fármaco, com os resultados previstos. Para a determinação do EP%, são utilizados os dados de absorção *in vivo* previstos, obtidos através dos resultados do ensaio de dissolução *in vitro* utilizando o modelo de CIVIV estabelecido seguido pela obtenção dos perfis plasmáticos previstos, obtidos por convolução. Em seguida, estes perfis plasmáticos previstos são comparados às curvas experimentais obtidas após administração dos medicamentos a indivíduos saudáveis.

O guia do FDA (1997) ainda estabelece que a validação desses resultados de CIVIV podem ser realizados utilizando estudos iniciais ao desenvolvimento do modelo de CIVIV, utilizando duas ou mais formulações desenvolvidas com diferentes taxas de dissolução. Nesse caso, a validação é

dita como interna. A validação interna pode ser estabelecida através do cálculo do EP%, utilizando dados de estudos iniciais de CIVIV. A validação interna descreve se a qualidade dos resultados obtidos por predição são aceitáveis para o desenvolvimento da CIVIV (FDA, 1997; QIU; CHEN; ZHANG, 2009).

Quando se utiliza dados a partir de novas ou diferentes formulações (ou seja, formulações não utilizadas no desenvolvimento da CIVIV), a validação é dita como externa. A validação externa é baseada em resultados adicionais, e tem por objetivo aumentar a robustez do modelo de CIVIV desenvolvido (EMANI, 2006). A validação externa é útil para complementar a interna, pois é realizada em condições não utilizadas no desenvolvimento inicial de uma CIVIV, tais como formulações com diferentes velocidades de liberação do fármaco, formulações com pequenas mudanças no processo de produção ou com diferentes excipientes utilizados na formulação. Para fármacos que possuem baixo índice terapêutico, além dos estudos iniciais de CIVIV, também é necessário obter resultados adicionais, no caso, estudos de validação externa, para aumentar a confiabilidade dos resultados inicialmente obtidos (FDA, 1997)

O uso da validação externa é muito importante quando se tem a necessidade de utilizar na prática a CIVIV para substituição dos ensaios de bioequivalência, o que torna tal metodologia mais confiável e robusta, ao avaliar o desempenho *in vitro* da formulação para os lotes subsequentes (EMANI, 2006).

Enquanto a validação interna é utilizada como propósito para fornecer base à aceitação do modelo de CIVIV; a validação externa é superior, e permite maior confiança com os resultados obtidos (FDA, 1997).

3.4 DISSOLUÇÃO

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende de sua liberação e dissolução nas condições fisiológicas e pela permeabilidade através das membranas biológicas. Desse modo a extensão e a velocidade de absorção dependem da extensão e da velocidade com que o fármaco é liberado da forma farmacêutica que o contém, e da permeabilidade ou capacidade de atravessar as membranas. Assim, a velocidade de dissolução acaba sendo crítica para a absorção de fármacos, podendo influenciar na velocidade e extensão da disponibilidade do fármaco *in vivo* (AULTON, 2005).

Com base nos aspectos teóricos, os ensaios de dissolução *in vitro* constituem uma importante ferramenta preditiva de caracterização da qualidade biofarmacêutica de uma forma farmacêutica sólida oral, no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica intacta ou de seus fragmentos e partículas formadas durante o teste (CHOWDARY & RAJYALAKSHIMI, 1987).

A determinação da dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas em condições padronizadas fornece informações importantes que são utilizadas para assegurar a qualidade do produto, auxiliar na escolha de excipientes e do processo de fabricação durante o desenvolvimento de medicamentos e modificações pós registro, além de poder ajudar a estabelecer correlações *in vitro-in vivo* (MARCOLONGO, 2003).

O perfil de dissolução obtido no ensaio relaciona a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo (ABDOU, 1989) e representa uma técnica relativamente rápida e barata para avaliar formas farmacêuticas sólidas, antes dos testes clínicos. Permite também a obtenção de parâmetros cinéticos, que são importantes para determinar a velocidade e eficiência do processo, além do tempo necessário para que determinadas porcentagens do fármaco se dissolvam, possibilitando, desta forma, conclusões a respeito das características biofarmacotécnicas *in vitro* de determinada formulação (AGUIAR et al., 2005).

Na monografia farmacopeica de medicamentos são especificadas as condições de um ensaio de dissolução e os critérios de aceitação. Em alguns casos, podem ser descritas mais de uma condição para o mesmo medicamento (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2007). Sendo equivalentes farmacêuticos, os medicamentos podem atender a qualquer uma das especificações, evidenciando que a dissolução é uma característica da forma farmacêutica e não do fármaco (BRASIL, 2006).

Historicamente, os testes de dissolução foram desenvolvidos, principalmente, para finalidades de controle de qualidade e para auxiliar no desenvolvimento de novas formulações, e não para prever a eficiência do produto *in vivo* (AULTON, 2005). Porém, estes testes adquirem maior relevância quando podem ser correlacionados com dados obtidos em testes *in vivo*, o que permite prever o comportamento de uma formulação específica no organismo humano a partir de dados obtidos *in vitro*. Neste sentido, surgiram diversos trabalhos com o objetivo de estabelecer correlação entre os parâmetros da dissolução *in vitro* e os parâmetros relativos aos estudos de

biodisponibilidade *in vivo* (LEVY et al., 1965; WAGNER, et al., 1973; WELLING; TSE; DIGHE, 1991; LINDENBAUN, et al., 1973; JOHNSON, et al., 1973).

Nos últimos anos, como o avanço no desenvolvimento de novas formulações de liberação modificada, expandiu-se bastante a aplicação de novas tecnologias de dissolução. Os protocolos para estas formulações requerem mais do que simples determinações de pontos únicos, sendo necessários perfis de dissolução multipontos para a sua caracterização. Este fato levou ao desenvolvimento de sistemas de dissolução avançados (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Os ensaios de dissolução recorrem a dois princípios básicos: o método de agitação em copo e o sistema de fluxo contínuo (FARINHA; PAIS; BICA, 1997).

De acordo com a forma farmacêutica, as condições do ensaio de dissolução podem ser variadas. Para formas farmacêuticas sólidas, pode-se utilizar os aparatos cestos, pá, cilindros recíprocos ou células de fluxo (MARCOLONGO, 2003). A escolha da aparelhagem é determinada pelas características físico-química da forma farmacêutica.

Os aparatos 1 (cesta) e 2 (pá) são clássicos e são os aparatos rotineiramente utilizados, para formas sólidas. São basicamente constituídos por uma cuba cilíndrica de vidro com fundo arredondado, com capacidade nominal de 1000mL, 160 a 210 mm de altura e diâmetro de 98 – 106mm. A cuba é imersa em um banho de temperatura controlada (geralmente $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$), que contém o meio de dissolução. Os elementos de agitação na forma de cesto ou de pá são parte da haste de aço inoxidável, que promovem a agitação no meio de dissolução através de rotação. O cesto cilíndrico é composto por aço

inoxidável com abertura de malha padronizada, e a pá contém duas lâminas revestidas de material inerte (podendo ser de aço inoxidável revestida de *teflon*) que formam um ângulo de 180°C, posicionada a uma distância de 25±2 mm do fundo da cuba (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; UNITED, 2007).

O aparato 3, ou método de Bio-Dis, consiste em um banho de aquecimento, contendo as cubas com meio de dissolução dispostas em fileiras (cilindros externos). Há ainda uma fileira de cilindros internos, montados em hastes, onde a forma farmacêutica a ser analisada é inserida. Essas cubas contêm os meios de dissolução com diferentes valores de pH, que de acordo com o tempo, se deslocam entres as fileiras de cilindros, fazendo o movimento de imersão e emersão nas cubas. Deste modo, a forma farmacêutica é transferida em tempo programado para condições diferentes, podendo mimetizar a variação inerente do trato gastrointestinal, em função de perfil de pH (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; UNITED, 2007).

O aparato 4 (ou célula de fluxo) consiste basicamente de uma célula de fluxo, que contém o medicamento, e através da qual o meio de dissolução é bombeado a uma velocidade constante, e impulsionado para cima, passando pela forma farmacêutica presa na célula. Em geral, a velocidade do fluxo do meio sobre a célula é de 4, 8 ou 16 mL/minutos (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Existem algumas vantagens e desvantagens associadas ao aparato de célula de fluxo. As principais vantagens são: condições de saturação (*sink*) infinitas para fármacos de baixa solubilidade, facilidade de mudanças de pH durante o teste, facilidade na coleta de amostras e na automação do teste. Por outro lado, algumas desvantagens são a necessidade de grandes volumes de

meio de dissolução e complicações no desenvolvimento da validação do método, entre outras (MARCOLONGO, 2003)

Diversos autores vem-se utilizando das novas tecnologias de aparatos de dissolução para desenvolver estudos CIVIV, tanto para o aparato 3 (JANTRATID et al., 2007; KLEIN et al.; 2008), quanto para o aparato 4 (SUNESSEN et al., 2005; IYER et al., 2007), porém os aparatos 1 e 2 ainda permanecem como os mais fáceis e exeqüíveis, garantindo bons resultados nos ensaios de dissolução.

Os ensaios de dissolução apresentam várias aplicações no desenvolvimento e produção de medicamentos. Podem ser empregados no controle de qualidade, nos estudos de estabilidade, para subsidiar a definição dos excipientes e do processo de fabricação durante o desenvolvimento do medicamento e em caso de modificações pós-registro, para a previsão da absorção e para o desenvolvimento de correlação *in vitro* - *in vivo* (SIEWERT et al., 2003). O objetivo do teste de dissolução consiste em encontrar uma característica *in vitro*, de uma formulação potencial, que reflita a seu desempenho *in vivo*.

O fator predominante para a dissolução de um fármaco nos líquidos do TGI é a sua solubilidade aquosa. Entretanto, a solubilidade no TGI também pode ser influenciada pelo pH, pelo efeito dos surfactantes dos sais biliares, pela presença de alimentos, por formação de complexos insolúveis com componentes naturais do TGI e mesmo por alimentos. Tais eventos podem resultar em alterações significativas na solubilidade de fármacos (WANG, FOTAKI, MAO, 2009).

Quando se planeja um teste de dissolução para avaliar a liberação de fármacos sob a perspectiva biofarmacêutica, tenta-se mimetizar tanto quanto possível as condições do trato gastrointestinal. Para isso, no teste de dissolução, considera-se os fatores fisiológicos que podem exercer influência na liberação e dissolução *in vivo* dos fármacos. Os fatores que podem influenciar a dissolução de fármacos no trato gastrointestinal são a composição, o volume e a hidrodinâmica do conteúdo do lúmen após a administração da forma farmacêutica. Além destes fatores, a permeabilidade do fármaco pela parede do trato gastrointestinal desempenha papel importante na manutenção das condições *sink* (DRESSMAN et al., 1998; WANG, FOTAKI, MAO, 2009).

Para que um teste de dissolução adquira características fisiologicamente representativas, novos estudos têm utilizado meios de dissolução denominados biorrelevantes, na tentativa de reproduzir características fisiológicas do estômago e intestino delgado. Para mimetizar o estado de jejum e estado pós prandial, alguns autores desenvolveram meios de dissolução denominados FaSSIF (*fasted state intestinal fluid*) e FeSSIF (*fed state intestinal fluid*) (GALIA et al., 1998).

Tais meios apresentam valores de pH semelhantes ao do intestino delgado em jejum e no estado pós-prandial, uma vez que a solubilidade de um fármaco ao longo da faixa de pH gastrointestinal constitui um dos primeiros indicadores de que a dissolução pode ser um parâmetro limitante da velocidade no processo de absorção. Para o desenvolvimento do método, o pH do meio de dissolução é ajustado dentro da faixa fisiológica de pH, de 1,0 a 6,8 para formas farmacêuticas de liberação imediata, e de 1,0 a 7,2 – 7,5 para formas farmacêuticas de liberação modificada (DREESMAN et al., 1998).

Além disso, com o objetivo de aumentar o valor preditivo dos estudos, tais meios recebem a adição de substâncias encontradas nos líquidos digestivos, na tentativa de reproduzir as condições fisiológicas nos testes *in vitro*. Além do pH, os meios biorrelevantes são constituídos de substâncias presentes nos sais biliares, como a lecitina e taurocolato. A descrição dos meios biorrelevantes é apresentada no Quadro 2 (MARQUES, 2004).

Quadro 1.2 - Composição dos meios biorrelevantes Fassif e Fessif (MARQUES, 2004)

FaSSIF (fasted state simulated intestinal fluid)	FeSSIF (fed state simulated intestinal fluid)
Taurocolato de sódio 3m	Taurocolato de sódio 15mM
Lecitina 0,75m	Lecitina 3,75mM
NaOH 0,174g	NaOH 4,04g
NaH₂PO₄ H₂O 1,977g	Ácido Acético glacial 8,65g
NaCl 3,093	NaCl 11,874g
Água purificada q.s.p. 500mL	Água purificada q.s.p. 1000mL
pH 6,5	pH 5,00
Osmolaridade ~270 mOsmol/Kg	Osmolaridade ~670 mOsmol/Kg

Na tentativa de mimetizar o quanto possível a constituição dos fluidos gastrintestinais, diversos trabalhos estão sendo realizados com o emprego de tais estratégias (WEI; LÖBENBERG, 2006; SOULIMAN et al., 2006; JANTRATID et al., 2009; GHAZAL et al., 2008).

No entanto, estas condições podem não ser sempre a opção mais adequada, sendo preferível a escolha de meios de dissolução mais simples, que garantam condições de ensaio facilmente exeqüíveis e reprodutíveis, baseadas nas características físico – químicas dos fármacos em questão, e que se aproximem das condições fisiológicas (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

No âmbito da pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, os estudos de dissolução acabam sendo uma ferramenta confiável para estabelecer uma estimativa preditiva de liberação do fármaco em relação ao desempenho *in vivo* da forma farmacêutica (EMANI, 2006).

3.5 DICLOFENACO DE SÓDIO

O diclofenaco de sódio (DFS) possui completa absorção (100%) e baixa solubilidade em pH abaixo de 6,0; o que o determina como classe II no SCB (CHUASUWAN et al., 2008).

Quimicamente é um derivado do ácido fenilacético com valor de pKa de 3,8 (a 25°C) e peso molecular de 318,1 e , sendo praticamente insolúvel em soluções ácidas, mas solúvel em soluções básicas, no fluido intestinal e água (GILMAN; GOODMAN; BRUNTON, 2006) (Figura 1).

Fonte: CHUASUWAN et al., 2008

Figura 1.1 Fórmula estrutural do diclofenaco ($M^+ = Na$)

O DFS é um potente antiinflamatório não esteroideal (AINE), e possui propriedades farmacológicas antiinflamatória, analgésica e antipirética. A ação antiinflamatória do DCF decorre da inibição irreversível das enzimas ciclooxigenases (COX 1 e COX 2), com consequente diminuição da produção de prostaglandinas que sensibilizam os nociceptores a mediadores da inflamação. As prostaglandinas desempenham um importante papel na causa da inflamação, da dor e da febre (RANG et al, 2004).

O DFS é utilizado no tratamento sintomático das formas degenerativas e inflamatórias de reumatismo, tais como da artrite reumatóide, espondilite anquilosante, osteoartrite e da espondilartrite. Também é útil no tratamento, em curto prazo, da dor musculoesquelética aguda e dismenorreia primária e dores pós traumáticas e pós operatórias, com inflamação e edema, como por exemplo, após cirurgias dentárias ou ortopédicas (GILMAN; GOODMAN; BRUNTON, 2006; CHUASUWAN et al., 2008). Na forma farmacêutica de liberação controlada, o DFS acaba sendo adequado para pacientes nos quais a dose diária de 100mg é adequada ao caso clínico.

O DFS é 100% absorvido depois da administração oral, mas somente 60% chega a circulação sistêmica devido ao metabolismo hepático de primeira passagem. O tempo para atingir o pico de concentração plasmática (T_{max}) do DFS é de aproximadamente 1 hora para formas farmacêuticas de liberação imediata, e aproximadamente de 4 a 5 horas para comprimidos de liberação lenta. Como resultado da liberação mais lenta do ativo a partir dos comprimidos de desintegração lenta, os picos de concentração plasmática atingidos são menores que os observados após a administração dos comprimidos de liberação imediata. Para comprimidos de liberação lenta, o pico de concentração plasmática é de 0,5 mcg/mL, porém concentrações plasmáticas médias de 13ng/mL podem ser registradas 24 horas após a administração do medicamento (SAVASER; OZKAN; ISSYMER, 2005; CHUASUWAN et al., 2008).

O DFS possui ampla ligação às proteínas plasmáticas (99%), principalmente à albumina, e tempo de meia-vida curto (de aproximadamente 2 horas). Após a administração, acumula-se no líquido sinovial, o que pode explicar por que o efeito terapêutico é mais longo que a meia vida. O volume de distribuição do DCF é de aproximadamente 1,4 L/Kg (GILMAN; GOODMAN; BRUNTON, 2006).

