

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* E  
CONTROLE DE QUALIDADE DE DICLOFENACO  
POTÁSSICO SUSPENSÃO ORAL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Alexandre Machado Rubim**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA  
AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* E CONTROLE DE  
QUALIDADE DE DICLOFENACO POTÁSSICO SUSPENSÃO  
ORAL**

**Alexandre Machado Rubim**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA  
LIBERAÇÃO *IN VITRO* E CONTROLE DE QUALIDADE DE  
DICLOFENACO POTÁSSICO SUSPENSÃO ORAL**

elaborada por  
**Alexandre Machado Rubim**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Clarice Madalena Bueno Rolim, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Marta Palma Alves, Dr. (UNIFRA)**

**Patrícia Gomes, Dr. (UNIFRA)**

Santa Maria, 16 de janeiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

A professora Dr. Clarice Madalena Bueno Rolim, minha orientadora, pela amizade e confiança;

A professora Luciane Varini Laporta pela amizade, exemplo profissional e contribuições durante a realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria;

Ao professor Marcos Roberto dos Santos e as estagiárias Jaqueline Bandeira Rubenick e Tatieli Sampaio dos Santos do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos pelo auxílio na execução dos ensaios;

Ao Centro Universitário Franciscano que possibilitou a execução dos ensaios;

A todos que, embora não tenham sido citados, contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* E CONTROLE DE QUALIDADE DE DICLOFENACO POTÁSSICO SUSPENSÃO ORAL

AUTOR: Alexandre Machado Rubim  
ORIENTADOR: Clarice Madalena Bueno Rolim  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de janeiro de 2013.

O diclofenaco potássico (DPt), fármaco derivado do ácido fenilacético, apresenta propriedade anti-inflamatória, analgésica e antitérmica, sendo assim indicado para o alívio da dor na região lombar, artrite reumatoide e dor pós-operatória. O DPt encontra-se no mercado nas formas farmacêuticas de suspensão oral, drágea, supositório, solução injetável, comprimido dispersível e comprimido, no entanto não foram encontrados na literatura métodos analíticos para determinação de DPt em suspensão oral. Também não há relatos de métodos para avaliação da dissolução *in vitro* de suspensão oral contendo este fármaco. Desta forma, no presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação e avaliação da porcentagem dissolvida do fármaco. A determinação quantitativa foi realizada utilizando coluna C<sub>8</sub>, fase móvel composta de metanol e tampão fosfato pH 2,5 e fluxo de 1,0 mL/min. O método quantitativo apresentou ser específico, mesmo na presença de possíveis produtos de degradação, boa linearidade ( $r = 1,0$ ), preciso (DPR < 2,0%) ser exato e robusto. O fármaco demonstrou ser estável em condições alcalinas e a alta temperatura, porém demonstrou instabilidade quando exposto a condições ácidas, oxidativas e na presença da radiação ultravioleta. Para o desenvolvimento do método de dissolução utilizou-se como meio 900 mL de solução aquosa contendo 0,3% de laurilsulfato de sódio, mantida a  $37,0 \pm 0,5$  °C, utilizando aparato pá com velocidade de rotação de 50 rpm. Nestas condições, a liberação de DPt foi superior a 85,0% em 30 minutos para ambos os lotes avaliados. O método validado demonstrou ser específico, linear ( $r > 0,99$ ), e apresentou precisão e exatidão satisfatórias. Também se avaliou a estabilidade do fármaco no meio de dissolução, assim como a possível adsorção do fármaco no papel de filtração utilizado. Para ambos os ensaios os resultados encontrados foram satisfatórios. Desta forma, os métodos desenvolvidos e validados podem ser utilizados como métodos de rotina no controle de qualidade para quantificação e avaliação do perfil de dissolução de DPt suspensão oral.

Palavras-chave: Dissolução. Diclofenaco Potássico. Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). Suspensão oral.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Graduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR EVALUATION OF LIBERATION *IN VITRO* AND QUALITY CONTROL OF DICLOFENAC POTASSIUM ORAL SUSPENSION

AUTHOR: Alexandre Machado Rubim  
ADVISER: Clarice Madalena Bueno Rolim  
Local and Date of Defense: Santa Maria, January 16<sup>th</sup>, 2013.

