**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área: Produção e Controle Farmacêuticos

**ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE A RANITIDINA E O
DICLOFENACO EM VOLUNTÁRIOS SÁDIOS APÓS
ADMINISTRAÇÃO PERORAL DE VOLTAREN 50**

VALENTINA PORTA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Prof. Assoc. SÍLVIA R. C. J. SANTOS

**São Paulo
1992**

Aos meus pais, Franco e Gianna

Aos meus irmãos, Michele, Enrico,
Stefano e Luis Gustavo

Ao José Carlos

Agradecimentos

À Professora Silvia R. C. J. Santos, pela orientação e estímulo.

À Coordenadora do curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Professora Érika R. M. Kedor, pelo incentivo

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas de Mestrado I e II (processo 89/3138-2).

À CAPES, pela complementação de bolsa recebida.

Às Professoras Elfriede M. Bacchi e Silvia Storpirtis, pela importante colaboração

À Moema R. dos Santos, pela revisão das referências bibliográficas.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Pesquisa do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas: Célia E. Omosako, Elisabeth A. Romão, Maria Aparecida Bertoline, Maria das Dores Pereira, Heloísa Donzella, Amara Barbosa, Edna Nogueira, Maria Luiza Silva de Paula e José de Souza Filho pelo apoio e colaboração.

Aos amigos Adalgisa L. Teixeira, Alírio S. dos Reis, Lenilson Moreira Filho, Maria Aparecida Nicoletti e Omar Zerino Jr.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, possibilitaram a realização deste trabalho.

Valentina Porta

ESTUDO DE INTERAÇÃO ENTRE A RANITIDINA
E O DICLOFENACO EM VOLUNTÁRIOS SADIOS APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE DOSE ÚNICA DE
VOLTAREN® 50

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

SILVIA REGINA C. J. SANTOS

Presidente e Orientador

SEIZI OGA

1º Examinador

DERMEVAL DE CARVALHO

2º Examinador

São Paulo, 27 de janeiro de 1993.

Apresentação

O objetivo principal deste trabalho foi a verificação da existência ou não de interação entre a ranitidina e o diclofenaco em voluntários sadios, através da avaliação da cinética do diclofenaco em plasma e da excreção urinária do fármaco inalterado e de seus produtos de biotransformação hidroxilados. Para isso foi necessário, inicialmente, estabelecer métodos analíticos para a quantificação de diclofenaco em plasma e urina e de seus metabólitos hidroxilados em urina através de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), uma vez que, até o momento, não se encontrou reportada na literatura metodologia adequada para tais determinações utilizando CLAE. Estes métodos estão descritos nos Capítulos I e III. Em seguida, foi necessário avaliar a biodisponibilidade de formulações do mercado contendo diclofenaco de sódio para determinar a mais adequada ao estudo de interação. Este estudo de biodisponibilidade encontra-se descrito no Capítulo II. Finalmente, no Capítulo IV, está relatado o estudo de interação entre ranitidina e diclofenaco propriamente dito, utilizando a formulação mais adequada escolhida a partir do estudo desenvolvido no Capítulo II..

Índice geral

Capítulo I	p. 1
Capítulo II	p. 28
Capítulo III	p. 80
Capítulo IV	p. 112

**Micrométodo para determinação de
diclofenaco em plasma por cromatografia
líquida de alta eficiência**

Capítulo I

Índice

Resumo	p. 3
1. Introdução	p. 4
2. Objetivo	p. 9
3. Material e métodos	p. 9
3.1. Material	p. 9
3.2. Preparação de padrões	p. 11
3.3. Determinação de diclofenaco em plasma	p. 12
3.4. Limites de confiança do método de determinação de diclofenaco em plasma	p. 14
4. Resultados	p. 15
5. Discussão	p. 18
6. Referências bibliográficas	p. 22
Abstract	p. 27

Resumo

O diclofenaco de sódio é um antiinflamatório não-esteroidal que, além de atividade antiinflamatória, apresenta também propriedades analgésica e antipirética. Seus efeitos farmacológicos estão relacionados à inibição da síntese de prostaglandinas. Vários métodos utilizando técnicas cromatográficas têm sido propostos para a determinação de diclofenaco em plasma, incluindo a cromatografia gás-líquido com detecção por captura de elétrons ou por ionização de chama, a cromatografia gás-líquido-espectrometria de massa e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica ou no ultravioleta. Descreve-se aqui um método rápido, sensível e específico para a determinação de diclofenaco em plasma usando apenas 200 µl de amostra e envolvendo extração simples e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta. Extraíu-se o diclofenaco adicionando-se 200 µl de plasma a tubos contendo 500 ng de padrão interno (ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propionico e 100 µl de ácido ortofosfórico 2,5 N. A seguir adicionaram-se 4 ml de diclorometano e extraíu-se a mistura em agitador de tubos durante 60 segundos. Após centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos a fase aquosa foi desprezada e a fase orgânica foi filtrada em membrana Millipore® FHLP 01300 de 0,4 µm e evaporada em corrente de nitrogênio a 37°C. O resíduo foi dissolvido em 100 a 1000 µl de fase móvel para injeção em CLAE. Empregou-se para a separação coluna Novapak® C₁₈, 150 × 3,9 mm, 4 µm e fase móvel constituída por mistura de tampão acetato 0,75 M, pH 5,0 e acetonitrila (55:45, v/v). A detecção foi feita em $\lambda = 282$ nm. O diclofenaco e seu padrão interno foram eluídos respectivamente a 3,3 e 6,5 minutos em fluxo de 0,9 ml/min. Os limites de confiança do método foram: 10-10000 ng/ml, linearidade; 1 ng/ml, sensibilidade; 95 %, recuperação relativa e 3,5 e 5,7 %, precisão intra e interdias, respectivamente. Este micrométodo mostrou-se suficientemente sensível, preciso e exato para estudos de disposição cinética e bioequivalência de formulações contendo diclofenaco.

1. Introdução

O diclofenaco de sódio é um antiinflamatório não-esteroidal (AINE) com atividade analgésica e antipirética, derivado do ácido fenil-acético. Corresponde ao sal sódico do ácido [o-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético, apresentando constante de dissociação igual a 4,0 e coeficiente de partição (n-octano) / tampão aquoso, pH 7,4) de 13,4. Sua estrutura química é mostrada na **Figura 1** [19].

Figura 1 Diclofenaco de sódio e seu padrão interno.

O diclofenaco é capaz de suprimir inflamação em vários modelos animais, apresentando potência semelhante à da indometacina, superior à da aspirina, ibuprofeno, naproxeno e fenilbutazona e inferior à do piroxicam. Como analgésico apresenta ação rápida e de longa duração, com potência semelhante à da indometacina e do piroxicam e maior que a da aspirina, ibuprofeno, naproxeno e fenilbutazona. A atividade analgésica do diclofenaco administrado em dose simples

de 150 mg mostrou ser superior à da codeína administrada em dose simples de 60 mg, provavelmente devido ao envolvimento de β -endorfinas na ação analgésica do diclofenaco. A atividade antipirética do diclofenaco em ratos foi superior à da indometacina, ibuprofeno, fenilbutazona e aspirina [19].

Os efeitos farmacológicos do diclofenaco estão relacionados à inibição da síntese de prostaglandinas, através da competição com o ácido araquidônico pela enzima cicloxigenase (**Figura 2**) [18,19].

Figura 2: Cascata do ácido araquidônico e mecanismo de ação do diclofenaco.

Este fármaco é bem absorvido após administração peroral, mas, por sofrer eliminação pré-sistêmica, apenas cerca de 60 % da dose administrada alcançam a

circulação na forma inalterada. É altamente ligado às proteínas plasmáticas (99,5 %) e rapidamente distribuído, penetrando no fluido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatóide de onde é eliminado mais lentamente que no plasma. Sua eliminação se dá principalmente por biotransformação e posterior excreção biliar e urinária dos produtos de biotransformação na forma de conjugados sulfúricos e glicurônicos [18,19].

Em comparação a outros antiinflamatórios não-esteroidais o diclofenaco é bem tolerado, raramente produzindo úlceras gástricas ou outros efeitos colaterais graves. Em vista disso ele é considerado um dos poucos antiinflamatórios não-esteroidais de primeira escolha no tratamento de condições inflamatórias e dolorosas agudas ou crônicas [19].

Vários métodos utilizando diversas técnicas cromatográficas têm sido propostos para a quantificação de diclofenaco em plasma, incluindo-se a cromatografia em camada delgada [16], a cromatografia gás-líquido [1,5,7-11] e a cromatografia líquida de alta eficiência [2,4,6,12-15,17,20-22].

Devido à presença de dois átomos de halogênio na molécula do diclofenaco, a primeira escolha para sua determinação em amostras biológicas recaiu sobre a cromatografia gás-líquido (CG) após derivatização do grupo carboxila por esterificação ou ciclização direta ou indireta (esterificação seguida de ciclização) [3], obtendo-se, respectivamente, ésteres do diclofenaco [1,7,11] ou derivados do tipo indolinonas [5,10] (**Figura 3**). Em geral estes métodos utilizam a detecção por captura de elétrons com detectores de níquel-63 (CG-DCE ^{63}Ni) [5,7], por espectrometria de massa [10,11] ou por ionização de chama [1].

Os métodos utilizando cromatografia gás-líquido mostraram-se bastante sensíveis na quantificação do diclofenaco, especialmente aqueles que empregam detecção por espectrometria da massa [10,11]. Entretanto, por necessitarem de um procedimento laborioso de extração e derivatização do fármaco e por empregarem grandes quantidades de plasma (0,5 a 2,0 ml), estes métodos foram substituídos por outros utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com procedimentos de extração mais simples e sem necessidade de derivatização pré-coluna.

Figura 3. Esterificação (A) e ciclização (B) do diclofenaco.

Em 1980 foi descrito um método utilizando a cromatografia em camada delgada com monitoramento em 290 nm para determinação de diclofenaco em plasma [16].

Os primeiros métodos para a determinação de diclofenaco plasmático utilizando cromatografia líquida de alta eficiência surgiram no início da década de 80 [14,2] e utilizaram extração simples com solvente orgânico em meio ácido para purificação das amostras. A separação foi obtida em coluna cromatográfica de fase reversa tipo C_{18} , utilizando-se detecção ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm [14] ou 215 nm [2]. Em 1985 foi proposto um método com separação em coluna C_8 e detecção em $\lambda = 282$ nm [6]. A partir de então vários outros métodos empregando técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foram propostos para a quantificação do diclofenaco plasmático [4,12,13,15,17,20-22]. A maioria utilizou coluna de fase reversa tipo C_{18} [12,15,17,20,22], mas o uso de colunas de fase reversa tipo C_8 [4] ou NH_2 [13] e de coluna de troca iônica tipo AAX [21] também é reportado. A detecção foi feita no ultravioleta com $\lambda = 254$ nm [12], 275 nm [21], 280 nm [4] ou 282 nm [15,17] ou utilizando-se detectores eletroquímicos [13,22] ou de fluorescência [20].

Devido à boa sensibilidade, à facilidade na purificação das amostras e à necessidade de pequenas quantidades de plasma (50 μ l a 1,0 ml) os métodos de quantificação de diclofenaco plasmático utilizando cromatografia líquida de alta eficiência substituíram atualmente aqueles utilizando cromatografia líquido-gás.

O método desenvolvido no presente trabalho utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção no ultravioleta, em $\lambda = 282 \text{ nm}$, utilizando apenas 200 μl de plasma por ensaio [15].

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é desenvolver um método de determinação de diclofenaco plasmático através de cromatografia líquida de alta eficiência para aplicação em estudos farmacocinéticos.

3. Material e métodos

3.1. Material

Todos os solventes utilizados para extração (diclorometano), cromatografia (acetonitrila) ou preparo de padrões (metanol) foram de grau espectroscópico ou cromatográfico (E. Merck, Grupo Química). Para evaporação dos extratos orgânicos usou-se nitrogênio de pureza 99,99 % (White Martins). As soluções ácidas, básicas, iônicas ou tampões foram preparadas a partir de reagentes pró-análise (grau p.a.). A água destinada tanto à limpeza do cromatógrafo quanto ao preparo de soluções foi filtrada em membrana Millipore® de 0,4 μm , tipo HA.

Para a análise cromatográfica utilizou-se coluna Novapak® C₁₈, Waters - Millipore, de 150 × 3,9 mm e partículas de 4 µm.

O material de vidro usado foi cuidadosamente lavado com detergente e solução sulfocrômica e enxaguado com água destilada. A secagem foi feita em estufa. Imediatamente antes do uso o material foi enxaguado com diclorometano.

Padrões

Usaram-se os seguintes compostos.

- **diclofenaco de sódio** - doado pela Biogalênica - utilizado como padrão para doseamento de diclofenaco em plasma e;
- **ácido-2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propiónico** - doado pela Biogalênica - utilizado como padrão interno no doseamento de diclofenaco em plasma.

Equipamento

Para a cromatografia utilizou-se equipamento Shimadzu constituído por bomba modelo LC-6A controlada por microprocessador modelo SCL-6B, injetor automático modelo SIL-6B, detector de absorvância variável modelo SPD-6AV ($\lambda = 282$ nm) e integrador automático modelo CR-6A.

Para as extrações utilizou-se agitador de tubos Phoenix, modelo AT 56 e centrífuga refrigerada Du Pont, modelo Sorvall® RC-5B. Para a evaporação dos extratos utilizou-se banho-maria Fanem® Ltda. equipado com sistema de evaporação

No preparo da fase móvel usou-se banho de ultrassom Mini-Som Thornton para a desgaseificação.

3.2. Preparação de padrões

Os padrões de diclofenaco em plasma foram preparados a partir de solução metanólica contendo exatamente cerca de 1 mg/ml de diclofenaco. Essa solução foi diluída inicialmente com água e em seguida com plasma branco previamente testado, obtendo-se padrões com as concentrações de 843 ng/ml, 169 ng/ml e 34 ng/ml.

O padrão interno foi preparado por dissolução do ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propiónico em metanol obtendo-se uma solução com concentração de 10 µg/ml.

Tanto os padrões em plasma quanto o padrão interno foram armazenados em congelador a -20°C.

3.3. Determinação de diclofenaco em plasma

A concentração plasmática de diclofenaco em padrões e amostras foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa precedida de extração conforme micrométodo desenvolvido no presente trabalho e já publicado [15].

A integração dos picos do cromatograma foi realizada pelo método da padronização interna utilizando-se como padrão interno (Pi) um análogo estrutural do diclofenaco, o ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propiónico (**Figura 1**).

Procedimento de extração

A purificação de branco, padrões e amostras biológicas foi feita através de extração do diclofenaco plasmático com solvente orgânico em meio ácido. Adicionaram-se volumes de 200 µl de plasma a tubos contendo 50 µl de padrão interno (solução metanólica de ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propiónico a 10 µg/ml) previamente evaporados em corrente de nitrogênio a 37°C. A seguir acidificou-se o plasma com 100 µl de ácido ortofosfórico 2,5 N e extraiu-se-o com 4 ml de diclorometano durante 60 segundos em agitador de tubos. Após centrifugação a 3000 rpm por 20 minutos para quebra da emulsão aspirou-se a fase aquosa e imergiu-se o extrato orgânico remanescente em banho de gelo seco e acetona para congelamento da fase aquosa restante. Decantou-se cuidadosamente o extrato orgânico que, em seguida, foi filtrado em sistema Millipore® com

membrana FHL P 01300 de 0,4 µm, transferido para tubo cônico e evaporado em corrente de nitrogênio a 37°C. Dissolveu-se o resíduo em volumes de 100 a 1000 µl de fase móvel para injeção em CLAE (Esquema analítico).

Esquema analítico. Procedimento de extração para determinação de diclofenaco em plasma.

Condições para cromatografia líquida de alta eficiência

Empregou-se para a separação uma coluna Novapak® C₁₈ de 150 mm de comprimento e 3.9 mm de diâmetro interno contendo partículas de 4 µm e 25000 pratos teóricos. Diariamente, antes do uso, a coluna mantida em metanol e água (75:25 v/v) foi condicionada com acetonitrila seguida de água ultrapura durante 30 minutos.

A fase móvel, constituída por mistura de tampão acetato 0,75 M, pH 5,0 e acetonitrila na proporção de 55:45 (v/v), foi desgaseificada a vácuo em ultrassom antes do uso e bombeada para o sistema cromatográfico em fluxo de 0,9 ml/min. A estabilização do sistema exigiu cerca de 30 min.

3.4. Limites de confiança do método de determinação de diclofenaco em plasma

A curva de calibração foi construída a partir de padrões obtidos pela adição de diferentes quantidades de diclofenaco a branco de plasma. A linearidade foi avaliada utilizando-se ajuste pelo método dos mínimos quadrados e regressão linear. O limite de quantificação do método foi estabelecido após purificação por extração dos padrões utilizados na construção da curva de calibração. A reprodutibilidade foi determinada a partir da precisão intra e interdias. Para a determinação da recuperação relativa da extração, padrões de diclofenaco em

plasma foram extraídos e analisados em CLAE contra injeção direta da mistura de diclofenaco e seu padrão interno. Finalmente a estabilidade dos extratos orgânicos foi avaliada reinjetando-se em CLAE extratos submetidos a diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e congelador a -20°C).

4. Resultados

O diclofenaco e o padrão interno apresentaram boa separação entre si e também dos componentes do plasma. Os tempos de retenção foram de 3,3 e 6,5 minutos respectivamente para o diclofenaco e o padrão interno, correspondendo a volumes de retenção de 3,0 e 5,9 ml (**Figura 4**).

Figura 4: Perfil cromatográfico do diclofenaco e seu padrão interno. A: plasma branco + padrão interno; B: padrão (plasma branco + 10 ng diclofenaco/ml) + padrão interno; C: plasma de voluntário após administração peroral de diclofenaco de sódio + padrão interno. 1: diclofenaco; 2: padrão interno.

O limite de quantificação do método foi de 1 ng/ml. Obteve-se uma relação linear entre as concentrações de 10 e 10000 ng/ml (Figura 5). O coeficiente de variação foi de 3,5 % para amostras analisadas no mesmo dia e de 5,7 % para amostras analisadas em dias diferentes. A recuperação relativa da extração foi de 95 % (Tabela 1).

CURVA DE CALIBRAÇÃO DO DICLOFENACO

Figura 5: Curva de calibração do diclofenaco em plasma.

Tabela 1. Limites de confiança do método de determinação de diclofenaco em plasma.

Parâmetro	Unidade	Valor
limite de quantificação	ng/ml	1
linearidade	ng/ml	10-10000
recuperação da extração	%	95
reprodutibilidade		
intradia	%	3.5
interdias	%	5.7

Os extratos orgânicos não reconstituídos com fase móvel mantêm-se estáveis por quatro dias quando conservados em congelador a -20°C e os extratos reconstituídos mantêm-se estáveis por dois dias quando conservados a -20°C e por 24 horas quando conservados à temperatura ambiente.

5. Discussão

A grande vantagem do método de determinação de diclofenaco em plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) aqui apresentado [15] em relação aos anteriormente descritos na literatura [2,4,6,12-14,17,20-22] consiste na pequena quantidade de plasma, apenas 200 µl, necessária para a análise quantitativa do fármaco, enquanto a maioria dos métodos utilizou 0,5 ml [4,13,17,21,22] ou 1,0 ml [2,6] de plasma por ensaio. Outros autores descrevem

ainda métodos utilizando volumes de plasma inferiores a 0,5 ml: 200 μ l [12], 100 μ l [14] ou 50 μ l [20]. Entretanto, nenhum destes métodos utilizando microvolumes de plasma apresentou sensibilidade comparável àquela do método aqui apresentado. Enquanto o presente método permitiu a quantificação de amostras contendo até 1 ng/ml de diclofenaco, os três métodos anteriormente referidos apresentaram limites de quantificação de, respectivamente, 0,4 μ g/ml [12], 10 μ g/ml [14] e 6 ng/ml [20] sendo que apenas este último apresentou sensibilidade suficiente para estudos farmacocinéticos.

Alguns dos métodos de determinação de diclofenaco em plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência descritos na literatura propõem, para purificação das amostras, apenas a precipitação de proteínas com acetonitrila [4,12,20]. Este procedimento, apesar de simples e rápido, não é eficiente na remoção de componentes endógenos presentes no material biológico e sua utilização pode levar a um bloqueio por entupimento do sistema de injeção do cromatógrafo, além de encurtar a vida útil da coluna cromatográfica. Outros autores propõem a extração do diclofenaco com solvente orgânico em meio ácido, utilizando benzeno [13,21], clorofórmio [14], diclorometano [15,22] ou ainda mistura de hexano e álcool isopropílico na proporção de 9:1 (v/v) [2,6]. O solvente adotado no método aqui descrito foi o diclorometano, que, além de ser mais eficiente que o benzeno na extração do diclofenaco, apresenta a vantagem de um menor ponto de ebulição, resultando em evaporação mais rápida dos extratos orgânicos com consequente diminuição do consumo de nitrogênio e do tempo de evaporação.

Como acidificante do meio de extração reporta-se a utilização de vários ácidos, como o ácido ortofosfórico 1 M [22] ou 2,5 N [2,6,13] e o ácido clorídrico 0,3 N [21] ou 0,1 N [14] em quantidades variando entre 0,5 e 4 ml. O método aqui descrito [15] utiliza apenas 100 µl de ácido ortofosfórico 2,5 N, o que permite a obtenção de extratos em faixa mais branda de pH, resultando em prolongamento da vida útil da coluna de cromatografia sem prejuízo da recuperação de diclofenaco na extração.

Entre os métodos descritos para determinação de diclofenaco em plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), apenas dois propõem procedimentos para purificação das amostras que não a extração simples do diclofenaco com solvente orgânico. Um deles é o método descrito por Plavsic e Culig [13], que propõem extração tripla, sendo duas extrações em meio ácido intercaladas por uma em meio básico, num procedimento bastante laborioso e semelhante ao descrito por Geiger e colaboradores [5] para determinação de diclofenaco plasmático através de cromatografia gas-líquido. O outro é o método descrito por Sioufi e colaboradores [17], que propõem a extração em coluna C₁₈ utilizando sistema automatizado de análise. A extração simples desenvolvida no presente trabalho e aqui descrita [15] demonstrou ser suficiente para extrair diclofenaco de amostras de plasma com uma boa recuperação e sem interferência analítica dos componentes endógenos presentes em amostras purificadas apenas por precipitação das proteínas do plasma com acetonitrila [4,12,20].