A biotransformação do DFS ocorre parcialmente por glicuronidação da molécula intacta, mas principalmente por hidroxilação e metoxilação simples e múltipla, resultando em vários metabólitos fenólicos (3'-hidroxi-, 4'-hidroxi-, 5-hidroxi-, 4',5 hidroxi- e 3'-hidroxi-4'-metoxi- diclofenaco), a maioria dos quais são convertidos a conjugados glicurônicos. Dois desses metabólitos fenólicos

são biologicamente ativos, mas em extensão muito menor que o DFS (LACY, 2011).

Cerca de 60% da dose administrada é excretada na urina como conjugado glicurônico da molécula intacta e como metabólitos, a maioria dos quais são também convertidos a conjugados glicurônicos. Menos de 1% é excretado como substância inalterada. O restante da dose é eliminada como metabólitos através da bile nas fezes (aproximadamente 35%) (LACY, 2011).

O DFS é contra indicado para pacientes que possuem hipersensibilidade conhecida ao fármaco, como também em pacientes com úlcera gástrica ou intestinal ativa (com sangramento ou perfuração); nos casos de insuficiência hepática grave, insuficiência renal ou cardíaca; e no último trimestre de gravidez. Como outros agentes AINE's, o DFS também é contra indicado para pacientes nos quais crises de asma, urticária ou rinite são causadas por ácido acetilsalicílico ou por outros fármacos com atividade inibidora da prostaglandina sintase (LACY, 2011).

A completa absorção (100%) e a baixa solubilidade em pH, abaixo de 6.0, classificam o DFS como classe II no SCB.

Devido às propriedades biofarmacêuticas do DFS e da necessidade de busca de uma metodologia de dissolução que possa ser efetivamente correlacionado com as propriedades biológicas da forma farmacêutica de liberação modificada; este trabalho propõe ao desenvolvimento e validação interna de CIVIV, bem como da realização de uma validação externa para a correlação *in vitro-in vivo* estabelecida para comprimidos de liberação

modificada de DFS, por meio da realização de ensaios de dissolução *in vitro* e de ensaios de biodisponibilidade *in vivo* de formulações comerciais contendo o fármaco.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS GERAIS

Em trabalho prévio, Mourão (2009) estabeleceu uma CIVIV para comprimidos de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio, empregando três formulações teste de liberação modificada (F1, F2 e F3) e uma formulação referência de liberação convencional (Voltaren® 50mg). A correlação de nível A obtida apresentou coeficiente de determinação de 0,7476. No presente trabalho, os resultados do estudo *in vivo* realizado por Mourão (2009), representados pelos perfis de absorção de diclofenaco em função do tempo, foram utilizados em novos estudos para obtenção de uma melhor CIVIV. Estes estudos consistiram, basicamente, no teste de diferentes condições de ensaios de dissolução para obtenção de perfis de dissolução de diclofenaco em função do tempo semelhantes aos perfis de absorção supracitados.

Uma vez obtida a nova CIVIV, procedeu-se à sua validação interna, empregando novamente os resultados do estudo *in vivo* realizado por Mourão (2009), representados pelas curvas de decaimento plasmático de diclofenaco em função do tempo, e à sua validação externa, para a qual foi planejado e executado novo ensaio *in vivo*, descrito no presente trabalho.

Assim, os itens a seguir descrevem os ensaios realizados para aperfeiçoamento da CIVIV obtida por Mourão (2009), e sua validação interna e externa.

4.2 APERFEIÇOAMENTO DA CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

4.2.1 Ensaio de dissolução

4.2.1.1 Materiais

4.2.1.1.1 Substância Química de Referência (SQT)

Para a realização dos ensaios de dissolução, foi utilizado como substância química de referência caracterizada (SQT), o padrão secundário de DFS, com teor declarado de 100,49% e identificado pelo lote 1102000136, gentilmente cedido pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. (São Paulo, Brasil).

4.2.1.1.2 Equipamentos e acessórios

- Âncora para dissolução, Vankel, modelo CAPWST-31;
- Aparelho de dissolução, Vankel, modelo VK 7010;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AX 200;
- Balões volumétricos de vidro;
- Banho ultrassônico Unique, modelo USC – 2800;

- Cânulas de aço inox;
- Chapa aquecedora Tecnal, modelo TE – 038;
- Espectrofotômetro de UV, Vankel, modelo 50 UV-Vis;
- Membranas filtrantes de celulose Sartorius de 47 mm de diâmetro e poro de 0,2 µm;
- pHmetro Hanna Instruments, modelo HI 221;
- Pipeta automática de volume variável 0,5 – 5 mL, Brand Transferpette®;
- Ponteiras descartáveis AxygenScientific;
- Provetas volumétricas de vidro;
- Seringas descartáveis de 10mL, Descarpac®;
- Sistema de filtração à vácuo;
- Tubos de ensaio cônicos de 10mL;
- Unidades filtrantes Millipore, modelo Millex HV com membrana de PVDF, com 13 mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade.

4.2.1.1.3 Reagentes e solventes

- Água purificada obtida em equipamento de Osmose Reversa Gehaka;
- Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) p.a., (Merck ©),
- Hidróxido de sódio (Synth®).

4.2.1.1.4 Produtos farmacêuticos

Para o desenvolvimento inicial da correlação *in vitro-in vivo*, foram utilizados nos estudos de dissolução, comprimidos de DFS produzidos por Mourão (2009). No trabalho citado, foram desenvolvidas três formulações (F1, F2 e F3) contendo 100mg de diclofenaco de sódio, incorporado a comprimidos matriciais com diferentes taxas de liberação do fármaco, obtidas pelo processo de granulação por via úmida. Os comprimidos matriciais utilizados continham como excipientes: hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) nas concentrações de 10% (F1), 20% (F2) e 30% (F3) como agente controlador de liberação do fármaco, além de estearato de magnésio (1,5%) como lubrificante, polivinilpirrolidona como agente aglutinante e celulose microcristalina e lactose como diluentes, em quantidades suficientes para obter uma massa final de 350mg por comprimido.

4.2.1.2 Métodos

4.2.1.2.1 Preparo das soluções padrão

Para o preparo das soluções padrão de trabalho utilizadas para quantificação de diclofenaco nas amostras provenientes do ensaio de dissolução, foi utilizada uma solução padrão de DFS em metanol na concentração de 2mg/mL, acondicionada em frasco de vidro âmbar e armazenada em freezer na temperatura a -20° C. As soluções padrão de

trabalho nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 60µg/mL foram preparadas a partir de alíquotas tomadas da solução padrão de DFS a 2mg/mL em metanol, diluídas em balões volumétricos, e com o volume completado com o meio de dissolução, tampão fosfato 0,05M com pH 6,8.

4.2.1.2.2 Preparo do meio de dissolução

O meio empregado no estudo de dissolução dos comprimidos de DFS, foi o suco entérico simulado (SES) ou tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,8, preparado como descrito a seguir:

Em um balão volumétrico de 1000mL, dissolveram-se 27,22g de fosfato de potássio monobásico em água purificada e adicionaram-se 224mL de NaOH 0,2N, completando-se o volume com água purificada. Transferiram-se 500mL desta solução para um balão volumétrico de 2000mL, completando-se o volume com água purificada. Para a desgaseificação do meio, o mesmo foi aquecida a 41°C em placa aquecedora, filtrado sob vácuo com membrana filtrante de 0,2µm de porosidade e sonicado em banho ultrassônico por 15 minutos (UNITED, 2007).

4.2.1.2.3 Quantificação de DFS nas amostras provenientes dos ensaios de dissolução

O percentual de DFS dissolvido em função do tempo no ensaio de dissolução foi determinado por espectrofotometria de UV, utilizando método adaptado da United States Pharmacopeia 32 (UNITED, 2007). A ausência de

interferentes dos excipientes no método quantitativo foi demonstrada por avaliação do valor de absorbância do DFS em tampão fosfato de potássio 0,05M com pH 6,8. Para isso, foi realizado uma varredura contemplando valores de absorbância de 200 a 400 nm com solução padrão de DFS a 30µg/mL, e solução amostra obtida a partir das formulações de DFS, conforme descrito abaixo.

Pesaram-se 20 comprimidos de Voltaren Retard[®] e determinando-se o peso médio. Em seguida, os comprimidos foram triturados em gral de porcelana, e o conteúdo foi homogeneizado. Pesou-se massa equivalente ao peso médio dos comprimidos , a qual foi diluída em 1mL de metanol. Completou-se o volume com tampão fosfato de potássio 0,05M com pH 6,8 para um balão volumétrico de 50 mL, obtendo uma solução a 2mg/mL de DFS. Desta solução, foi retirada uma alíquota de 1,50 mL e adicionada a um balão volumétrico de 100mL em tampão fosfato de potássio, obtendo uma solução de DFS a 30µg/mL.

A faixa de linearidade do método foi avaliada a partir de soluções de trabalho padrão nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 60µg/mL. A leitura dos valores de absorbância das soluções de trabalho de DFS foi realizada em 276nm, utilizando tampão fosfato 0,05M com pH 6,8 como branco. A equação da reta de calibração obtida foi utilizada para a quantificação do DFS nas amostras provenientes dos ensaios de dissolução.

4.2.1.2.4 Condições de dissolução

As condições do ensaio de dissolução (tais como tipo de equipamento, composição e volume do meio, velocidade de rotação) devem ser selecionadas de tal maneira que o teste adquira condições discriminativas e reprodutíveis quanto ao comportamento *in vivo* do fármaco.

Na tentativa de otimizar as condições do ensaio de dissolução para o desenvolvimento de uma CIVIV, a partir dos resultados obtidos por Mourão (2009), alterou-se a velocidade de rotação do aparato II (pá) e também recorreu-se a utilização de âncoras, uma vez que as formulações analisadas, constituídas de polímeros hidrofílicos (HPMC), que quando em contato com meio de dissolução, adquirem um aspecto “gelatinoso”, o que gera a aderência das formulações ao fundo das cubas de vidro, e conseqüentemente, a diminuição da superfície exposta ao meio de dissolução. O emprego de âncoras foi uma tentativa de expor toda a superfície dos comprimidos ao meio de dissolução.

Nesta proposta como condição de ensaio de dissolução, utilizou-se tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,8 como meio de dissolução, em volume de 900mL mantido em temperatura a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O aparato de rotação utilizado foi do tipo II (pá) em uma velocidade de 25 rpm, e com os comprimidos inseridos em âncoras (UNITED, 2007).

Para obtenção do perfil de dissolução das formulações em estudo foram retiradas manualmente, com o emprego de seringas descartáveis e cânulas de aço inox, alíquotas de 10 mL do meio, nos tempos de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0;

3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 horas após o início do ensaio. As alíquotas foram filtradas através de unidades filtrantes Millex, com porosidade de 0,45µm. A concentração do fármaco nas amostras foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 276 nm, empregando-se uma curva analítica para cada ensaio, com linearidade no intervalo de 10 – 60 µg/mL.

4.2.2 Estabelecimento da CIVIV

Os valores de fração do fármaco dissolvido em cada tempo (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 hs) (F_{d0-8}), obtidos nos ensaios de dissolução, foram plotados diretamente com os dados de fração do fármaco absorvido em cada tempo (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 hs) (F_{a0-8}) (Mourão, 2009), na tentativa de estabelecer uma correlação linear de nível A, para as formulações de DFS em estudo.

4.3 VALIDAÇÃO INTERNA DA CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

4.3.1 Dados

- Dados de dissolução *in vitro* das formulações F1, F2 e F3;
- Dados dos estudos de biodisponibilidade das formulações F1, F2 e F3 (obtidos de Mourão, 2009),
- Correlação *in vitro-in vivo* estabelecida.

4.3.2 Métodos

A validação interna da CIVIV foi realizada a partir dos dados dos ensaios de dissolução *in vitro* e dos ensaios de biodisponibilidade *in vivo*, conforme descrito por Eddington e colaboradores (1998).

A CIVIV estabelecida inicialmente, foi empregada para obtenção das curvas previstas de concentração plasmática em função do tempo das formulações F1, F2 e F3. Esta correlação é apresentada a seguir:

$$\Delta A = 0,406 * FD$$

Onde:

ΔA = Fração absorvida *in vivo*

FD = fração dissolvida *in vitro*

Desta forma, a fração absorvida prevista de fármaco (ΔA_{ip}) foi obtida para cada formulação avaliada a partir dos dados de dissolução *in vitro*, por meio da aplicação da CIVIV.

Em seguida, a técnica de convolução foi aplicada para obtenção das curvas previstas de concentração plasmática em função do tempo, de acordo com a equação:

$$C_{VOtn} = \frac{1}{D_{IV}} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta A_i}{\Delta t_i} \bullet \Delta AUC_{IV}^{(tn-t_i-1)}_{(tn-t_i)}$$

Onde:

C_{VOtn} = concentração no tempo t após a administração por via oral do produto teste

D_{IV} = dose administrada do produto de referência (comprimido de diclofenaco de sódio 50 mg de liberação imediata)

$\Delta A_i / \Delta t_i$ = velocidade de absorção

ΔAUC_{IV} = fração a área sobre a curva após administração do produto de referência extrapolada para administração intravascular (IV) (dados obtidos de MOURÃO, 2009).

Esses resultados de concentração plasmática previstas para o DFS em função do tempo foram comparados, com os resultados das curvas plasmáticas reais de DFS, obtidas nos ensaios de biodisponibilidade *in vivo*. A validação da CIVIV foi estabelecida a partir da semelhança entre as curvas previstas e as curvas reais de decaimento plasmático do DFS para cada formulação avaliada (F1, F2 e F3).

Após o desenvolvimento da CIVIV, utiliza-se o modelo matemático obtido (que descreve a relação entre F_a versus F_d e corresponde à própria CIVIV) para obter a absorção prevista do fármaco, a partir dos dados de dissolução. Em seguida, a técnica de convolução é aplicada a estes dados de absorção prevista para obter a concentração plasmática prevista *in vivo* (MAHAYNI et al., 2000). A comparação entre os valores de concentração plasmática prevista *in vivo* e concentração plasmática real *in vivo* fornece o erro de predição da CIVIV (EP%) com base no qual a CIVIV será validada ou não (MAHAYNI et al., 2000). No processo de validação interna da CIVIV, os dados de dissolução e absorção utilizados são aqueles obtidos das formulações usadas no desenvolvimento da correlação, enquanto que, para a validação externa, empregam-se dados de dissolução e de absorção de formulações diferentes daquelas empregadas na obtenção da CIVIV (EDDINGTON, 1998).

Na prática, o EP% é obtido pela comparação entre os resultados reais com os resultados do modelo de CIVIV previsto, tais como C_{max} e ASC. A determinação do EP% é realizada como a seguir:

$$EP\% = \left[\frac{V_{obs} - V_{prev}}{V_{obs}} \right] * 100$$

Onde V_{obs} é o parâmetro real e V_{prev} é o parâmetro previsto.

Os critérios de EP% aceitáveis são 10% ou menos para parâmetros farmacocinéticos (tais como C_{max} ou ASC). Além disso, o EP% para cada formulação não deve exceder 15%. Quando esses critérios não são alcançados, o desenvolvimento de uma validação externa, utilizando formulações diferentes às iniciais, é necessário (FDA, 1997)

A validação interna da CIVIV foi realizada pela determinação de EP% para as formulações F1, F2 e F3.

4.4 VALIDAÇÃO EXTERNA DA CORRELAÇÃO IN VITRO-IN VIVO

4.4.1 Aspectos Gerais

A validação externa da CIVIV foi realizada empregando-se formulações de liberação modificada contendo o fármaco DFS encontradas no mercado nacional. Tais formulações foram empregadas em estudo de biodisponibilidade relativa com voluntários sadios e submetidas a ensaios de dissolução, conforme método anteriormente descrito. O modelo matemático obtido no desenvolvimento inicial da CIVIV foi utilizado para prever a fração absorvida do DFS, a partir dos dados de fração dissolvida obtidas nos estudos de dissolução. Utilizando a técnica de convolução, a concentração plasmática do DFS foi prevista e comparada à curva real, obtida no estudo de biodisponibilidade.

4.4.2 Ensaio de Dissolução

4.4.2.1 Produtos Farmacêuticos

- Comprimidos referência (R) Voltaren Retard® 100mg, lote Z0098;
- Comprimidos de DFS 100mg genérico (G) (Ranbaxy), lote 2021769;
- Comprimidos de DFS 100mg Similar (S) (Voltaflex AP® - EMS - lote 239658).