The diclofenac potassium (DPt) is a derivate of phenylacetic acid, with proprietary anti-inflammatory, analgesic and antipyretic, thus indicated for the relief of low back pain, rheumatoid arthritis and postoperative pain. The DPt is in the market for oral suspension dosage forms, dragee, suppository, injectable solution, dispersible tablet and tablet. However not been found in literature analytical method for determination of DPt in oral suspension. There are also no reports of methods for evaluating the *in vitro* dissolution of oral suspension containing the drug. Thus, in the present work were developed and validated methods by liquid chromatography high efficiency for the quantification and assessment of drug dissolution in oral suspension. Quantification of DPt was performed using column C<sub>8</sub>, mobile phase consisting of methanol and phosphate buffer pH 2.5 with a flow rate of 1.0 mL/min. The quantitative method was shown to be specific, even in the presence of possible degradation products, good linearity ( $r = 1.0$ ), precise (RSD < 2.0%) and having adequate accuracy and robustness. The drug demonstrated to be stable under alkaline conditions and high temperature, but showed instability when exposed to conditions acid, oxidative and in the presence of ultraviolet radiation. To develop the method of dissolving the best conditions were 900 mL of aqueous solution containing 0.3% of sodium laurylsulfate, maintained at  $37.0 \pm 0.5$  °C, using paddle apparatus with rotation speed of 50 rpm. Thus, the release of DPt was greater than 85.0% at 30 minutes for both batches evaluated. The validated method proved to be specific, linear ( $r > 0.99$ ), and showed precision and accuracy satisfactory. We also evaluated the stability of the drug in the dissolution medium selected, and the possible adsorption of the drug on the paper filter used. For both the test results were satisfactory. Thus, the methods developed and validated may be used as routine methods in quality control for the quantification and evaluation of the dissolution profile of DPt oral suspension.

Keywords: Dissolution. Diclofenac potassium. High performance liquid chromatography (HPLC). Oral suspension.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do diclofenaco potássico.....	19
Figura 2 – Estrutura química dos metabólitos do diclofenaco.....	21
Figura 3 - Cromatograma da solução SQR de DPt (30 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ= 275 nm.....	54
Figura 4 - Cromatograma da solução amostra de DPt (30 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ= 275 nm.....	55
Figura 5 - Cromatograma dos excipientes. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ= 275 nm.....	56
Figura 6 - Cromatograma da solução amostra suspensão oral de DPt. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ= 275 nm.....	57
Figura 7 - Cromatograma da solução de DPt SQR. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ= 275 nm.....	57
Figura 8 - Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a hidrólise alcalina tempo zero; A2: solução de DPt SQR submetida a hidrólise alcalina tempo 5 horas; A3: solução de DPt SQR submetida a hidrólise alcalina tempo 24 horas.....	58
Figura 9 - Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a hidrólise ácida tempo zero; A2: solução de DPt SQR submetida a hidrólise ácida tempo 5 horas; A3: solução de DPt SQR submetida a hidrólise ácida tempo 24 horas.....	60
Figura 10 - Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a oxidação tempo zero; A2: solução de DPt SQR submetida a oxidação tempo 5 horas; A3: solução de DPt SQR submetida a oxidação tempo 24 horas.....	61
Figura 11 - Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a temperatura de 80 °C tempo 5 horas; A2: solução de DPt SQR submetida a temperatura de	