A grande maioria dos métodos referidos [2,12,14,15,17,20,22] propõe a utilização de coluna cromatográfica de fase reversa, tipo C₁₈, para separação do diclofenaco e seu padrão interno dos componentes endógenos. Entretanto outras

colunas de fase reversa também têm sido usadas para esta separação, tais como a RP-C₈ [4,6] e a Lichrosorb® NH₂ [13]. Reporta-se ainda a utilização da coluna Permaphase® AAX, de troca iônica [21]. Entre as fases móveis refere-se a utilização de misturas de acetonitrila e água ou tampões, contendo de 32 a 50 % de acetonitrila [4,12,13,15,20,22], de metanol, acetonitrila e tampão acetato 0,02 M (25:20:55, v/v) [2], de etanol e água (1:2, v/v) [14] ou de metanol e tampão fosfato, contendo de 56 a 60 % do solvente orgânico [6,17] para cromatografia de fase reversa e de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0, contendo 0,02 mol de nitrato de sódio para cromatografia de troca iônica [21]. A utilização de coluna Novapak® C₁₈ e fase móvel constituída por mistura de tampão acetato 0,75 M, pH 5,0 e acetonitrila (55:45, v/v) para separação do diclofenaco e seu padrão interno dos componentes endógenos no método aqui descrito mostrou ser uma boa escolha em virtude da alta seletividade alcançada.

Finalmente, a maioria dos métodos referidos utiliza detecção no ultravioleta nos comprimentos de onda de 215 nm [2], 254 nm [12,14], 275 nm [21], 280 nm [4] ou 282 nm [6,15,17]. O espectro do diclofenaco no ultravioleta apresenta dois picos de absorbância, em 215 e em 278 nm. Assim, os métodos mais sensíveis são aqueles que utilizam comprimentos de onda próximos a estes. Reporta-se também o uso de detectores eletroquímicos [13,22] ou de fluorescência [20]. Neste último caso o diclofenaco sofre derivatização pós-coluna originando um derivado fluorescente. O método aqui descrito utiliza detecção em $\lambda = 282$ nm, obtendo boa sensibilidade e seletividade.

Em conclusão, o procedimento analítico aqui apresentado para a quantificação de diclofenaco em plasma mostrou-se seletivo, sensível, linear na

faixa de estudo, com boa recuperação da extração e precisão das medidas, possibilitando estudos farmacocinéticos e de bioequivalência de formulações.

6. Referências bibliográficas*

1. BROMBACHER, P.J., CREMERS, H.M.H.G., VERHEESEN, P.E., QUANJEL-SCHREURS. Quantitative determination of sodium-o-[(2,6-dichlorophenyl)-amino]phenylacetate (diclofenac) in human blood plasma or serum *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, v. 27, n. 8, p. 1597-1599, 1977.
2. CHAN, K.K.H., VYAS, K.H., WNUCK, K. A rapid and sensitive method for the determination of diclofenac sodium in plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal. Lett.*, New York, v. 15, n. B21/22, p. 1649-1663, 1982.
3. DEGEN, P.H. The assay of diclofenac and metabolites: a review. *Methodol. Surv. Biochem. Anal.*, New York, v. 18, p. 107-114, 1988.

*De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

4. EL-SAYED, Y M., ABDEL-HAMEED, M.E., SULEIMAN, M S., NAJIB, N M. A rapid and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in serum and its use in pharmacokinetic studies. **J. Pharm. Pharmacol.**, London, v 40, p. 727-729, 1988.
5. GEIGER, U.P., DEGEN, P.H., SIOUFI, A. Quantitative assay of diclofenac in biological material by gas-liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 111, p. 293-298, 1975.
6. GODBILLON, J., GAURON, S., METAYER, J.P. High performance liquid chromatographic determination of diclofenac and its monohydroxilated metabolites in biological fluids. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 338, p. 151-159, 1985.
7. IKEDA, M., KAWASE, M., HIRAMATSU, M., HIROTA, K., OHMORI, S. Improved gas chromatographic method of determining diclofenac in plasma. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 183, p. 41-47, 1980.
8. IKEDA, M., KAWASE, M., KISHIE, T., OHMORI, S. Supplementary data for improved gas chromatographic method of determining diclofenac in plasma - behavior of the methyl ester and the indolone derivative of diclofenac in gas-liquid chromatography with electron-capture detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v 223, p. 486-491, 1981.

9. JACK, D.B., WILLIS, J.V. Comments to the article "Improved gas chromatographic method of determining diclofenac in plasma". *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 223, p. 484-485, 1981.
10. KADOWAKI, H., SHIINO, M., UEMURA, I. Sensitive method for the determination of diclofenac in human plasma by gas-chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 308, p. 329-333, 1984.
11. MÖLLER, H., STÜBER, W., DING, R. Bioverfügbarkeit, in vivo- und in vitro-Freisetzung von oralen diclofenac-retardformen - 1. Mitteilung. *Pharm. Ztg.*, Frankfurt, v. 129, n. 41, p. 2387-2392, 1984.
12. OWEN, S.G., ROBERTS, M.S., FRIESEN, W.T. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 416, p. 293-302, 1987.
13. PLAVSIC, F., CULIG, J. Determination of serum diclofenac by high-performance liquid chromatography by electromechanical detection. *Hum. Toxicol.*, Basingstoke, v. 4, p. 317-322, 1985.
14. SAID, S.A., SHARAF, A.A. Pharmacokinetics of diclofenac using a developed HPLC method. *Arzneim. Forsch.*, Aulendorf, v. 31, n. 12, p. 2089-2092, 1981.
15. SANTOS, S.R.C.J., DONZELLA, H., BERTOLINE, M.A., PEREIRA, M.D., OMOSAKO, C.E., PORTA, V. Simplified micromethod for the HPLC

measurement of diclofenac in plasma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v 25, p. 125-128, 1992.

16. SCHUMACHER, A., GEISLER, H.E., MUTSCHLER, E. Quantitative Bestimmung von Diclofenac-Natrium aus Plasma durch Absorptionsmessung mit Hilfe der direkten Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 181, p. 512-515, 1980.
17. SIOUFI, A , RICHARD, J , MANGONI, P , GODBILLON, J. Determination of diclofenac in plasma using a fully automated analytical system combining liquid-solid extraction with liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v 565, p. 401-407, 1991.
18. SMALL, R.E. Diclofenac sodium. **Clin. Pharm.**, Bethesda, v. 8, p.545-558, 1989.
19. TODD, P.A., SORKIN, E.M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, Auckland, v.35, p.244-285, 1988.
20. WIESE, B., HERMANSSON, J. Bioanalysis of diclofenac as its fluorescent carbazole acetic acid derivative by a post-column photoderivatization high-performance liquid chromatographic method. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 567, p. 175-183, 1991.
21. YAGINUMA, H., NAKATA, T., TOYA, H., MURAKAMI, T., YAMAZAKI, M., KAMADA, A. Rectal delivery of antiinflammatory drugs. I. The

influence of antiinflammatory drugs on rectal absorption of β -lactam antibiotics. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 29, n 10, p 2974-2982, 1981.

22. ZECCA, L., FERRARIO, P Determination of diclofenac in plasma and synovial fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 495, p. 303-308, 1989.

Abstract

Diclofenac sodium is a non-steroid anti-inflammatory agent which shows a high degree of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity. It inhibits prostaglandin biosynthesis *in vitro* and *in vivo*, and this inhibitory effect at least partly explains the mechanism of action of the drug. Several methods have been described for the determination of diclofenac in human plasma or serum, including gas chromatography with electron-capture or flame ionization detection, gas-chromatography-mass spectrometry, and high-performance liquid chromatography with UV-detection. We describe a rapid, sensitive and specific procedure for the determination of diclofenac in plasma, using only 200 μ l of biological sample, involving single extraction and high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-detection. An extraction with dichlormethane was performed by adding 200 μ l of plasma to a test tube containing 500 ng internal standard (2-(p-ciclohexen-1'-fenil)propionic acid) and 100 μ l 2,5 N phosphoric acid. HPLC grade dichlormethane (4 ml) was added and the mixture was agitated with a vortex mixer and centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes. The aqueous phase was discarded and the organic phase filtered through a 0,4 μ m FHLP 01300 Millipore[®] filter and evaporated in a stream of nitrogen at 37°C. The residue was dissolved in 100-1000 μ l mobile phase and injected into the liquid chromatograph. Analytical separation was performed in an isocratic system on a reverse-phase column (Novapak[®] C₁₈, 150 $\times$ 3,9 mm, 4 μ m). The mobile phase was 0,75 M acetate buffer, pH 5,0 and acetonitrile (55:45, v/v). Peaks were monitored at λ = 282 nm. Diclofenac and its internal standard were eluted at 3,3 and 6,5 minutes, respectively, at a flow rate of 0,9 ml/min. Confidence limits for diclofenac measurements in plasma were: 10-10000 ng/ml, linearity; 1 ng/ml, sensitivity; 95 %, relative recovery, and intra and interassay precision of 3,5 and 5,7 %, respectively. This micromethod proved to be sufficiently sensible, precise and accurate for kinetic disposition or bioequivalence studies.

Bioequivalência de formulações contendo diclofenaco de sódio

Capítulo II

Índice

Resumo	p. 31
1. Introdução	p. 32
2. Objetivo	p. 39
3. Material e métodos	p. 40
3.1. Protocolo de estudo	p. 40
3.1.1. Casuística	p. 40
3.1.2. Administração do fármaco	p. 40
3.1.3. Coleta e armazenamento de amostras	p. 42
3.2. Procedimento analítico	p. 42
3.3. Cálculos e análise estatística	p. 44
3.3.1. Cálculos	p. 44
3.3.2. Análise estatística	p. 47
4. Resultados	p. 48
5. Discussão	p. 69
6. Conclusões	p. 72

Resumo

Estudou-se a biodisponibilidade do diclofenaco nos produtos Voltaren® 50 (A), Voltaren Retard® 100 (B) e Artren® 100 (C) após administração de dose única peroral de um comprimido a oito voluntários de ambos os sexos, adultos e saudáveis. As formulações foram administradas seguindo protocolo de estudo estabelecido por sorteio. Os voluntários em jejum receberam os medicamentos em dose única pela manhã e as amostras de sangue foram colhidas 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas após a administração. A concentração plasmática de diclofenaco foi determinada por técnica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa com detecção no ultravioleta em $\lambda = 282$ nm após extração com solvente orgânico em meio ácido. Com base nas curvas "concentração plasmática (C) vs tempo" e "logC vs tempo" foram determinados os parâmetros da fase absorptiva para os três produtos, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$: $C_{\max} = 741 \pm 137$ ng/ml e $t_{\max} = 2,6 \pm 0,4$ h para o produto A, $C_{\max} = 1399 \pm 326$ ng/ml e $t_{\max} = 2,4 \pm 0,2$ h para o produto B, $C_{\max} = 192 \pm 70$ ng/ml e $t_{\max} = 2,3 \pm 0,2$ h para o produto C. Os valores de AUC_T , calculados pelo método dos trapezóides e extrapolação a infinito, foram, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$: 1603 ± 253 ng·h/ml para o produto A, 3177 ± 606 ng·h/ml para o produto B, 2237 ± 529 ng·h/ml para o produto C. A extensão da biodisponibilidade (EBA) do diclofenaco nos produtos Voltaren® 50 (A) e Artren® 100 (C) foi calculada usando-se como referência o produto Voltaren Retard® 100 (B). Foram obtidos os seguintes valores, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$ (mediana): 138 ± 35 (123) % para o produto A, 102 ± 35 (68) % para o produto C. A partir dos resultados obtidos sugere-se que o produto B, citado como de liberação prolongada e usado como referência neste trabalho, apresentou características de rápida liberação, semelhantes às do produto A, sugerindo possível falha de impermeabilização no revestimento dos núcleos contendo diclofenaco de sódio durante o processamento industrial do lote do qual provieram os comprimidos aqui avaliados.

1. Introdução

O diclofenaco de sódio é um antiinflamatório não-esteroidal derivado do ácido fenil-acético, cuja estrutura química é indicada na **Figura 1**.

Figura 1: Diclofenaco de sódio.

Para exercer atividade, um antiinflamatório não-esteroidal deve apresentar pKa entre 4 e 5, coeficiente de partição ao redor de 10 e dois anéis aromáticos em planos diferentes um em relação ao outro. O diclofenaco apresenta todas estas propriedades [25].

O diclofenaco exerce sua ação farmacológica por inibição reversível da enzima cicloxigenase (**Figura 2**), o que resulta em diminuição da formação de prostaglandina E_2 , prostaglandina $F_{2\alpha}$, prostaciclina e tromboxana A_2 . Inibindo a produção destas prostaglandinas o diclofenaco reduz a inflamação, o inchaço e a dor que acompanham a artrite [25]

Figura 2: Cascata do ácido araquidônico e mecanismo de ação do diclofenaco.

Além de atividade antiinflamatória o diclofenaco apresenta também atividade analgésica e antipirética [12,25].

Este fármaco mostrou eficácia no tratamento de pacientes com artrite reumatóide [3,4], osteoartrite [7] e outros estados inflamatórios de origem reumática ou não [28].

No tratamento de pacientes com artrite reumatóide o diclofenaco foi mais eficiente que a aspirina e o diflunisal e equivalente à indometacina [7,18,26], ao sulindaco, ao ibuprofeno [13], ao naproxeno, e ao quetoprofeno. Em pacientes portadores de osteoartrite o diclofenaco foi mais eficiente que a aspirina e o

ibuprofeno; equivalente ao diflunisal, à indometacina, ao sulindaco, ao naproxeno, ao quetoprofeno, ao flurbiprofeno, ao carprofeno e ao ácido mefenâmico e inferior ao piroxicam. O diclofenaco mostrou-se tão eficiente quanto a fenilbutazona e a indometacina no tratamento de pacientes com gota aguda [25,28].

O diclofenaco é usado como analgésico no alívio da dor em cólicas renais ou biliares, dismenorréia, enxaqueca e estados pós-cirúrgicos [25,28]. É usado também no alívio de dores de pacientes com câncer sendo, nestes casos, tão eficiente quanto o naproxeno [30] e mais eficiente que alguns analgésicos narcóticos [28]. A concentração plasmática de β -endorfinas em pacientes que receberam diclofenaco aumenta cerca de quatro vezes quando comparada à de pacientes que receberam placebo. Este fato pode explicar a potente atividade analgésica deste antiinflamatório [25].

O diclofenaco produz menos efeitos colaterais que a aspirina [29], o diflunisal, a indometacina [3,7,18,26], o ibuprofeno, a fenilbutazona [26] e é equivalente ao naproxeno [5,29], ao quetoprofeno, ao flurbiprofeno, ao carprofeno, ao ácido mefenâmico e ao piroxicam [25,28].

Devido às excelentes atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética e ao fato de ser bem tolerado, raramente produzindo ulcerações gastrointestinais e outros efeitos colaterais graves, o diclofenaco é hoje considerado um dos poucos antiinflamatórios de primeira escolha no tratamento de pacientes portadores de condições inflamatórias dolorosas, agudas ou crônicas [28].

O diclofenaco é rapidamente absorvido quando administrado por via peroral na forma de comprimidos de revestimento entérico, alcançando seu pico de

concentração plasmática 1,5 a 2,5 horas após a administração. A presença de alimento prolonga o tempo de absorção sem, no entanto, alterar a extensão da absorção [31,32]. Também é absorvido quando administrado por via retal ou cutânea. O diclofenaco sofre biotransformação pré-sistêmica, com cerca de 60 % da dose administrada alcançando a circulação sanguínea na forma inalterada [25,28]. É um fármaco altamente ligado às proteínas plasmáticas (99,7 %), principalmente à albumina [6,24]. É capaz de penetrar no fluido sinovial, de onde é eliminado mais lentamente que no plasma, o que explica seu prolongado tempo de ação, apesar da curta meia-vida plasmática [6,28]. Atravessa a placenta de ratos e camundongos e pode ser encontrado em leite humano, mesmo quando administrado em doses terapêuticas [28]. É eliminado principalmente por biotransformação, sofrendo fundamentalmente processo de oxidação em várias posições do seu anel e subsequente conjugação, originando glicuronatos e sulfatos que são excretados na urina e na bile [28]. Dentre os produtos de biotransformação oxidados destacam-se os derivados hidroxilados 3'-hidroxiclofenaco, 4'-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco e 4',5-di-hidroxiclofenaco que possuem atividade antiinflamatória desprezível quando comparados ao diclofenaco inalterado. Sua meia-vida de eliminação plasmática varia entre 1,2 e 1,8 h [25,28].

O diclofenaco é encontrado em diversas formas farmacêuticas, entre as quais destacam-se comprimidos de revestimento entérico, comprimidos ou cápsulas de liberação prolongada, supositórios e injeções intramusculares [16,28].

Por ser um fármaco de primeira escolha no tratamento de pacientes portadores de doenças inflamatórias de origem reumática, sendo administrado cronicamente nestes casos, e devido à grande variedade de especialidades

farmacêuticas contendo diclofenaco de sódio existentes no mercado, torna-se importante avaliar a possibilidade de se substituir uma formulação por outra, sem prejuízo do tratamento. Usa-se o termo "bioequivalentes" para designar duas formulações contendo o mesmo princípio ativo e que, quando administradas, são absorvidas de forma igual pelo paciente, isto é, apresentam a mesma velocidade de absorção e a mesma extensão da absorção. Estas duas características da absorção de um fármaco a partir de uma determinada forma farmacêutica, a velocidade e a extensão, determinam a biodisponibilidade deste fármaco naquela forma farmacêutica. Assim, podemos afirmar que duas formulações são bioequivalentes quando o fármaco nelas contido apresenta a mesma biodisponibilidade [9]

Vários fatores interferem na absorção de fármacos pelo organismo, sendo responsáveis, portanto, por alterações na biodisponibilidade destes fármacos. Entre estes fatores podemos citar aqueles relacionados ao fármaco propriamente dito, aqueles relacionados à forma farmacêutica e aqueles relacionados ao organismo do paciente. Com relação ao fármaco, os fatores que podem alterar sua absorção pelo organismo são a solubilidade (e sua dependência ao pH), a constante de dissociação (pK), a lipofilicidade, a massa molecular, o tipo e tamanho de partículas e a estabilidade química e enzimática (indicando se o fármaco sofre ou não metabolismo pré-sistêmico), entre outros. Tomando-se a forma farmacêutica temos que a biodisponibilidade depende do transporte gastrointestinal desta forma farmacêutica e também da sua cinética de dissolução. Finalmente, a biodisponibilidade pode ser alterada por inúmeros fatores relacionados ao organismo do paciente, entre os quais estão o pH do trato gastrointestinal, a atividade das enzimas do trato gastrointestinal, a motilidade intestinal, a

constituição da flora intestinal, o fluxo sanguíneo, a presença ou ausência de alimento no trato gastrointestinal, a idade do paciente e a presença de patologias [15]

Embora pouco possa ser feito para alterar propriedades físico-químicas dos fármacos ou fatores metabólicos ou fisiológicos relacionados ao paciente que sejam desfavoráveis a uma boa biodisponibilidade, o mesmo não ocorre com as formas farmacêuticas. Durante a última década observou-se uma maior conscientização sobre o papel da forma farmacêutica na biodisponibilidade e eficácia clínica dos fármacos levando, conseqüentemente, à obtenção de melhores formas farmacêuticas [9]. Existem diversas razões para a bioinequivalência entre formulações, incluindo diferenças no processo de produção e nos excipientes. Um produto pode conter cerca de 30 ingredientes inativos, entre conservantes, corantes, agregantes e outros e qualquer um deles pode afetar de forma importante a biodisponibilidade do fármaco [14]

Devido à importância da formulação para a biodisponibilidade de um fármaco, a F.D.A. (Food and Drug Administration) passou a exigir testes de bioequivalência para novas formas farmacêuticas a serem introduzidas no mercado americano. Um teste de bioequivalência consiste geralmente em comparações entre a área sob a curva "concentração plasmática vs tempo" do fármaco, concentração máxima e tempo necessário para atingir concentração máxima após administração de dose única do produto teste e do produto referência, em estudo aleatório cruzado em voluntários sadios [9].

Recentemente têm havido tentativas de se estabelecer testes de dissolução *in vitro* como uma alternativa aos testes de bioequivalência, que são realizados *in vivo*, embora não existam evidências de que os testes de dissolução possam garantir a bioequivalência entre duas formulações [9]. Especificamente em relação ao diclofenaco, Terhaag e colaboradores relatam a comparação entre cinco supositórios através de teste de dissolução *in vitro* e através de teste de bioequivalência [27]. Os autores conseguem estabelecer uma correlação entre o tempo necessário para liberação de 63,2 % do diclofenaco contido nos supositórios no teste *in vitro* e os valores de concentração máxima e tempo necessário para atingir a concentração máxima *in vivo*, sugerindo que o comportamento desse fármaco, em supositórios, *in vivo* pode ser previsto a partir de estudos de dissolução *in vitro*. Por outro lado, Möller, em estudo semelhante, descreve a comparação entre duas formas farmacêuticas de liberação prolongada também através de teste de dissolução *in vitro* e através de teste de bioequivalência [15]. Foram comparados comprimidos de liberação prolongada e cápsulas contendo microgrânulos de liberação prolongada. No teste de dissolução *in vitro* o diclofenaco das cápsulas contendo microgrânulos de liberação prolongada foi completamente liberado em cinco horas, enquanto que apenas 50 % do diclofenaco dos comprimidos foi liberado em 12 horas. No teste de bioequivalência a liberação de diclofenaco a partir das duas formas farmacêuticas foi comparável. Assim, enquanto que o teste *in vitro* revelou diferença de disponibilidade entre as duas formulações, o mesmo não ocorreu no teste *in vivo*, no qual as duas formulações se mostraram bioequivalentes. Essa diferença pode ser explicada em função do transporte das formas farmacêuticas ao longo do trato gastrointestinal. A liberação *in vivo* do diclofenaco de microgrânulos de liberação prolongada é amplamente

influenciada pelo esvaziamento gástrico. Os microgrânulos presentes no estômago passam gradualmente para o intestino ao longo de um período de cinco horas ($t(1/2) = 2,5 \text{ h}$) e, uma vez no intestino, alcançam as condições de pH necessárias à liberação do diclofenaco. Durante a passagem pelo intestino delgado que, no caso dos microgrânulos, demora de quatro a cinco horas, o fármaco é liberado e absorvido. A passagem dos microgrânulos para o intestino delgado em função do tempo de esvaziamento gástrico não é simulada no teste *in vitro*. Isto explica por que a liberação *in vivo* ocorre com considerável atraso em relação à liberação *in vitro*.

Atualmente os testes de dissolução não são capazes de reproduzir *in vitro* todos os fatores que, *in vivo*, são responsáveis por alterações na biodisponibilidade de um fármaco. Assim, embora sejam importantes para garantir a uniformidade entre lotes de um determinado produto e também para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas [11], os testes de dissolução não devem ser considerados substitutos para os testes de bioequivalência.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar a existência ou não de bioequivalência entre duas formulações teste contendo diclofenaco de sódio frente a uma formulação referência.

3. Material e métodos

3.1. Protocolo de estudo

3.1.1. Casuística

O estudo aleatório cruzado foi desenvolvido em oito voluntários sadios de ambos os sexos com idade variando entre 19 e 41 anos e pesando de 55 a 80 kg (Quadro a.1, Apêndice). Os voluntários foram informados em detalhes sobre o estudo e forneceram o consentimento de participação por escrito (**Consentimento de Participação Pós-informação, Apêndice**). Nenhum deles tomou qualquer medicação nas três semanas que precederam o estudo.