A relação de excipientes contidos nas formas farmacêuticas utilizadas no estudo, é apresentada no Quadro 4.1 abaixo:

Quadro 4.1 Relação de excipientes contidos nas formulações farmacêuticas contendo 100mg de diclofenaco de sódio, analisadas nos ensaios de dissolução. *Informações retiradas das bulas dos medicamentos.*

	Formulação	Excipientes
R	VoltarenRetard®	Dióxido de silício, álcool cetílico, estearato de magnésio, povidona, sacarose, hipromelose, óxido de ferro vermelho, polissorbato 80, talco e dióxido de titânio.
G	Diclofenaco sódico (Genérico – Ranbaxy)	Lactose, hidroxipropilmetil celulose, hidroxipropil celulose, estearato de magnésio, talco, sílica anidra coloidal, corante opadry.
S	Voltaflex AP (EMS)	Sacarose, dióxido de silício, álcool cetosteárilico, polímero catiônico do ácido metacrílico, óxido de ferro vermelho, macrogol, dióxido de titânio, estearato de magnésio, talco.

4.4.2.2 Condições do ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução determina a porcentagem de princípio ativo liberado no meio de dissolução, em função do tempo. Baseando-se no planejamento do estudo de biodisponibilidade, procurou-se estabelecer um tempo de ensaio e intervalos de coleta de amostras que permitissem construir uma correlação *in vitro* - *in vivo*, preferencialmente, tempo a tempo.

Para a realização dos ensaios de dissolução, utilizou-se tampão fosfato de potássio 0,05M pH 6,8 como meio de dissolução, em volume de 900mL; e mantidos à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (UNITED, 2007). O aparato utilizado foi do tipo II (pá) a 25 rpm. Nesta condição de dissolução foi utilizado âncoras, para evitar a baixa exposição dos comprimidos ao meio de dissolução.

Para obtenção do perfil de dissolução das formulações em estudo foram retiradas manualmente, com o emprego de seringas descartáveis e cânulas de aço inox, alíquotas de 10 mL do meio, nos tempos de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 horas após o início do ensaio. As alíquotas foram filtradas através de unidades filtrantes Millex, com porosidade de $0,45\mu\text{m}$. A concentração do fármaco nas amostras foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda de 276 nm, empregando-se uma curva analítica para cada ensaio, com linearidade no intervalo de 10 – 60 $\mu\text{g/mL}$.

4.4.3 Ensaio de biodisponibilidade relativa

4.4.3.1 Materiais

4.4.3.1.1 Amostras

Para o estudo de biodisponibilidade, foram avaliados três amostras dos mesmos comprimidos comerciais de liberação modificada contendo 100 mg DFS empregados nos ensaios de dissolução, sendo uma amostra de medicamento de referência , uma amostra de medicamento genérico e uma amostra de medicamento similar. Foram utilizados comprimidos do mesmo lote utilizado nos estudos de dissolução. As amostras são descritas a seguir:

- Comprimidos de Voltaren Retard[®] 100mg, lote Z0098. Medicamento de referência;
- Comprimidos de DFS 100mg genérico (Ranbaxy), lote 2021769. Medicamento genérico
- Comprimidos de DFS 100mg (Voltaflex AP[®] - EMS) lote 239658. Medicamento similar.

4.4.3.1.2 Substância Química de Referência (SQT)

Para as análises de quantificação de DFS em plasma, foi utilizado como substância química de referência caracterizada (SQT), o padrão secundário de DFS, com teor declarado de 100,49% e identificado pelo lote 1102000136, gentilmente cedido pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. (São Paulo, Brasil).

Como padrão interno para os ensaios de quantificação de DFS em amostras de plasma, foi utilizado como SQT, o padrão secundário de nimesulida, com teor declarado de 100% e identificado pelo lote 82901210001, gentilmente cedido pela empresa Eurofarma (São Paulo, Brasil).

4.4.3.1.3 Materiais Médico-Hospitalares

- Agulhas descartáveis estéril BD (Becton Dickinson) PrecisionGlide[®], de 0,8 x 30;
- Álcool etílico hidratado 70º INPM;
- Algodão hidrófilico não estéril, Sussex[®];
- Cateter intravenoso periférico 21G, BD (Becton Dickinson), Angiocath[®];
- Cloreto de sódio a 0,9%, Baxter (solução fisiológica);
- Heparina sódica frasco-ampola 5000UI, Hepamax-S, Blausiegel (lote 0902046);

- Injetor de borracha BD (Becton Dickinson), Interlink®;
- Luvas para procedimentos não estéreis;
- Seringas descartáveis BD (Becton Dickinson) de 5 e 10mL,
- Tubos de coleta de sangue de 10mL, BD (Becton Dickinson), Vacutainer®.

4.4.3.1.4 Equipamentos e materiais

- Centrífuga Hettich, modelo Rotofix 32
- Agitadores de tubos tipo vórtex;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AX 200;
- Banho termostático Fanem, modelo 102R;
- Banho ultrassônico Unique, modelo USC 2800;
- Centrífuga Hettich, modelo Rotofix 32;
- Coluna cromatográfica Phenomenex®, modelo Gemini-NX de C18 com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, contendo partículas de 5µm;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Hitachi, composto por uma bomba L7100, injetor automático de amostras L7200, detector UV L7400 e FL L7485, e forno de coluna L7300;
- Membranas filtrantes de celulose, Sartorius, de 47 mm de diâmetro e poro de 0,22 µm;
- Pipeta automática de volume variável 10 - 100µL, Brand Transfepette®;

- Pipeta automática de volume variável 100 - 1000µL, Brand Transfepette®;
- Pipetador automático de 0,5 – 5 mL, Brand Dispensette®;
- Ponteiros descartáveis AxygenScientificInc;
- Pré – coluna Phenomenex®, modelo AJO – 4287 de C18 com 3 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro, contendo partículas de 5µm;
- Provetas de vidro de 500 e 1000mL;
- Seringas de vidro B.D. Yale de 10mL;
- Sistema de filtração à vácuo;
- Tubos de ensaio com fundo cônico de 10mL;
- Tubos de ensaio com rolha esmerilhada de 10mL;
- Unidades filtrantes Millipore, modelo Millex HV com membrana de PVDF, com 13 mm de diâmetro e 0,45µm de porosidade.

4.4.3.1.5 Reagentes e solventes

- Acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Barker®);
- Ácido Fosfórico 10% (Synth®);
- Água ultrapura obtida em equipamento Millipore, modelo Milli-Q Academic;
- Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) p.a., (Merck ©);
- Nitrogênio grau analítico, Air Liquide.

4.4.3.2 Métodos

4.4.3.2.1 Aspectos éticos

O estudo de biodisponibilidade foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP/SP em 1 de setembro de 2009 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário-USP em 7 de agosto de 2009 (Registro CEP/HU USP: 930/09) (Anexo B e C, respectivamente).

4.4.3.2.2 Casuística

O estudo foi realizado em humanos, de acordo com as normas nacionais para ensaios desta natureza, segundo a regulamentação estabelecida pela ANVISA (BRASIL, 2006).

Foram selecionados para este estudo 6 voluntários sadios de ambos os sexos, devidamente informados sobre as características da pesquisa e sobre os procedimentos adotados, e que assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo D), em duas vias, sendo uma via do pesquisador e a outra do voluntário.

A seleção dos voluntários foi realizada de acordo com os seguintes critérios:

⇒ não fumantes;

- ⇒ bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos e peso dentro do ideal $\pm$ 15 %, calculado pela fórmula $PI = 0,9 (H - 100)$ em que PI é o peso ideal (kg) e H, a altura do voluntário (cm);
- ⇒ ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- ⇒ sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- ⇒ ausência de tratamento com medicamentos durante a realização da pesquisa;

A inclusão dos voluntários foi baseada em resultados de exames clínicos, além dos seguintes exames laboratoriais.

- ✓ Hemograma completo;
- ✓ Ureia;
- ✓ Creatinina;
- ✓ Fosfatase alcalina;
- ✓ Glicemia;
- ✓ Bilirrubina total;
- ✓ Proteínas totais e albumina;
- ✓ Transaminases;
- ✓ Colesterol total;
- ✓ Ácido úrico;
- ✓ Triglicérides;

- ✓ Sorologias para HIV e Hepatites B e C;
- ✓ β – HCG (para mulheres);
- ✓ Análise de urina completa,
- ✓ Eletrocardiograma completo com 12 derivações.

Os exames clínicos e laboratoriais foram repetidos após a realização do estudo de biodisponibilidade, exceto para as sorologias de HIV e Hepatites B e C.

Os voluntários seriam excluídos do estudo nos casos a seguir:

- ⇒ não satisfizessem os critérios de inclusão supracitados;
- ⇒ apresentassem resultados fora da normalidade para os exames clínicos e laboratoriais;
- ⇒ apresentassem mal-estar decorrente da retirada de amostras de sangue, tal como tontura, queda de pressão ou desmaio e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- ⇒ apresentassem reações adversas ao medicamento administrado;
- ⇒ ausência de estado de gravidez para voluntários do sexo feminino (comprovado através de exame laboratorial de β -HCG) ou em período de amamentação;
- ⇒ independentemente de qualquer intercorrência, expressassem desejo de serem excluídos do estudo.

4.4.3.2.3 Procedimentos

O estudo foi do tipo cruzado e realizado em três fases, de forma que todos os voluntários receberam as três formulações em estudo, e em diferentes dias. Entre as fases houve um período de “*wash-out*”, que correspondente a, no mínimo, dez vezes o valor da meia-vida de eliminação do DFS. Neste estudo, o período de *wash-out* foi de sete dias.

Os produtos foram administrados aos voluntários pela manhã, após jejum de 8 horas, e ingeridos com auxílio de 200 mL de água. Após a ingestão das formulações, os voluntários permaneceram mais 4 horas em jejum. Em seguida, os voluntários receberam almoço, lanche e jantar padronizados, respectivamente, quatro, seis e dez horas após a administração dos medicamentos.

Os voluntários foram orientados a não ingerirem bebidas alcoólicas, café e outras bebidas xânticas, por pelo menos 48 horas antes do ensaio, e estas bebidas não foram oferecidas durante a realização do estudo. Além disso, os voluntários foram orientados a não tomarem qualquer medicação uma semana antes do estudo, e durante a sua realização; e qualquer intercorrência deveria ser imediatamente comunicada ao médico de plantão.

4.4.3.2.4 Coleta de amostras de plasma

Foram coletadas amostras de 10mL de sangue em tubos heparinizados nos seguintes intervalos de tempo: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 12,0 horas após a administração dos produtos, para determinação do perfil de decaimento plasmático do DFS. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3500 rpm, obtendo desse modo o plasma, que foi armazenado em tubos criogênicos e congelado a -20°C até a realização do ensaio analítico para quantificação do fármaco. As amostras de sangue foram coletadas por profissionais habilitados.

4.4.3.2.5 Quantificação do DFS em plasma

Para a quantificação de DFS em plasma foi utilizado um método analítico adaptado, partindo-se de um método validado, proposto por Mourão (2009). A validação parcial do método foi realizada por meio da determinação dos parâmetros especificidade, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade.

As amostras de plasma de voluntários que receberam DFS foram analisadas paralelamente a curva de calibração com dez pontos e a amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações em triplicata. As amostras de plasma padrão da curva de calibração e as amostras de plasma de controle de qualidade utilizadas, foram obtidas adicionando-se padrão de referência de DFS ao plasma “branco”.

4.4.3.2.5.1 Preparo das soluções-padrão

4.4.3.2.5.1.1 Diclofenaco de sódio

Foi preparada, a partir da SQT de DFS, uma solução estoque em metanol na concentração de 250µg/mL. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar e mantida em freezer na temperatura a -20° C.

A partir da solução estoque, foram preparadas as soluções de trabalho diluídas em água e metanol, na proporção de 90:10, v/v nas seguintes concentrações: 0,25 µg/mL, 0,375 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 3,75 µg/mL, 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL e 10 µg/mL. Essas soluções foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em geladeira na temperatura de 4° C, sendo que a estabilidade das mesmas foi monitoradas na corridas analíticas.

4.4.3.2.5.1.2 Nimesulida

Preparou-se uma solução estoque de nimesulida (padrão interno) na concentração de 50 µg/mL, em metanol. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar e mantida em geladeira na temperatura de 4° C. A estabilidade da solução foi monitorada diariamente durante as corridas analíticas.

4.4.3.2.5.2 Preparo das amostras de plasma da curva de calibração

As amostras de plasma da curva de calibração foram preparadas diariamente, a partir das soluções padrões de 0,25 µg/mL, 0,375 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,75 µg/mL, 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 3,75 µg/mL, 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL e 10 µg/mL de DFS em uma mistura de água e metanol 90:10, v/v.

Tomaram-se alíquotas de 50 µL das soluções de trabalho de DFS diluídas em água e metanol 90:10, v/v; e 20 µL da solução padrão de nimesulida (50 µg/mL, em metanol). Adicionaram-se 200 µL de plasma branco, e as amostras foram homogeneizadas em agitadores de tubos do tipo vórtex, por 30 segundos, e seguiu-se o processo de purificação das amostras, descrito a seguir. A Tabela 4.1 apresenta as diluições realizadas para a obtenção das amostras de plasma padrão para a curva de calibração.

Tabela 4.1 – Amostras de plasma padrão da curva de calibração para quantificação do DFS

Concentração da solução padrão de DFS (µg/mL)	Alíquota (µL)	Volume do plasma branco (µL)	Concentração final de DFS (µg/mL)
0,25	50	200	0,05
0,375	50	200	0,075
0,5	50	200	0,1
0,75	50	200	0,15
1,25	50	200	0,25
2,5	50	200	0,5
3,75	50	200	0,75
5,0	50	200	1,0
7,5	50	200	1,5
10	50	200	2,0

4.4.3.2.5.3 Preparo das amostras de plasma de controle de qualidade

As amostras de plasma de controle de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) foram preparadas diariamente tomando alíquotas de 50µL das soluções de trabalho de DFS nas concentrações de 0,5 µg/mL, 3,75 µg/mL e 7,5 µg/mL, respectivamente, e 20 µL da solução padrão de nimesulida (50 µg/mL, em metanol). Adicionaram-se 200 µL de plasma branco, e as amostra foram homogeneizadas em agitadores de tubos do tipo vórtex, por 30

segundos, e seguiu-se para o processo de purificação das amostras, descrito a seguir. A Tabela 4.2 apresenta as diluições realizadas para a obtenção das amostras de plasma de controle de qualidade.

Tabela 4.2 – Obtenção de amostras de plasma de controle de qualidade de DFS

Amostras de Controle de Qualidade	Concentração da solução padrão de DFS (µg/mL)	Alíquota (µL)	Volume do plasma branco (µL)	Concentração final de DFS (µg/mL)
CQB	0,5	50	200	1,0
CQM	3,75	50	200	0,75
CQA	7,5	50	200	1,5

4.4.3.2.5.4 Purificação de amostras de plasma para quantificação do DFS

As amostras de plasma branco, da curva de calibração, de controle de qualidade e dos voluntários que receberam as formulações contendo DFS; foram submetidas ao processo de purificação, por meio de precipitação de proteínas plasmáticas com acetonitrila.

4.4.3.2.5.4.1 Purificação das amostras de plasma branco, da curva de calibração e de controle de qualidade

Para as amostras da curva de calibração e de controle de qualidade, foram adicionados 200 µL de plasma branco a tubos de ensaio contendo 20 µL de nimesulida (padrão interno) na concentração de 50 µg/mL em metanol, e 50µL das soluções padrão de trabalho de DFS, nas respectivas concentrações. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos em agitadores de tubos do tipo vórtex. O método de extração do fármaco foi realizado por precipitação de proteínas plasmáticas, através da adição de 4mL de acetonitrila. Os tubos de ensaio foram fechados com o auxílio de tampas de vidro esmerilhadas e homogeneizados em agitadores de tubos do tipo vórtex, por 60 segundos em velocidade intermediária, para evitar perdas de amostras. Em seguida, os tubos passaram por centrifugação numa velocidade de 3500 rpm por 10 minutos, e após a centrifugação, as amostras foram filtradas através de unidades filtrantes Millex, em tubos de ensaio cônicos. Posteriormente, as amostras foram evaporadas através de corrente de nitrogênio, sob banho-maria a 40° C. O resíduo seco foi ressuscitado com 250 µL de fase móvel, e 50 µL da amostra foi injetada no sistema cromatográfico.

4.4.3.2.5.4.2 Purificação das amostras de plasma dos voluntários contendo DFS obtidas no ensaio clínico

Para a o processo de purificação das amostras de plasma dos voluntários, foram adicionados 250 µL das amostras de plasma, correspondente ao tempo de coleta no estudo clínico, a tubos de ensaio contendo 20 µL de nimesulida (padrão interno) na concentração de 50 µg/mL em metanol. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos em agitadores de tubos do tipo vórtex. O método de extração do fármaco foi realizado por precipitação de proteínas plasmáticas, através da adição de 4mL de acetonitrila. Os tubos de ensaio foram fechados com o auxílio de tampas de vidro esmerilhadas e homogeneizados em agitadores de tubos do tipo vórtex, por 60 segundos em velocidade intermediária, para evitar perdas de amostras. Em seguida, os tubos passaram por centrifugação numa velocidade de 3500 rpm por 10 minutos, e após a centrifugação, as amostras foram filtradas através de unidades filtrantes Millex, em tubos de ensaio cônicos. Posteriormente, as amostras foram evaporadas através de corrente de nitrogênio, sob banho-maria a 40° C. O resíduo seco foi ressuspendido com 250 µL de fase móvel, e 50 µL da amostra foi injetada no sistema cromatográfico.