80 °C tempo 24 horas.....	62
Figura 12 - Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a fotólise ( $\lambda = 254$ nm) tempo 5 horas; A2: solução de DPt SQR submetida a fotólise ( $\lambda = 254$ nm ) tempo 24 horas.....	63
Figura 13 - Cromatograma da solução contendo substância relacionada A, (N-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona) do DPt. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex <sup>®</sup> Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; $\lambda=275$ nm.....	64
Figura 14 - Representação gráfica da curva padrão média de DPt SQR.....	65
Figura 15 - Robustez: cromatograma A: fator s; cromatograma B: fator t; cromatograma C: fator u; cromatograma D: fator v; cromatograma E: fator w; cromatograma F: fator x; cromatograma G: fator y e cromatograma H: fator z.....	72
Figura 16 – Perfil de dissolução médio das suspensões de DPt (n = 12) nos meios de dissolução tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,4 utilizando velocidade de rotação de 75 rpm.....	75
Figura 17 – Perfil de dissolução médio das suspensões de DPt (n = 12) nos meios de dissolução contendo água + 0,3%, 0,5%, 1,0% e 1,5% de LSS utilizando velocidade de rotação de 75 rpm.....	75
Figura 18 – Perfis de dissolução das amostras de DPt (n = 6) nos meios de dissolução água + 0,3% e 0,5% LSS, utilizando velocidade do aparato de 50 rpm.....	77
Figura 19 – Especificidade do método após teste de dissolução utilizando água + 0,3% de LSS (p/v) como meio de dissolução: cromatograma da amostra placebo (A) e do DPt SQR (B).....	80
Figura 20 – Representação gráfica da curva padrão média de DPt SQR.....	82
Figura 21 – Comparação dos perfis de dissolução (n = 12): Cataflam <sup>®</sup> lote ZOO47 e Cataflam <sup>®</sup> lote ZOO49A. Condições do ensaio de dissolução: meio de dissolução contendo água + 0,3% de LSS a 37,0 $\pm$ 0,5°C.....	84



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	24
Tabela 2 - Metodologias analíticas empregadas para quantificação de diclofenaco potássico em especialidades farmacêuticas e amostras biológicas...	25
Tabela 3 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	26
Tabela 4 - Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	27
Tabela 5 – Parâmetros analisados e seus critérios de avaliação.....	28
Tabela 6 - Limites percentuais do teor de analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade.....	29
Tabela 7 – Condições cromatográficas para o doseamento de diclofenaco potássico por CLAE.....	40
Tabela 8 – Preparo das soluções para teste de exatidão.....	46
Tabela 9 – Matriz de fatores para determinação da robustez do método.....	47
Tabela 10 – Condições cromatográficas utilizadas no ensaio de dissolução de DPt em suspensão oral.....	50
Tabela 11 – Modelos matemáticos utilizados para representar o perfil de dissolução de suspensão oral contendo DPt.....	53
Tabela 12 – Parâmetros cromatográficos obtidos com a solução SQR de diclofenaco potássico (30 µg/mL).....	55
Tabela 13 – Parâmetros cromatográficos obtidos com a solução amostra de DPt (30 µg/mL).....	55
Tabela 14 – Valores de área obtidos a partir da curva padrão de DPt SQR por CLAE.....	65
Tabela 15 – Análise de variância da curva padrão do DPt.....	66
Tabela 16 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária de DPt em suspensão oral.....	67
Tabela 17 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade de DPt em suspensão oral.....	68