3.1.2. Administração do fármaco

A biodisponibilidade das formulações estudadas foi determinada em três fases (Fases I, II e III), intercaladas por períodos de uma semana para eliminação

completa do fármaco do organismo, conforme o esquema a seguir:

Fase I	Fase II	Fase III
1ª semana	2ª semana	3ª semana
1º dia Produto A, B ou C	1º dia Produto B, C ou A	1º dia Produto C, A ou B

Produto A: Voltaren[®] Geigy - comprimidos com revestimento entérico contendo 50 mg de diclofenaco de sódio por comprimido; formulação teste 1 ou T₁.

Produto B: Voltaren Retard[®] Geigy - comprimidos de liberação prolongada contendo 100 mg de diclofenaco de sódio por comprimido; formulação referência ou R.

Produto C: Artren[®] Merck - cápsulas gelatinosas duras com microgrânulos de liberação prolongada contendo 100 mg de diclofenaco de sódio por comprimido; formulação teste 2 ou T₂.

A bioequivalência foi avaliada sempre entre uma formulação teste e a formulação referência.

Os produtos A, B ou C foram administrados aos voluntários em jejum em dose única peroral de um comprimido pela manhã, acompanhado por 100 ml de água. Os voluntários receberam desjejum, almoço e lanche padronizados

respectivamente 3, 5 e 8 horas após a administração do medicamento. Depois disso, seguiram uma dieta normal.

A ordem de administração das três formulações a cada voluntário foi estabelecida por sorteio (Quadro a.2, Apêndice).

3.1.3. Coleta e armazenamento de amostras

Foram coletadas amostras de sangue 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas após a administração do diclofenaco nas três fases. Esta coleta foi feita com seringas plásticas descartáveis mantendo-se a veia dos voluntários com Butterfly® Abbott heparinizado. O plasma foi separado por centrifugação e mantido em congelador a -20°C até a execução da análise.

3.2. Procedimento analítico

As amostras de sangue foram ensaiadas em duplicata paralelamente a padrões em três concentrações em triplicata, conforme método descrito anteriormente no Capítulo I (Esquema analítico) [23]

Esquema analítico: Micrométodo para determinação de diclofenaco em plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.3. Cálculos e análise estatística

3.3.1 Cálculos

A bioequivalência das formulações teste contendo diclofenaco de sódio frente à referência foi avaliada com base nos seguintes parâmetros farmacocinéticos [9,21]:

- C_{max} : concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração peroral. É obtida a partir da curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)";

- t_{max} : tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco atinja o valor de C_{max} . Também é obtido a partir da curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)";

- AUC_T : área sob a curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)", calculada da seguinte forma:

$$AUC_T = AUC_{0-24} + AUC_{24-\infty} \quad (\text{ng} \cdot \text{h/ml})$$

onde:

AUC_{0-24} = área sob a curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)" no intervalo de 0 a 24 horas, calculada pelo método dos trapezóides através da equação.

$$AUC_{0-24} = \sum AUC_{\text{intervalo}}$$

e:

$$AUC_{\text{intervalo}} = \frac{(t_2 - t_1)(C_1 + C_2)}{2}$$

t_1 = instante inicial do intervalo em que se quer determinar AUC;

t_2 = instante final do intervalo em que se quer determinar AUC;

C_1 = concentração plasmática de diclofenaco em t_1 e;

C_2 = concentração plasmática de diclofenaco em t_2 .

e:

$AUC_{24-\infty}$ = área sob a curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h) no intervalo de 24 h a ∞ , calculada por extrapolação até infinito através da equação:

$$AUC_{24-\infty} = \frac{C_{24}}{\beta}$$

C_{24} = concentração plasmática de diclofenaco em t=24 h e;

β = constante de velocidade de eliminação, calculada através da fórmula:

$$\beta = \frac{0,693}{t(1/2)_{\beta}} \quad (h^{-1})$$

$t(1/2)_{\beta}$ = meia-vida de eliminação do diclofenaco, que corresponde ao tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco se reduza em 50 %. É obtida graficamente a partir da curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)".

Também determinou-se a extensão da biodisponibilidade (**EBA**) dos produtos teste em relação ao produto referência. A extensão da biodisponibilidade é expressa em porcentagem e calculada através da equação:

$$EBA = \frac{AUC_{Tt}}{AUC_{Tr}} \times \frac{D_r}{D_t} \times 100$$

AUC_{Tr} = AUC_T do produto usado como referência;

AUC_{Tt} = AUC_T do produto teste;

D_r = dose do fármaco no produto referência e;

D_t = dose do fármaco no produto teste.

3.3.2. Análise estatística

Os resultados para os parâmetros t_{max} , C_{max} e AUC_T nas três fases do estudo foram comparados através de testes paramétricos (análise de variância - ANOVA "two-way" e teste de Friedman) e testes não-paramétricos (teste de Wilcoxon) [22]. Utilizaram-se na análise de variância os valores obtidos para t_{max} , C_{max} e AUC_T bem como a transformação logarítmica de C_{max} e AUC_T , isto é, $\ln C_{max}$ e $\ln AUC_T$. A variação entre indivíduos, ou efeito indivíduo, foi obtida através da comparação de linhas na análise de variância, enquanto que a variação entre formulações, ou efeito formulação, foi obtida através da comparação de colunas. Nos testes de Friedman e Wilcoxon utilizaram-se os valores obtidos para t_{max} , C_{max} e AUC_T .

4. Resultados

A partir das concentrações plasmáticas de diclofenaco nas amostras de sangue provenientes dos voluntários foram construídas as curvas de decaimento plasmático do diclofenaco (concentração plasmática vs tempo) para cada voluntário e para cada formulação. As curvas individuais dos oito voluntários, acompanhadas dos valores dos parâmetros farmacocinéticos mais importantes para cada uma das três formulações, estão ilustradas no **Apêndice**. As curvas médias e medianas de decaimento plasmático do diclofenaco para cada formulação podem ser vistas nas **Figuras 3, 4 e 5** respectivamente para a formulação A (Voltaren® 50, teste 1 ou T₁), a formulação B (Voltaren Retard® 100, referência ou R) e a formulação C (Artren® 100, teste 2 ou T₂).

A **Figura 6** permite comparar o decaimento plasmático médio do diclofenaco após a administração de cada formulação a voluntários sadios, enquanto que a **Figura 7** permite uma comparação das medianas.

CURVA DAS MEDIAS E MEDIANAS

Voltaren[®] 50

Figura 3: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de Voltaren[®] 50 a voluntários sadios (n = 8) - média e mediana.

CURVA DAS MEDIAS E MEDIANAS Voltaren[®] 100

Figura 4: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de Voltaren Retard[®] 100 a voluntários sadios (n = 8) - média e mediana.

CURVA DAS MEDIAS E MEDIANAS

Artren^R 100

Figura 5: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de Artren[®] 100 a voluntarios sadios (n = 8) - média e mediana.

	t_{max} h	C_{max} $\mu\text{g/ml}$	AUC_t $\mu\text{g.h/ml}$
VOLTAREN ^R 50	2,6	741	1603
VOLTAREN ^R 100	2,4	1399	3177
ARTREN ^R	2,3	192	2237

Figura 6: Curvas médias de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio a voluntários sadios (n = 8).

	t_{max} h	C_{max} $\mu\text{g/ml}$	AUC_T $\mu\text{g.h/ml}$
VOLTAREN ^R 50	2,5	746	1666
VOLTAREN ^R 100	2,0	1215	3081
ARTREN ^R	2,0	124	1559

Figura 7: Curvas medianas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio a voluntários sadios (n = 8).

As Figuras 8, 9 e 10 ilustram os valores das médias, acompanhados do respectivo erro padrão da média (EPM), e das medianas dos parâmetros $t_{\max}$, $C_{\max}$ e AUC_T respectivamente, obtidos a partir das curvas "concentração plasmática vs tempo" da população de voluntários investigada após administração das três formulações.

Figura 8: Valores das médias, acompanhados do respectivo erro padrão da média, e das medianas do parâmetro $t_{\max}$ após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio a voluntários sadios ($n = 8$). A: Voltaren[®] 50; B: Voltaren Retard[®] 100; C: Artren[®] 100.

Figura 9: Valores das médias, acompanhados do respectivo erro padrão da média, e das medianas do parâmetro C_{max} após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio a voluntários sadios ($n = 8$). A: Voltaren[®] 50; B: Voltaren Retard[®] 100; C: Artren[®] 100.

Figura 10: Valores das médias, acompanhados do respectivo erro padrão da média, e das medianas do parâmetro AUC_T após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio a voluntários sadios (n = 8). A: Voltaren[®] 50; B: Voltaren Retard[®] 100; C: Artren[®] 100.

A bioequivalência das formulações teste (Voltaren® 50 ou T₁ e Artren® 100 ou T₂) em relação à referência (Voltaren Retard® 100) foi avaliada comparando-se as formulações duas a duas (teste contra referência), com base nos parâmetros t_{max}, C_{max} e AUC_T.

O estudo de bioequivalência entre as formulações A (Voltaren® 50 ou T₁) e B (Voltaren Retard® ou R) é ilustrado nas Tabelas 1 e 2, nas Figuras 11, 12 e 13 e no Apêndice. Verifica-se que o parâmetro t_{max} apresentou valores, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$ (mediana), de $2,4 \pm 0,2$ (2,0) h e de $2,6 \pm 0,4$ (2,5) h respectivamente para R e T₁, sem diferença significativa entre as duas formulações (Tabela 1, Figura 11). Também não houve diferença significativa entre as duas formulações quando se compararam os valores C_{max} e AUC_T. Para C_{max} obtiveram-se valores, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$ (mediana), de 1399 ± 326 (1215) ng/ml para R e de 741 ± 137 (746) ng/ml para T₁ (Tabela 1, Figura 12). Com relação ao parâmetro AUC_T obtiveram-se valores, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$ (mediana), de 3177 ± 607 (3081) ng·h/ml para R e de 1603 ± 253 (1666) ng·h/ml para T₁ (Tabela 1, Figura 13). A comparação entre as transformações logarítmicas dos valores de C_{max} e AUC_T também não evidenciou diferença significativa entre T₁ e R. Os testes estatísticos paramétricos e não paramétricos aplicados na análise dos dados obtidos não evidenciaram diferença significativa entre estas duas formulações. Analisando os valores das médias e as medianas obtidos para os parâmetros AUC_T e C_{max} (Tabela 1) ou para a transformação logarítmica destes parâmetros observou-se que a variação do parâmetro foi proporcional à dose, isto é, uma razão de AUC_T ou de C_{max} entre T₁ e R de 1:2, equivale à razão de doses entre estas duas formulações.

Tabela 1: Estudo de bioequivalência entre as formulações T₁ (Voltaren® 50) e R (Voltaren Retard® 100). Parâmetros: t_{max}, C_{max} e AUC_T.

	t _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _T (ng·h/ml)
Formulação R	2,4 ± 0,2 (2,0)	1399 ± 326 (1215)	3177 ± 607 (3081)
Formulação T₁	2,6 ± 0,4 (2,5)	741 ± 137 (746)	1603 ± 253 (1666)
Testes paramétricos:	ANOVA	p > 0,05	p > 0,05
	Friedman	p > 0,05	p > 0,05
Teste não-paramétrico:	Wilcoxon	p > 0,05	p > 0,05
Significância	NS*	NS	NS

*NS = diferença não significativa.

Tabela 2: Estudo de bioequivalência entre as formulações T₁ (Voltaren® 50) e R (Voltaren Retard® 100). Parâmetros: lnC_{max} e lnAUC_T.

	lnC _{max}	lnAUC _T
Formulação R	7,0361 ± 0,2517 (7,1011)	7,9241 ± 0,2043 (8,0185)
Formulação T₁	6,4178 ± 0,2661 (6,6114)	7,2692 ± 0,1899 (7,4066)
Teste paramétrico	ANOVA	p > 0,05
Significância	NS*	NS

*NS = diferença não significativa.

TESTE DE BIOEQUIVALENCIA - PARAMETRO t_{max}

Figura 11: Comparação entre os valores médios de t_{max} e respectivos erros padrões da média após administração das formulações T₁ (Voltaren[®] 50), T₂ (Artren[®] 100) e R (Voltaren Retard[®] 100) a voluntários saudáveis (n = 8).

TESTE DE BIOEQUIVALENCIA - PARAMETRO C_{max}

Figura 12: Comparação entre os valores médios de C_{max} e respectivos erros padrões da média após administração das formulações T₁ (Voltaren® 50), T₂ (Artren® 100) e R (Voltaren Retard® 100) a voluntários sadios (n = 8).

TESTE DE BIOEQUIVALENCIA - PARAMETRO AUC_T

Figura 13: Comparação entre os valores médios de AUC_T e respectivos erros padrões da média após administração das formulações T₁ (Voltaren[®] 50), T₂ (Artren[®] 100) e R (Voltaren Retard[®] 100) a voluntários sadios (n = 8).

Os resultados indicam ainda que a população estudada foi bastante homogênea, uma vez que só se observou "efeito indivíduo" na análise de variância (ANOVA) para o parâmetro $t_{\max}$, mas não para $C_{\max}$ ou AUC_T , apesar do número de voluntários ser apenas oito (**Apêndice**).

O produto referência (Voltaren Retard® 100) é indicado como formulação de liberação prolongada. Em vista disso, e com base em estudos anteriores, era esperado que o Voltaren Retard® fosse bioinequivalente quando comparado ao Voltaren® 50, o que não aconteceu (**Tabelas 1 e 2**). Além disso era esperado que a curva "concentração plasmática vs tempo" do diclofenaco após administração de Voltaren Retard® 100 apresentasse um decaimento mais lento que a mesma curva após administração de Voltaren® 50, o que também não foi observado (**Figura 3**). A extensão da biodisponibilidade (EBA) do diclofenaco no produto Voltaren® 50 foi (em $\bar{X} \pm EPM$) $138 \pm 35 \%$, com mediana de 123 % (**Tabela 3**).

Tabela 3: Extensão da biodisponibilidade da formulação T₁ (Voltaren[®] 50) em relação à formulação R (Voltaren Retard[®] 100).

Voluntário	AUC _{TT1} (ng·h/ml)	AUC _{TR} (ng·h/ml)	EBA (%)
1	1918	1550	247
2	938	1424	132
3	2108	1425	296
4	1080	6051	36
5	533	3602	30
6	2358	2560	184
7	2475	4385	113
8	1414	4418	64
$\bar{X}^*$	1603	3177	138
MED**	1666	3081	123
DP†	715	1716	98
EPM‡	253	607	35

* $\bar{X}$ = média

**MED = mediana

†DP = desvio padrão da média

‡EPM = erro padrão da média

Considerando-se agora o estudo de bioequivalência entre as formulações C (Artren® 100 ou T₂) e B (Voltaren Retard® ou R) ilustrado nas **Tabelas 4 e 5**, nas **Figuras 11, 12 e 13** e no **Apêndice** observa-se que não houve diferença significativa entre as duas formulações para o parâmetro t_{max} , que apresentou valores, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$ (mediana), de $2,4 \pm 0,2$ (2,0) h para R e de $2,3 \pm 0,2$ (2,0) h para T₂ (**Tabela 4, Figura 11**). Em relação ao parâmetro AUC_T obtiveram-se valores, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$ (mediana), de 3177 ± 607 (3081) ng·h/ml para R e de 2237 ± 529 (1559) para T₂ (**Tabela 4, Figura 11**), sem diferença significativa. Finalmente, quando se avaliou o parâmetro C_{max} , obtiveram-se valores, em $\bar{X} \pm \text{EPM}$ (mediana) de 1399 ± 326 (1215) ng/ml para R e de 192 ± 70 (124) ng/ml para T₂ (**Tabela 4, Figura 12**), evidenciando diferença significativa entre as formulações C e B para esse parâmetro. A análise de variância (ANOVA) das transformações logarítmicas dos valores de C_{max} e de AUC_T também não revelou diferença estatística entre as formulações para o parâmetro AUC_T enquanto que comprovou a existência de diferença estatística para C_{max} (**Tabela 5**).

Tabela 4: Estudo de bioequivalência entre as formulações T₂ (Artren® 100) e R (Voltaren Retard® 100). Parâmetros: t_{max}, C_{max} e AUC_T.

	t _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _T (ng·h/ml)
Formulação R	2,4 ± 0,2 (2,0)	1399 ± 326 (1215)	3177 ± 607 (3081)
Formulação T₂	2,3 ± 0,2 (2,0)	192 ± 70 (124)	2237 ± 529 (1559)
Testes paramétricos:	ANOVA	p > 0,05	p = 0,012
	Friedman	p > 0,05	p = 0,039
Teste não-paramétrico:	Wilcoxon	p > 0,05	p = 0,021
Significância	NS*	S**	NS

*NS = diferença não significativa.

**S = diferença significativa.

Tabela 5: Estudo de bioequivalência entre as formulações T₂ (Artren® 100) e R (Voltaren Retard® 100). Parâmetros: lnC_{max} e lnAUC_T.

	lnC _{max}	lnAUC _T
Formulação R	7,0361 ± 0,2517 (7,1011)	7,9241 ± 0,2043 (8,0185)
Formulação T₂	5,0137 ± 0,2212 (4,8200)	7,5036 ± 0,2475 (7,3340)
Testes paramétricos	ANOVA	p = 0,002
Significância	S**	NS*

*NS = diferença não significativa.

**S = diferença significativa.

Nesta fase do estudo a análise de variância (ANOVA) revelou que não ocorreu o "efeito indivíduo" (**Apêndice**).

Os testes estatísticos paramétricos e não-paramétricos aplicados à análise dos dados obtidos não evidenciaram diferença significativa entre as formulações C (Artren® 100, T₂) e B (Voltaren Retard® 100, R) para os parâmetros t_{max} e AUC_T. Entretanto, houve diferença significativa entre as duas formulações para o parâmetro C_{max} , comprovada por três testes estatísticos, evidenciando bioinequivalência entre as formulações C e B.

O produto Artren® 100, também indicado como de liberação prolongada, apresentou uma curva "concentração plasmática vs tempo" com decaimento lento e com um patamar onde a concentração de diclofenaco se manteve mais ou menos constante, conforme era esperado (**Figuras 5 e 6**). O Artren® 100 foi bioinequivalente ao produto referência (Voltaren Retard® 100), apresentando valores de C_{max} significativamente menores que os deste último (**Tabelas 4 e 5**). A extensão da biodisponibilidade (EBA) do diclofenaco no produto Artren® 100 foi (em $X \pm EPM$) $102 \pm 35 \%$, com mediana de 68 % (**Tabela 6**).

Tabela 6: Extensão da biodisponibilidade da formulação T₂ (Artren® 100) em relação à formulação R (Voltaren Retard® 100).

Voluntário	AUC _{TT2} (ng·h/ml)	AUC _{TR} (ng·h/ml)	EBA (%)
1	3438	1550	222
2	4050	1424	284
3	913	1425	64
4	1222	6051	20
5	729	3602	20
6	1848	2560	72
7	2475	4385	101
8	4424	4418	29
$\bar{X}^*$	2237	3177	102
MED**	1559	3081	68
DP†	1496	1716	99
EPM‡	529	607	35

* $\bar{X}$ = média

**MED = mediana

†DP = desvio padrão da média

‡EPM = erro padrão da média

5. Discussão

As formas farmacêuticas de liberação prolongada contendo diclofenaco de sódio têm, como objetivo, minimizar os efeitos colaterais no trato gastrointestinal causados por picos de concentração além de aumentar o intervalo de tempo entre as doses, baseando-se numa liberação mais lenta e prolongada do fármaco no organismo, o que permite que a concentração plasmática se mantenha dentro dos níveis terapêuticos por um intervalo de tempo mais longo que o obtido com os produtos comuns de liberação rápida [1].

Devido à importância do diclofenaco de sódio na terapia de doenças inflamatórias, várias formulações de liberação prolongada contendo este fármaco têm sido pesquisadas, principalmente comprimidos [1,2,19] e supositórios [20]. Diversas formulações de liberação prolongada contendo diclofenaco de sódio encontram-se disponíveis no mercado e, devido ao seu amplo uso, torna-se importante avaliar até que ponto essas formulações são eficazes em evitar picos de concentração e em manter níveis plasmáticos adequados de diclofenaco durante um longo período de tempo. Möller e colaboradores avaliaram em voluntários três formulações contendo diclofenaco de sódio, sendo uma de liberação rápida e duas de liberação prolongada (comprimidos e cápsulas contendo microgrânulos) [17]. A administração das formulações de liberação prolongada originou valores de concentração plasmática máxima de diclofenaco ao redor de 450 ng/ml enquanto que, após administração da formulação de liberação rápida, obtiveram-se valores de concentração plasmática máxima de aproximadamente 1400 ng/ml. Além disso, o

período de tempo em que a concentração plasmática de diclofenaco manteve-se dentro dos níveis terapêuticos foi bem maior após a administração das formulações de liberação prolongada (cerca de 12 horas) do que após a administração da formulação de liberação rápida (cerca de 4 horas). Outra formulação de liberação prolongada foi avaliada por Fowler e colaboradores e também esta mostrou-se eficiente em evitar picos muito elevados de concentração plasmática de diclofenaco e em manter os níveis plasmáticos de diclofenaco dentro da faixa terapêutica por um longo intervalo de tempo [8]. Neste caso, o diclofenaco atingiu sua concentração plasmática máxima cerca de quatro horas após a administração, com valores de aproximadamente 220 ng/ml, e manteve-se na faixa terapêutica por 10 horas.

Com base nos resultados aqui obtidos sugere-se que o produto escolhido como referência (Voltaren Retard® 100) apresentou um comportamento semelhante ao produto de liberação rápida (Voltaren® 50) quanto à desintegração do comprimido e liberação do fármaco no organismo, já que ambos apresentaram picos de concentração cerca de duas horas após a administração seguidos de decaimento plasmático rápido do diclofenaco. Este comportamento era esperado para o Voltaren® 50, mas não para o Voltaren Retard® 100, indicado pelo fabricante como produto de liberação prolongada e que, portanto, deveria apresentar não um pico, mas um patamar de concentração, seguido de decaimento lento do diclofenaco plasmático.

Neste caso considerou-se o comportamento inesperado como decorrente de um problema de produção do lote de Voltaren Retard® 100 usado neste estudo, uma vez que em outros estudos realizados no Centro Avançado de Estudos em

Farmacologia Clínica, utilizando comprimidos de Voltaren Retard® 100 provenientes de outros lotes, este último comportou-se como formulação de liberação prolongada. Também Gross e colaboradores, em estudo com Voltaren Retard® 100, descrevem-no como formulação de liberação prolongada originando picos de concentração plasmática de diclofenaco entre duas e oito horas após a administração mais baixos que os originados pelo Voltaren® 50 [10].