4.4.3.2.5.5 Condições cromatográficas

A fase móvel utilizada foi constituída por uma mistura de tampão fosfato de potássio 10 mM pH 3.0 e acetonitrila, na proporção de 50:50, v/v, contendo 0,1% de ácido fosfórico para ajuste de pH. A fase móvel foi filtrada sobre membrana de celulose com porosidade de 0,2 µm, e desgaeseficada em banho ultrassônico por 15 minutos.

Como fase estacionária utilizou-se coluna cromatográfica Phenomenex[®], modelo Gemini-NX de C18 com 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, contendo partículas de 5µm; pré-cedida por uma pré-coluna Phenomenex[®], modelo AJO – 4287 de C18 com 3 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro, contendo partículas de 5µm.

O sistema cromatográfico foi composto por cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Hitachi, composto por uma bomba L7100, injetor automático de amostras L7200, detector UV L7400 e FL L7485, e forno de coluna L7300;

Utilizou-se um fluxo de 1,2 mL/minuto, com tempo total de corrida de 10 minutos. A temperatura do forno foi mantida em 40° C. Foram injetados 50µL das amostras ressuspensas e o comprimento de onda utilizado no detector de UV foi de 280 nm.

4.4.3.2.5.6 Validação do método analítico para quantificação de DFS em plasma humano

Para a validação da metodologia analítica utilizada na quantificação de DFS em plasma, foram seguidas as diretrizes descritas na Resolução 899, de 29 de maio de 2003, proposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2003b).

A RDC n.899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003b), define que quando há a necessidade de modificação de um método bioanalítico validado, como na mudança do procedimento de preparação da amostra, é necessário que se realize uma validação parcial do método. A validação parcial pode ser desde uma pequena determinação exatidão e precisão intra-ensaio, até próximo uma validação total.

Para a validação parcial do método analítico, foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade.

4.4.3.2.5.6.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto na presença de outros componentes, tais como impurezas, metabólitos, produtos de degradação e componentes do plasma (BRASIL, 2003b).

Nos ensaios de especificidade foram avaliados 6 amostras de plasma livres de fármaco, sendo 4 delas de plasma normal, uma amostra de plasma lipêmico e uma amostra de plasma hemolisado.

4.4.3.2.5.6.2 Limite de quantificação inferior

O limite de quantificação inferior (LQI) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003b).

Esse parâmetro foi determinado pela utilização da menor concentração detectada com precisão e exatidão dentro dos limites estabelecidos, em seis repetições. O coeficiente de variação (precisão) pode ser no máximo 20% e a exatidão deve estar na faixa de 80 – 120%.

4.4.3.2.5.6.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade da metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003b). A linearidade representa a relação diretamente proporcional entre o sinal emitido pelo detector e a concentração do analito na amostra padrão e é constituída pela faixa de concentração entre a menor e a maior concentração da curva de calibração (KARNES, SHIU & SHAH, 1991).

Para a construção da curva de calibração, foram utilizadas amostras de plasma adicionadas de padrão de DFS em dez concentrações diferentes, e em três repetições.

Os critérios de aceitação para cada curva de calibração e para a curva de calibração obtida pela média das seis réplicas são:

- desvio menor ou igual a 20 % (vinte por cento) em relação à concentração nominal para o LQI;
- desvio menor ou igual a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;
- no mínimo oito de dez concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LQI e a maior concentração da curva de calibração;
- o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98 (BRASIL, 2003b).

4.4.3.2.5.6.4 Precisão

A precisão e a exatidão juntas determinam o erro de uma medida analítica e são os principais critérios usados quando se avalia a adequação de um método bioanalítico (KARNES, SHIU & SHAH, 1991).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos por uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Este parâmetro foi avaliado no mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias diferentes (precisão inter-dias) (BRASIL, 2003b).

Esse parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes (CQB, CQM e CQA) em 6 réplicas no mesmo ensaio (precisão intra-dia) e em três dias diferentes (precisão inter-dias).

$$DPR.\% = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

onde:

DPR = Desvio Padrão Relativo

DP= desvio padrão

CMD = concentração média determinada

O desvio padrão relativo deve ser superior a 15%, exceto para o limite de quantificação (LQ), onde se admitem valores menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003b).

4.4.3.2.5.6.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, e pode ser expressa como exatidão, ou, também, como inexatidão, e em porcentagem (BRASIL, 2003b).

Esse parâmetro foi determinado pela análise de amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações diferentes (CQB, CQM e CQA) em 6 réplicas no mesmo ensaio (exatidão intra-dia) e em três dias diferentes (exatidão inter-dias).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{CME}{CT} \times 100$$

onde:

CME = concentração média experimental

CT = concentração teórica

O desvio não deve exceder 15% (85 – 115%), exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20% (180 – 120%).

4.4.3.2.5.6.6 Recuperação

A recuperação indica a eficiência da extração do fármaco e/ou seus metabólitos através de todo o processo de preparação de amostras. É estabelecida como a relação que existe entre a resposta de uma amostra extraída *versus* uma amostra não extraída, avaliadas a partir de três concentrações conhecidas (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método (BRASIL, 2003b).

A recuperação foi avaliada comparando-se os resultados de quantificação das amostras submetidas ao processo de extração, com aquelas que não sofreram processo de extração, mas que foram adicionadas de concentrações das amostras de controle de qualidade, ao plasma branco previamente submetido ao processo de extração. Este parâmetro foi analisado em três concentrações diferentes das amostras de controle de qualidade (CQB, CQM e CQA) e em sextuplicata.

A recuperação do padrão e padrão interno é ideal quando próxima a 100%, mas são aceitos valores menores (50-60%) desde que sejam precisos e exatos (BRASIL, 2003b). Na tentativa de obter valores de recuperação próximos a 100%, desde que exatos e precisos, optou-se por utilizar um volume de 4 mL de solvente extrator.

A média de recuperação foi determinada da seguinte forma:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Amostra extraída}}{\text{Amostra adicionada}} \times 100$$

4.4.3.2.5.6.7 Estabilidade

A estabilidade de um fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas e da matriz biológica. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras (BRASIL, 2003b).

- *Estabilidade pós-processamento*

Esse parâmetro foi determinado durante o tempo de espera das amostras no auto-injetor. Para isso, utilizaram-se amostras de plasma de controle de qualidade em três concentrações (CQB, CQM e CQA), em triplicata.

As amostras de plasma branco sofreram descongelamento natural, e foram adicionadas de fármaco padrão (DFS) e padrão interno (nimesulida). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de extração e mantidas sob temperatura ambiente durante 24 e 48 horas. Os resultados foram comparadas com amostras de controle de qualidade recém preparadas e imediatamente analisadas.

4.4.3.2.6 Determinação dos parâmetros farmacocinéticos

Os parâmetros farmacocinéticos avaliados foram (RITSCHEL, 1992; SHARGEL; YU, 1992; BRASIL, 2006):

⇒ C_{max} : concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração; determinada diretamente a partir das curvas de concentração plasmáticas *versus* tempo, sem interpolação dos dados,

⇒ T_{max} : tempo necessário para C_{max} , determinado diretamente a partir das curvas de concentração plasmática *versus* tempo, sem interpolação dos dados,

⇒ ASC_{0-t} : área sob a curva “concentração plasmática vs tempo” do tempo zero à última concentração quantificável, calculada pelo método dos trapezóides.

⇒ ASC_{0-inf} : área sob a curva “concentração plasmática vs tempo” do tempo zero extrapolada ao infinito;

⇒ $t_{(1/2)el}$: meia-vida de eliminação plasmática do fármaco, determinada a partir do valor da constante de velocidade de eliminação rápida ($t_{(1/2)el} = 0,693/K_{el}$).

Os parâmetros ASC_{0-t} e ASC_{0-inf} relacionam-se à quantidade de fármaco absorvida, enquanto que os parâmetros C_{max} e T_{max} relacionam-se à velocidade desse processo.

4.4.4 Obtenção dos parâmetros de validação externa da correlação in vitro-in vivo

4.4.4.1 Dados

- Dados de dissolução *in vitro* das formulações comerciais;
- Dados dos estudos de biodisponibilidade das formulações comerciais,
- Correlação *in vitro-in vivo* estabelecida.

4.4.4.2 Métodos

A validação externa da CIVIV foi realizada a partir dos dados dos ensaios de dissolução *in vitro* e dos ensaios de biodisponibilidade *in vivo*, conforme descrito por Eddington e colaboradores (1998).

O modelo de CIVIV inicialmente estabelecido foi empregado para obtenção das curvas previstas de concentração plasmática em função do tempo, a partir dos dados de dissolução das formulações comerciais contendo diclofenaco de sódio. O modelo de correlação obtido é apresentado a seguir:

$$\Delta A = 0,406 * FD$$

Onde:

ΔA = Fração absorvida *in vivo*

FD = fração dissolvida *in vitro*

Desta forma, a fração absorvida prevista de fármaco (ΔA_{ip}) foi obtida para cada formulação avaliada a partir dos dados de dissolução *in vitro*, por meio da aplicação do modelo de CIVIV.

Em seguida, a técnica de convolução foi aplicada para obtenção das curvas previstas de concentração plasmática em função do tempo, de acordo com a equação:

$$C_{VO_{tn}} = \frac{1}{D_{IV}} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta A_i}{\Delta t_i} \bullet \Delta AUC_{IV}^{(tn-t_i-1)}_{(tn-t_i)}$$

Onde:

$C_{VO_{tn}}$ = concentração no tempo t após a administração por via oral do produto teste

D_{IV} = dose administrada do produto de referência (comprimido de diclofenaco de sódio 50 mg de liberação imediata)

$\Delta A_i / \Delta t_i$ = velocidade de absorção

ΔAUC_{IV} = fração a área sobre a curva após administração do produto de referência extrapolada para administração intravascular (IV) (dados obtidos de MOURÃO, 2009).

Esses resultados de concentração plasmática previstas para o DFS em função do tempo foram comparados, com os resultados das curvas plasmáticas reais de DFS, obtidas nos ensaios de biodisponibilidade *in vivo*. A validação da CIVIV foi estabelecida a partir da semelhança entre as curvas previstas e as curvas reais de decaimento plasmático do DFS para cada formulação avaliada.

Quando os critérios estabelecidos para a validação interna não são satisfatórios, ou seja, a predição interna não é conclusiva, a avaliação da previsibilidade externa da CIVIV deve ser realizada como uma determinação

final da capacidade da CIVIV, para então se concluir se tal método pode ser utilizado como substituto ao ensaio de bioequivalência (FDA, 1997).

A validação externa é realizada com formulações farmacêuticas, que não foram utilizadas no desenvolvimento inicial da CIVIV.

Na validação externa, novamente o EP% é estimado pela comparação entre os resultados reais com os resultados do modelo de CIVIV previsto, tais como C_{max} e ASC. A determinação do EP% foi realizada como a seguir:

$$EP\% = \left[\frac{V_{obs} - V_{prev}}{V_{obs}} \right] * 100$$

Onde V_{obs} é o parâmetro real e V_{prev} é o parâmetro previsto.

Os critérios aceitáveis para validação externa são valores de EP% menores ou igual a 10% para C_{max} e ASC. Valores de EP% entre 10 a 20% indicam dados de predição inconclusivos, e precisam de estudos adicionais para a validação de uma CIVIV. Valores maiores que 20% indicam resultados de predição inadequados (FDA, 1997).

Para cada formulação em estudo, o EP% foi estimado para determinar a validação externa da CIVIV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 APERFEIÇOAMENTO DA CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

5.1.1 Ensaio de dissolução

5.1.1.1 Quantificação do DFS nas amostras provenientes dos ensaios de dissolução

O espectro de absorção da solução padrão de DFS (30µg/mL) em tampão fosfato pH 6,8 apresentou uma absorção máxima em 276 nm, sendo esse valor de absorbância adotado para a leitura espectrofotométrica dos padrões provenientes das curvas analíticas e das amostras do ensaio de dissolução. Os espectros de absorção, obtidos pela análise em tampão fosfato de potássio acrescido por comprimidos triturados de Voltaren Retard[®], não apresentaram interferentes no espectro de absorção do DFS nas condições analisadas, comprovando-se a inexistência de interferência dos excipientes da formulação nas leituras espectrofotométricas (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Espectro de absorção no UV da solução padrão DFS (30 µg/mL), e solução amostra (Voltaren Retard® - 28,86 µg/mL) em tampão fosfato 0,05M- pH 6,8.

A curva analítica obtida para o DFS em meio tampão fosfato pH 6,8, no UV a 276 nm apresentou coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,9993, sendo a média de seis determinações. A equação que representa essa reta é $y=0,027x - 0,001$ (Figura 5.2). A curva analítica e a equação da reta foram empregadas para quantificação do diclofenaco de sódio nas amostras provenientes de ensaios de dissolução.

Figura 5.2 - Curva analítica do diclofenaco de sódio em tampão fosfato pH 6,8 (276 nm), n=6.

5.1.1.2. Obtenção dos perfis de dissolução das formulações F1, F2 e F3

Os ensaios de dissolução com as formulações de liberação modificada contendo o fármaco DFS F1, F2 e F3 desenvolvidas por Mourão (2009), foram realizados utilizando aparato tipo II (pá) com rotação a 25 rpm e com as formulações farmacêuticas inseridas em âncoras. Os resultados são apresentados na figura 5.3.

Figura 5.3 - Perfil de dissolução das formulações F1, F2 e F3 (Mourão, 2009) obtidas em aparato II, a 25 rpm, em meio tampão fosfato pH 6,8, com âncoras (n=6).

Os perfis de dissolução das formulações analisadas indicam redução na velocidade de liberação do fármaco de acordo com o aumento da concentração do polímero HPMC. Ao final do ensaio, a formulação F1 apresentou uma média de porcentagem de 93,6% de liberação do fármaco, a F2 apresentou uma média de 84,0% e a formulação F3 apresentou uma média de porcentagem de 59,0% de liberação do fármaco.

Os dados de fração dissolvida das formulações em cada intervalo de tempo (F_{d0-8}) foram utilizados para o desenvolvimento da CIVIV.

5.1.2 Estabelecimento da CIVIV

Para o desenvolvimento da CIVIV, os valores de fração do fármaco dissolvido (F_{d0-8}) para cada formulação foram plotados diretamente com os dados de fração do fármaco absorvido (F_{a0-8}) (Tabela 5.1), obtidos nos resultados do estudo de biodisponibilidade relativa realizado por Mourão, (2009). Os resultados são apresentados na Figura 5.4.

Tabela 5.1 - Fração dissolvida e fração absorvida (Mourão, 2009) das formulações nos tempos de 0-8 horas

Tempo (horas)	F1		F2		F3	
	Fdiss. (%)	Fabs. (%)	Fdiss. (%)	Fabs. (%)	Fdiss. (%)	Fabs. (%)
0						
0,5	23,2	6,23	10,9	2,43	8,9	2,67
1	35,3	9,07	19,0	4,30	15,0	4,37
1,5	44,2	12,62	25,5	6,62	19,9	7,07
2	51,5	18,41	31,2	8,92	24,2	9,70
2,5	59,3	23,04	36,2	11,14	27,9	11,51
3	66,3	24,04	41,0	14,34	31,8	12,57
3,5	71,5	29,76	45,6	17,72	35,1	14,52
4	74,8	32,69	50,1	21,36	38,4	16,11
5	84,0	37,21	60,2	28,03	44,2	18,38
6	89,1	38,87	69,2	30,28	49,7	19,75
7	92,3	39,58	79,4	35,71	54,4	20,90
8	94,7	40,28	88,0	38,68	60,2	22,73

Figura 5.4 - Correlação entre os dados de dissolução e absorção.

O coeficiente de determinação linear obtido entre fração dissolvida *versus* fração absorvida foi de 0,955, e a equação da reta obtida que determina tal correlação (intercepto e inclinação), é expressa como $y=0,406x$. O modelo de correlação obtido foi utilizado para os estudos de validação externa, empregando a técnica de convolução.