Tabela 18 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de exatidão de DPt em suspensão oral.....	69
Tabela 19 – Combinações ensaiadas para avaliação da robustez do método analítico, avaliando-se a condição 1.....	71
Tabela 20 – Combinações ensaiadas para avaliação da robustez do método analítico, avaliando-se a condição 2.....	71
Tabela 21 – Porcentagem dissolvida de DPt SQR em diferentes meios de dissolução.....	73
Tabela 22 – Teor de DPt dissolvido após perfil de dissolução utilizando tampão fosfato pH 6,8 e 7,4 como meio de dissolução e velocidade do aparato de 75 rpm.....	76
Tabela 23 – Teor de DPt dissolvido após perfil de dissolução utilizando água + 0,3%, 0,5%, 1,0% e 1,5% de LSS como meio de dissolução e velocidade do aparato de 75 rpm.....	76
Tabela 24 – Teor de DPt dissolvido após perfis de dissolução utilizando LSS 0,3% e 0,5% como meios de dissolução e velocidade do aparato de 50 rpm.....	77
Tabela 25 – Condições selecionadas para o ensaio de dissolução para suspensão oral contendo DPt.....	78
Tabela 26 – Estabilidade da amostra após teste de dissolução.....	79
Tabela 27 – Avaliação da adsorção do DPt no filtro utilizado.....	79
Tabela 28 – Valores de área obtidos a partir da curva padrão de DPt SQR por CLAE. ....	81
Tabela 29 – Análise de variância da curva padrão do DPt.....	82
Tabela 30 – Exatidão do teste de dissolução das suspensões orais contendo DPt.....	83
Tabela 31 – Precisão do teste de dissolução da suspensão oral contendo DPt..	83
Tabela 32 – Porcentagens dissolvidas de DPt após perfil de dissolução.....	84
Tabela 33 – Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) dos modelos matemáticos utilizados.....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C8	Octilsilano
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
DAD	<i>Diodo Array Detector</i>
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DPt	Diclofenaco Potássico
ED	Eficiência de Dissolução
gl	Graus de liberdade
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.
r	Coefficiente de Correlação de <i>Pearson</i>
SQR	Substância Química de Referência
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
$\lambda$	Lâmbida

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs).....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Diclofenaco potássico.....</b>	<b>18</b>
2.2.1 Descrição e características físico-químicas.....	18
2.2.2 Características farmacocinéticas.....	20
2.2.3 Mecanismo de ação.....	21
2.2.4 Indicações e usos.....	22
2.2.5 Contra indicações e reações adversas.....	22
2.2.6 Principais interações.....	23
2.2.7 Posologia.....	23
<b>2.3 Sistema de classificação biofarmacêutica.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Métodos analíticos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Validação de metodologia analítica.....</b>	<b>26</b>
<b>3 Dissolução.....</b>	<b>31</b>
2.6.1 Dissolução e absorção.....	31
2.6.2 Fatores que interferem na dissolução e absorção de fármacos.....	32
2.6.2.1 Fatores fisiológicos.....	32
2.6.2.2 Fatores relacionados ao fármaco.....	32
2.6.2.2.1 Solubilidade e pH.....	32
2.6.2.2.2 Polimorfismo.....	33
2.6.2.2.3 Tamanho da partícula.....	33
2.6.2.3 Fatores inerentes a formulação.....	34
2.6.3 Ensaio de dissolução.....	34
2.6.4 Comparação dos perfis de dissolução.....	35
2.6.5 Dissolução de suspensões.....	36
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Amostras.....</b>	<b>38</b>
4.1.1 Substância química de referência (SQR) e composto relatado A.....	38

4.1.2 Produto farmacêutico.....	38
4.1.3 Reagentes.....	38
4.1.4 Equipamentos e acessórios.....	38
<b>4.2 Metodologia.....</b>	<b>39</b>
4.2.1 Método cromatográfico através da CLAE para o doseamento de DPt em suspensão oral.....	39
4.2.1.1 Preparo das soluções padrão contendo DPt SQR, amostra suspensão oral e amostra placebo.....	39
4.2.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos.....	40
4.2.1.3 Preparo da fase móvel.....	41
4.2.1.3.1 Tampão fosfato pH 2,5.....	41
4.2.1.3.2 Metanol grau cromatográfico.....	41
4.2.1.4 Validação do método de doseamento do DPt por CLAE.....	41
4.2.1.4.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	41
4.2.1.4.2 Intervalo e linearidade.....	42
4.2.1.4.3 Especificidade.....	42
4.2.1.4.4 Precisão.....	45
4.2.1.4.5 Exatidão.....	46
4.2.1.4.6 Robustez.....	47
4.2.1.4.7 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	48
4.2.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	48
4.2.2.1 Determinação da solubilidade de DPt em diferentes meios.....	49
4.2.2.2 Condições do ensaio de dissolução.....	49
4.2.2.3 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução.....	50
4.2.2.4 Influência do filtro .....	50
4.2.2.5 Validação do método CLAE para determinação da porcentagem dissolvida de DPt em suspensão oral.....	51
4.2.2.5.1 Especificidade.....	51
4.2.2.5.2 Intervalo e linearidade.....	51
4.2.2.5.3 Exatidão e precisão.....	51
4.2.2.6 Comparação dos perfis de dissolução.....	52
4.2.2.7 Cinética de dissolução.....	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Análise quantitativa do DPt em suspensão oral.....</b>	<b>54</b>