Esse fato evidencia a necessidade de se realizarem estudos periódicos para avaliação da biodisponibilidade dos produtos de liberação prolongada. Considerando que este tipo de formulação tem como principal objetivo aumentar o intervalo de tempo entre as doses por prolongamento do tempo de ação e diminuir os efeitos colaterais é fácil notar que falhas de produção como as evidenciadas por este estudo comprometem seriamente a eficácia terapêutica deste tipo de formulação e que a realização periódica de estudos de biodisponibilidade e bioequivalência é extremamente importante para detectar este tipo de falha e permitir sua correção industrial.

Com relação ao Artren® 100, os resultados obtidos indicam que este produto se comportou como forma de liberação prolongada, apresentando níveis baixos de concentração plasmática, mas que se mantiveram constantes durante um intervalo de tempo prolongado. Os baixos níveis obtidos se devem, provavelmente, a uma liberação ultra-lenta do fármaco no organismo, com maior degradação por eliminação pré-sistêmica durante o processo absorptivo. Entretanto, estes baixos níveis de concentração plasmática não devem comprometer a eficácia clínica do produto, uma vez que a concentração mínima eficaz do diclofenaco é cerca de 50 ng/ml [20].

Este estudo mostra a existência de diferenças importantes entre três formulações comerciais contendo diclofenaco de sódio quanto à biodisponibilidade do fármaco. Assim, a substituição de uma formulação por outra no tratamento crônico de pacientes deve ser precedida por análise cuidadosa das características de cada uma delas e das necessidades do paciente, com o objetivo de evitar diminuição na eficácia clínica da terapia ou aumento de efeitos colaterais.

6. Conclusões:

Com base no trabalho desenvolvido conclui-se que:

- o produto Voltaren® 50 se comportou como formulação de liberação rápida com EBA (em $X \pm EPM$) = 138 ± 35 % (mediana = 123%) do produto referência (Voltaren Retard® 100).
- o produto Artren® 100 se comportou como formulação de liberação prolongada com EBA (em $X \pm EPM$) = 102 ± 35 % (mediana = 68 %) do produto referência (Voltaren Retard® 100) ;
- o produto referência (Voltaren Retard® 100) se comportou como formulação de liberação rápida , devido a provável falha de impermeabilização do núcleo central do comprimido no processamento industrial deste lote e;

- os produtos Voltaren® 50 e Voltaren Retard® 100 se mostraram bioequivalentes neste estudo enquanto Artren® 100 e Voltaren Retard® 100 se mostraram bioinequivalentes.

7. Referências bibliográficas

1. ACARTÜRK, F. Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. Part 1: using chitosan. **Pharmazie**, Berlin, v. 44, n. 8, p. 547-549, 1989.
2. ACARTÜRK, F. Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. Part 2: using chitin. **Pharmazie**, Berlin, v. 44, n. 9, p. 621-622, 1989.
3. BIJLSMA, A. The long-term efficacy and tolerability of Voltaren (diclofenac sodium) and indomethacin in rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 74-80, 1978.
4. BIJLSMA, A, TEN PAS, J.G. A study of the anti-inflammatory effect of Voltaren in patients with rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 46-50, 1978.
5. CAR, A., JAJIC, I., KRAMPAC, I., VITAUS, M., ZENIC, N., ZIVKOVIC, M. A double-blind multicentre comparison of diclofenac sodium and naproxen

- in osteoarthritis of the hip. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 63-68, 1978.
6. CHAN, K.K.H., VYAS, K.H., BRANDT, K.H. In vitro protein binding of diclofenac sodium in plasma and synovial fluid. **J. Pharm. Sci.**, Washington, v. 76, n. 2, p. 105-108, 1987.
 7. CICCOLUNGI, S.N., CHAUDRI, H.A., SCHUBIGER, B.I., REDDROP, R. Report on a long-term tolerability study of up to two years with diclofenac sodium (Voltaren). **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 86-96, 1978.
 8. FOWLER, P.D., DAWES, P.T., JOHN, V.A., SHOTTON, P.A. Plasma and synovial fluid concentration of diclofenac sodium and its hydroxylated metabolites during once-daily administration of a 100 mg slow-release formulation. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 31, p. 469-472, 1986.
 9. GIBALDI, M. **Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics**. 4^a ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 146-175.
 10. GROSS, W., KROH, J., KREBS, A., ZÖLLER, H. Diclofenac sodium: blood concentration of the slow-release form and influence on the metabolism of kallikrein. **Arzneim.-Forsch.**, Aulendorf, v. 34, n. 10, p. 1327-1329, 1984.
 11. HERZFELDT, C.D., BREHM, R. Drug release - Test USP XXI. **Pharm. Ztg.**, Frankfurt, v. 132, n. 7. p. 360-364, 1987.

12. HULTIN, M., OLANDER, K.J. A clinical trial of the analgesic properties of Voltaren (diclofenac sodium). **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 42-45, 1978.
13. KAJANDER, A., MARTIO, J. Diclofenac sodium (Voltaren) and naproxen in the treatment of rheumatoid arthritis: a comparative double-blind study. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 57-62, 1978.
14. LAMY, P.P. Generic equivalents: issues and concerns. **J. Clin. Pharmacol.**, New York, v. 26, n. 5, p. 309-316, 1986.
15. MÖLLER, H. Biopharmaceutical assessment of modified release oral dosage forms. **Pharm. Ind.**, Aulendorf, v. 48, n. 5, p. 514-519, 1986.
16. MÖLLER, H., STÜBER, W., CZECHANOWSKI, B., GUNDERT-REMY, U. Bioverfügbarkeit von Diclofenac-Fertigarzneimitteln für die orale, rektale und intramuskuläre Applikation. 2. Mitteilung. **Pharm. Ztg.**, Frankfurt, v. 129, n. 46, p. 2841-2844, 1984.
17. MÖLLER, H., STÜBER, W., REINHARD, D. Bioverfügbarkeit, in vivo- und in vitro-Freisetzung von oralen Diclofenac-Retardformen - 1. Mitteilung. **Pharm. Ztg.**, Frankfurt, v. 129, n. 41, p. 2387-2392, 1984.
18. MUTRU, O., PENTTILÄ, M., PESONEN, J., SALMELA, P., SUHONEN, O., SONCK, T. Diclofenac sodium (Voltaren) and indomethacin in the ambulatory treatment of rheumatoid arthritis: a double-blind multicentre study. **Scand. J. Rheumatol., Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 51-56, 1978.

19. NISHIHATA, T. Simple formulation of sustained-release tablets of sodium diclofenac and examination in humans. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 40, p. 125-128, 1987.
20. NISHIHATA, T, SUDHO, M., KAMADA, A., KEIGAMI, M., FUJIMOTO, T., KAMIDE, S., TATSUMI, N. Investigation of sustained-release suppository of sodium diclofenac in humans. **Int. J. of Pharm.**, Amsterdam, v. 33, p. 181-186, 1986.
21. RITSCHER, W.A. **Handbook of basic pharmacokinetics**. 3^a ed., Bethesda: Drug Intelligence Publications, 1986.
22. SACHS, L. **Applied statistics**. 2^a ed., New York: Springer, 1984.
23. SANTOS, S.R.C.J., DONZELLA, H., BERTOLINE, M.A, PEREIRA, M.D., OMOSAKO, C.E., PORTA, V. Simplified micromethod for the HPLC measurement of diclofenac in plasma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 125-128, 1992.
24. SHAMS, M.A., MOHAMED, H.F. Binding study of diclofenac sodium to serum albumin. **Pharm. Ind.**, Aulendorf, v. 46, n. 12, p. 1289-1291, 1984.
25. SMALL, R. Diclofenac sodium. **Clin. Pharm.**, Bethesda, v. 8, p. 545-558, 1989.
26. SØRENSEN, K. A long-term investigation of a new antirheumatic drug, diclofenac sodium (Voltaren). **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 81-85, 1978.

27. TERHAAG, B., LE PETIT, G., RICHTER, K., ROGNER, M. Zur Beziehung von in-vitro- und in-vivo- Untersuchungen beim Menschen am Beispiel von Diclofenac Suppositorien. **Pharmazie**, Berlin, v. 40, n. 11, p. 784-786, 1985.
28. TODD, A.P., SORKIN, E.M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, Auckland, v.35, p. 244-285, 1988.
29. VALTONEN, E.J. A comparative short-term trial with Voltaren (diclofenac sodium) and naproxen in soft tissue rheumatism. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 69-73, 1978.
30. VENTAFRIDDA, V., TOSCANI, F., TAMBURINI, M., CORLI, O., GALLUCCI, M., GOTTLIEB, A., SPERANZA, R., CONNO, F. Sodium naproxen versus sodium diclofenac in cancer pain control. **Arzneim.-Forsch.**, Aulendorf, v. 40, n. 10, p. 1132-1134, 1990.
31. WILLIS, J.V., KENDALL, M.J., JACK, D.B. The influence of food on the absorption of diclofenac after single and multiple oral doses. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Berlin, v. 19, p. 33-37, 1981.

Abstract

Bioavailability of diclofenac in two test formulations was compared to a reference after single oral dose to healthy adult volunteers of both sex. Formulations were administered after a fasting night following a randomized study protocol. Blood samples were collected at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 and 24 hours after dose administration. Diclofenac plasma levels were measured by HPLC technique using a reversed phase system after single extraction with organic solvent in acidic medium. Peaks were monitored at UV-282 nm. Based on "plasma concentration vs time" curves, parameters were determined, expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$: $C_{\max} = 741 \pm 137$ ng/ml and $t_{\max} = 2,6 \pm 0,4$ h, product A, $C_{\max} = 1399 \pm 326$ ng/ml and $t_{\max} = 2,4 \pm 0,2$ h, product B and $C_{\max} = 192 \pm 70$ ng/ml and $t_{\max} = 2,3 \pm 0,2$ h, product C. AUC_T values, determined by trapezoidal rule and integration to infinity, were, expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$: 1603 ± 253 ng·h/ml, product A, 3177 ± 606 ng·h/ml, product B and 2237 ± 529 ng·h/ml, product C. Bioavailability (EBA) of diclofenac in test products (A, B) was calculated against reference (B). EBA, expressed as $\bar{X} \pm \text{SEM}$ (median), were: 138 ± 35 (123) %, product A and 102 ± 35 (68) %, product C. Based on this data formulation A and B are bioequivalents while C and B are not bioequivalents. There is a strong evidence that product B, slow-release formulations, as described by the manufacturer, presented fast-release properties.

Apêndice

Quadro a.1: Características dos voluntários.

Voluntário		sexo	idade (anos)	altura (cm)	peso real (kg)	peso ideal* (kg)	DPI** (%)
1 (SS)	NF†	F	41	172	56	65	-14
2 (OP)	F‡	F	32	168	55	61	-10
3 (HD)	F	F	24	170	72	63	14
4 (CB)	F	F	23	165	58	0	0
5 (PB)	F	M	24	175	65	68	-4
6 (IL)	NF	M	22	167	55	60	-8
7 (RF)	NF	M	19	169	55	62	-11
8 (MA)	NF	M	28	173	80	66	21

*peso ideal = (altura (cm) - 100) × 0,9

**DPI = desvio porcentual do peso ideal

$$DPI = |(\text{peso real} - \text{peso ideal}) / \text{peso ideal}| \times 100$$

†NF = não fumante

‡F = fumante

Termo de Consentimento Pós-informação

Nome do voluntário / Idade _____ / _____

Registro e / ou documento de identificação _____ / _____

Título do projeto: Bioequivalência de formulações contendo diclofenaco de sódio.

Declaro que em ____ / ____ / ____ concordei voluntariamente em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes que:

1. O estudo implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, cujos eventuais riscos me foram explicados;

2. Os procedimentos não incluem, necessariamente, os já reconhecidos como aplicáveis e podem visar à avaliação de tratamentos novos ou a compará-los com os tradicionais;

3. Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento, sair do mesmo,

4. Meu consentimento aplica-se, igualmente, a participar da pesquisa como componente do grupo controle, podendo receber substâncias inócuas ou inativas, com a finalidade de dimensionar o "efeito placebo";

5. A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para mim. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato minha participação como voluntário.

Observações complementares: _____

assinatura do voluntário

São Paulo, ____ de ____ de ____.

Quadro a.2: Protocolo de administração das formulações aos voluntários.

Voluntário	Fase I	Fase II	Fase III
1	Produto A	Produto B	Produto C
2	Produto B	Produto C	Produto A
3	Produto C	Produto A	Produto B
4	Produto A	Produto B	Produto C
5	Produto B	Produto C	Produto A
6	Produto C	Produto A	Produto B
7	Produto A	Produto B	Produto C
8	Produto B	Produto C	Produto A

VOLUNTARIO 1 - S.S.

Figura a.1: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 1.

VOLUNTARIO 2 - O.P.

	t_{max} h	C_{max} $\mu\text{g/ml}$	AUC_T $\mu\text{g.h/ml}$
VOLTAREN [®] 50	4,0	938	938
VOLTAREN [®] 100	3,0	403	1424
ARTREN [®]	2,0	681	4050

Figura a.2. Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 2.

VOLUNTARIO 3 - H.D.

	t_{max} h	C_{max} $\mu\text{g/ml}$	AUC_T $\mu\text{g.h/ml}$
VOLTAREN [®] 50	2,0	1190	2108
VOLTAREN [®] 100	2,0	682	1425
ARTREN [®]	2,0	121	913

Figura a.3: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 3.

VOLUNTARIO 4 - C.B.

Figura a.4: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 4.

VOLUNTARIO 5 - P.B.

	t_{max} h	C_{max} $\mu g/ml$	AUC_T $\mu g.h/ml$
VOLTAREN ^R 50	4,0	145	533
VOLTAREN ^R 100	3,0	1268	3602
ARTREN ^R	2,0	95	729

Figura a.5: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 5.

VOLUNTARIO 6 - I.L.

Figura a.6: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 6.

VOLUNTARIO 7 - R.F.

Figura a.7: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 7.

VOLUNTARIO 8 - M.A.

	t_{max} h	C_{max} $\mu\text{g/ml}$	AUC_T $\mu\text{g.h/ml}$
VOLTAREN ^R 50	2,0	691	1414
VOLTAREN ^R 100	2,0	1936	4418
ARTREN ^R	3,0	114	1269

Figura a.8: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de três formulações contendo diclofenaco de sódio - Voluntário 8.

Estudo de Bioequivalência
Voltaren® 50 (T₁)× Voltaren Retard® 100 (R)

Tabela a.1: Principais parâmetros farmacocinéticos após administração peroral de Voltaren® 50 (T₁) e Voltaren Retard® 100 (R) em dose única a voluntários sadios.

Voluntário	Voltaren Retard® 100			Voltaren® 50		
	t _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _T (ng·h/ml)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _T (ng·h/ml)
1	3,0	547	1550	3,0	800	1918
2	3,0	403	1424	4,0	265	938
3	2,0	682	1425	2,0	1190	2108
4	2,0	3088	6051	3,0	683	1080
5	3,0	1268	3602	4,0	145	533
6	2,0	1161	2560	2,0	1190	2358
7	2,0	2110	4385	1,0	966	2475
8	2,0	1936	4418	2,0	691	1414
$\bar{X}^*$	2,4	1399	3177	2,6	741	1603
MED**	2,0	1215	3081	2,5	746	1666
DP†	0,5	922	1716	1,1	386	715
EPM‡	0,2	326	607	0,4	137	253

* $\bar{X}$ = média

**MED = mediana

†DP = desvio padrão da média

‡EPM = erro padrão da média

Tabela a.2: Principais parâmetros farmacocinéticos após administração peroral de Voltaren® 50 (T₁) e Voltaren Retard® 100 (R) em dose única a voluntários sadios - transformação logarítmica.

Voluntário	Voltaren Retard® 100		Voltaren® 50	
	lnC _{max}	lnAUC _T	lnC _{max}	lnAUC _T
1	6,3044	7,3460	6,6846	7,5590
2	5,9989	7,2612	5,5797	6,8437
3	6,5250	7,2619	7,0817	7,6535
4	8,0353	8,7080	6,5265	6,9847
5	7,1452	8,1892	4,9767	6,2785
6	7,0570	7,8478	7,0817	7,7656
7	7,6544	8,3859	6,8732	7,8140
8	7,5684	8,3934	6,5381	7,2542
$\bar{X}^*$	7,0361	7,9241	6,4178	7,2692
MED**	7,1011	8,0185	6,6114	7,4066
DP†	0,7120	0,5777	0,7527	0,5370
EPM‡	0,2517	0,2043	0,2661	0,1899

* $\bar{X}$ = média

**MED = mediana

†DP = desvio padrão da média

‡EPM = erro padrão da média

Tabela a.3: Análise de variância - Voltaren® 50 (T₁) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: t_{max}.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	8,00	0,88
formulação	1	0,25	0,25
erro	6	1,75	0,28
total	15	10,00	
	$t_{\max T1}$ (h)	$t_{\max R}$ (h)	
média	2,6	2,4	
variância	1,1	0.3	
efeito indivíduo	p = 0,031 (p < 0,05, S**)		
efeito formulação	p = 0,351 (p > 0,05, NS*)		

*NS = diferença não significativa.

**S = diferença significativa

Tabela a.4: Análise de variância - Voltaren® 50 (T₁) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: C_{max}.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	3606964	515281
formulação	1	1732514	1732514
erro	6	3390426	565071
total	15	8729904	
	C _{maxT₁} (ng/ml)	C _{maxR} (ng/ml)	
média	741	1399	
variância	149281	850347	
efeito indivíduo	p = 0,469 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,100 (p > 0,05, NS)		

*NS = diferença não significativa.

Tabela a.5: Análise de variância - Voltaren® 50 (T₁) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: C_{max} - transformação logaritmica.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	4,402771	0,628967
formulação	1	1,529175	1,529175
erro	6	3,111633	0,518606
total	15	9,043579	
	$\ln C_{\max T1}$		$\ln C_{\max R}$
média	6,4178		7,0361
variância	0,566515		0,506971
efeito indivíduo	p = 0,329 (p > 0.05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,106 (p > 0.05, NS)		

*NS = diferença não significativa.

Tabela a.6: Análise de variância - Voltaren[®] 50 (T₁) × Voltaren Retard[®] 100 (R)
Parâmetro: AUC_T.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	10259220	1465602
formulação	1	9908336	9908336
erro	6	13932040	2322006
total	15	34099600	
	AUC _{TT1} (ng·h/ml)		AUC _{TR} (ng·h/ml)
média	1603		3177
variância	511577		2944320
efeito indivíduo	p = 0,652 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,061 (p > 0,05, NS)		

*NS = diferença não significativa.

Tabela a.7: Análise de variância - Voltaren® 50 (T₁) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: AUC_T - transformação logarítmica.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	1,758057	0,251151
formulação	1	1,715637	1,715637
erro	6	2,595947	0,432658
total	15	6,069641	
	lnAUC _{TT1}		lnAUC _{TR}
média	7,2691		7,9241
variância	0,288369		0,333631
efeito indivíduo	p = 0,690 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,069 (p > 0,05, NS)		

*NS = diferença não significativa.

Estudo de Bioequivalência

Artren® 100 (T₂) × Voltaren Retard® 100 (R)

Tabela a.8: Principais parâmetros farmacocinéticos após administração peroral de Artren® 100 (T₂) e Voltaren Retard® 100 (R) em dose única a voluntários sadios.

Voluntário	Voltaren Retard® 100			Artren® 100		
	t _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _T (ng·h/ml)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _T (ng·h/ml)
1	3,0	547	1550	2,0	115	3438
2	3,0	403	1424	2,0	681	4050
3	2,0	682	1425	2,0	121	913
4	2,0	3088	6051	3,0	130	1222
5	3,0	1268	3602	2,0	95	729
6	2,0	1161	2560	2,0	127	1848
7	2,0	2110	4385	2,0	155	4424
8	2,0	1936	4418	3,0	114	1269
X*	2,4	1399	3177	2,3	192	2237
MED**	2,0	1215	3081	2,0	124	1559
DP†	0,5	922	1716	0,5	198	1496
EPM‡	0,2	326	607	0,2	70	529

*X = média

**MED = mediana

†DP = desvio padrão da média

‡EPM = erro padrão da média

Tabela a.9: Principais parâmetros farmacocinéticos após administração peroral de Artren® 100 (T₂) e Voltaren Retard® 100 (R) em dose única a voluntários sadios - transformação logarítmica.

Voluntário	Voltaren Retard® 100		Artren® 50	
	lnC _{max}	lnAUC _T	lnC _{max}	lnAUC _T
1	6,3044	7,3460	4,7449	8,1426
2	5,9989	7,2612	6,5236	8,3065
3	6,5250	7,2619	4,7958	6,8167
4	8,0353	8,7080	4,8675	7,1082
5	7,1452	8,1892	4,5539	6,5917
6	7,0570	7,8478	4,8442	7,5219
7	7,6544	8,3859	5,0434	8,3948
8	7,5684	8,3934	4,7362	7,1460
$\bar{X}^*$	7,0361	7,9241	5,0137	7,5036
MED**	7,1011	8,0185	4,8200	7,3340
DP†	0,7120	0,5777	0,6255	0,7005
EPM‡	0,2517	0,2043	0,2212	0,2475

* $\bar{X}$ = média

**MED = mediana

†DP = desvio padrão da média

‡EPM = erro padrão da média

Tabela a.10: Análise de variância - Artren[®] 100 (T₂) × Voltaren Retard[®] 100 (R)
Parâmetro: t_{max}.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	0,94	0,13
formulação	1	0,06	0,06
erro	6	2,44	0,41
total	15	3,44	
	$t_{\max T_2}$ (h)	$t_{\max R}$ (h)	
média	2,3	2,4	
variância	0,2	0,3	
efeito indivíduo	p = 0,885 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,685 (p > 0,05, NS)		

*NS = diferença não significativa.

Tabela a.11: Análise de variância - Artren® 100 (T₂) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: C_{max}.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	2598456	371208
formulação	1	5828604	5828604
erro	6	3628992	604832
total	15	12056050	
	C _{maxT1} (ng/ml)		C _{maxR} (ng/ml)
média	192		1399
variância	39289		850347
efeito indivíduo	p = 0,665 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,012 (p < 0,05, S**)		

*NS = diferença não significativa.

**S = diferença significativa.

Tabela a.12: Análise de variância - Artren® 100 (T₂) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: C_{max} - transformação logarítmica.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	1,556702	0,222386
formulação	1	16,360230	16,360230
erro	6	4,731079	0,788513
total	15	22,648010	
	lnC _{maxT2}		lnC _{maxR}
média	5,0137		7,0361
variância	0,391283		0,506971
efeito indivíduo	p = 0,917 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,002 (p < 0,05, S**)		

*NS = diferença não significativa.

**S = diferença significativa.

Tabela a.13: Análise de variância - Artren® 100 (T₂) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: AUC_T.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	13444100	1920586
formulação	1	3536280	3536280
erro	6	22824070	3804012
total	15	39804460	
	AUC _{TT2} (ng·h/ml)		AUC _{TR} (ng·h/ml)
média	2237		3177
variância	2236849		2944320
efeito indivíduo	p = 0,749 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,332 (p > 0,05, NS)		

*NS = diferença não significativa.