5.2 VALIDAÇÃO INTERNA DA CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

O modelo de CIVIV obtido para as três formulações F1, F2 e F3 foi utilizado para prever a fração absorvida do fármaco para cada formulação individual a partir dos dados de fração dissolvida e, em seguida, prever a

concentração plasmática do DFS, empregando a técnica de convolução. Os resultados são expressos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Frações absorvidas extrapoladas pela CIVIV e concentrações plasmáticas de DFS previstas para as formulações F1, F2 e F3, de 0-8 horas

Tempo (horas)	F1		F2		F3	
	Fabs prevista (%)	Curva plasmática prevista [ng/mL]	Fabs prevista (%)	Curva plasmática prevista [ng/mL]	Fabs prevista (%)	Curva plasmática prevista [ng/mL]
0						
0,5	9,62	640,1	4,43	294,6	3,8	253,1
1	14,96	643,7	7,71	351,2	6,4	287,1
1,5	18,92	553,9	10,35	333,7	8,5	268,6
2	22,01	455,6	12,67	305,3	10,3	242,2
2,5	25,66	448,3	14,72	273,9	11,9	215,2
3	28,55	394,8	16,67	253,4	13,5	206,1
3,5	30,95	337,7	18,56	240,0	15,0	187,0
4	32,52	256,6	20,37	228,9	16,2	170,2
5	36,56	247,3	24,48	245,1	18,8	159,8
6	38,62	149,9	28,12	225,4	21,2	145,8
7	40,00	97,4	32,29	247,2	23,2	126,7
8	40,93	64,7	35,77	218,4	25,7	145,0

Os parâmetros farmacocinéticos (como C_{max} e ASC) da curva plasmática de DFS em função do tempo prevista foram comparados aos dados farmacocinéticos reais, da curva plasmática em função do tempo, obtidos no ensaio de biodisponibilidade realizado por Mourão (2009). A comparação foi

realizada pela avaliação do EP% (FDA, 1997a). Os resultados são expressos na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Estimação do EP% para $C_{\max}$ e ASC, para as formulações F1, F2 e F3

Formulação	$C_{\max}$			ASC		
	Observado ($\mu\text{g/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g/mL}$)	EP (%)	Observado ($\mu\text{g/mL}$)	Previsto ($\mu\text{g/mL}$)	EP (%)
F1	1,08	0,64	40,4	3,37	4,97	-47,4
F2	0,72	0,35	51,2	3,16	4,31	-36,3
F3	0,42	0,29	31,6	1,73	3,10	-78,9

Outras correlações entre parâmetros *in vivo* e *in vitro* foram observadas e o coeficiente de determinação linear é apresentado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Coeficiente de determinação linear obtido pela correlação entre os dados de fração dissolvida e fração absorvida

Relação entre*	Formulação	Coeficiente de determinação (r^2)
		Linear
$C_{\max} - T_{d2h}$	F1, F2 e F3	0,976
$C_{\max} - T_{d4h}$	F1, F2 e F3	0,964
$ASC - T_{d8h}$	F1, F2 e F3	0,977
$F_{a0-1,5} - F_{d0-1,5}$	F1, F2 e F3	0,935
$F_{a8h} - F_{d8h}$	F1, F2 e F3	0,991
$F_{a0-8h} - F_{d0-8h}$	F1	0,977
$F_{a0-8h} - F_{d0-8h}$	F2	0,963
$F_{a0-8h} - F_{d0-8h}$	F3	0,976

* $C_{\max} - T_{d2h}$ = concentração máxima observada entre fração dissolvida no tempo de 2 horas; $C_{\max} - T_{d4h}$ = concentração máxima observado entre fração dissolvida no tempo de 4 horas; $ASC - T_{d8h}$ = Área sob a curva observada entre fração dissolvida no tempo de 8 horas; $F_{a0-1,5} - F_{d0-1,5}$ = fração absorvida e dissolvida entre os tempos 0 e 1,5 horas; $F_{a8h} - F_{d8h}$ = fração absorvida e dissolvida no tempo de 8 horas; $F_{a0-8h} - F_{d0-8h}$ = fração absorvida e dissolvida entre os tempos 0 e 8 horas.

5.3 VALIDAÇÃO EXTERNA DA CORRELAÇÃO *IN VITRO-IN VIVO*

5.3.1. Ensaio de dissolução

Os resultados apresentados na Figura 5.5 referem-se aos perfis de dissolução obtidos para as formulações R (VoltarenRetard®), G (Diclofenaco sódico (Genérico – Ranbaxy) e S (Voltaflex AP).

Figura 5.5 - Perfil de dissolução das formulações R, G1 e S1 obtidas em aparato II, a 25 rpm, em meio tampão fosfato pH 6,8, com âncoras.

A análise dos perfis de dissolução das formulações mostra que a formulação R apresentou um perfil de liberação sustentado durante a realização do ensaio, liberando um percentual de 71,1% do fármaco ao final do ensaio. O perfil de dissolução da formulação G apresentou-se semelhante ao perfil da formulação R até 240 minutos, diferenciando-se na etapa final do ensaio. A velocidade de liberação do fármaco foi mais rápida que a do produto R na etapa final do ensaio, liberando um percentual de 95,4% do fármaco. Já a formulação de medicamento genérico S apresentou um percentual baixo de liberação do fármaco nas condições analisadas, sendo de 15,5% ao final do ensaio.

5.3.2 Ensaio de biodisponibilidade relativa

5.3.2.1 Ensaio clínico

O estudo clínico foi realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU – USP), em 3 fases, com *wash-out* de 7 dias entre as fases.

Os voluntários foram submetidos à avaliação clínica no início de cada fase e não houve desistências e nem intercorrências durante a realização do estudo.

5.3.2.2 Quantificação de DFS em plasma humano

5.3.2.2.1 Validação do método analítico para quantificação de DFS em plasma humano

5.3.2.2.1.1 Especificidade

O método analítico empregado para a quantificação de DFS em plasma humano mostrou-se específico para o fármaco e para o padrão interno (nimesulida), obtendo-se boa separação destes entre si e dos componentes do plasma branco, lipêmico e hemolisado (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Cromatograma da amostra de plasma branco.

Os tempos de retenção foram de 6,8 minutos para o DFS e 4,9 minutos para a nimesulida (Figura 5.7). O tempo total da corrida analítica foi de 10 minutos.

Figura 5.7 – Cromatograma do diclofenaco de sódio (0,5 µg/mL – tempo de retenção de 6,81 minutos) e nimesulida como padrão interno (4 µg/mL – tempo de retenção 4,95 minutos) extraído de plasma branco.

5.3.2.2.1.2 Limite de quantificação inferior

Para a validação analítica do método, foi definido como LQI a concentração de 0,05µg/mL.

A Tabela 5.5 apresenta os valores de precisão e exatidão para a determinação do LQI. Segundo a RE 899/03 (BRASIL, 2003b), o valor de coeficiente de variação (CV%), que determina a precisão, deve ser menor ou igual a 20% e a exatidão deve apresentar desvio de, no máximo, 20%.

Tabela 5.5 - Determinação do limite de quantificação inferior

	Amostra
Concentração nominal	0,05 µg/mL
Concentração real (média)*	0,0496 µg/mL
Desvio padrão	0,001
Precisão (CV%)	2,04 %
Exatidão	99,19 %

** média de seis determinações.*

5.3.2.2.1.3 Linearidade

O método mostrou-se linear na concentração de 0,05 a 2,0µg/mL, com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9999. A curva está representada na Figura 5.8 e os parâmetros relativos à curva de calibração estão apresentados

na Tabela 5.2. Os desvios encontrados em cada concentração foram inferiores a 20% para o LQI, e inferior a 15% nas demais concentrações (Tabela 5.6).

Figura 5.8 - Curva de calibração do método analítico para quantificação de diclofenaco de sódio em plasma humano por CLAE, na faixa de concentração de 0,05 a 2,0µg/mL.

Tabela 5.6 - Desvios da curva de calibração do diclofenaco de sódio em plasma branco

Concentração nominal (µg/mL)	Média (P/PI)	Concentração real (µg/mL)	Exatidão (%)	Desvio padrão (%)
0,05	0,018	0,047	94,09	4,65
0,075	0,031	0,079	104,83	2,50
0,1	0,039	0,099	98,59	1,96
0,15	0,063	0,155	103,50	0,30
0,25	0,100	0,245	98,02	3,82
0,5	0,205	0,497	99,34	0,19
0,75	0,307	0,742	98,95	0,88
1,0	0,419	1,010	100,99	0,25
1,5	0,628	1,510	100,70	0,20
2,0	0,828	1,991	99,56	1,79

5.3.2.2.1.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método analítico foram avaliadas em 3 concentrações diferentes (CQB, CQM e CQA), e foram determinadas para amostras analisadas em um mesmo dia (intradia) e amostras analisadas em dias diferentes (interdias). Os resultados obtidos no ensaio de precisão e exatidão apresentaram, respectivamente, coeficiente de variação (CV%) e desvios menores do que 20% para as três diferentes concentrações. Os resultados para as determinações intradia estão apresentados na Tabela 5.7, e os resultados para as determinações interdia estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.7 - Resultados de precisão e exatidão intradia de amostras de plasma de controle de qualidade em três níveis de concentração

	CQB	CQM	CQA
Concentração nominal	0,1 µg/mL	0,75 µg/mL	1,5 µg/mL
Concentração medida (média)*	0,094µg/mL	0,742µg/mL	1,529µg/mL
Desvio padrão	0,002	0,017	0,035
Precisão (DPR%)	2,22 %	2,30 %	2,31 %
Exatidão	93,96 %	98,94 %	101,97 %

**média de seis determinações.*

Tabela 5.8 - Resultados de precisão e exatidão interdia de amostras de plasma de controle de qualidade em 3 níveis de concentração

	CQB	CQM	CQA
Concentração nominal	0,1 µg/mL	0,75 µg/mL	1,5 µg/mL
Concentração medida (média)*	0,103 µg/mL	0,760 µg/mL	1,559 µg/mL
Desvio padrão	0,01	0,05	0,04
Precisão (CV%)	10,03 %	6,48 %	2,63 %
Exatidão	102,78 %	101,37 %	103,93 %

**média de três dias.*

5.3.2.2.1.5 Recuperação

Nesse estudo, o processo de extração dos fármacos DFS (padrão) e nimesulida (padrão interno), foi realizado por precipitação de proteínas, utilizando acetonitrila como solvente extrator.

Durante o desenvolvimento do método, outros solventes orgânicos foram avaliados, como acetato de etila e diclorometano, porém, os resultados de recuperação apresentaram-se abaixo ao do obtido com acetonitrila.

A recuperação média com acetonitrila foi de 89,98% para o padrão (DFS) e de 97,31% para o padrão interno (nimesulida), com exatidão e precisão dentro dos limites especificados, o que indicou que o procedimento de extração descrito para o método bioanalítico apresentou eficiência adequada (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 - Recuperação média do procedimento de extração por precipitação de proteínas plasmáticas, das amostras de plasma para DFS (padrão) e para nimesulida (padrão interno)

Concentração de diclofenaco de sódio (µg/mL)	Recuperação (%)	
	Padrão (CV%)	Padrão interno (CV%)
0,1	90,59 (6,22)	100,27 (6,75)
0,75	88,98 (2,28)	98,01 (7,17)
1,5	90,38 (3,99)	93,65 (6,27)
Média	89,98 (4,26)	97,31 (6,93)

Cada valor representa uma média de seis repetições. CV= coeficiente de variação.

5.3.2.2.1.6 Estabilidade

5.3.2.2.1.6.1 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi avaliada com as amostras de plasma de controle de qualidade, em três concentrações diferentes, que foram processadas e mantidas à temperatura ambiente por 24 e 48 horas, sendo analisadas após esse período. Os resultados foram comparados com amostras recém-preparadas e analisadas imediatamente. O desvio aceito para esse parâmetro é no máximo $\pm 15\%$ (Tabela 5.10 e 5.11).

Tabela 5.10 - Resultados do estudo de estabilidade do DFS em amostras analisadas após processamento, e mantidas em temperatura ambiente por 24 horas após o processamento

Conc. nominal (µg/mL)	Amostras recém preparadas e analisadas imediatamente após o processo de extração			Amostras analisadas 24 horas após o processo de extração			
	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,1	0,094	9,15	94,30	0,093	9,18	93,37	1,0
0,75	0,790	4,41	105,29	0,755	3,84	100,68	4,4
1,5	1,540	1,38	102,64	1,498	3,10	99,88	2,7

Cada resultado representa a média de três determinações. Conc = concentração. Det = determinada. Desvio = desvio em relação à amostra recém analisada.

Tabela 5.11 - Resultados do estudo de estabilidade do DFS em amostras analisadas após processamento, e mantidas em temperatura ambiente por 48 horas

Conc. nominal (µg/mL)	Amostras recém preparadas e analisadas imediatamente após o processo de extração			Amostras preparadas e mantidas 48 horas imediatamente após o processo de extração			
	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Conc. det. (µg/mL)	Precisão (%)	Exatidão (%)	Desvio (%)
0,1	0,098	13,12	98,47	0,093	12,78	92,79	5,8
0,75	0,711	7,96	94,86	0,697	5,26	92,89	2,1
1,5	1,549	2,42	103,25	1,490	0,64	99,35	3,8

Cada resultado representa a média de três determinações. Conc = concentração. Det = determinada. Desvio = desvio em relação à amostra recém analisada.

5.3.2.3 Análise das amostras de plasma dos voluntários

As concentrações plasmáticas de DFS após a administração das formulações são apresentadas nas Figuras 5.9 e 5.10. As Tabelas 5.12, 5.13 e 5.14 apresentam as médias dos parâmetros farmacocinéticos derivados das formulações R, G e S, respectivamente.

Figura 5.9 - Curvas plasmáticas após a administração das formulações comerciais R, G e S (1= voluntário 1; 2= voluntário 2 e 3= voluntário 3).

Figura 5.10 - Curvas plasmáticas após a administração das formulações comerciais R, G e S (4= voluntário 4; 5= voluntário 5 e 6= voluntário 6).

Tabela 5.12 - Parâmetros farmacocinéticos após a administração da formulação comercial R

Voluntário	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	t_{(1/2)el}	ASC0-t (µgh/mL)	ASC_{0-∞} (µgh/mL)
Vol 1	1,19	5,00	1,02	4,03	5,78
Vol 2	0,66	3,00	3,97	3,52	3,92
Vol 3	0,86	5,00	1,42	4,53	5,07
Vol 4	0,76	3,00	1,45	2,90	3,10
Vol 5	0,63	0,50	1,48	2,56	2,73
Vol 6	0,78	5,00	1,37	2,95	3,08
Média	0,81	3,58	1,79	3,42	3,94
Desvio	0,20	1,80	1,08	0,75	1,23
DPR	24,89	50,25	60,67	22,01	31,24

Tabela 5.13 - Parâmetros farmacocinéticos após a administração da formulação comercial G

Voluntário	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	t_{(1/2)el}	ASC0-t (µgh/mL)	ASC_{0-∞} (µgh/mL)
Vol 1	1,09	4,00	2,59	5,08	5,47
Vol 2	0,54	5,00	1,27	2,86	3,08
Vol 3	1,47	2,50	2,23	3,55	3,78
Vol 4	0,75	3,50	0,94	3,61	3,74
Vol 5	1,08	0,50	4,04	3,49	3,52
Vol 6	1,05	3,50	3,16	3,15	3,29
Média	1,00	3,17	2,37	3,62	3,81
Desvio	0,32	1,54	1,16	0,77	0,85
DPR	32,00	48,58	49,02	21,18	22,39

Tabela 5.14 - Parâmetros farmacocinéticos após a administração da formulação comercial S

Voluntário	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	t _{(1/2)el}	ASC _{0-t} (µgh/mL)	ASC _{0-∞} (µgh/mL)
Vol 1	2,44	2,00	1,20	7,04	6,09
Vol 2	1,00	0,50	1,20	3,79	4,01
Vol 3	1,17	3,50	2,20	2,77	3,15
Vol 4	1,18	5,00	0,38	2,73	2,76
Vol 5	0,35	3,50	1,20	1,23	1,44
Vol 6	1,75	1,50	2,63	3,08	3,33
Média	1,32	2,67	1,47	3,44	3,46
Desvio	0,71	1,63	0,81	1,95	1,54
DPR	53,83	61,24	55,14	56,71	44,55

5.3.3 Obtenção dos parâmetros de validação externa da correlação *in vitro-in vivo*

No desenvolvimento de um estudo de correlação *in vitro – in vivo*, a fração absorvida do fármaco, pode ser determinada pela utilização de métodos modelos-independentes. Nesse estudo, a concentração plasmática do DFS foi determinada a partir dos dados de porcentagem de absorção *in vivo*, que foram obtidas após a administração oral do medicamento de referência, Voltaren® 50mg (dados de concentração plasmáticas extrapolados, obtidos de Mourão, 2009). Para determinar a fração absorvida de um fármaco por meio do método de deconvolução, recomenda-se que o cálculo seja realizado em função dos parâmetros farmacocinéticos de uma formulação intravascular (IV), entretanto, se essa formulação não estiver disponível, os dados de uma solução oral, por exemplo, podem ser utilizados (DEMIRTURK; ONER, 2003).