<b>5.1.1 Validação de metodologia analítica para forma farmacêutica</b>	
<b>suspensão oral.....</b>	<b>54</b>
5.1.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico.....	54
5.1.1.2 Especificidade.....	56
5.1.1.2.1 Interferência dos excipientes da formulação.....	56
5.1.1.3 Intervalo e linearidade.....	64
5.1.1.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	66
5.1.1.5 Precisão.....	66
5.1.1.6 Exatidão.....	69
5.1.1.7 Robustez.....	70
<b>5.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....</b>	<b>73</b>
5.2.1 Determinação da solubilidade de DPt em diferentes meios.....	73
5.2.2 Determinação das condições para o ensaio de dissolução.....	74
5.2.3 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução .....	78
5.2.4 Interferência do tipo de filtro utilizado.....	79
5.2.3 Desenvolvimento e validação do método por CLAE para determinação de DPt no ensaio de dissolução.....	80
5.2.3.1 Especificidade.....	80
5.2.3.2 Intervalo e linearidade.....	80
5.2.3.3 Exatidão e precisão.....	83
5.2.4 Comparação dos perfis de dissolução .....	83
5.2.5 Cinética de dissolução e eficiência de dissolução.....	85
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>86</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO 1.....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICE B – ARTIGO 2.....</b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE C – APÊNDICE C – Participação no 1º Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas com apresentação do trabalho: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY ANALYTICAL FOR DETERMINATION OF DICLOFENAC POTASSIUM IN SUSPENSION ORAL.....</b>	<b>98</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que em 2025 o Brasil ocupe a sexta posição no mundo com relação ao número de pessoas idosas e este fator associado à prática da automedicação, hábitos de vida, presença de doenças específicas e facilidade para aquisição de medicamentos, são alguns dos fatores que contribuem para o aumento do uso dos mesmos, destacando-se a classe dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (CORRER et al., 2007; FILHO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2009).

Os AINEs, são vendidos sem prescrição médica e constituem a classe de fármacos mais prescrita em todo o mundo, anualmente, nos Estados Unidos, são comercializados mais de 30 bilhões de comprimidos e cerca de 70 milhões de prescrições médicas (FILHO; LIMA, 2010; WOLF; LICHTENSTEIN; SINGH, 1999). Esta classe de substâncias tem por características exercer atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória (ISSY; SAKATA, 2008).

O diclofenaco potássico (DPT) é um (AINE) derivado do ácido fenilacético indicado para o tratamento da dor pós-operatória ou trauma, tendinite, cefaleia, dor oncológica e reumática possui como principal mecanismo de ação a inibição da biossíntese das prostaglandinas, as principais mediadoras da inflamação (VANE, 1971; JANBROERS, 1987; ISSY; SAKATA, 2008; SANCHES; VILETTI, 2009;).

Na bibliografia consultada encontraram-se diversas metodologias analíticas para o controle de qualidade de DPT matéria-prima, especialidades farmacêuticas, assim como em fluidos biológicos. Atualmente, monografias para análise de DPT matéria-prima e especialidade farmacêutica comprimido estão disponíveis nas Farmacopeias Brasileira (2010), *The United States Pharmacopeia* (2012) e *British Pharmacopeia* (2012).