Tabela a.14: Análise de variância - Artren® 100 (T₂) × Voltaren Retard® 100 (R)
Parâmetro: AUC_T - transformação logarítmica.

fonte de variação	graus de liberdade	soma de quadrados	desvio padrão da variância
indivíduo	7	2,129273	0,304182
formulação	1	0,707336	0,707336
erro	6	3,641174	0,606862
total	15	6,477783	
	lnAUC _{TT₂}		lnAUC _{TR}
média	7,5036		7,9241
variância	0,490718		0,333631
efeito indivíduo	p = 0,752 (p > 0,05, NS*)		
efeito formulação	p = 0,282 (p > 0,05, NS)		

*NS = diferença não significativa.

**Método para determinação simultânea de
diclofenaco e seus produtos de
biotransformação hidroxilados em urina por
cromatografia líquida de alta eficiência**

Capítulo III

Índice

Resumo	p. 82
1. Introdução	p. 83
2. Objetivo	p. 89
3. Material e métodos	p. 89
3.1. Material	p. 89
3.2. Preparação de padrões	p. 92
3.3. Determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina	p. 93
3.4. Limites de confiança do método de determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina	p. 97
4. Resultados	p. 98
5. Discussão	p. 103
6. Referências bibliográficas	p. 108
Abstract	p. 111

Resumo

O diclofenaco é um antiinflamatório não-esteroidal indicado para o tratamento de pacientes portadores de inflamações dolorosas de origem reumática ou não. É biotransformado por reações de oxidação seguidas de conjugação glicurônica. Uma pequena porcentagem do fármaco original sofre glicuronização direta. Vários métodos têm sido propostos para a determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação em fluidos biológicos, incluindo cromatografia a gás com detecção por captura de elétrons e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção eletroquímica ou no ultravioleta. Entretanto, nenhum dos métodos utilizando CLAE mostrou-se suficientemente seletivo para o uso em estudos de disposição cinética. Descreve-se aqui um método sensível e específico para a determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina por CLAE com detecção no ultravioleta precedida de hidrólise enzimática nas amostras e extração com solvente orgânico em meio ácido. Adicionaram-se 500 µl de urina a tubos contendo 10 mg de mistura de β-glicuronidase e aril-sulfatase e 500 µl de tampão acetato 0,75 M. A mistura foi incubada a 37°C por uma hora e, em seguida, transferiram-se 800 µl do hidrolisado para tubos contendo 3,3 µg de padrão interno para diclofenaco (ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-fenil)propiónico) e 1,0 µg de padrão interno para produtos de biotransformação (fenacetina). Procedeu-se à extração com 2 ml de mistura de diclorometano e álcool isopropílico (9:1, v/v) e agitação seguida por centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos. Desprezou-se a fase aquosa e filtrou-se a fase orgânica em sistema Millipore® com membrana FHLP 01300 0,4 µm. O extrato orgânico foi evaporado em corrente de nitrogênio a 37°C e o resíduo, dissolvido em volumes de 500-2000 µl de fase móvel e injetado em CLAE. Usaram-se dois sistemas cromatográficos independentes e consecutivos para a separação do diclofenaco e seus metabólitos hidroxilados. Inicialmente utilizou-se coluna de fase reversa ODS-Shimadzu, 150 × 6,0 mm, 5 µm e fase móvel constituída por tampão acetato 0,01 M, pH 5,0, metanol e acetonitrila (50:40:5) a um fluxo de 1,0 ml/min para eluição do padrão interno (fenacetina) a 10 minutos, 4',5-di-hidroxiclofenaco a 12 minutos, 3'-hidroxiclofenaco a 34 minutos, 4'-hidroxiclofenaco a 40 minutos e 5-hidroxiclofenaco a 44 minutos. Em seguida utilizou-se a coluna Novapak® C₁₈, 150 × 3,9 mm, 4 µm e fase móvel constituída por tampão acetato 0,75 M, pH 5,0 e acetonitrila (55:45, v/v) e um fluxo de 0,9 ml/min para eluição do diclofenaco a 3,3 minutos e padrão interno (ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propiónico, a 6,5 minutos. Os limites de confiança do método foram: 0,4-10,0 µg/ml, linearidade; 0,1 µg/ml, sensibilidade, 75 %, recuperação relativa média da extração e precisão intra e interdias variando de 1,3 a 2,2 % e de 3,3 a 5,7 %, respectivamente. O método mostrou-se suficientemente sensível, preciso, exato e específico para o uso em estudos de excreção urinária de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados.

1. Introdução

O diclofenaco de sódio, ou sal sódico do ácido [o-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético (**Figura 1**) é um potente antiinflamatório não-esteroidal administrado em doses de 75 a 200 mg/dia em regime de dose única ou múltipla no tratamento de pacientes com osteoartrite, artrite reumatóide, gota e outras condições reumáticas [12,13]. Além da ação antiinflamatória apresenta também ação analgésica, sendo usado para o alívio da dor em pacientes com cólica renal ou biliar e no período pós-operatório imediato [13].

Figura 1: Diclofenaco de sódio.

O diclofenaco é bem absorvido após administração peroral e rapidamente distribuído, apesar de altamente ligado às proteínas plasmáticas. Apresenta uma elevada taxa de depuração plasmática, em função da biotransformação hepática e posterior excreção renal e biliar de seus produtos de metabolismo [13]. No homem o diclofenaco é biotransformado através de reações oxidativas da fase I, fornecendo os derivados mono-hidroxilados 3'-hidroxidiclofenaco (3'-OH-D), 4'-hidroxidiclofenaco (4'-OH-D) e 5-hidroxidiclofenaco (5-OH-D) e o derivado di-hidroxilado 4',5-di-hidroxidiclofenaco (4',5-OH-D). O derivado 3'-OH-D pode ainda sofrer metilação originando o 3'-hidroxi-4'-metoxidiclofenaco (3'-OH-4'-MeO-D) (Figura 2). Estes produtos sofrem conjugação, através das reações da fase II do metabolismo, fornecendo sulfatos ou glicuronatos. Apenas pequena porcentagem da dose administrada é encontrada na urina sob forma de diclofenaco inalterado [6].

Figura 2: Diclofenaco e seus produtos de biotransformação.
 I: diclofenaco; II: 4'-OH-D; III: 5-OH-D; IV: 3'-OH-D;
 V: 4', 5-OH-D; VI: 3'-OH-4'-MeO-D.

Dentre os métodos de quantificação de diclofenaco em urina, aqueles utilizando a cromatografia gás-líquido com detecção por captura de elétrons (CG-DCE ^{63}Ni) destacaram-se inicialmente como os mais adequados, em função da presença de dois átomos de cloro na molécula deste fármaco [2]. Entretanto, a determinação de diclofenaco por CG só foi possível após derivatização do grupo carboxila. Para a quantificação de diclofenaco urinário os derivados foram obtidos através de ciclização, originando indolinonas [3,9,11].

Os produtos de biotransformação do diclofenaco podem também ser quantificados em urina [9,11] ou plasma [10] simultaneamente ao diclofenaco, por métodos utilizando a técnica de cromatografia gás-líquido com detecção por captura de elétrons e derivatização por ciclização.

Devido às estruturas análogas, é difícil obter boa separação entre os produtos de biotransformação do diclofenaco. Schweizer e colaboradores [11] propuseram a determinação simultânea de diclofenaco e seus produtos de biotransformação mono-hidroxilados, mas não conseguiram diferenciação entre 3'-OH-D, 4'-OH-D e 5-OH-D, expressando sua excreção urinária sob forma de derivados mono-hidroxilados totais.

Em seguida, Schneider e Degen reportaram a determinação simultânea de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados também por CG-DCE ^{63}Ni após ciclização [9]. Os derivados foram eluídos no sistema cromatográfico em cerca de 15 minutos. Estes mesmos autores [10], posteriormente, propuseram modificações no método acrescentando uma etapa de extração e aumentando o tempo de eluição para 30 minutos e conseguindo, desta

forma, quantificar em plasma o diclofenaco, seus produtos de biotransformação hidroxilados e, ainda, o produto de biotransformação metoxilado, com ótima sensibilidade e seletividade.

Devido ao procedimento laborioso de extração e derivatização, os métodos de quantificação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação em urina utilizando CG-DCE ^{63}Ni vêm sendo substituídos por outros utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sem necessidade de derivatização pré-coluna.

No início da década de 80 propôs-se um método para determinação de diclofenaco na urina utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por absorvância no ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$) precedida de extração com solvente orgânico em meio ácido [7]. Este método apresenta boa precisão e exatidão, além de uma ótima recuperação relativa da extração, mas não é suficientemente sensível para estudos farmacocinéticos. Outro método para determinação de diclofenaco em urina juntamente com outros anti-inflamatórios, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, é descrito na literatura. Este método visa a realização de "screening" toxicológico, não sendo indicado para estudos farmacocinéticos [1].

A determinação simultânea de diclofenaco e seus produtos de biotransformação na urina por métodos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência foi proposta inicialmente por Godbillon e colaboradores [4]. Este método apresentou boa sensibilidade, mas não se mostrou seletivo, já que o produto de biotransformação di-hidroxilado (4',5-OH-D) não pôde ser determinado devido a

interferência de compostos endógenos; além disso, os produtos mono-hidroxilados 3'-OH-D e 4'-OH-D foram eluídos como um único pico não sendo, portanto, possível a sua quantificação. Uma melhoria da seletividade foi obtida por Landsorp e colaboradores [5], que conseguiram uma separação razoável entre 3'-OH-D e 4'-OH-D, além da eliminação da interferência dos compostos endógenos na análise de 4',5-OH-D. Estes dois métodos utilizaram detecção por absorbância no ultravioleta em comprimento de onda de 282 nm. Um método para determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação em plasma e fluido cerebrospinal utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e detector eletroquímico encontra-se descrito na literatura. Estes autores conseguiram uma separação razoável entre o diclofenaco e seus cinco produtos de biotransformação conhecidos [14].

Para a quantificação de diclofenaco em plasma propuseram-se inicialmente métodos analíticos utilizando a cromatografia gás-líquido. Estes métodos foram posteriormente substituídos por outros utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência mantendo-se, ou até melhorando-se, a sensibilidade e a seletividade. Da mesma forma, os primeiros métodos analíticos propostos para a quantificação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação em fluidos biológicos empregaram a cromatografia gás-líquido e a tendência foi substituir estes métodos por outros que empregassem a cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, apesar de todas as tentativas que têm sido feitas, nenhum dos métodos propostos até a presente data para análise simultânea e quantificação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

apresentou seletividade equivalente à dos métodos que utilizam cromatografia líquido-gás.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é estabelecer um método analítico para quantificação do diclofenaco e seus metabólitos hidroxilados em urina através de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para uso em estudo farmacocinético.

3. Material e métodos

3.1. Material

Todos os solventes utilizados para extração (diclorometano, álcool isopropílico), cromatografia (metanol, acetonitrila) ou preparo de padrões (metanol) foram de grau espectroscópico ou cromatográfico (E. Merck, Carlo Erba, Grupo Química) Para evaporação dos extratos orgânicos usou-se nitrogênio de pureza 99,99 % (White Martins). As soluções ácidas, básicas, iônicas ou tampões foram preparadas a partir de reagentes pró-análise (grau p.a.). A água

destinada tanto à limpeza do cromatógrafo quanto ao preparo de soluções foi filtrada em membrana Millipore[®], tipo HA, de 0,4 μm .

Para a análise cromatográfica utilizaram-se as colunas Novapak[®] C₁₈, Waters - Millipore, de 150 $\times$ 3,9 mm e partículas de 4 μm e ODS Shimadzu de 150 $\times$ 6,0 μm e partículas de 5 μm .

O material de vidro usado foi cuidadosamente lavado com detergente e solução sulfocrômica e enxaguado com água destilada. A secagem foi feita em estufa. Todo o material foi enxaguado com diclorometano imediatamente antes do uso.

Padrões e enzimas

Usaram-se os seguintes compostos:

- **diclofenaco de sódio** - doado pela Biogalênica - utilizado como padrão para doseamento de diclofenaco em urina;
- **3'-hidroxiclofenaco, 4'-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco e 4',5-di-hidroxiclofenaco** - doados pela Ciba-Geigy (Suíça) - utilizados como padrões para doseamento destes produtos de biotransformação em urina;
- **ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propiónico** - doado pela Biogalênica - utilizado como padrão interno para doseamento de diclofenaco em urina;

- **fenacetina** - doada pelo Setor de Química Farmacêutica da FCF-USP - utilizada como padrão interno para doseamento de produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco em urina e;

- **mistura de enzimas (β -glicuronidase e aril-sulfatase - Limpet Acetone Powder, tipo I, L-1251)** - adquirida da Sigma Chemical Company (EUA) - utilizada para hidrólise dos conjugados de diclofenaco, 3'-OH-D, 4'-OH-D, 5-OH-D e 4',5-OH-D em urina.

Equipamento

Para a cromatografia utilizou-se equipamento Shimadzu constituído por bomba modelo LC-6A controlada por microprocessador modelo SCL-6B, injetor automático modelo SIL-6B, detector de absorvância variável modelo SPD 6AV ($\lambda = 282 \text{ nm}$) e integrador automático modelo CR-6A.

Para as hidrólises e extrações utilizaram-se banho-maria Fanem[®] Ltda., tipo Dubnoff, modelo 145, agitador de tubos Phoenix, modelo AT 56 e centrífuga refrigerada Du Pont, modelo Sorvall[®] RC-5B. Para a evaporação dos extratos utilizou-se banho-maria Fanem[®] Ltda. equipado com sistema de evaporação.

No preparo da fase móvel usaram-se banho de ultrassom Mini-Som Thornton para a desgaseificação e medidor de pH Tacussel, modelo PHN 75, equipado com eletrodo específico para mistura de soluções **aquosas** e solventes orgânicos, para o ajuste de pH.

3.2. Preparação de padrões

Os padrões de diclofenaco e de seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina foram preparados a partir de soluções metanólicas contendo exatamente cerca de 1 mg/ml de diclofenaco ou de cada produto de biotransformação hidroxilado. Essas soluções foram diluídas inicialmente com água e em seguida com branco de urina previamente testado, obtendo-se: padrões em três concentrações diferentes contendo exatamente cerca de 6,0, 3,0 e 0,6 µg/ml de diclofenaco e 10,0, 5,0 e 1,0 µg/ml de cada produto de biotransformação hidroxilado (3'-OH-D, 4'-OH-D, 5-OH-D e 4',5-OH-D).

O padrão interno para doseamento de diclofenaco em urina foi preparado por dissolução de ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-fenil)propiónico em metanol obtendo-se uma solução com concentração de 66 µg/ml, enquanto que o padrão interno para doseamento de produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco em urina foi preparado por dissolução de fenacetina em metanol obtendo-se uma solução com concentração de 10 µg/ml.

Tanto os padrões em urina quanto os padrões internos foram armazenados em congelador a -20°C.

3.3. Determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina

O diclofenaco é excretado na urina sob forma livre e de conjugados, tanto glicuronatos quanto sulfatos, enquanto que os seus produtos de biotransformação hidroxilados (3'-OH-D, 4'-OH-D, 5-OH-D e 4',5-OH-D) são excretados na urina sob forma conjugada [13]. As concentrações de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em amostras de urina humana foram determinadas através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa precedida de hidrólise enzimática nas amostras e extração do hidrolisado com solvente orgânico em meio ácido.

A integração dos picos do cromatograma foi realizada pelo método da padronização interna utilizando-se como padrão interno (Pi) para o diclofenaco um análogo estrutural, o ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propiónico e para os produtos de biotransformação, a fenacetina.

Procedimento de extração

Efetuuou-se a hidrólise enzimática das amostras biológicas utilizando-se uma mistura comercial contendo β -glicuronidase e aril-sulfatase. As amostras hidrolisadas foram purificadas por extração do diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados com solvente orgânico em meio ácido. Adicionaram-se volumes de 500 μ l de urina a tubos contendo 10 mg da mistura de enzimas. A

seguir acidificou-se a urina com 500 µl de tampão acetato 0,75 M, pH 5,0 contendo 4 mg/ml do antioxidante metabissulfito de sódio e incubou-se esta mistura em banho-maria a 37°C por uma hora. Transferiram-se, então, 800 µl do hidrolisado para tubos contendo 50 µl de Pi para diclofenaco (solução metanólica de ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-il-fenil)propionico a 66 µg/ml) e 100 µl de Pi para produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco (solução metanólica de fenacetina a 10 µg/ml) previamente evaporados em corrente de nitrogênio a 37°C. Procedeu-se à extração com 2 ml de mistura diclorometano:álcool isopropílico (9:1, v/v) durante 90 segundos. Após centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos para quebra da emulsão aspirou-se a fase aquosa e imergiu-se o extrato orgânico remanescente em banho de gelo seco e acetona para congelamento da fase aquosa restante. Decantou-se cuidadosamente o extrato orgânico que, em seguida, foi filtrado em sistema Millipore® com membrana FHLP 01300, transferido para tubo cônico e evaporado em corrente de nitrogênio a 37°C. Dissolveu-se o resíduo em volumes de 500 a 2000 µl de fase móvel para injeção em CLAE.

Para a purificação do branco e dos padrões utilizou-se o mesmo procedimento, omitindo-se apenas a incubação por uma hora em banho-maria a 37°C, uma vez que, no caso dos padrões, tanto o diclofenaco quanto os produtos de biotransformação encontram-se na forma não-conjugada (**Esquema analítico**).

Esquema analítico: Procedimento de extração para determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina.

Condições instrumentais para cromatografia líquida de alta eficiência

Foram realizadas duas análises por amostra através de cromatografia líquida de alta eficiência: a primeira para quantificação de produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco e a segunda para a quantificação de diclofenaco inalterado.

Na análise de produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco empregou-se coluna ODS Shimadzu de 150 mm de comprimento e 6,0 mm de diâmetro interno contendo partículas de 5 μm , enquanto que, na análise de diclofenaco inalterado empregou-se coluna Novapak® C₁₈ de 150 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno contendo partículas de 4 μm . Diariamente, antes do uso, as colunas mantida em metanol e água (75:25 v/v) foram condicionadas com acetonitrila seguida de água ultrapura durante 30 minutos.

Para a quantificação de produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco a fase móvel foi constituída por mistura de tampão acetato 0,01 M, pH 5,0, metanol e acetonitrila na proporção de 50:40:5 (v/v) e teve seu pH ajustado com ácido acético glacial para 5,40. A fase móvel foi desgaseificada a vácuo em ultrassom e, em seguida, bombeada para o sistema cromatográfico com fluxo de 1,0 ml/min. A estabilização do sistema exigiu cerca de 30 minutos.

Para a quantificação de diclofenaco a fase móvel foi constituída por mistura de tampão acetato 0,75 M, pH 5,0 e acetonitrila na proporção de 55:45 (v/v), desgaseificada a vácuo em ultrassom antes do uso e bombeada para o sistema

cromatográfico com fluxo de 0,9 ml/min. A estabilização do sistema exigiu cerca de 30 minutos.

3.4. Limites de confiança do método de determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina

As curvas de calibração foram construídas a partir de padrões obtidos pela adição de diferentes quantidades de diclofenaco e de seus produtos de biotransformação hidroxilados a brancos de urina. A linearidade foi avaliada utilizando-se ajuste pelo método dos mínimos quadrados e regressão linear. O limite de quantificação do método foi estabelecido após purificação por extração dos padrões utilizados na construção das curvas de calibração. A reprodutibilidade foi determinada a partir da precisão intra e interdias. Para a determinação da recuperação relativa da extração, padrões de diclofenaco e de seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina foram extraídos e analisados por CLAE contra injeção direta da mistura de diclofenaco e de seus produtos de biotransformação hidroxilados com os respectivos padrões internos. Finalmente, a estabilidade dos extratos orgânicos foi avaliada reinjetando-se em CLAE extratos submetidos a diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente e congelador a -20°C).

4. Resultados

O diclofenaco e seu padrão interno (ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-fenil)propiónico) apresentaram boa separação entre si e também dos componentes da urina. Os tempos de retenção foram de 3,3 e 6,5 minutos respectivamente para o diclofenaco e o padrão interno, correspondendo a volumes de retenção de 3,0 e 5,9 ml (**Figura 3**).

Figura 3: Perfil cromatográfico do diclofenaco e seu padrão interno (ácido 2-(p-ciclo-hexen-1-il-fenil)propiónico). A: branco de urina + padrão interno; B: padrão (branco de urina + 6,0 µg diclofenaco/ml) + padrão interno; C: urina de voluntário após administração peroral de diclofenaco de sódio + padrão interno. 1: diclofenaco; 2: padrão interno.

Também os quatro produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco e seu padrão interno (fenacetina) apresentaram boa separação entre si e dos componentes da urina. Os tempos de retenção foram de 10, 12, 34, 40 e 44 minutos respectivamente para o padrão interno, o 4',5-OH-D, o 3'-OH-D, o

4'-OH-D e o 5-OH-D correspondendo a volumes de retenção de 10, 12, 34, 40 e 44 ml (Figura 4).

Figura 4: Perfil cromatográfico dos produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco e seu padrão interno (fenacetina). A: branco de urina + padrão interno; B: padrão (branco de urina + 5,0 µg de cada metabólito/ml) + padrão interno; C: urina de voluntário após administração peroral de diclofenaco de sódio + padrão interno. 1: padrão interno; 2: 4',5-OH-D; 3: 3'-OH-D; 4: 4'-OH-D; 5: 5-OH-D.

O limite de quantificação do método foi de 0,1 µg/ml tanto para o diclofenaco inalterado quanto para todos os produtos de biotransformação hidroxilados. Obteve-se uma relação linear entre as concentrações de 0,4 e 10,0 µg/ml para o diclofenaco e para os produtos de biotransformação hidroxilados (Figura 5). O coeficiente de variação foi de 1,3 a 2,2 % para amostras analisada no mesmo dia e de 3,3 a 5,7 % para amostras analisadas em dias diferentes. A recuperação relativa da extração foi de 70 % em média para todos os compostos investigados (Tabela 1).

Figura 5: Curvas de calibração do diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina. ●: 4',5-OH-D; ▲: 3'-OH-D; ■: 4'-OH-D; ○: 5-OH-D; □: diclofenaco. $r^2 = 0,99$.

Os extratos orgânicos não reconstituídos com fase móvel mantêm-se estáveis por quatro dias quando conservados em congelador a -20°C; os extratos reconstituídos mantêm-se estáveis por dois dias quando conservados a -20°C e por 24 horas quando conservados à temperatura ambiente. Em vista disso, foi possível a automatização das análises por cromatografia líquida de alta eficiência, além da realização de dois perfis, conforme proposto neste trabalho.

Tabela 1: Limites de confiança do método de determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina.