Para a validação externa, a fração absorvida (ΔA_{ip}) prevista do DFS foi determinada a partir dos dados de fração dissolvida obtidas nos ensaios de dissolução, utilizando a equação de CIVIV estabelecida (Tabela 5.15). A fração absorvida (mg) prevista para cada formulação é mostrada na Figura 5.11.

Tabela 5.15 - Dados de fração dissolvida (%) e frações absorvidas extrapoladas pelo modelo de CIVIV desenvolvido

Tempo (horas)	R		G		S	
	Fdiss. (%)	Fabs. prevista (%)	Fdiss. (%)	Fabs. prevista (%)	Fdiss. (%)	Fabs. prevista (%)
0						
0,5	15,97	6,49	8,93	3,62	1,28	0,52
1	24,62	10,00	16,21	6,58	1,69	0,68
1,5	31,12	12,64	22,94	9,31	2,17	0,88
2	36,44	14,80	29,32	11,91	2,39	0,97
2,5	40,96	16,63	35,67	14,48	3,42	1,39
3	45,01	18,28	42,69	17,33	4,17	1,69
3,5	48,07	19,52	49,20	19,98	5,00	2,03
4	50,83	20,64	56,19	22,81	6,14	2,49
5	56,33	22,87	66,71	27,08	8,22	3,34
6	61,52	24,98	77,48	31,46	10,59	4,30
7	66,77	27,11	86,47	35,11	13,08	5,31
8	71,07	28,86	95,44	38,75	15,53	6,31

Figura 5.11 - Fração absorvida percentual (média dos 6 voluntários).

As curvas de concentração plasmática em função do tempo foram extrapoladas através da técnica de convolução, partindo-se dos dados de fração absorvida do fármaco. Os resultados para cada formulação são apresentados nas Figuras 5.12 e 5.13. As concentrações previstas para a formulação S não puderam ser determinadas devido aos baixos valores de liberação do fármaco no estudo de dissolução, e consequentemente, aos baixos valores de fração absorvida extrapoladas.

Figura 5.12 - Curva de concentração plasmática *versus* tempo da formulação comercial de Referência (média dos 6 voluntários). Obs=observada; Prev.=prevista.

Figura 5.13 - Curva de concentração plasmática *versus* tempo da formulação comercial de medicamento Genérico (média dos 6 voluntários). Obs=observada; Prev.=prevista.

Os parâmetros farmacocinéticos (como C_{max} e ASC) da curva plasmática de DFS em função do tempo prevista foram comparados aos dados farmacocinéticos reais, da curva plasmática em função do tempo, obtidos no ensaio de biodisponibilidade. A comparação foi realizada pela avaliação do EP% (FDA, 1997). Os resultados são expressos na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 - Estimação do EP% para C_{max} e ASC, para as formulações R, G e S

Formulação	Cmax			ASC		
	Observado (µg/mL)	Previsto (µg/mL)	EP (%)	Observado (µg/mL)	Previsto (µg/mL)	EP (%)
R	0,75	0,64	14,0	2,71	1,89	30,3
G	0,73	0,35	25,0	2,94	1,94	228,0
S	0,73	-	-	2,82	-	-

Algumas outras relações para correlação foram observadas e o coeficiente de determinação linear é apresentado na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 - Coeficiente de determinação linear obtido pela correlação entre os dados da curva de concentração plasmática de DFS e de fração dissolvida

Relação entre*	Formulação	Coeficiente de determinação (r^2) Linear
$F_{Aprev0-3,0h}$ - Curva plasm.Observ. 0-3,0h	G	0,990

* Fração absorvida prevista e concentração plasmática determinada nos tempos entre 0 e 3 horas.

6. DISCUSSÃO

O diclofenaco de sódio (DFS) é um fármaco antiinflamatório não esteroideal com atividades analgésicas e antipiréticas. Este fármaco possui rápida absorção, ampla ligação às proteínas plasmáticas (99%) e tempo de meia vida curto (1 -2 horas) (GILMAN; GOODMAN; BRUNTON, 2006). Devido às características de curto tempo de meia vida, associado aos efeitos de irritação à mucosa gástrica, o fármaco adquire potencial candidatura ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas de liberação modificada, na tentativa de aumentar a eficácia, além de melhorar adesão ao tratamento devido à facilidade de posologia (RANI; MISHRA, 2004).

Uma CIVIV é usualmente desenvolvida quando a dissolução do fármaco é a etapa limitante da absorção *in vivo*. Devido a classificação do DFS como fármaco classe II em decorrência da baixa solubilidade em meio ácido (CHUASUWAN et al., 2008), bem como da incorporação do fármaco em sistemas de liberação controlada, tal fármaco foi escolhido como modelo para o desenvolvimento e validação interna e externa de CIVIV.

Para formas farmacêuticas de DFS com revestimento entérico (no caso de comprimidos de liberação modificada), a liberação do fármaco acontece no duodeno, com rápida dissolução e consequente absorção no local, o que faz com que nessas condições, o fármaco se comporte como classe I no SCB (CHUASUWAN et al., 2008) .

O planejamento deste estudo de CIVIV baseou-se nas características físico-químicas do DFS, bem como nas condições fisiológicas que podem ser representadas *in vitro*. Deste modo, optou-se por utilizar nos estudos de

dissolução o tampão fosfato de potássio com valor de pH 6,8 (valor de pH aproximado encontrado entre a porção do duodeno e jejuno) (FREIRE, et al., 2006). Aliado a isso, tal meio possui características simples de preparo, bem como pode fornecer condições de ensaio de dissolução facilmente exequíveis e reprodutíveis.

No desenvolvimento inicial de um estudo de CIVIV é necessário utilizar três ou mais formulações contendo o mesmo fármaco e que apresentem taxas de liberação diferenciadas (FDA, 1997). Na etapa inicial deste estudo foram utilizados três comprimidos matriciais de DFS contendo 100mg do fármaco, com diferentes concentrações de HPMC (10, 20 e 30%), e por consequente, diferentes taxas de liberação do fármaco. O mecanismo de liberação do fármaco incorporado ao HPMC começa com a hidratação da formulação, que gera a liberação do fármaco através de uma interação entre a água, o polímero e o fármaco. A hidratação do polímero resulta na formação de uma camada de gel que controla a liberação do fármaco, sendo que, a estrutura do gel é crítica para o comportamento de dissolução e é dependente da concentração, viscosidade e estrutura do polímero (COLOMBO et al., 200).

No trabalho proposto por Mourão (2009), tais formulações foram avaliadas em diferentes condições de dissolução, sendo que para o desenvolvimento da CIVIV foi utilizada a condição com aparato tipo II a 50 rpm, empregando tampão fosfato de potássio pH 6,8 como meio de dissolução. A partir dos dados de fração dissolvida na condição analisada e os dados estimados de fração absorvida obtidas pelo método de deconvolução das diferentes formulações (F1, F2 e F3), foi estabelecido um modelo de CIVIV obtendo coeficiente de determinação linear de 0,7476 (Mourão, 2009). Na

tentativa de obter um modelo de CIVIV com resultados de determinação linear próximos a 0,9, optou-se por avaliar novas condições de dissolução.

Sendo assim, foi proposta uma condição de ensaio de dissolução para o desenvolvimento da CIVIV, alterando a velocidade de rotação (de 50 para 25 rpm) com o objetivo de retardar a velocidade de dissolução do fármaco. Também recorreu-se a utilização de âncoras, uma vez que as formulações analisadas, constituídas de polímeros, sofrem adesão à parede das cubas de dissolução com consequente diminuição da superfície de contato com o meio de dissolução. Assim, a utilização de âncoras foi uma tentativa de aumentar a área de contato da superfície do comprimido com o meio de dissolução.

Os perfis de dissolução das formulações analisadas apresentaram uma redução na velocidade de liberação do fármaco de acordo com o aumento da concentração do polímero HPMC. Os dados de fração dissolvida das formulações em cada intervalo de tempo (F_{d0-8}) foram plotados diretamente, através de gráficos de dispersão, com os dados de fração absorvida em cada intervalo de tempo (F_{a0-8}), obtidos por deconvolução (Mourão, 2009). Deste modo, foi obtido uma correlação com coeficiente de determinação linear (r^2) de 0,9738. O modelo de CIVIV obtido entre as três formulações foi utilizado para prever a fração absorvida do fármaco para cada formulação individual (a partir dos dados de fração dissolvida) e consequentemente, prever a concentração plasmática do DFS, empregando a técnica de convolução.

O objetivo da validação de uma CIVIV é estimar a magnitude do erro na previsão dos resultados de biodisponibilidade *in vivo*, a partir dos dados de dissolução *in vitro*. A validação interna é realizada na etapa de

desenvolvimento da CIVIV, sendo útil para fornecer critérios de aceitação do modelo, através do estabelecimento do EP% (EMANI, 2006).

Embora neste estudo o coeficiente de determinação (r^2) para a CIVIV desenvolvida tenha apresentado resultados satisfatórios, os critérios de EP% não foram aceitáveis, apresentando valores acima do recomendado (diferenças >10% para os parâmetros $C_{\max}$ e ASC). Porém, uma correlação de nível C foi obtida através de vários outros parâmetros (tais como $C_{\max}$ observado com tempo de dissolução em 2 horas, ASC com o tempo de dissolução em 8 horas, entre outros).

Eddington e colaboradores (1998) desenvolveram e validaram internamente uma CIVIV para comprimidos de liberação modificada de metoprolol. Para o desenvolvimento dessa correlação, os autores utilizaram como condição de dissolução o aparato I, com 150 rpm e tampão fosfato em pH 6,8. Os resultados apresentaram significativa correlação linear entre a fração do fármaco dissolvida, com a fração do fármaco absorvida, em diversas combinações das formulações. Porém, a combinação entre a formulação de liberação lenta e moderada, foi a que apresentou maior coeficiente de determinação linear ($r^2 = 0,991$). Os resultados de validação interna apresentaram EP% menores do que 10%, para todos os modelos desenvolvidos.

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores desenvolveram um estudo de validação externa empregando diferentes condições de produção dos comprimidos de liberação modificada de metoprolol. Tais diferenças foram na quantidade de massas de excipientes utilizadas no processo de produção, além de diferentes processos de produção dos comprimidos (comparado ao

empregado na validação interna) e uma formulação com diferente mecanismo de liberação (cápsulas contendo grânulos com revestimento). O método de correlação estabelecido no estudo de validação interna foi utilizado para prever a fração absorvida *in vivo*. A partir dos resultados de fração absorvida, a curva de concentração plasmática prevista foi estabelecida pelo método de convolução. Os resultados de validação externa apresentaram EP% menores do que 10% para C_{max} e ASC para todas as formas farmacêuticas analisadas, exceto para a formulação em cápsulas com grânulos revestidos. Os autores concluíram que a CIVIV para o fármaco metoprolol, é específica para o tipo de formulação utilizada, e a utilização de tal correlação deve ser restrita às mudanças de fabricação avaliadas neste estudo, pois não alteram o mecanismo de liberação do fármaco (MAHAYNI et al., 2000).

Na tentativa de estabelecer CIVIV com predição externa, foram selecionadas formulações de liberação modificada contendo 100mg de DFS, comercializadas no mercado nacional. Para esse estudo, tais formulações foram submetidas à ensaio de dissolução, e o comportamento *in vivo* do fármaco foi avaliado em um estudo de biodisponibilidade empregando seis voluntários sadios. Para a quantificação do DFS em plasma, um método de quantificação de DFS previamente desenvolvido foi adaptado e validado.

Com o modelo de CIVIV estabelecido nos estudos iniciais, os dados de fração dissolvida foram extrapolados para dados de fração absorvida. Aplicando a técnica de convolução, a curva de concentração plasmática do DFS foi prevista, e comparada aos resultados reais obtidos no ensaio de biodisponibilidade, através da determinação do EP%.

A convolução é o processo inverso à deconvolução, onde se realiza a conversão do perfil de dissolução *in vitro* em perfil de concentração plasmática. A maior vantagem de métodos baseados na convolução para CIVIV é que não são necessários estudos *in vivo* adicionais, uma vez que a partir do perfil de dissolução *in vitro* torna-se possível prever o comportamento da formulação *in vivo*. O processo de convolução é descrito a seguir (LI; MUELLER-ZSIGMONDY; YIN, 2007):

- ✓ 1º passo: Obtenção do perfil de dissolução *in vitro*;
- ✓ 2º passo: Calcular o perfil de absorção *in vivo* a partir do perfil de dissolução;
- ✓ 3º passo: Obter a curva de concentração plasmática a partir do perfil de absorção *in vivo* calculado.

Na condição de dissolução analisada (aparato tipo II, 25 rpm e tampão fosfato de potássio com pH 6,8; com âncoras), observou-se que a formulação R apresentou um perfil de liberação controlado do fármaco, liberando-o de forma sustentada, quando comparado as outras formulações. Esse perfil assemelha-se ao perfil de liberação das formulações desenvolvidas por Mourão et al. (2010), que utilizou hidroxipropilmetilcelulose como agente controlador de liberação, o mesmo excipiente utilizado nas formulações R e G.

O perfil de dissolução da formulação G apresentou-se semelhante ao perfil da formulação R até 240 minutos, diferenciando-se na etapa final do ensaio. A velocidade de liberação do fármaco foi mais rápida que a do produto R na etapa final do ensaio.

A formulação S apresentou baixo perfil de liberação do fármaco. Essa formulação possui o polímero catiônico de ácido metacrílico como agente controlador de liberação do fármaco, que segundo a literatura, é dissolvido em valores de pH até 5 (ROWE, 2006). Tal valor de pH é encontrado no estômago em estado alimentado (WATTS & ILLUM, 1997). Bertocchi e colaboradores (2005) também relataram perfis de dissolução (em tampão fosfato pH 6,8) com baixa dissolução de diclofenaco de sódio para formulações de liberação modificada que continham ácido metacrílico em sua constituição, porém as condições de estudo eram nas velocidades de rotação (100 rpm) e tempo de coleta (até 24 horas).

O meio de dissolução composto de tampão fosfato com pH 6,8 apresentou boa relação discriminatória entre as formulações, podendo avaliar as diferenças de perfis de dissolução de acordo com os excipientes utilizados nas formulações.

Para análise das amostras do estudo de biodisponibilidade, o método de quantificação de DFS em plasma foi adaptado, partindo-se de um método validado, proposto por Mourão (2009). O objetivo da adaptação foi de aumentar a porcentagem de recuperação do fármaco em plasma.

O processo de extração do fármaco foi realizado por precipitação de proteínas plasmáticas, utilizando acetonitrila como solvente extrator. Rigatto e colaboradores (2009) também desenvolveram um método por precipitação de proteínas para análise do DFS em plasma, com valores médios de recuperação entre 88,76 e 99,14%, precisão de 0,26% a 11,4%, e exatidão entre 92 e 105,34%.

O método com validação parcial neste estudo apresentou resultados dentro dos critérios de aceitação para os parâmetros especificidade, recuperação, linearidade, precisão e exatidão (BRASIL, 2003b); e foi utilizado para quantificação do DFS proveniente das amostras de voluntários que participaram do estudo de biodisponibilidade.

Os resultados das curvas plasmáticas de DFS obtidos no estudo de biodisponibilidade, apresentaram-se com perfis de absorção irregulares. Na literatura são encontrados diversos trabalhos que avaliaram esse tipo de comportamento do DFS incorporado à formulações de liberação modificada (LIU et al., 1995; RIAD et al., 1995; SU et al., 2003). Embora para a realização de estudos de CIVIV sejam empregados voluntários sadios, as variabilidades entre os resultados de absorção *in vivo* são muito grandes, podendo ser maiores do que 100%; diferente da variabilidade dos resultados *in vitro*, que podem chegar a 5% (VERGNAUD; ROSCA, 2005). Tal variabilidade *in vivo* pode ser reduzida com o aumento do número de voluntários na realização do estudo de biodisponibilidade.

Para a validação externa da CIVIV utilizando formulações de DFS do mercado nacional, a equação da reta obtida no desenvolvimento inicial da CIVIV (intercepto e inclinação) foi utilizada para a obtenção da fração absorvida prevista, a partir dos dados de fração dissolvida de formulações de DFS comerciais. Posteriormente, os dados de fração absorvida foram utilizados para a predição da curva plasmática de DFS em função do tempo, empregando o modelo de convolução.

Novamente, os dados de EP% obtidos na validação externa não estavam dentro dos critérios estabelecidos (FDA, 1997). Os valores de

concentração de DFS da curva plasmática prevista foram superiores aos valores de concentração da curva observados. Porém, houve relação entre outros parâmetros, tais como fração absorvida prevista em 1 hora com os valores de T_{max} observados, empregando as três formulações; fração absorvida prevista no tempo de 0 a 3 horas, com os dados de concentração plasmática observados de 0 a 3 horas, para a formulação G e fração absorvida prevista no tempo de 0 a 2 horas, com os dados de concentração plasmática observados de 0 a 2 horas, para a formulação S.