Entre as diversas análises realizadas para o controle de qualidade da forma farmacêutica suspensão oral, destacam-se a determinação quantitativa dos fármacos assim como a determinação da porcentagem de dissolução *in vitro*, visto que, suspensões orais são compostas por fármacos dispersos em um veículo líquido, no qual as partículas são insolúveis e após sua administração via oral, a absorção destes fármacos depende entre outros fatores de uma eficiente dissolução

em fluidos biológicos para posteriormente serem absorvidos (ABDOU, 1989; ANSEL; ALLEN; POPOVICH, 2008; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Para assegurar a qualidade das especialidades farmacêuticas é necessário que os métodos analíticos utilizados forneçam resultados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, no entanto, estas metodologias devem passar por um processo de avaliação denominado validação. A validação de uma metodologia analítica tem como objetivo demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida (RIBANI et al., 2004).

De acordo com *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005), resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2007) os principais parâmetros que devem ser avaliados durante o processo de validação de metodologia são especificidade, intervalo, linearidade, precisão intermediária, repetibilidade, exatidão, robustez, limite de quantificação e detecção.

Até o presente momento não foram encontradas em compêndios oficiais metodologias analíticas para avaliação da liberação *in vitro* assim como metodologias para determinação quantitativa de DPt suspensão oral.

Conforme citado anteriormente, este trabalho justifica-se devido à inexistência de metodologias analíticas para o controle de qualidade de DPt suspensão oral. Este trabalho teve como propósito o desenvolvimento de metodologia para a quantificação de DPt suspensão oral, como também o desenvolvimento de um teste de dissolução *in vitro* para avaliação da porcentagem dissolvida, utilizando-se da cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)

A inflamação é caracterizada como uma resposta do organismo frente à lesão celular, caracterizando-se por ser um fenômeno complexo e dinâmico promovido por diferentes agentes lesivos, como do tipo físico (radiação, queimadura, trauma), biológico (micro-organismo, reações imunológicas) ou químico (substância cáustica) (ZALDIVAR et al., 2005; SILVA, 2010).

Em processos inflamatórios localizados é preferível o tratamento não medicamentoso como a utilização de gelo, repouso e imobilização, porém quando há o comprometimento sistêmico deve-se optar pela utilização dos AINEs. No decorrer do tempo os medicamentos da classe dos anti-inflamatórios tornaram-se os medicamentos de rotina para o combate de inflamações e dores lombares proporcionando um alívio imediato (WANNMACHER; PASSOS, 2010). Em relato feito por Piotto e colaboradores (2009), a classe de medicamentos com maior frequência de utilização em relação à automedicação foi a dos AINEs entre os pacientes atendidos no pronto socorro da cidade de Taubaté.

Estes fármacos são vistos como eficazes e seguros quando utilizados corretamente, sendo muito utilizados por toda a população mundial, porém podem produzir inúmeros efeitos colaterais podendo até causar a morte (BRICKS; SILVA, 2005).

Os AINEs podem ter efeito central e periférico, aliviando a dor a partir do bloqueio da síntese e da ação de substâncias que ativam o sistema nervoso. As prostaglandinas são as principais mediadoras da inflamação, sendo assim o principal alvo desta classe de medicamentos (VANE, 1971). Possuindo em comum efeito antitérmico, analgésico e anti-inflamatório os AINEs representam um grupo heterogêneo de fármacos com diferentes estruturas químicas. A partir de sua composição química estas substâncias encontram-se divididas em grupos farmacológicos com propriedades semelhantes, porém fármacos de um mesmo grupo podem apresentar diferenças em relação a propriedades físico químicas, farmacocinéticas, farmacodinâmicas e metabólicas (JACQZ-AIGRAIN; LITALIEN, 2001; CLARK; LAYTON; SHAKIR, 2004).

De acordo com seu mecanismo de ação os AINEs podem ser divididos em duas categorias: os inibidores não seletivos da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), estes representados por diversos fármacos, entre eles a dipirona, paracetamol, indometacina, diclofenaco potássico e sódico, ibuprofeno, meloxicam e os inibidores seletivos da enzima (COX-2), onde se destacam a nimesulida, celecoxibe, etoricoxibe e valdecoxibe. Os AINEs mais antigos inibem tanto a ciclo-oxigenase-1 (COX-1), esta considerada enzima constitutiva e encontrada em plaquetas, rins e estômago, quanto a (COX-2), considerada induzida, pois é expressa durante o processo inflamatório, sendo que os fármacos mais novos possuem acentuada seletividade sobre esta última (WANNMACHER; PASSOS, 2010).