Parâmetro	Unidade	Valor				
		4'-OH-D	3'-OH-D	4'-OH-D	5-OH-D	D
limite de quantificação	µg/ml	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
linearidade	µg/ml	0,4-10,0	0,4-10,0	0,4-10,0	0,4-10,0	0,4-10,0
recuperação da extração	%	57 ± 1	68 ± 4	63 ± 3	63 ± 4	92 ± 8
reproduzibilidade (1,0-10,0 µg/ml)						
intradia	%	1,7	2,2	2,0	1,3	1,4
interdias	%	3,3	3,9	4,9	4,6	5,7

5. Discussão

Nos últimos oito anos reportaram-se apenas dois métodos para determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando detector espectrofotométrico com luz ultravioleta no comprimento de onda de 282 nm [4,5] após hidrólise química básica das amostras seguida de extração em meio ácido com éter di-isopropílico [4] ou éter metil-t-butilico [5]. A hidrólise é necessária pois o diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados são excretados na urina sob forma de conjugados, mas só podem ser quantificados na forma livre, ou não-conjugada.

No presente trabalho propõe-se a hidrólise enzimática da urina utilizando uma mistura comercial de β -glicuronidase e aril-sulfatase (Limpet Acetone Powder, tipo I; 10 mg/ensaio) na quebra dos conjugados. A hidrólise enzimática, além de específica, ocorre em condições mais brandas que a hidrólise química básica, fornecendo um hidrolisado que deve conter apenas o diclofenaco inalterado e seus produtos de biotransformação na forma não-conjugada, permanecendo portanto livre de produtos indesejáveis que possam se formar em função da hidrólise química da urina.

Os dois métodos para determinação simultânea de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina referidos acima propõem, para purificação das amostras, duas extrações em meio ácido intercaladas por uma extração em meio básico utilizando-se, como solvente orgânico, o éter

di-isopropílico [4] ou o éter metil-t-butílico [5]. Zecca e colaboradores propõem, para a análise simultânea de diclofenaco e seus produtos de biotransformação em plasma ou fluido cerebrospinal, a extração em coluna tipo C₁₈ [14]. No presente método realizou-se extração simples em meio ácido do diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados (3'-OH-D, 4'-OH-D, 5-OH-D e 4',5-OH-D), após a hidrólise enzimática das amostras de urina, utilizando-se uma mistura de solventes contendo diclorometano e álcool isopropílico (9:1, v/v). A extração simples proposta no método aqui descrito, precedida de hidrólise enzimática nas amostras de urina, garantiu uma melhor recuperação que a extração tripla proposta por Landsorp e colaboradores além de fornecer extratos mais puros que aqueles obtidos após hidrólise química alcalina. Como consequência, o método aqui apresentado mostrou ser mais sensível que aquele descrito por Landsorp e colaboradores [5] tanto na determinação de diclofenaco inalterado quanto na determinação de seus produtos de biotransformação hidroxilados.

De forma geral a separação cromatográfica foi obtida utilizando-se coluna de fase reversa tipo C₁₈ [4,5] ou C₈ [14]. Godbillon e colaboradores, utilizando coluna Nucleosil® C₁₈, 250 × 4,7 mm, contendo partículas de 10 µm e fase móvel constituída por mistura de metanol, acetonitrila e tampão fosfato de pH 7,0 na proporção de 30:17:53 (v/v) não conseguiram separar o produto de biotransformação 4',5-OH-D dos componentes endógenos extraídos da urina; também não obtiveram separação entre 3'-OH-D e 4'-OH-D, que foram eluídos no mesmo tempo de retenção, tornando impossível a quantificação destes dois compostos no material biológico em questão [4]. Landsorp e colaboradores conseguiram uma melhoria da seletividade em relação ao método anterior

utilizando coluna Chrompack® Hypersil 5-ODS, 250 × 4,6 mm, contendo partículas de 5 µm, acoplada a uma pré-coluna e fase móvel constituída por mistura de acetonitrila, metanol, tetra-hidrofurano e água na proporção de 15:10:3:72 (v/v). Este sistema permitiu uma separação razoável dos produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco com eluição do 4',5-OH-D aos 5 minutos, seguida pela eluição do 3'-OH-D, 4'-OH-D e 5-OH-D aos 10, 11 e 15 minutos respectivamente. Observa-se que o 4',5-OH-D foi eluído muito próximo aos componentes endógenos presentes no extrato de urina hidrolisada e que a separação entre 3'-OH-D e 4'-OH-D foi incompleta. Após a eluição dos produtos de biotransformação hidroxilados foram necessários cerca de 30 minutos adicionais para a eluição do diclofenaco inalterado [5]. Zecca e colaboradores, analisando amostras de plasma e fluido cerebrospinal, e utilizando coluna C₈, 80 × 4,6 mm, contendo partículas de 3 µm e fase móvel constituída por acetonitrila e tampão acetato pH 3,0 na proporção 35:65 (v/v) conseguiram separação entre todos os produtos de biotransformação do diclofenaco, embora, também neste caso, a eluição do 4',5-OH-D tenha sido precoce e a separação entre 3'-OH-D, 3'-OH-4'-MeO-D e 4'-OH-D tenha sido incompleta. Após a eluição dos produtos de biotransformação foram necessários cerca de 15 minutos adicionais para a eluição do diclofenaco inalterado [14].

No presente trabalho, propõe-se a análise do diclofenaco e produtos de biotransformação hidroxilados em dois perfis combinados, ou seja, em dois sistemas cromatográficos independentes, mas consecutivos. No primeiro deles efetuou-se a separação dos produtos de biotransformação hidroxilados utilizando coluna ODS Shimadzu®, 150 × 6,0 mm, contendo partículas de 5 µm e fase móvel

constituída por mistura de tampão acetato 0,01 M, pH 5,0, metanol e acetonitrila na proporção de 50:40:5 (v/v). O pH da fase móvel foi ajustado com ácido acético glacial (pH = 5,40). Este sistema mostrou-se altamente seletivo para os produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco e seu padrão interno (fenacetina) que foram eluídos na seguinte ordem e com os seguintes tempos de retenção, respectivamente: padrão interno, 10 minutos; 4',5-OH-D, 12 minutos; 3'-OH-D, 34 minutos; 4'-OH-D, 40 minutos e 5-OH-D, 44 minutos. Foram necessários cerca de 45 minutos para a eluição de todos os produtos de biotransformação hidroxilados utilizando fluxo de 1,0 ml/min. É importante ressaltar que o pH final da fase mostrou-se crítico para garantir a seletividade do sistema, devendo ser testado diariamente para garantir a reprodutibilidade dos tempos de retenção dos produtos de biotransformação. No sistema acima descrito, o diclofenaco inalterado exigiria cerca de 300 minutos para ser eluído, equivalendo a um volume de retenção de 300 ml. Portanto, o prejuízo em função do tempo de análise, desgaste do sistema cromatográfico e utilização de volumes altos de fase móvel, bem como problemas na detecção do pico deste componente pela sua alta interação com a fase estacionária justificam a realização de um segundo perfil de separação para determinação do diclofenaco inalterado na urina. Assim sendo, propõe-se um segundo sistema cromatográfico utilizando coluna Novapak[®] C₁₈, 150 × 3,9 mm, contendo partículas de 4 µm e fase móvel constituída de tampão acetato 0,75 M, pH 5,0 e acetonitrila na proporção de 55:45 (v/v) e fluxo de 0,9 ml/min. Este sistema é o mesmo utilizado para a determinação de diclofenaco em plasma descrita no Capítulo I [8]. Neste sistema o diclofenaco foi eluído em 3,3 minutos e o seu padrão interno (ácido 2-(p-ciclo-hexen-1'-fenil)propiónico), em 6,5 minutos.

Desta forma foi possível automatizar a análise cromatográfica de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados. Os extratos secos de urina hidrolisada reconstituídos com fase móvel foram submetidos primeiramente ao sistema cromatográfico para análise simultânea dos produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco, numa corrida de 45 minutos por amostra. Em seguida, os mesmos extratos foram submetidos ao segundo sistema para determinação do diclofenaco inalterado. Cerca de 15 horas são necessárias para a análise dos extratos de urina (replicata, $n = 2$) provenientes de amostras de voluntários coletadas nos periodos de 0-4, 4-8, 8-12, 12-24, 24-36 e 36-48 horas e dos extratos de urina provenientes dos padrões (replicata, $n = 3$) utilizando estes dois sistemas cromatográficos num mesmo equipamento.

O método de determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados na urina mostrou-se sensível, linear na faixa de estudo, com boa recuperação na extração e precisão das medidas para todos os componentes investigados. O procedimento analítico mostrou-se também altamente seletivo comparativamente àqueles já reportados, possibilitando estudos de excreção renal e metabolismo do diclofenaco bem como de interação farmacocinética.

6. Referências bibliográficas

1. BATTISTA, H.J., WEHINGER, G., HENN, R. Separation and identification of non-steroidal antirheumatic drugs containing a free carboxyl function using high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.345, p. 77-89, 1985.
2. DEGEN, P.H. The assay of diclofenac and metabolites: a review. **Methodol. Surv. Biochem. Anal.**, New York, v. 18, p. 107-114, 1988.
3. GEIGER, U.P., DEGEN, P.H., SIOUFI, A. Quantitative assay of diclofenac in biological material by gas-liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.111, p. 293-298, 1975.
4. GODBILLON, J., GAURON, S., METAYER, J.P. High performance liquid chromatographic determination of diclofenac and its monohydroxylated metabolites in biological fluids. **J. Chromatogr.** Amsterdam, v. 338, p. 151-159, 1985.
5. LANDSORP, D., JANSSEN, T.J., GUELEN, P.J.M., VREE, T.B. High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.528, p.487-494, 1990.
6. MENASSÉ, R., HEDWALL, P.R., KRAETZ, J., PERICIN, C. RIESTERER, A., SALLMANN, R., ZIEL, R., JAQUES, R. Pharmacological properties

- of diclofenac sodium and its metabolites. **Scand. J. Rheumatol. Suppl.**, Stockholm, v. 22, p. 5-16, 1978.
7. SAID, S.A., SHARAF, A.A. Pharmacokinetics of diclofenac using a developed HPLC method. **Arzneim. Forsch.**, v.31, p. 2089-2092, 1981
 8. SANTOS, S.R.C.J.S., DONZELLA, H., BERTOLINE, M.A., PEREIRA, M.D., OMOSAKO, C.E., PORTA, V. Simplified micromethod for the HPLC measurement of diclofenac in plasma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.25, p.124-128, 1992.
 9. SCHNEIDER, W. & DEGEN, P.H. Simultaneous determination of diclofenac sodium and its hydroxy metabolites by capillary column gas chromatography with electron-capture detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 217, p. 263-271, 1981.
 10. SCHNEIDER, W., DEGEN, P.H. Simultaneous determination of diclofenac sodium and its metabolites in plasma by capillary column gas chromatography with electron-capture detection. **J. of Chromatogr.**, Amsterdam, v.383, p. 412-418, 1986.
 11. SCHWEIZER, A., WILLIS, J.V., JACK, D.B, KENDALL, M.J. Determination of total monohydroxylated metabolites of diclofenac in urine by electron-capture gas-liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 195, p. 421-424, 1980.
 12. SMALL, R.E. Diclofenac sodium. **Clin. Pharm.**, Bethesda, v. 8, p.545-558, 1989.

13. TODD, P.A. & SORKIN, E.M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, Auckland, v.35, p.244-285, 1988..
14. ZECCA, L., FERRARIO, P. & COSTI, P. Determination of diclofenac and its metabolites in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.567, p.425-432., 1991.

Abstract

Diclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) advocated for use in painful and inflammatory rheumatic diseases and certain non-rheumatic conditions. Diclofenac is extensively metabolized mainly by oxidative pathways followed by glucuronide conjugation. A small percentage of the original drug is glucuronidated directly. Many methods have been described for the determination of diclofenac and its metabolites in biological fluids, including gas-chromatography with electron-capture detection and high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV or electrochemical detection. However, none of the HPLC methods was sufficiently specific for use in kinetic disposition studies. We describe a sensitive and specific procedure for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in urine, involving single extraction after enzymic hydrolysis of the glucuronic conjugates and HPLC with UV detection. The enzymic hydrolysis was performed by adding 500 μ l of urine to test tubes containing 10 mg of a mixture of β -glucuronidase and aril-sulphatase and 500 μ l of acetate buffer 0,75 M, pH 5,0. This mixture was incubated at 37°C for one hour. Then, 800 μ l of the mixture were transferred to test tubes containing 3,3 μ g internal standard for diclofenac (2-(p-ciclohexen-1'-il-phenyl)propionic acid) and 1 μ g internal standard for metabolites (phenacetine). Dichlormethane and isopropyl alcohol (9:1, v/v) (2 ml) was added and the mixture was agitated with a vortex mixer and centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes. The aqueous phase was discarded and the organic phase filtered through a 0,4 μ m FHLP 01300 Millipore® filter and evaporated in a stream of nitrogen at 37°C. The residue was dissolved in 500-2000 μ l mobile phase and injected in the liquid chromatograph. Analytical separation was performed in two independent consecutives isocratic systems on reverse-phase column. In the first HPLC profile an ODS-Shimadzu column, 150 $\times$ 6,0 mm, 5 μ m and a mobile phase constituted of acetate buffer 0,01 M, pH 5,0, methanol and acetonitrile (50:40:5, v/v) at a flow rate of 1,0 ml/min were used for the elution of internal standard (phenacetine) at 10 minutes, 4',5-dihydroxydiclofenac at 12 minutes, 3'-hydroxydiclofenac at 34 minutes, 4'-hydroxydiclofenac at 40 minutes and 5-hydroxydiclofenac at 44 minutes. In the second one a Novapak® C₁₈ column, 150 $\times$ 3,9 mm, 4 μ m and a mobile phase constituted of acetate buffer 0,75 M, pH 5,0 and acetonitrile (55:45, v/v) at a flow rate of 0,9 ml/min were used for the elution of diclofenac at 3,3 minutes and internal standard (2-(p-ciclohexen-1'-phenyl)propionic acid) at 6,5 minutes. Confidence limits for diclofenac and its hydroxy metabolites were: 0,4-10,0 μ g/ml, linearity; 0,1 μ g/ml, sensitivity, 75 %, mean extraction recovery, and intra and interassay precision ranging from 1,3 to 2,2 % and 3,3 to 5,7 %, respectively. This method proved to be sufficiently sensitive, precise, accurate and specific for urinary excretion studies involving diclofenac and its hydroxy metabolites.

**Estudo de interação entre
a ranitidina e o diclofenaco em
voluntários sadios após administração
peroral de Voltaren® 50**

Capítulo IV

Índice

Resumo	p. 115
1. Introdução	p. 116
2. Objetivo	p. 121
3. Material e métodos	p. 122
3.1. Protocolo de estudo	p. 122
3.1.1. Casuística	p. 122
3.1.2. Administração dos fármacos	p. 123
3.1.3. Coleta e armazenamento de amostras	p. 124
3.2. Procedimento analítico	p. 125
3.2.1. Análise das amostras de plasma	p. 125
3.2.2. Análise das amostras de urina	p. 127
3.3. Cálculos e análise estatística	p. 129
3.3.1. Cálculos	p. 129
3.3.2. Análise estatística	p. 133
4. Resultados e discussão	p. 134

5. Conclusão ..	p. 159
6. Referências bibliográficas	p. 159
Abstract	p. 165
Apêndice	p. 166

Resumo

Avaliou-se a existência ou não de interação farmacocinética entre a ranitidina e o diclofenaco em voluntários sadios após administração de dose peroral de Voltaren® 50. Selecionaram-se 15 e avaliaram-se oito voluntários adultos, de ambos os sexos, sadios, em estudo constituído por duas fases. Dos oito voluntários, um foi excluído do estudo. Na Fase I o diclofenaco foi administrado isoladamente aos voluntários em jejum pela manhã. Na Fase II, os voluntários foram submetidos a um tratamento de sete dias com ranitidina, depois do qual receberam nova dose de diclofenaco. A administração de ranitidina continuou por mais três dias. Foram colhidas amostras de sangue e urina no intervalo de 0-72 horas após a administração de diclofenaco nas duas fases do estudo. Determinou-se a concentração plasmática e urinária de diclofenaco e a concentração urinária de seus produtos de biotransformação hidroxilados por técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, em dois perfis independentes e consecutivos para diclofenaco e produtos de biotransformação, precedida por extração com solvente orgânico em meio ácido e, no caso das amostras de urina, precedida também por hidrólise enzimática. Os valores de "clearance" de formação (Cl_f) dos produtos de biotransformação hidroxilados foram, em $X \pm EPM$ (mediana): $15,9 \pm 2,9$ (15,2) ml/min para o 4',5-hidroxiclofenaco, $3,3 \pm 0,9$ (2,6) ml/min para o 3'-hidroxiclofenaco, $22,1 \pm 5,9$ (23,5) ml/min para o 4'-hidroxiclofenaco e $8,74 \pm 1,43$ (7,4) ml/min para o 5-hidroxiclofenaco quando se administrou diclofenaco isoladamente. Não houve alteração significativa destes valores pela associação com a ranitidina. Da mesma forma, o "clearance" renal (Cl_r) do diclofenaco, de $7,1 \pm 2,8$ (5,1) ml/min após administração de diclofenaco isolado, não sofreu alteração significativa pela associação com a ranitidina. A associação com a ranitidina provocou um aumento significativo de cerca de 43 % na meia-vida de eliminação do diclofenaco em plasma, que passou de $1,01 \pm 0,13$ h ($X \pm EPM$) na Fase I (fármaco isolado) para $1,44 \pm 0,34$ h na Fase II (fármaco associado), além de causar redução da excreção urinária do produto de biotransformação 4'-hidroxiclofenaco, que teve sua fração eliminada total (Fel_T) reduzida de $5,85 \pm 1,12$ (5,06) % ($X \pm EPM$ (med)) na Fase I para $4,39 \pm 0,75$ (3,73) % na Fase II. Com base nestes resultados sugere-se que a ranitidina reduza a biotransformação do diclofenaco pela diminuição da excreção renal de seu principal produto de biotransformação hidroxilado (4'-hidroxiclofenaco) com conseqüente aumento da meia-vida de eliminação plasmática do diclofenaco. Apesar da interação farmacocinética aqui registrada, a associação diclofenaco-ranitidina é vantajosa para pacientes com história de úlcera péptica, suscetíveis a ulceração recorrente.

1. Introdução

O diclofenaco é um antiinflamatório não-esteroidal capaz de suprimir inflamação aguda e crônica, dor e hipertermia em modelos animais [16,29]. Seus efeitos farmacológicos estão relacionados à inibição da enzima cicloxigenase com conseqüente inibição da síntese de prostaglandinas [29].

O diclofenaco é indicado no tratamento de pacientes portadores de doenças reumáticas acompanhadas de dor e inflamação e também em algumas condições não-reumáticas [27,29].

Este fármaco é eliminado do organismo fundamentalmente através de biotransformação, sofrendo principalmente reações de oxidação em várias posições dos anéis aromáticos que originam quatro produtos de biotransformação hidroxilados: 3'-hidroxidiclofenaco (3'-OH-D), 4'-hidroxidiclofenaco (4'-OH-D), 5-hidroxidiclofenaco (5-OH-D) e 4',5-di-hidroxidiclofenaco (4',5-OH-D) [17,26,28]. Em 1988, Faigle e colaboradores identificaram um quinto produto de biotransformação do diclofenaco, o 3'-hidroxi-4'-metoxidiclofenaco (3'-OH-4'-MeO-D). A formação deste produto envolve reações de oxidação e metilação e é provável que os produtos de biotransformação 3'-OH-D e 4'-OH-D atuem como intermediários destas reações [5] (**Figura 1**).

Figura 1: Diclofenaco e seus produtos de biotransformação.
 I: diclofenaco; II: 4'-OH-D; III: 5-OH-D; IV: 3'-OH-D;
 V: 4', 5-OH-D; VI: 3'-OH-4'-MeO-D.

Os produtos de biotransformação hidroxilados (4'-OH-D, 3'-OH-D, 5-OH-D e 4',5-OH-D) apresentam uma cinética em plasma semelhante à do diclofenaco, atingindo concentração plasmática máxima cerca de 40 minutos após administração de solução peroral de diclofenaco de sódio. A meia-vida de decaimento plasmático dos produtos de biotransformação hidroxilados varia entre 1 e 3 horas, sendo, portanto, semelhante à do diclofenaco. Decorridas 36 horas da administração já não é possível detectar o diclofenaco ou seus produtos de biotransformação hidroxilados no plasma. O produto de biotransformação metoxilado (3'-OH-4'-MeO-D), por sua vez, alcança concentração plasmática máxima 12 horas após a administração e permanece no plasma por mais de 96 horas, apresentando meia-vida de eliminação de cerca de 80 horas [2].

Tanto o diclofenaco quanto seus produtos de biotransformação sofrem conjugação originando no homem glicuronatos e sulfatos que são excretados na bile e na urina [17,26,28,29]. No cão e no rato o diclofenaco sofre circulação entero-hepática [17]. Schneider e colaboradores, em estudo realizado em pacientes portadores de doença hepática ou câncer de pâncreas, determinaram que cerca de 5 % da dose administrada por via oral foi excretada por via biliar na forma de diclofenaco inalterado e produtos de biotransformação, mas este valor pode chegar a 10 % em indivíduos com função hepática normal [23]

Entre os produtos de biotransformação hidroxilados, o de maior excreção urinária é o 4'-OH-D, seguido pelos produtos 4',5-OH-D, 5-OH-D e 3'-OH-D, em ordem decrescente de excreção urinária [2,17].

O produto de biotransformação 4'-OH-D apresenta atividade antiedematosa em ratos, sendo seis vezes mais potente neste caso que o ácido acetilsalicílico, mas 30 vezes menos ativo que o diclofenaco inalterado. Também é ativo na redução do inchaço de artrite induzida em ratos, sendo, neste caso, 40 vezes menos eficiente que o diclofenaco. Apresenta atividade antipirética cerca de 30 vezes menor que a do diclofenaco. A atividade antiinflamatória deste produto de biotransformação deve-se à sua capacidade de inibir a síntese de prostaglandinas *in vitro*. Os outros produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco não apresentam atividade antiinflamatória e só são capazes de inibir a síntese de prostaglandinas *in vitro* em altas doses. Nenhum dos produtos de biotransformação hidroxilados apresentou toxicidade superior à do diclofenaco: a DL₅₀ do 4'-OH-D é da mesma ordem que a do diclofenaco inalterado, enquanto que a toxicidade dos outros produtos é significativamente menor. Além disso, nenhum destes produtos de biotransformação apresenta efeito deletério na mucosa gastrointestinal de ratos, ao contrário do fármaco inalterado [16]. O produto 3'-OH-4'-MeO-D é cerca de 300 vezes menos ativo que o diclofenaco inalterado na inibição da síntese de prostaglandinas *in vitro* e cerca de 50 vezes menos potente como analgésico [29].

Como a grande maioria dos fármacos antiinflamatórios não-esteroidais, o diclofenaco pode provocar, como efeito colateral, lesões no trato gastrointestinal [29]. Para evitar essas reações adversas alguns autores sugerem a administração de ranitidina, um antagonista de receptores H₂ de histamina a pacientes que estejam em tratamento crônico com antiinflamatórios não-esteroidais [4].