Neste trabalho foram obtidas outras correlações com valores de determinação linear maiores ou iguais a 0,9 (Tabela 5.3), incluindo a formulação comercial de medicamento genérico que não foi utilizada no desenvolvimento inicial da CIVIV (Tabela 5.16). A correlação que relaciona um ou mais parâmetros farmacocinéticos a um ponto no perfil de dissolução é uma correlação de nível C (EMANI, 2006). Tais correlações confirmam a existência de uma relação entre a dissolução e absorção do DFS a partir de formulações contendo HPMC como agente controlador de liberação do fármaco.

A CIVIV refere-se ao estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica e suas propriedades ou características físico-químicas (BRASIL, 2002). A velocidade de dissolução do DFS no trato gastrointestinal é limitada pelo processo de dissolução (LIU et al., 1995; SU et al., 2003).

Neste estudo, foram obtidos resultados de correlação de nível C entre os dados de dissolução *in vitro* e os dados de absorção *in vivo*, tanto para as formulações que desenvolveram o método de CIVIV, bem como para a formulação de medicamento genérico contendo o fármaco DFS, encontradas

no mercado nacional. Sendo assim, tais métodos podem ser utilizados para auxiliarem o processo de desenvolvimento de novas formulações, contendo o fármaco DFS e o excipiente HPMC.

7. CONCLUSÕES

- Obtiveram-se correlações *in vitro-in vivo* de nível A e de nível C para comprimidos matriciais de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio.
- Realizou-se validação interna de correlação *in vitro-in vivo* de nível C para comprimidos matriciais de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio. Não foi possível realizar a validação interna da correlação *in vitro-in vivo* de nível A.
- Os perfis de dissolução obtidos de comprimidos comerciais de liberação modificada contendo 100mg diclofenaco de sódio apresentaram diferença entre as formulações avaliadas. Estes perfis foram utilizados para a obtenção de valores previstos de absorção do fármaco previstas, a partir do modelo de CIVIV de nível A desenvolvido.
- O ensaio de biodisponibilidade realizado com os comprimidos comerciais de diclofenaco de sódio mostrou diferença no perfil de absorção entre as formulações analisadas, bem como entre os voluntários.
- Realizou-se validação externa de correlação *in vitro-in vivo* de nível C para comprimidos comerciais de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio. Não foi possível realizar a validação externa da correlação *in vitro-in vivo* de nível A.
- A metodologia empregada nos estudos de dissolução pode ser empregada para auxiliar o processo de desenvolvimento de novas formulações, uma vez que foi obtida correlação nível C validada interna

e externamente entre os dados de dissolução *in vitro* e os dados de absorção *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H.M. **Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence**. Easton, Mack Publishing Company, 1989. 554 p.

AGUIAR, G., FARIA, L.G., FERRAZ, H.G., SERRA, C.H.R., PORTA, V. Avaliação biofarmacotécnica *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas contendo doxiciclina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 41, n. 4, 2005

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

AOYAGI, N., OGATA, H., KANIWA, N., KOIBUCHI, M., SHIBAZAKI, T., EJIMA, A. Bioavailability of griseofulvin from tablets in humans and the correlation with its dissolution rate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, n.10, p.1165-1169, 1982.

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

BALAN, G., TIMMINS, P., GREENE, D.S., MARATHE, P.H. In-vitro in-vivo correlation models for glibenclamide after administration of metformin/glibenclamide tablets to healthy human volunteers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 52, n. 7, p. 831-838, 2000.

BALAN, G., TIMMINS, P., GREENE, D.S., MARATHE, P.H. In vitro-In vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 90, n. 8, p. 1176-1185, 2001.

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

BERTOCCI, 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**. vol. 37, p. 679 – 685, 2005.

BONAMICI, D. Sistema de classificação biofarmacêutico. São Paulo, 2009, 171p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 9.787, de 10 de agosto de 1999. Altera a Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, 10 de fevereiro de 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 482, de 19 de março de 2002. Guia para estudos da correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV). Diário Oficial da União, Brasília, 20 mar. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 893, de 29 de maio de 2003. Guia para realizações de alterações, inclusões e notificações pós-registro de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, 07 nov. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 899, de 29 de maio de 2003b. Guia para validações de métodos analíticos e bionalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE n. 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa / bioequivalência de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, 24 abr. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC 16, de 02 de março de 2007. Dispõe sobre o registro de medicamento genérico e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 05 mar. 2006.

CARDOT, J.M., BEYSSAC, E. In vitro-In vivo Correlation. In: SWARBRICK, J., BOYLAN, J.C. **Encyclopedia of pharmaceutical technology**. 3° ed.: Informa Healthcare, 2006, p. 1062-1072.

CHOWDARY K.P.R., RAJYALAKSHIMI Y., **Dissolution rate in modern pharmacy**. East Pharm. 1987; 30(350):51-4.

CHUASUWAN, B.; BINJEOSH, V.; POLLI, J. E.; ZHANG, G. L.; AMIDON, H. E.; JUNGINGER, H.E.; MIDHA, K.K.; SHAH, V.P.; STAVCHANSKY, S.; DRESSMAN, J. B.; BARENDT, D. M. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: diclofenac sodium and diclofenac potassium. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 27, p. 1-14, 2008.

COLOMBO, P., BETTINI, R., SANTI, P., PEPPAS, N.A. Swellable matrices for controlled drug delivery gel-layer behavior, mechanisms and optimal performance. **Pharmaceutical Science & Technology Today**., vol. 3, n. 6, p. 198-204, 2000.

CONSIGLIERI, V.O.; STORPIRTIS, S. Bioequivalência de medicamentos: objetivos, parâmetros farmacocinéticos, delineamento experimental e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 36, n. 1, p. 13 – 21, 2000.

DALTON, J.T., STRAGHN, A.B., DICKASON, D.A., GRANDOLFI, G. Predictive ability of level A for RingCap controlled-release acetaminophen tablets. **Pharmaceutical Research**., vol. 18, n. 12, p. 1729-1734, 2001.

DEMİRTÜRK, R., ÖNER, L. In vitro-In vivo correlation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**., vol. 28, p. 215-224, 2003.

DEY, M., ENEVER, R., MARINO, M., MICHELUCCHI, J., SMITH, D., WARNER, R., WEIERSTALL, R. Sustained-release etodolac bioavailability and dose proportionality: correlation between in vivo and in vitro performance. **International Journal Pharmaceutical**, v. 49, n. 2, p. 121-128, 1989.

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

DREWE, J. GUITARD, P. *In vitro* - *in vivo* correlation for modified-release formulations. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.82, n.2, p.132-137, 1993.

DUNNE, A.; O'HARA, T.; DEVANE, J. A. New approach to modeling the relationship between *in vitro* and *in vivo* drug dissolution / absorption. **Statistics in medicine**, vol. 18, p. 1865-1876, 1999.

EDDINGTON, N.D.; MARROUM, P.; UPPOOR, R.; HUSSAIN, A.; AUGSBURGER, L. Development and internal validation of an *in vitro*-*in vivo* correlation for a hydrophilic metoprolol tartrate extended release tablet formulation. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 3, p. 466-473, 1998.

EMANI, J. *In vitro* – *in vivo* correlation: From theory to applications. **Journal of Pharmacia and Pharmaceutical Sciences**. vol. 9, n. 2, p. 169-189, 2006.

FARINHA, A., PAIS, J. P., BICA, A. O ensaio de dissolução *in vitro* na avaliação da qualidade biofarmacêutica. **LEF- Boletim**, vol. 4, n. 15, p. 1-7, 1997.

FDA Guidance for industry. Extended release oral dosage forms: Development, evaluation and application of *In vitro*/*In vivo* correlations. Rockville, 1997.

FREIRE, A.C., PODCZECK, F., SOUSA, F., VEIGA, F. Liberação específica de fármacos para administração no cólon por via oral. I – O cólon como local de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 42, n.3, p.319-335, 2006.

GALIA E., NICOLAIDES E., HÖRTER, D., LÖBENBERG, R., REPPAS, C., DRESSMAN, J.B. Evaluation of various dissolution media for predicting *in vivo* performance of class I and II drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 5., p. 698 – 705, 1998.

GHAZAL, H., DYAS, A.M., FORD, J.L., HUTCHEON, G.A. *In vitro* evaluation of the dissolution behavior of itraconazole in bio-relevant media. **International Journal of Pharmaceutics**., vol. 366, p. 117-123, 2009.

GHOSH, A., BHAUMIK, U.K., BOSE, U.M., GOWDA, V., CHATTERJEE, B., CHAKRABARTY, U.S., PAL, T.P. Extended release dosage form of glipizide: Development and validation of a level A *in vitro-in vivo* correlation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin.**, vol. 31, n. 10, p. 1946-1951, 2008.

GLEITER, C.H., KLOTZ, U., KUHLMANN, J., BLUME, H., STANISLAUS, F., HARDER, S., PAULUS, H., POETHKO-MÜLLER, C., HOLZ-SLOM-CZYK, M., When are bioavailability studies required ? a German proposal. **Journal of Clinical Pharmacological.** vol. 38, p. 904 – 911, 1998.

GILMAN, A.; GOODMAN, L. S.; BRUNTON, L. L. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica.** 11 ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006, 1821p.

GRDINIC, S., GJURIS, V., BICAN-FISTER, T. Comparison of *in vitro* release and renal elimination of 1- butylbiguanide from timed-release oral antidiabetic preparations. **Acta Pharmaceutica Jugoslavia.**, v.29, n. 4, p.215-221, 1979.

HAYASHI, T., OGURA, T., TAKAGISHI, Y. New evaluation method for *in vitro/in vivo* correlation of enteric-coated multiple unit dosage forms. **Pharmaceutical Research.**, v.12, n.9, p.1333-1337, 1995.

IYER, S.S., BARR, W.H., DANCE, M.E., COLEMAN, P.R., KARNES, H.T. A 'biorelevant' system to investigate *in vitro* drug released from a naltrexone implant. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 340, p. 104-118, 2007.

JANTRAI, E., JANSSEN, N., CHOKSHI, H., TANG, K., DRESSMAN, J.B. Designing biorelevant dissolution tests for lipid formulations: Case example – Lipid suspension of RZ-50. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, vol. 69, p. 776-785, 2008.

JOHNSON, B.F., GREER, H., MACCRERIE, J., BYE, C., FOWLE, A. Rate dissolution of digoxin tablets as a predictor of absorption. **Lancet**, vol. 301, n. 7818, p. 1473 – 1475, 1973.

KARNES, H.T., SHIU, G., SHAH, V.P. Validation of bioanalytical methods. **Pharmaceutical Research.**, vol. 8, n. 4, 421-426, 1991.

KELDENICH, J. Measurement and Prediction of Oral Absorption. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, p.2000-2013, 2009.

KLEIN, S., RUDOLPH, M.W., SKALSKY, B., PETEREIT, H.U., DRESSMAN, J.B. Use of BioDis to generate a physiologically relevante IVIVC. **Journal of Controlled Release**., vol. 130, p. 216-219, 2008.

LACY, C.F. **Drug Information Handbook**. 20a. ed. Ohio: Lexi-Comps Clinical Reference Library, 2011, 1946 p.

LEVY, G., LEONARDS J.R., POCKNAL, J.A. Development of in vitro dissolution tests which correlate quantitatively with dissolution rate-limited drug absorption in man. **Journal Pharmaceutical Science**, vol. 54, pag. 1719 – 1722, 1965.

LI, Z., HE, X., GAO, X., XU, Y.Y., WANG, Y., GU, H., JI, R., SUN, S. Study on dissolution and absorption of four dosage forms of isosorbide mononitrate: Level A *in vitro-in vivo* correlation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**., vol. 79, p. 364-371, 2011.

LI, S.; MUELLER-ZSIGMONDY, M.; YIN, H. The role of *in vitro* – *in vivo* correlation in product development and life cycle management. In: QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.G.Z.; LIU, L.; PORTER, W.R. **Developing solid oral dosage forms: pharmaceutical theory and practice**. 1.ed. London:Elsevier, 2009, cap 4, p.71-105.

LIN, S. Y., KAO, Y. H., CHANG, H. N. Preliminary evaluation of the correlation between *in vitro* release and *in vivo* bioavailability of two aminophylline slow-release tablets. **Journal of Pharmaceutical Sciences**., Washington, v.79, n.4, p.326-330, 1990.

LINDENBAUM, J., BUTTLER, V.P., MORPHY, J.E., CRESSWELL, R.M. Correlation of digoxin tablet dissolution rate with biological availability. **Lancet**, vol. 301, n. 7814, p. 1215 – 1217, 1973.

LIU, C.H., KAO, Y.H., CHEN, S.C., SOKOLOSKI, T.D., SHEU, M.T., *In vitro an In vivo* studies of the diclofenac sodium controlled-release matrix tablets. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 47, n. 5, p. 360-364, 1995.

MAHAYNI, H., REKHI, G.S., UPPOOR, R.S., MARROUM, P., HUSSIAN, A.S., AUGSBURGER, L.L., EDDINGTON, N.D. Evaluation of “external” predictability of an in vitro-in vivo correlation for an extended-release formulation containing metoprolol tartrate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 89, p. 1354-1361, 2000.

MANADAS, R.; PINA M.E.; VEIGA. F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375 – 399, 2002.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. São Paulo, 2003, 127p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

MARQUES, M. Dissolution Media Simulating Fasting and Fed States. **Dissolution Technologies**, v. 11, n. 2, p. 16 , 2004.

MODI, N.B. In vitro- In vivo Correlation. In: CHILUKURI, D.M.; SUNKARA, G.; YOUNG, D. **Pharmaceutical Product Development. In vitro-In vivo Correlation** 1.ed. New York: Informa Healthcare., 2007, cap. 5, p. 107-123.

MOURÃO, S.C. **Correlação *in vitro* – *in vivo* para formas farmacêuticas sólidas de liberação modificada contendo diclofenaco de sódio**. São Paulo, 2009. 182p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo)

MOURÃO, S.C.; SILVA, C.; BRESOLIN T.M.B.; SERRA C.H.R.; PORTA, V. Dissolution parameters for sodium diclofenac – containing hypromellose matrix tablet. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, p. 201 – 207, 2010.

OCHOA, L., IGARTUA, M., HERNÁNDEZ, R.M., ÁNGELES, M.A., GASCÓN, A.R., PEDRAZ, J.L. *In vivo* evaluation of two new sustained release formulations elaborated by one-step melt granulation: Level A *in vitro-in vivo* correlation. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, vol. 75, p. 232-237, 2010.

OLIVEIRA, M.E.; MANZO, R.H. O sistema de classificação biofarmacêutica e as bioisensões. In: STORPIRTIS,S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmarmacotécnica**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2009, cap 18, p.187-203.

PEZZINI, B.R., SILVA, M.A.S., FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 4, 491-502, 2007.

QIU, Y., CHEN Y., ZHANG G.G.Z. **Developing solid oral dosage forms. Pharmaceutical Theoty and Prattice**. 1a ed. Elsevier, 2009, 921 p.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 5a ed. Elsevier, 2004. 855 p.

RANI, M. MISHRA, B. Comparative in vitro and in vivo evaluation of matrix, osmotic matrix, and osmotic pump tablets for controlled delivery of diclofenac sodium. **Pharmaceutical Science & Technology**., vol. 5, n. 4, 2004.

RAO, B.S, SESHASAYANA, A., PARDHA SARADHI, S.V., RAVI KUMAR, N., NARAYAN, C.P.S., RAMANA MURTHY, K.V. Correlation of “in vitro” release and “in vivo” absorption characteristics of rifampicin form ethylcellulose coated nonpareil beads. **International Journal of Pharmaceutics**., vol. 230, p. 1-9, 2001.

RECIO, D.C.; DELGADO, C.A.G.; RUANO, L.O.; FERNANDEZ, A.C. Bioequivalencia. Introducción a la correlación *in vivo-in vitro*. Parte I. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 33, n. 2, p. 137-142, 1999.

RIGATO, H.M., MORENO, R.A., ORPINELLI, E.Z., BORGES, B.C., SVEDLOFF, C.E., PEDRAZZOLI, J., BORGES, N.C. A simple high-performance liquid chromatographic method for a determination of diclofenac in human plasma: application to a comparative bioavailability study. **International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy & Toxicologic**., vol. 47, n. 2, p. 132-140, 2009.

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

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; WELLER, P.J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 5. ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London–Washington, 2006, 918 p.

SAVASER, A.; OZKAN, Y.; ISSYMER, A. Preparation and in vitro evaluation of sustained release tablet formulations of diclofenac sodium. **II Farmaco**, vol. 60, n. 2, p. 171–177, 2005.

SCHLIECKER, G., SCHMIDT, C., FUCHS, S., EHINGER, A., SANDOW, J., KISSEL, T. In vitro and in vivo correlation of buserelin release from biodegradable implants using statistical moment analysis. **Journal of Controlled Release**, vol. 94, p. 25-37, 2004.

SHARGELL, L., YU, A.B.X.C. **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 3.ed. London: Prentice-Hall International, 1992. 625 p.