A ranitidina é um antagonista de receptor H₂ de histamina que, juntamente com a famotidina, vêm substituindo a cimetidina no tratamento de pacientes com

lesões gástricas, por se mostrar mais potente e por produzir menos efeitos colaterais.

Os fármacos que sofrem reações de biotransformação oxidativas no retículo endoplasmático hepático, entre os quais inclui-se o diclofenaco, ligam-se ao citocromo P-450 formando um complexo que sofre oxidação pela ação de monoxigenases de função mista. A cimetidina também se liga ao citocromo P-450, produzindo um complexo citocromo-substrato estável. A formação deste complexo impede o acesso de outros fármacos ao sistema enzimático do citocromo P-450, inibindo as monoxigenases de função mista e reduzindo, desta forma, a biotransformação de outros fármacos. [24,25]. A ranitidina não forma um complexo tão estável quanto a cimetidina e, portanto, não inibe a biotransformação de outros fármacos na mesma extensão [24]. Alguns autores chegam a considerar a ranitidina e a famotidina livres de interação [19,32], mas, como a cimetidina, a ranitidina também é capaz de inibir a monoxigenase [9,10,13].

Estudos comprovam que a cimetidina e a ranitidina provocam redução do fluxo sanguíneo hepático, e foi sugerido que este fato seria responsável pela redução da depuração hepática de alguns fármacos [1]. Novas evidências, no entanto, indicam que os antagonistas de receptores H_2 de histamina não têm efeito significativo sobre o fluxo sanguíneo hepático [3,15,30] e este efeito seria pouco importante na interação.

A cimetidina é capaz de inibir o metabolismo da nifedipina [24] o mesmo ocorrendo, em menor escala, com a ranitidina [13]. Também a nitrendipina sofreu inibição por parte da cimetidina [12] e da ranitidina [9,22]. A famotidina, um novo

antagonista de receptores H_2 de histamina, não mostrou interferência no metabolismo da nifedipina [11].

Outros fármacos que têm sua cinética alterada por inibição de sua biotransformação quando associados à cimetidina ou à ranitidina são o midazolam [6], a warfarina e o metoprolol. As alterações provocadas pela ranitidina são sempre em menor escala que as provocadas pela cimetidina. Assim, quando é necessário associar um fármaco altamente biotransformado no sistema microssomal hepático a um antagonista de receptor H_2 de histamina opta-se pela ranitidina [24]. Em vista disso, a ranitidina é largamente prescrita em associação a antiinflamatórios não-esteroidais, como o diclofenaco. Que tipo de interação pode ser esperada, de forma a tornar essa associação vantajosa? Devido à ausência de trabalhos sobre tal assunto é imperativa a realização desse estudo, para dar suporte farmacológico ao Clínico, visando terapia eficaz e de baixo risco.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar a existência ou não de interação entre diclofenaco, um fármaco altamente biotransformado, e a ranitidina, um antagonista de receptores H_2 de histamina, altamente prescrito em associação.

3. Material e métodos

3.1. Protocolo de estudo

3.1.1. Casuística

Foram selecionados inicialmente 15 voluntários sadios, de ambos os sexos, para inclusão no estudo. Apenas oito, dos quais um fumante e sete não fumantes, consumidores moderados ou não-consumidores de álcool, com idade variando de 20 a 44 anos (28 ± 8 anos, $\bar{X} \pm DP$), peso de 47 a 97 kg (64 ± 15 kg, $\bar{X} \pm DP$) e altura de 150 a 193 cm (171 ± 14 cm, $\bar{X} \pm DP$) concluíram o protocolo de estudo. A identificação e dados pessoais de cada voluntário são indicados no **Quadro a.1, Apêndice**. Todos os voluntários foram informados em detalhes sobre o estudo e forneceram o seu consentimento de participação por escrito (**Consentimento de Participação Pós-informação, Apêndice**). Nenhum deles tomou qualquer medicação que pudesse interferir no estudo nas três semanas que o precederam. Um dos voluntários (Voluntário 8) foi retirado do estudo por ter contraído infecção durante o mesmo, necessitando da administração de antibióticos e antivirais.

3.1.2. Administração dos fármacos

O estudo foi dividido em duas fases, conforme o esquema:

Fase I	Fase II	
1ª semana	2ª semana	
1º dia diclofenaco de sódio 50 mg dose única	1º ao 10º dia cloridrato de ranitidina 300 mg/dia	7º dia diclofenaco de sódio 50 mg dose única

O diclofenaco foi administrado na forma de comprimidos de revestimento entérico contendo 50 mg de diclofenaco de sódio por comprimido (Voltaren® 50), enquanto que a ranitidina foi administrada diariamente na dose de 300 mg, duas vezes ao dia

Na Fase I do estudo o diclofenaco foi administrado pela manhã aos voluntários em jejum em dose única peroral de um comprimido. Os voluntários receberam desjejum uma hora após a administração e, depois disso, seguiram uma dieta normal.

Uma semana após a realização da Fase I iniciou-se a Fase II. Nesta fase os voluntários foram submetidos a um tratamento de dez dias com ranitidina durante o qual receberam 300 mg de cloridrato de ranitidina por dia, divididos em duas doses

de 150 mg cada, sendo uma dose administrada de manhã e a outra, à noite. No sétimo dia do tratamento procedeu-se à administração do diclofenaco conforme descrito anteriormente para a Fase I. A administração de ranitidina continuou por mais três dias, correspondentes ao tempo necessário para as coletas de urina.

3.1.3. Coleta e armazenamento de amostras

Plasma

Foram coletadas amostras de sangue 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 e 8 horas após a administração do diclofenaco, tanto na Fase I quanto na Fase II do estudo. Esta coleta foi feita com seringas plásticas descartáveis mantendo-se a veia dos voluntários com Butterfly® Abbott heparinizado. O plasma foi separado por centrifugação e mantido em congelador a -20°C até a execução da análise.

Urina

A urina dos voluntários foi coletada nos intervalos de 0-4, 4-8, 8-12, 12-24, 24-36, 36-48, 48-60 e 60-72 horas após a administração do diclofenaco. Esta coleta foi realizada em frascos âmbar contendo o antioxidante metabissulfito de sódio (4 mg/mL urina). No período de coleta os frascos foram mantidos em refrigerador. Mediram-se o pH e o volume total de urina em cada intervalo de

colera. Aliquotas de 20 ml em duplicata foram mantidas em congelador a -20°C até a execução da análise.

3.2. Procedimento analítico

3.2.1. Análise das amostras de plasma

As amostras de plasma foram analisadas em duplicata paralelamente a padrões em três diferentes concentrações em triplicata. A concentração plasmática de diclofenaco nas amostras foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa precedida de extração, conforme descrito no Capítulo I e resumido no **Esquema analítico 1** [21].

Esquema analítico 1: Micrométodo para determinação de diclofenaco em plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.2. Análise das amostras de urina

As amostras de urina foram analisadas em duplicata paralelamente a padrões em três diferentes concentrações em triplicata. A concentração urinária de diclofenaco e seus metabólitos hidroxilados nas amostras foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência precedida de hidrólise enzimática e extração com solvente orgânico em meio ácido conforme descrito no Capítulo III e resumido no **Esquema analítico 2**.

Esquema analítico 2: Procedimento de extração para determinação de diclofenaco e seus produtos de biotransformação hidroxilados em urina.

3.3. Cálculos e análise estatística

3.3.1. Cálculos

Plasma

A farmacocinética do diclofenaco em plasma após administração de dose única peroral de diclofenaco de sódio associado ou não à ranitidina foi avaliada em voluntários sadios com base nas curvas "concentração plasmática vs tempo" ($C \times t$) e "transformação logarítmica da concentração plasmática vs tempo" ($\log C \times t$). Aplicou-se um modelo bicompartimental aberto de administração extravascular, caracterizado por três fases: absorção, distribuição e eliminação [18].

Foram calculados os seguintes parâmetros farmacocinéticos:

- $C_{\max}$: concentração plasmática máxima que o fármaco atinge após a administração peroral. É obtida a partir da curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)".
- $t_{\max}$: tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco atinja o valor de $C_{\max}$. Também é obtido a partir da curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)".
- $t(1/2)_\beta$: meia-vida de eliminação do diclofenaco, que corresponde ao tempo necessário para que a concentração plasmática do fármaco se reduza em

50 %. É obtida graficamente a partir da curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)"

- β : constante de velocidade de eliminação, calculada através da equação.

$$\beta = \frac{0,693}{t(1/2)_\beta} \quad (\text{h}^{-1})$$

- AUC_T : área sob a curva "concentração plasmática (ng/mL) vs tempo (h)", calculada da seguinte forma:

$$AUC_T = AUC_{0-8} + AUC_{8-\infty} \quad (\text{ng}\cdot\text{h/ml})$$

onde:

AUC_{0-8} : área sob a curva "concentração plasmática (ng/mL) x tempo (h)" no intervalo de 0 a 8 horas, calculada pelo método dos trapezóides através da equação.

$$AUC_{0-8} = \sum AUC_{\text{intervalo}}$$

e:

$$AUC_{\text{intervalo}} = \frac{(t_2 - t_1)(C_1 + C_2)}{2} \quad (\text{ng}\cdot\text{h/ml})$$

t_1 : instante inicial do intervalo em que se quer determinar AUC;

t_2 : instante final do intervalo em que se quer determinar AUC;

C_1 : concentração plasmática de diclofenaco em t_1 e;

C_2 : concentração plasmática de diclofenaco em t_2 .

e:

$AUC_{8-\infty}$: área sob a curva "concentração plasmática (ng/mL) x tempo (h)" no intervalo de 8 h a ∞ , calculada por extrapolação até infinito através da equação:

$$AUC_{8-\infty} = \frac{C_8}{\beta} \quad (\text{ng} \cdot \text{h/ml})$$

onde:

C_8 : concentração plasmática de diclofenaco em $t = 8$ h.

• Cl_T : taxa de depuração plasmática total ("clearance" total) do diclofenaco, calculada pela equação:

$$Cl_T = \frac{D}{AUC_T} \quad (\text{ml/min})$$

onde.

D: dose de diclofenaco administrada.

• V_d : volume aparente de distribuição do fármaco, obtido através da equação.

$$V_d = \frac{Cl_T}{\beta} \quad (l)$$

Urina

A excreção urinária do diclofenaco e de seus metabólito hidroxilados em voluntários sadios após administração de dose única de diclofenaco associado ou não à ranitidina foi avaliada através dos seguintes parâmetros [7,18]:

- **$Ae_{\Delta t}$** : quantidade de fármaco ou metabólito excretada na urina num determinado intervalo de tempo. É obtida pela equação:

$$Ae_{\Delta t} = C_{\Delta t} \times V_{\Delta t} \quad (\text{mg})$$

onde:

$C_{\Delta t}$ concentração urinária de diclofenaco ou produto de biotransformação no intervalo de tempo Δt e;

$V_{\Delta t}$ volume de urina no intervalo de tempo Δt .

- **Fel_T** : fração da dose eliminada na urina sob forma de diclofenaco ou produto de biotransformação durante todo o periodo de duração do estudo. É calculado pela equação:

$$Fel_T = \sum Fel_{\Delta t} \quad (\%)$$

e:

$Fel_{\Delta t}$ fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de diclofenaco ou produto de biotransformação, calculada pela equação:

$$Fel_{\Delta t} = \frac{Ae_{\Delta t}}{D} \times 100 \quad (\%)$$

• Cl_r : taxa de depuração renal ("clearance" renal) do diclofenaco, obtida por meio da equação:

$$Cl_r = Fel_{Td} \times Cl_T \quad (\text{ml/min})$$

onde:

Fel_{Td} : fração da dose eliminada na urina sob forma de diclofenaco durante todo o periodo de duração do estudo.

• Cl_f : taxa de formação ("clearance" de formação) de cada produto de biotransformação do diclofenaco, calculada pela equação:

$$Cl_f = Fel_{Tm} \times Cl_T \quad (\text{ml/min})$$

onde:

Fel_{Tm} : fração da dose eliminada na urina sob forma de cada produto de biotransformação do diclofenaco durante todo o periodo de duração do estudo.

3.3.2. Análise estatística

Sugeriu-se, com base estatística, que a interpretação dos resultados fosse efetuada utilizando-se teste estatístico não-paramétrico, uma vez que se trata de

estudo altamente controlado, investigando-se, no entanto, população reduzida. Desta forma os resultados foram submetidos ao teste de Wilcoxon ("Rank Sum Test"). Efetuou-se também um teste estatístico paramétrico (teste "t" de Student) para efeito de comparação [20].

4. Resultados e discussão

Os principais parâmetros farmacocinéticos do diclofenaco em voluntários sadios, determinados com base nas curvas de decaimento plasmático do diclofenaco em função do tempo após administração de diclofenaco isolado e associado à ranitidina, estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1 Disposição cinética do diclofenaco em voluntários sadios apos dose única peroral de diclofenaco de sódio.

Parâmetro	diclofenaco	diclofenaco + ranitidina	p	significância
$t(1/2)_\beta$ (h)	1.01 ± 0.13 (0.95)	1.44 ± 0.34 (0.95)	0.26* 0.05**	NS† S‡
β (h ⁻¹)	0.7683 ± 0.1102 (0.7295)	0.5933 ± 0.0859 (0.7295)	0.23 0.09	NS NS
Cl_T (ml/min)	447 ± 80 (374)	408 ± 52 (367)	0.69 0.35	NS NS
V_d (l)	37.9 ± 7.2 (30.7)	46.7 ± 6.7 (48.8)	0.39 0.45	NS NS
AUC_T (ng·h/ml)	1986 ± 252 (2075)	2022 ± 209 (2113)	0.91 0.93	NS NS

valores em $X \pm EPM$ (mediana)

* teste "t", paramétrico

** teste de Wilcoxon, não-paramétrico

†NS: diferença não-significativa

‡S: diferença significativa

As curvas médias de decaimento plasmático do diclofenaco em função do tempo após administração isolada e associado à ranitidina estão ilustradas na **Figura 2**, enquanto que as curvas das medianas podem ser vistas na **Figura 3**.

CURVA DAS MEDIAS Voluntarios 1 a 7

	β n^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu g \cdot h / ml$
FASE I	0.768	447	37.9	1987
FASE II	0.593	408	46.7	2022

Figura 2: Curvas médias de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) a voluntários sadios (n = 7).

CURVA DAS MEDIANAS Voluntarios 1 a 7

	β h^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu g \cdot h/ml$
FASE I	0.730	374	30.7	2074
FASE II	0.730	367	48.8	2113

Figura 3: Curvas medianas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) a voluntários sadios (n = 7).

Observou-se uma diferença significativa, com $p = 0,05$, entre os valores de meia-vida de eliminação do diclofenaco nas duas fases do estudo. Após administração de diclofenaco isolado (Fase I), obteve-se meia-vida de, expressa em $X \pm \text{EPM}$ (mediana), $1,01 \pm 0,13$ (0,95) h. Quando o diclofenaco foi associado à ranitidina (Fase II), a meia-vida aumentou para $1,44 \pm 0,34$ (0,95) h (**Tabela 1**). Os demais parâmetros farmacocinéticos, como constante de eliminação (β), depuração plasmática total (Cl_T), volume aparente de distribuição (V_d) e área sob a curva "concentração plasmática vs tempo" (AUC_T) não mostraram diferença entre as duas fases do estudo (**Tabela 1**).

Os valores de meia-vida de eliminação ($t(1/2)_\beta$) e área sob a curva "concentração plasmática vs tempo" (AUC_T) obtidos para o diclofenaco na Fase I deste estudo são semelhantes aos descritos anteriormente na literatura para voluntários sadios [2,31]

A **Figura 4** ilustra as curvas média de excreção urinária do diclofenaco inalterado e de seus produtos de biotransformação hidroxilados nas Fases I e II deste estudo. As medianas dos valores de fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de fármaco inalterado ou biotransformado em cada período de coleta (0-4, 4-8, 8-12, 12-24, 24-36, 36-48, 48-60 e 60-72) nas Fases I e II do estudo estão ilustradas nas **Figuras 5, 6, 7, 8 e 9** respectivamente para o 4',5-di-hidroxiclofenaco, o 3'-hidroxiclofenaco, o 4'-hidroxiclofenaco, o 5-hidroxiclofenaco e o diclofenaco inalterado.

FRACAO ELIMINADA - MEDIAS

Figura 4: Curvas médias de excreção urinária de diclofenaco e de seus produtos de biotransformação hidroxilados após administração de dose única de diclofenaco de sódio isolado ou associado à ranitidina (n = 7).

FRAÇÃO ELIMINADA vs INTERVALO 4'5-DIIDROXIDICLOFENACO

Figura 5: Fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de 4'5-di-hidroxiclofenaco após administração de dose única de diclofenaco de sódio isolado ou associado à ranitidina - medianas (n = 7).

Figura 6: Fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de 3'-hidroxidiclofenaco após administração de dose única de diclofenaco de sódio isolado ou associado à ranitidina - medianas (n = 7).

Figura 7: Fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de 4'-hidroxidiclofenaco após administração de dose única de diclofenaco de sódio isolado ou associado à ranitidina - medianas (n = 7).

Figura 8: Fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de 5-hidroxiclofenaco após administração de dose única de diclofenaco de sódio isolado ou associado à ranitidina - medianas (n = 7).

Figura 9: Fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de diclofenaco inalterado após administração de dose única de diclofenaco de sódio isolado ou associado à ranitidina - medianas (n = 7).

Observou-se decaimento exponencial para os principais produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco, o 4',5-OH-D (**Figuras 4 e 5**), o 4'-OH-D (**Figuras 4 e 7**) e o 5-OH-D (**Figuras 4 e 8**). O mesmo não ocorreu para o 3'-OH-D (**Figuras 4 e 6**), o que é explicado pelo fato deste produto ser, entre os produtos de biotransformação hidroxilados, o de menor importância na depuração hepática do diclofenaco e, portanto, de menor excreção urinária [2,17]. Assim sendo, no presente trabalho, não se observou decaimento exponencial deste produto em função do tempo.

A excreção renal de diclofenaco inalterado e de seus produtos de biotransformação expressa sob forma de fração eliminada no período de 0-72 horas é descrita nas **Tabela 2 e 3A e B**. A fração da dose administrada eliminada na urina sob forma inalterada e biotransformada no período de 0-72 horas foi da ordem de 20 % nas duas fases do estudo.

Tabela 2. Excreção renal de diclofenaco inalterado e seus produtos de biotransformação hidroxilados em voluntários sadios após dose única peroral de diclofenaco de sódio expressa por meio da fração da dose administrada excretada na urina durante o período do estudo (F_{el-T}).

Produto	F_{el-T} (%)		p	significância
	diclofenaco	diclofenaco + ranitidina		
4'-S-OH-D	3,81 ± 0,69 (3,55)	3,61 ± 0,67 (2,99)	0,84* 0,67**	NS† NS
3'-OH-D	0,83 ± 0,27 (0,69)	0,72 ± 0,20 (0,87)	0,76 0,67	NS NS
4'-OH-D	5,85 ± 1,12 (5,06)	4,39 ± 0,75 (3,73)	0,30 0,05	NS S‡
5-OH-D	2,21 ± 0,41 (1,92)	1,99 ± 0,38 (1,96)	0,70 0,27	NS NS
diclofenaco	1,69 ± 0,65 (1,13)	1,47 ± 0,47 (1,00)	0,78 0,45	NS NS

valores em $X \pm EPM$ (mediana)

*: teste "t", paramétrico

** : teste de Wilcoxon, não-paramétrico

†NS: diferença não-significativa

‡S: diferença significativa

Tabela 3: Excreção renal de diclofenaco inalterado e seus produtos de biotransformação hidroxilados em voluntários sadios após dose única peroral de diclofenaco de sódio expressa por meio da fração da dose administrada excretada na urina durante o período do estudo (Fel_T).

A: Faixa de variação ($X - DP - X + DP$).

Produto	Fel_T (%)	
	diclofenaco	diclofenaco + ranitidina
4'-S-OH-D	1,99 - 5,63	1,83 - 5,39
3'-OH-D	0,11 - 1,55	0,20 - 1,24
4'-OH-D	2,88 - 8,82	2,42 - 6,36
5-OH-D	1,13 - 3,29	0,98 - 3,98
diclofenaco	0,00 - 3,42	0,21 - 2,71

B: Valores mínimos e máximos.

Produto	Fel_T (%)	
	diclofenaco	diclofenaco + ranitidina
4'-S-OH-D	1,96 - 6,79	0,90 - 6,33
3'-OH-D	0,00 - 2,11	0,00 - 1,25
4'-OH-D	2,85 - 11,83	1,99 - 7,83
5-OH-D	0,83 - 3,77	0,27 - 3,22
diclofenaco	0,13 - 5,30	0,00 - 3,76

A excreção renal mostrou-se significativamente reduzida pela associação com a ranitidina apenas para o produto de biotransformação 4'-OH-D, com $p \leq 0,05$, com diminuição da fração eliminada total (Fel_T) de $5,85 \pm 1,12$ (5,06) para $4,39 \pm 0,75$ (3,73) % (valores em $X \pm EPM$ (med)) (Tabela 2). A faixa de

variação da fração eliminada total (F_{elT}) deste produto foi reduzida de 2,88 - 8,82 quando o diclofenaco foi administrado isoladamente para 2,42 - 6,36 quando o diclofenaco foi associado à ranitidina (**Tabela 3A**) e os valores mínimos e máximos foram reduzidos respectivamente de 2,85 e 11,83 % quando o diclofenaco foi administrado isoladamente para 1,99 e 7,83 % quando o diclofenaco foi associado à ranitidina (**Tabela 3B**).

Os outros produtos de biotransformação hidroxilados não apresentaram redução significativa de sua excreção renal pela associação com a ranitidina (**Tabelas 2, 3A e B**). Acredita-se que a diminuição da excreção renal de produtos de biotransformação do diclofenaco só seja detectável a nível do produto 4'-OH-D por ser este o produto de biotransformação hidroxilado de maior excreção urinária e de maior contribuição na depuração hepática do diclofenaco [2,17].

Apesar da ausência de estudos na literatura reportando tal interação, os resultados obtidos no presente trabalho referentes à excreção urinária (F_{elT}) estão de acordo com investigações anteriores, em que a eliminação de diclofenaco sob forma de produtos hidroxilados é descrita na seguinte ordem, do produto mais excretado para o menos excretado: 4'-OH-D, 4',5-OH-D, 5-OH-D e 3'-OH-D [2,17]. Devido à sua lenta eliminação, o produto 3'-OH-4'-MeO-D é detectado em pequenas quantidades na urina em estudos de excreção urinária realizados em períodos de até 96 horas. Isto não significa, no entanto, que este seja um produto de biotransformação menos importante que os outros, já que ele apresenta valores de área sob a curva "concentração plasmática vs tempo" superiores aos de todos os produtos de biotransformação hidroxilados [2].

Não foi observada alteração significativa na excreção renal de diclofenaco inalterado pela associação com a ranitidina (Tabelas 2, 3A e B). A depuração renal do diclofenaco é de pequena importância, uma vez que porcentagens inferiores a 5 % da dose administrada [2,17] são eliminadas na urina sob forma inalterada. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os anteriormente reportados para o homem evidenciando eliminação na faixa ao redor de 3,4 e 2,7 % da dose administrada sob forma de produto inalterado na urina após administração isolada ou associada, respectivamente (Tabela 3A). Entretanto, devido a variações individuais da biotransformação hepática valores mínimos de 0,13 % e máximos de 5,30 % foram obtidos na presente investigação (Tabela 3A e B). A Figura 9 ilustra a fração eliminada de diclofenaco inalterado em função do tempo. Observa-se, na Fase I (diclofenaco isolado), um decaimento mais acentuado da fração eliminada que o observado na Fase II (diclofenaco associado à ranitidina). Quando a ranitidina foi associada ao diclofenaco (Fase II) observou-se um prolongamento da meia-vida de eliminação do diclofenaco em plasma (Tabela 1, Figuras 2 e 3) comprovada pelos resultados obtidos a partir da excreção urinária deste produto expressa em fração eliminada no intervalo 0-4 e 4-8 horas (Figura 9). A diminuição na biotransformação, evidenciada pela diminuição na excreção renal de 4'-OH-D, é responsável pelo prolongamento da meia-vida de eliminação do diclofenaco quando associado à ranitidina.

A literatura reporta diversos valores para o parâmetro Fel_T (fração da dose administrada eliminada na urina) dos produtos de biotransformação do diclofenaco, valores estes que não coincidem com os obtidos neste trabalho. Acredita-se que isto tenha ocorrido provavelmente devido à falta de sensibilidade e

seletividade da metodologia empregada para as dosagens nos estudos anteriores [8,14].

Um perfil da excreção urinária de diclofenaco inalterado e seus produtos de biotransformação hidroxilados após administração do produto isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) é ilustrado nas **Figuras 10 e 11** respectivamente em médias e medianas. Da mesma forma, a depuração renal e hepática do diclofenaco após administração peroral do produto farmacêutico estão ilustradas nas **Figuras 12 e 13** respectivamente em médias e medianas. Nenhum estudo anterior reportou dados relativos aos parâmetros Cl_f ("clearance" de formação) dos produtos 4'-OH-D, 4',5-OH-D, 5-OH-D e 3'-OH-D, quer após administração isolada do diclofenaco, quer após associação com outros fármacos e, mais especificamente, com a ranitidina. Assim sendo, os valores para este parâmetro obtidos na presente investigação foram apenas comparados entre si ("Fase I vs Fase II").

Figura 10: Excreção urinária de diclofenaco e seus produtos de biotransformação após administração peroral de dose única de diclofenaco isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - médias.

Figura 11: Excreção urinária de diclofenaco e seus produtos de biotransformação após administração peroral de dose única de diclofenaco isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - medianas.

DEPURAÇÃO RENAL E HEPÁTICA DO DICLOFENACO

Figura 12: Depuração renal e hepática de diclofenaco e seus produtos de biotransformação após administração peroral de dose única de diclofenaco isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - médias.

DEPURAÇÃO RENAL E HEPÁTICA DO DICLOFENACO

ml/min

Figura 13: Depuração renal e hepática de diclofenaco e seus produtos de biotransformação após administração peroral de dose única de diclofenaco isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - medianas.

A depuração renal do diclofenaco é de pequena importância uma vez que porcentagens da dose inferiores a 5 % são excretadas na urina sob forma inalterada. Não houve alteração significativa de depuração renal pela associação com ranitidina (**Tabela 4**), entretanto observa-se larga variação individual uma vez que foram obtidos valores mínimos de 0,4 e máximos de 23,3 ml/min referentes ao "clearance" renal (Clr) do diclofenaco após administração de diclofenaco isolado e valores mínimos de 0,0 e máximos de 14,6 ml/min após associação com ranitidina (**Tabela 5B**). Não se demonstrou qualquer acúmulo digno de nota para o diclofenaco, uma vez que sua depuração renal se manteve inalterada pela coadministração.

Tabela 4 Depuração renal do diclofenaco inalterado (Cl_r) e dos seus produtos de biotransformação hidroxilados (Cl_r) em voluntários sadios após dose única peroral de diclofenaco de sódio.

Produto	Clearance (ml/min)		p	significância
	diclofenaco	diclofenaco + ranitidina		
4'-OH-D (Cl_r)	15,9 ± 2,9 (15,2)	14,9 ± 2,7 (15,3)	0,79* 0,55**	NS†
3'-OH-D (Cl_r)	3,3 ± 0,9 (2,6)	2,7 ± 0,7 (3,3)	0,64 0,40	NS
4'-OH-D (Cl_r)	22,1 ± 5,9 (23,5)	18,1 ± 3,2 (17,6)	0,56 0,27	NS
5-OH-D (Cl_r)	8,7 ± 1,4 (7,4)	8,4 ± 2,4 (6,1)	0,91 0,40	NS
diclofenaco (Cl_r)	7,1 ± 2,8 (5,1)	5,4 ± 1,9 (3,5)	0,64 0,45	NS

valores em $X \pm EPM$ (mediana)

*: teste "t", paramétrico

**: teste de Wilcoxon, não-paramétrico

†NS: diferença não-significativa

Tabela 5: Depuração renal do diclofenaco inalterado (Cl_r) e dos seus produtos de biotransformação hidroxilados (Cl_f) em voluntários sadios após dose única peroral de diclofenaco de sódio

A: Faixa de variação ($X - DP$, $X + DP$).

Produto	Clearance (ml/min)	
	diclofenaco	diclofenaco + ranitidina
4'-S-OH-D (Cl_f)	8,2 - 23,6	7,8 - 22,0
3'-OH-D (Cl_f)	0,9 - 5,7	0,8 - 4,6
4'-OH-D (Cl_f)	6,5 - 37,7	10,0 - 26,6
5-OH-D (Cl_f)	5,0 - 12,4	2,1 - 14,7
diclofenaco (Cl_r)	0 - 14,5	0,4 - 10,4

B: Valores mínimos e máximos

Produto	Clearance (ml/min)	
	diclofenaco	diclofenaco + ranitidina
4'-S-OH-D (Cl_f)	5,4 - 29,8	2,4 - 23,2
3'-OH-D (Cl_f)	0 - 6,7	0 - 4,4
4'-OH-D (Cl_f)	2,6 - 52,0	5,3 - 30,5
5-OH-D (Cl_f)	5,1 - 16,6	1,3 - 20,3
diclofenaco (Cl_r)	0,4 - 23,3	0 - 14,6

Apesar da excreção urinária do principal produto de biotransformação hidroxilado do diclofenaco (4'-OH-D) apresentar redução significativa pela associação com a ranitidina (Tabela 2) e do seu "clearance" de formação (Cl_f) estar

reduzido em cerca de 25 % na Fase II (diclofenaco associado à ranitidina) em relação à Fase I (diclofenaco isolado) (Tabela 4) não se observou diferença significativa nos valores de "clearance" de formação deste produto pela associação com a ranitidina, provavelmente devido à grande variação individual na população investigada (Tabela 5A e B), evidenciando valores mínimos de 2,6 e máximos de 52,0 ml/min na Fase I do estudo e de 5,3 e 30,5 ml/min na Fase II do estudo..

Os outros dois importantes produtos de biotransformação hidroxilados do diclofenaco, 4',5-OH-D e 5-OH-D, também não mostraram redução significativa do seu "clearance" de formação (Cl_f) pela associação com a ranitidina (Tabela 4), quer em vista da menor contribuição na biotransformação do diclofenaco que o produto referido anteriormente (4'-OH-D), quer devido à larga variação individual deste parâmetro na população investigada (Tabela 5A e B).

Finalmente, o produto hidroxilado de menor contribuição na biotransformação do diclofenaco, 3'-OH-D, da mesma forma que os anteriores, não mostrou redução do seu "clearance" de formação (Cl_f) pela ranitidina.

O perfil de excreção urinária mostrou serem os parâmetros fração eliminada no intervalo de coleta ($Fel_{\Delta t}$) e fração eliminada total (Fel_T) na urina, parâmetros mais sensíveis que o "clearance" (Cl_f) para o estudo de interação proposto inicialmente.

Uma vez que a ranitidina mostrou-se inibidor pouco potente do metabolismo do diclofenaco sugere-se, com base nos resultados da presente investigação, que a ranitidina afete a via principal de hidroxilação do diclofenaco, reduzindo a excreção do maior produto de biotransformação, o 4'-OH-D. Apesar

disso, a associação mostra-se segura e vantajosa para pacientes em tratamento crônico com este antiinflamatório e que possuam história de úlcera péptica [4]. Apesar da interação farmacocinética registrada no presente trabalho não se espera qualquer efeito adverso de relevância clínica pela associação de diclofenaco e ranitidina.

5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos sugere-se que a ranitidina reduza a biotransformação do diclofenaco afetando o principal caminho metabólico envolvendo a hidroxilação de anel na posição 4' (4'-hidroxiclofenaco, 4'-OH-D) com conseqüente prolongamento da meia-vida de desaparecimento plasmático do diclofenaco e redução da fração da dose administrada eliminada na urina sob forma de 4'-OH-D. Entretanto, apesar desta interação farmacocinética, não se espera qualquer conseqüência de relevância clínica decorrente desta associação.

6. Referências bibliográficas

1. BURROUGHS, A.K., WALT, R.P., DUNK, A.A., JENKINS, W.J., SHERLOCK, S. Effect of cimetidine on portal hypertension in cirrhosis patients. *Br. Med. J.*, London, v. 284, p. 1159-1160, 1982.

2. DEGEN, P.H., DIETERLE, W., SCHNEIDER, W., THEOBALD, W., SINTERHAUF, U. Pharmacokinetics of diclofenac and five metabolites after single oral doses in healthy volunteers and after repeated doses in patients. *Xenobiotica*, London, v. 18, n. 12, p. 1449-1455, 1988.
3. DUNK, A.A., JENKINS, W.J., BURROUGHS, A.K., WALT, R.P., OSUAFOR, T.O.K. The effect of ranitidine on the plasma clearance and hepatic extraction of indocyanine green in patients with chronic liver disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, London, v. 16, p. 117-120, 1983.
4. EHSANULLAH, R.S.B., PAGE, M.C., TILDESLEY, G., WOOD, J.R. Prevention of gastroduodenal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs: controlled trial of ranitidine. *Br. Med. J.*, v. 297, p. 1017-1021, 1988.
5. FAIGLE, J.W., BÖTTCHER, I., GODBILLON, J., KRIEMLER, H.P., SCHLUMPF, E., SCHNEIDER, W., SCHWEIZER, A., STIERLIN, H., WINKLER, T. A new metabolite of diclofenac sodium in human plasma. *Xenobiotica*, London, v. 18, n. 10, p. 1191-1197.
6. FEE, J.P.H., COLLIER, P.S., HOWARD, P.J., DUNDEE, J.W. Cimetidine and ranitidine increase midazolam bioavailability. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 41, n. 1, p. 80-84, 1987.
7. GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics*. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. p. 203-233.

8. GODBILLON, J., GAURON, S., METAYER, J.P. High performance liquid chromatographic determination of diclofenac and its monohydroxylated metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr. Amsterdam*, v. 338, p. 151-159, 1985
9. HALABI, A., NAHOUI, R., KIRCH, W. Influence of ranitidine on kinetics of nitrendipine and on noninvasive hemodynamic parameters. *Ther. Drug Monit.*, Edimburg, v. 12, n. 3, p. 303-304, 1990.
10. HOENSCH, H.P., HUTZEL, H., KIRCH, W., OHNHAUS, E.E. Isolation of human hepatic microsomes and their inhibition by cimetidine and ranitidine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, Berlin, v. 29, p. 199-201
11. KIRCH, W., HALABI, A., LINDE, M., SANTOS, S.R., OHNHAUS, E.E. Negative effects of famotidine on cardiac performance assessed by noninvasive hemodynamic measurements. *Gastroenterology*, New York, v. 96, p. 1388-1392.
12. KIRCH, W., HOENSCH, H., JANISH, H.D. Interactions and non-interactions with ranitidine. *Clin. Pharmacokinet.*, Auckland, vol 9, p. 493-510, 1984.
13. KIRCH, W., JANISH, H.D., HEIDEMANN, H., RAEMSCH, K.D., OHNHAUS, E.E. Einfluss von Cimetidin und Ranitidin auf Pharmacokinetic und antihypertensiven Effekt von Nifedipine. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, Stuttgart, v. 108, p. 1757-1761, 1983.
14. LANDSORP, D., JANSSEN, T.J., GUELEN, P.J.M., VREE, T.B. High-performance liquid chromatographic method for the determination of

- diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 528, p. 487-494, 1990
15. MASFORD, M.L., HARMAN, P.J.K., MORPHETT, B.S., BREEN, K.J.,
DESMOND, P.V. Ranitidine does not affect chlormethiazole or
indocyanine green disposition. *Clin. Pharmacol. Ther.*, St. Louis, v. 34, p.
231-233, 1983.
 16. MENASSÉ, R., HEDWALL, J., KRAETZ, J., PERICIN, L., RIESTERER, L.,
SALLMANN, A., ZIEL, R., JAQUES, R. Pharmacological properties of
diclofenac sodium and its metabolites. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*,
Stockholm, v. 22, p. 5-16, 1978.
 17. RIESS, W., STIERLIN, H., DEGEN, P., FAIGLE, J.W., GÉRARDIN, A.,
MOPPERT, J., SALLMANN, A., SCHMID, K., SCHWIZER, A., SULE,
M., THEOBALD, W., WAGNER, J. Pharmacokinetics and metabolism of
the anti-inflammatory agent Voltaren. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*
Stockholm, v. 22, p. 17-29., 1978.
 18. RITSCHEL, W.A. *Handbook of basic pharmacokinetics*. 3^a ed., Bethesda:
Drug Intelligence Publications, 1986.
 19. ROBSON, R.A., WING, L.M.H., MINERS, J.O., LILLYWHITE, K.J.,
BIRKETT, D.J. The effect of ranitidine on the disposition of lignocaine. *Br.*
J. Clin. Pharmacol., London, v. 20, p. 170-173, 1985.
 20. SACHS, L. *Applied statistics*. 2^a ed., New York: Springer, 1984.

21. SANTOS, S.R.C.J., DONZELLA, H., BERTOLINE, M.A., PEREIRA, M.D., OMOSAKO, C.E., PORTA, V. Simplified micromethod for the HPLC measurement of diclofenac in plasma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 125-128, 1992.
22. SANTOS, S.R., STORPIRTIS, L., MOREIRA-FILHO, L., DONZELLA, H., KIRCH, W. Ranitidine increases the bioavailability of nitrendipine in patients with arterial hypertension. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 337-347, 1992.
23. SCHNEIDER, T.H., NUERNBERG, B., DIETZEL, K., BRUNE, K. Biliary elimination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 29, p. 127-131, 1990.
24. SMITH, S.R., KENDALL, M.J. Ranitidine versus cimetidine. A comparison of their potential to cause clinically important drug interactions. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v.15, p. 44-56, 1988.
25. SOMOGYI, A., GUGLER, R. Drug interactions with cimetidine. **Clin. Pharmacokinet.**, Auckland, v 7, p. 23-41, 1982.
26. STIERLIN, H., FAIGLE, J.W. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren®) in animals and in man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile. **Xenobiotica**, London, v. 9, n. 10, p. 611-621, 1979.

27. STIERLIN, H., FAIGLE, J.W., COLOMBI, A. Pharmacokinetics of diclofenac sodium (Voltaren) and metabolites in patients with impaired renal function. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, Stockholm, v. 22, p. 30-35, 1978.
28. STIERLIN, H., FAIGLE, J.W., SALLMANN, A., KUENG, W., RICHTER, W.J., KRIEMLER, H.P., ALT, K.O., WINKLER, T. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren®) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica*, London, v. 9, n. 10, p. 601-610, 1979.
29. TODD, A.P., SORKIN, E.M. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, Auckland, v.35, p. 244-285, 1988.
30. TYDEN, G., THULIN, L., NYBERG, B. The effect of cimetidine on liver blood flow in anaesthetized man. *Acta Chir. Scand.*, Stockholm, v. 149, p. 303-305, 1983.
31. WILLIS, J.V., KENDALL, M.J. Pharmacokinetic studies on diclofenac sodium in young and old volunteers. *Scand. J. Rheumatol.*, Stockholm, v. 22, p. 36-41, 1978.
32. ZIMMERMANN, R., HARENBERG, J., KRAMER, H.J., KOMMERELL, B. Interaktion von Famotidin mit der oralen Antikoagulation. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, Stuttgart, v. 27, p. 1097-1098, 1985.

Abstract

The pharmacokinetic interaction between diclofenac and ranitidine was evaluated in 8 healthy volunteers after peroral single administration of Voltaren® 50 in a two-phase study protocol. On phase I, diclofenac was administered alone, while on Phase II the volunteers were submitted to a chronic treatment with ranitidine for seven days; then a dose of diclofenac was administered and ranitidine continued for three days afterwards. Blood and urine samples were collected at time intervals 0-72 hours after diclofenac administration. Diclofenac and its hydroxylated metabolites in biological fluids were determined by two independent profiles using HPLC technique after a single extraction with organic solvent in acidic medium. Enzymic hydrolysis was necessary for the cleavage of conjugates in urine. Diclofenac elimination half-life was increased by 43 % ranging from $1,01 \pm 0,13$ h to $1,44 \pm 0,34$ h ($X \pm SEM$) when ranitidine was coadministered. Significant decrease on F_{el} of 4'-OH-D ranging from $5,85 \pm 1,12$ (5,06) % to $4,89 \pm 0,75$ (3,73) % ($X \pm SEM$ (med)) was obtained by ranitidine association. Cl_f of metabolites expressed as $X \pm SEM$ (med) were, in ml/min: $15,9 \pm 2,9$ (15,2) for 4',5-OH-D, $3,3 \pm 0,9$ (2,6) for 3'-OH-D, $22,1 \pm 5,9$ (23,5) for 4'-OH-D and $8,7 \pm 1,4$ (7,4) for 5-OH-D after peroral single dose of diclofenac alone. These data showed no significant difference when ranitidine was administered. Diclofenac renal clearance (Cl_r), expressed as $X \pm SEM$ (med), was $7,1 \pm 2,8$ (5,1) ml/min after diclofenac and $5,4 \pm 1,9$ (3,5) ml/min, ranitidine. Based on these data, ranitidine decreases the biotransformation of diclofenac by inhibition of hydroxylation affecting urinary excretion of its main hydroxy metabolite, 4'-hydroxydiclofenac. In spite of this pharmacokinetic interaction, without clinical relevance, patients with a history of peptic ulcer and more susceptible to recurrent ulceration, could benefit from the association diclofenac-ranitidine.

Apêndice

Quadro a.1: Características dos voluntários.

Voluntário		sexo	idade (anos)	altura (cm)	peso real (kg)	peso ideal* (kg)	DPI** (%)
1 (HD)	F†	F	25	168	68	61	11
2 (VP)	NF‡	F	24	165	58	59	-2
3 (SS)	NF	F	43	172	65	65	0
4 (LM)	NF	M	33	193	97	84	15
5 (EP)	NF	M	21	183	73	75	-2
6 (SP)	NF	M	20	178	64	70	-9
7 (AL)	NF	F	23	150	47	45	4
8 (CE)	NF	F	33	156	54	49	10

*peso ideal = (altura (cm) - 100) × 0,9

**DPI = desvio porcentual do peso ideal

$$DPI = [(peso\ real - peso\ ideal) / peso\ ideal] \times 100$$

†F = fumante

‡N = não-fumante

Termo de Consentimento Pós-informação

Nome do voluntário / Idade _____ / _____

Registro e / ou documento de identificação _____ / _____

Título do projeto. Estudo de interação entre a ranitidina e o diclofenaco em voluntários sadios após administração peroral de Voltaren[®] 50.

Declaro que em ____ / ____ / ____ concordei voluntariamente em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima referido. Fui devidamente informado em detalhes que:

1. O estudo implica em que eu me submeta a procedimentos, exames complementares e tratamentos devidamente planejados, cujos eventuais riscos me foram explicados;

2. Os procedimentos não incluem, necessariamente, os já reconhecidos como aplicáveis e podem visar à avaliação de tratamentos novos ou a compará-los com os tradicionais;

3 Não sou obrigado a continuar participando do projeto e posso, a qualquer momento, sair do mesmo;

4 Meu consentimento aplica-se, igualmente, a participar da pesquisa como componente do grupo controle, podendo receber substâncias inócuas ou inativas, com a finalidade de dimensionar o "efeito placebo";

5. A pesquisa não será feita se houver, relacionados à mesma, grandes riscos para mim. Da mesma forma, caso algum risco proibitivo venha a se revelar no decurso do estudo, o pesquisador se compromete a me alertar sobre o fato e a suspender de imediato minha participação como voluntário.

Observações complementares: _____

assinatura do voluntário

São Paulo, ____ de ____ de ____

VOLUNTARIO 1 - H.D.

	β h^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu g \cdot h / ml$
FASE I	0.603	276	27.6	2809
FASE II	0.204	267	78.6	2804

Figura a.1: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração peroral de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - Voluntário 1.

VOLUNTARIO 2 - V.P.

	β h^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu\text{g.h/ml}$
FASE I	0.495	315	38.2	2460
FASE II	0.433	367	50.8	2113

Figura a.2: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração peroral de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - Voluntário 2.

VOLUNTARIO 3 - S.S.

	β h ⁻¹	Cl _T ml/min	Vd l	AUC _T µg.h/ml
FASE I	0.730	374	30.7	2075
FASE II	0.730	351	28.8	2211

Figura 2.3: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração peroral de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - Voluntário 3.

VOLUNTARIO 4 - L.F.

	β n^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu\text{g.h/ml}$
FASE I	0.730	887	73.0	874
FASE II	0.770	702	54.7	1104

Figura 2.4: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração peroral de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - Voluntário 4.

VOLUNTARIO 5 - E.P.

	β h^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu\text{g.h/ml}$
FASE I	1.056	317	17.8	2446
FASE II	0.815	354	26.0	2191

Figura a.5: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração peroral de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - Voluntário 5.

VOLUNTARIO 6 - S.P.

	β h^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$
FASE I	1.260	523	24.9	1481
FASE II	0.730	427	38.9	1640

Figura a.6. Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração peroral de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - Voluntário 6.

VOLUNTARIO 7 - A.L.

	β h^{-1}	Cl_T ml/min	V_d l	AUC_T $\mu g \cdot h / ml$
FASE I	0.495	440	53.3	1762
FASE II	0.472	389	48.8	1993

Figura a.7: Curvas de decaimento plasmático do diclofenaco após administração peroral de Voltaren® 50 isolado (Fase I) ou associado à ranitidina (Fase II) - Voluntário 7.