SHARGEL L., KANFER, I. **Generic Drug Product Development – Solid oral dosage forms**. New York: Marcel Dekker, 2005.

SIEWERT, M., DRESSMAN, J., BROWN, C., SHAH, V. FIP/AAPS guidelines for dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. **Dissolution Technology**, v. 10, p. 6-15, 2003.

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. *In vitro-In vivo* correlation: Definitions and Regulatory Guidance. **International Journal of Generic Drugs**, 2004.

SIRISUTH, N., AUGSBURGUER, L.L., EDDINGTON, N.D. Development and validation of a non-linear IVIVC model for a diltiazem extended release formulation. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, vol. 23, p. 1-8, 2002.

SOULIMAN, S., BLANQUET, S., BEYSSAC, E., CARDOT, J. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 27, p. 72-79, 2006.

SU, S.F., CHOU, C.H, KUNG, C.F., HUANG, J.D. *In vitro and In vivo* comparison of two diclofenac sodium sustained release oral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 260, p. 39-46, 2003

SUNESSEN, V.H., PEDERSEN, B.L., KRITENSEN, H.G., MÜLLERTZ, A. In vivo in vitro correlations for a poorly soluble drug, danazo, using flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**., vol. 24, p. 305-313, 2005.

UNITED STATES. National Archives and Records Service. Office of the Federal Register. Code of Federal Regulations. Title 21: Food and Drug Administration. Part 320. **Bioavailability and bioequivalence requirements**. 2004. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>. Acesso em 30 mai. 2010.

UNITED States Pharmacopeia. 30 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

UPPOOR, V.R.S. Regulatory perspectives on *in vitro* (dissolution)/*in vivo* (bioavailability) correlations. **Journal of Controlled Release**, v. 72, p.127-132, 2001.

VERGNAUD, J.M., ROSCA, I.D. **Assessing bioavailability of drug delivery systems: Mathematical modeling**. 1. ed., :CRC, 2005, 219 p.

WAGNER, J.G., CHRISTENSEN, M. SAKMAR, E., BLAIR, D., YATES, J.D., WILLIS, P.W., SEDMAN, A.J., STOLL, R.G. Equivalence lack in digoxin plasma levels. **JAMA**, vol. 224, n. 2, p. 199 – 204, 1973.

WANG, Q., FOTAKI, N., MAO, Y. Biorrelevant dissolution: Methodology and application in drug development. **Dissolution Technologies**. Vol. 16, n. 3, p. 6 – 12, 2009.

WATTS, P.J., ILLUM, L. Colon drug delivery. **Drug development and Industrial Pharmacy**. V.23, n.9, p. 893 – 913, 1997.

WELLING, P.G.; TSE F.L.S.; DIGHE S.V. **Pharmaceutical bioequivalence**. New York: Marcel Dekker Inc.; 1991. 467p.

WEI, H., LÖBENBERG, R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**., vol. 29, p. 45-52, 2006.

YAU, M. K. T., MEYER, M. C. *In vivo* - *in vitro* correlation with a commercial dissolution simulator. II: papaverine, phenytoin and sulfisoxazole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**., v.72, n.6, p.681-686, 1983.

**ANEXO A – CÓPIA DO DOCUMENTO DE INFORMAÇÕES PARA OS
MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS DE MESTRADO/DOCTORADO.**

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Parecer CEP/FCF/107/2009
 Protocolo CEP/FCF/518
 CAAE: 0051.0.198.198-09

I – Identificação:

Projeto de Pesquisa:	Validação externa de correlação <i>in vitro-in vivo</i> para comprimidos comerciais de liberação controlada de diclofenaco de sódio
Pesquisador Responsável:	Profa. Dra. Valentina Porta
Instituição:	Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP
Área Temática Especial:	Não se aplica
Patrocinadores:	FAPESP

II - Sumário Geral do Protocolo:

A dissolução de fármacos administrados por via oral é pré-requisito para sua absorção e eficácia clínica. Esta constatação fornece a base para o estabelecimento de correlações entre a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo* de medicamentos, isto é, correlações *in vitro - in vivo* (CIVIV). O estabelecimento dessa correlação pode possibilitar a substituição dos estudos *in vivo*, necessários para avaliação da biodisponibilidade de medicamentos, por estudos *in vitro*, com vantagens éticas e econômicas. A probabilidade de obtenção de CIVIV é maior quando o processo limitante da absorção do fármaco é a dissolução, o que ocorre para medicamentos contendo fármacos de classe biofarmacêutica II (baixa solubilidade e alta permeabilidade) e para sistemas de liberação controlada. O objetivo do projeto é a validação externa de CIVIV para formulações comerciais contendo diclofenaco de sódio.

Os objetivos do presente estudo são:

O objetivo geral é realizar validação externa de correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) para comprimidos de liberação modificada de diclofenaco de sódio. E, os objetivos específicos:
 1) Caracterizar os comprimidos quanto aos aspectos físicos e físico-químicos; 2) Avaliar o perfil de dissolução dos comprimidos de duas formulações contendo diclofenaco de sódio comercializadas no Brasil em diversas condições de dissolução (estudo *in vitro*); 3) Desenvolver metodologia analítica para determinação e quantificação do diclofenaco de sódio em plasma humano; 4) Realizar estudos de biodisponibilidade (*in vivo*) em voluntários, utilizando duas formulações comerciais de diclofenaco de sódio.

Tipo de estudo:

O ensaio será do tipo aleatório, cruzado, formando-se três grupos (A, B, C) e três fases, de forma que todos os voluntários recebam as duas formulações em estudo (comprimidos de liberação controlada), além da formulação referência (comprimido de liberação convencional de diclofenaco de sódio).

Descrição da Casuística:

Participarão do ensaio de biodisponibilidade de 6 a 10 voluntários. Serão selecionados voluntários sadios, devidamente informados sobre as características da pesquisa e que assinarão Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Serão realizados os seguintes exames: hemograma completo; uréia; creatinina; fosfatase alcalina; glicemia; bilirrubina total; proteínas totais e albumina; transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP); ácido úrico; colesterol total; triglicérides; urina tipo I; sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C; β -HCG para mulheres; eletrocardiograma com doze derivações.

Todos os exames laboratoriais, exceto a sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C, serão realizados também no período pós-estudo. Além disso, os voluntários farão outro eletrocardiograma e passarão por uma avaliação médica.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Para os exames laboratoriais de seleção e pós-estudo serão coletados cerca de 8 mL de sangue e 10 mL de urina em cada período.

Os critérios de inclusão dos participantes são:

Os voluntários deverão satisfazer os seguintes critérios:

- não fumantes ou fumantes até 10 cigarros/dia;
- bom estado de saúde, idade entre 21 e 45 anos, e peso dentro do ideal $\pm 15\%$, calculado pela fórmula $PI = (H - 100)$ para homens e $PI = 0,9 \times (H - 100)$ para mulheres, em que PI é o peso ideal (kg) e H, a altura do voluntário (cm);
- ausência de patologias cardíacas, renais, gastrintestinais, neurológicas ou metabólicas;
- sem antecedentes de hipersensibilidade a medicamentos;
- não devem estar em tratamento com medicamentos;
- voluntárias do sexo feminino não devem estar em estado de gravidez (comprovado através de exame laboratorial) ou em período de amamentação.

A inclusão dos indivíduos será baseada também em resultados de exames clínicos e laboratoriais, além do eletrocardiograma.

Serão critérios de exclusão:

Os voluntários serão excluídos do estudo nos casos a seguir:

- não satisfaçam os critérios de inclusão supracitados;
- apresentem resultados fora da normalidade para os exames clínicos e laboratoriais, segundo critério médico;
- apresentem mal-estar decorrente da retirada de amostras de sangue, tal como tontura, queda de pressão ou desmaio e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- apresentem reações adversas ao medicamento administrado e expressem desejo de serem excluídos do estudo;
- independentemente de qualquer intercorrência, expressem desejo de serem excluídos do estudo.

Caso algum resultado do exame laboratorial apresente-se fora das especificações de normalidade, o médico deverá avaliar o mesmo considerando-se os resultados apresentados para os demais exames. O médico poderá considerar o voluntário como apto desde que os resultados dos exames laboratoriais não representem risco para o voluntário e nem prejuízo para o estudo.

III – Situação do Protocolo: APROVADO em reunião de 31/08/2009.

O CEP sugere apenas que o item III do TCLE que seja substituído a frase: "...de modo a estabelecer...dissolução" por "...de modo a estabelecer uma relação com estudos realizados em laboratório."

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP:
 - a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
 - eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
 - a interrupção do projeto.

Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 01 de setembro de 2009.

Prof. Dr. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/FCF/USP

CEP / HU USP

São Paulo, 7 de agosto de 2009.

Il^{mo}(a) S^{ra}(a).

Dra. Valentina Porta

Departamento de Farmácia
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Validação externa de correlação in vitro – in vivo para comprimidos comerciais de liberação controlada de diclofenaco de sódio”-
Co-investigador(es): Rafael da Silva Melo - **Registro CEP-HU/USP:** 930/09 –
SISNEP CAAE: 0051.0.198.198-09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 7 de agosto de 2009, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

O primeiro relatório está previsto para 7 de agosto de 2010.

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Voluntário.....
Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....
CEP:.....Telefone:.....
2. Responsável Legal:.....
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
Documento de Identidade Nº:.....Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: **Investigação da influência da velocidade de liberação do fármaco metoprolol a partir da forma farmacêutica sobre seu processo de absorção e de seus enantiômeros**
2. Pesquisador: **Francinayra Dantas de Medeiros**
Cargo/Função: **Doutorando** Inscrição Conselho Regional Nº: **CRF-SP 44.602**
Departamento da FCF/USP: **Departamento de Farmácia**
3. **AValiação do Risco da Pesquisa**
Risco Mínimo (X) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()
4. Duração da Pesquisa: **2 anos**

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa, objetivos e procedimentos da pesquisa:

Este estudo pretende avaliar o comportamento do remédio metoprolol no organismo humano a fim de estabelecer uma forma mais eficiente de comparar os medicamentos genéricos e similares, que contêm metoprolol.

O metoprolol é um remédio utilizado no tratamento de pressão alta e problemas do coração.

O remédio que o(a) senhor(a) tomará será um líquido oral obtido a partir de comprimidos de metoprolol comprados em uma farmácia.

Para ser incluído no estudo, o(a) senhor(a) será submetido a exames clínicos e laboratoriais, com quatro coletas de amostras de sangue e uma de urina. Serão realizados os seguintes exames laboratoriais: hemograma completo; uréia; creatinina; fosfatase alcalina; glicemia; bilirrubina total; proteínas totais e albumina; transaminase oxalacética e pirúvica (TGO e TGP); ácido úrico; colesterol total; triglicérides; urina tipo I; sorologia para HIV, hepatite B e hepatite C; e β -HCG (para mulheres). As coletas de sangue e urina para exames laboratoriais serão realizadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da USP. Para a coleta da urina o(a) senhor(a) irá receber um frasco coletor, e após o período de 2h sem urinar, irá coletar sua urina. Será feito também um eletrocardiograma. A avaliação médica e o eletrocardiograma serão realizados no Hospital Universitário da USP. Ao final do estudo estes mesmos exames laboratoriais e clínicos serão repetidos, juntamente com o eletrocardiograma. As internações para o estudo serão no Hospital Universitário da USP, nos dias do estudo, às 6:00 horas da manhã. O(a) senhor(a) deverá comparecer em jejum de pelo menos 8:00 horas e não poderá levar nenhum tipo de alimento para o hospital, pois a partir do momento da internação receberá dieta padronizada.

O(A) senhor(a) permanecerá no hospital durante todo o dia, até às 21:00h, não sendo necessário passar a noite no hospital. O(A) senhor(a) deverá retornar 2 vezes ao hospital para repetir o procedimento e finalizar o estudo.

O estudo será dividido em 3 fases. Na primeira fase o(a) senhor(a) receberá o produto em uma única tomada, na segunda fase o(a) senhor(a) receberá o produto em 2 tomadas com intervalo de 60 minutos entre elas, e na terceira fase o(a) senhor(a) receberá produto em 5 tomadas com intervalo de 30 minutos entre elas. O intervalo entre as fases será de, no mínimo, 2 dias. Para avaliar o comportamento do remédio no organismo serão realizadas coletas de sangue nos seguintes tempos: 0:00, 0:20, 0:40, 1:00, 1:20, 1:40, 2:00, 2:30, 3:00, 3:30, 4:00, 5:00, 6:00, 8:00, 10:00, 12:00 e 14:00 horas após cada administração do produto. Desta forma, em cada fase serão retirados 95 mL de sangue, e 255 mL no total ao final do estudo. Para evitar que sua veia seja punccionada muitas vezes, será colocado um sistema apropriado para a retirada de sangue. O jejum deverá ser mantido até quatro horas depois de tomar o produto.

2. Desconfortos e riscos esperados:

O metoprolol é um remédio muito utilizado no tratamento da pressão alta e problemas do coração. Tem seu uso aprovado em vários países do mundo, inclusive Europa e Estados Unidos e também no Brasil, pelo Ministério da Saúde. O metoprolol é contra-indicado para pacientes com insuficiência cardíaca e com suspeita de infarto agudo do miocárdio. O metoprolol é bem tolerado e as reações adversas são, geralmente, leves e reversíveis. Algumas reações desagradáveis observadas são: diminuição dos batimentos do coração, cansaço, vertigem, dor de cabeça, náusea, dificuldade de respirar após fazer esforço. Porém, tais reações são observadas em pacientes que recebem metoprolol por muitos dias.

Durante as coletas de sangue, algumas pessoas podem sentir fraqueza e até mesmo desmaiar por causa da picada. Também podem surgir hematomas e dor no local da picada. Entretanto, esses efeitos são passageiros e não são graves. A coleta de amostras será acompanhada por um médico que poderá atendê-lo no caso de alguma eventualidade, além de esclarecer qualquer dúvida.

3. Benefícios que poderão ser obtidos:

Embora não existam benefícios diretos aos voluntários envolvidos no estudo descrito, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, na medida em que irá avaliar o comportamento desse tipo de remédio no organismo e discutir a forma como os medicamentos genéricos e similares contendo metoprolol devem ser comparados ao medicamento de referência. Assim, no futuro, poderemos ter medicamentos genéricos e similares mais seguros e eficazes.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. O(a) senhor(a) terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.
2. O(a) senhor(a) terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo..
3. Na divulgação dos resultados da pesquisa, os voluntários serão identificados apenas por números, garantindo sua privacidade e a confidencialidade dos dados obtidos.
4. Será realizado um seguro para garantir indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

O ensaio será acompanhado por profissional médico capacitado a prestar assistência em caso de necessidade. Os pesquisadores estarão à disposição dos voluntários para quaisquer esclarecimentos nos telefones: 3091-3623 / 3091-2217 (Profa. Dra. Valentina Porta e Doutoranda e Farmacêutica Francinalva Dantas de Medeiros)

“Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos dessa pesquisa, favor entrar em contato com: CEP-HU/USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2565 Cidade Universitária CEP: 05508-000, São Paulo – SP. Telefone: 3091-9457. Fax: 3091-9452. E-mail: cep@hu.usp.br.

VI – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 2565
CEP: 05508-000
São Paulo – SP
Telefone: 3091-9457, Fax: 3091-9452
E-mail: cep@hu.usp.br.

ANEXO D – FICHA DO ALUNO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 6962752/1 - Rafael da Silva Melo

Email:	rafaelmelo@usp.br
Data de Nascimento:	09/02/1985
Cédula de Identidade:	RG - 29.532.866-6 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Universidade de Sorocaba - Brasil - 2009

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	15/07/2009
Início da Contagem de Prazo:	15/07/2009
Data Limite:	15/01/2012
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Valentina Porta - 15/07/2009 até o presente. E-Mail: vporta@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 15/07/2009
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 09/09/2010
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 15/07/2009 Mudança de Regulamento em 06/08/2009 Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred	Freq	Conc	Exc	Situação
FBF5751 -6/1	Introdução aos Métodos Termooanalíticos	17/08/2009	25/10/2009	150	10	95	A	N	Concluída
FBC5813 -2/2	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	16/11/2009	20/12/2009	60	0	0	-	N	Turma cancelada
FBC5803 -1/1	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	01/03/2010	14/03/2010	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5777 -2/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	01/03/2010	13/06/2010	45	3	86.5	B	N	Concluída
FBF5778 -1/3	Biofarmacotécnica: Estudo de Permeabilidade de Fármacos	20/05/2010	30/06/2010	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5706 -6/3	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos	02/08/2010	12/09/2010	60	4	80	B	N	Concluída
FBF5766 -2/3	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	05/08/2010	06/10/2010	90	6	87.5	A	N	Concluída
EDM579 1-5/5	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2010	30/11/2010	120	8	75	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	37
Estágios:			
Total:	0	25	37

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:	
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.	
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.	