Acredita-se que a ação antitérmica, anti-inflamatória e analgésica dos AINEs, decorra da ação inibitória sobre a (COX-2), enquanto que os efeitos indesejáveis sejam produzidos a partir da ação sobre a (COX-1) (KUMMER; COELHO, 2002; SILVA, 2010).

## **2.2 Diclofenaco potássico**

### **2.2.1 Descrição e características físico-químicas**

Sintetizado pela primeira vez no final dos anos 70 e aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 1988), como primeiro fármaco anti-inflamatório não esteroide, o DPt (Figura 1), é um derivado do ácido fenilacético existente nas formas tri-hidratada, tetra-hidratada e anidra, porém apenas esta última forma é utilizada para preparação de produtos farmacêuticos, não apresentando polimorfos (CHUASUWAN et al., 2008; MITCHELL, et al., 1993; SCULLY; CLARKE; BARR, 1993).

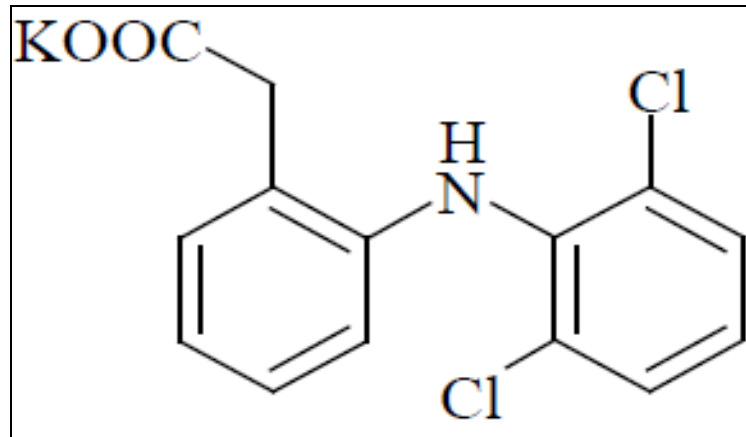


Figura 1 – Estrutura química do diclofenaco potássico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010)

- Nome químico: 2-[(2,6-diclorofenil) amino]-ácido benzenoacético
- CAS: 15307-81-0
- DCB: diclofenaco potássico
- Fórmula:  $C_{14}H_{10}Cl_2KNO_2$
- Massa molecular: 334,24 g/mol
- $pK_a$ : 4,0 a 25 °C
- Coeficiente de partição: 13,4
- Temperatura de fusão: 295 °C a 300 °C
- Aparência: pó cristalino, higroscópico, branco ou levemente amarelado
- Solubilidade: ligeiramente solúvel em água, solúvel em soluções alcalinas e metanol, muito pouco solúvel em acetona (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; SALLMANN, 1986; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

O diclofenaco está presente em mais de 120 países, sendo o AINE mais prescrito em todo o mundo, ocupando assim a 8ª posição na lista dos medicamentos mais comercializados, no mercado nacional apresenta-se nas formas de sal livre, sal potássico, sal sódico, dietilamônio, resinato e em associação com a colestiramina. O sal potássico é indicado para o tratamento da dor aguda, febre e inflamação e quando comparado aos outros sais, é o que apresenta maior solubilidade, promovendo uma maior velocidade e extensão da sua absorção em uma

administração oral (BARTOLOMEI et al., 2006; BULÁRIO ELETRÔNICO ANVISA; KOROLKOVAS, 2012; MITCHELL et al., 1993; SILVA, 2010).

### 2.2.2 Características farmacocinéticas

O DPt é rapidamente absorvido por via oral, porém a presença de alimentos reduz sua concentração plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) em torno de 40% a 60%. Ao contrário do sal sódico que possui liberação retardada, o DPt é formulado para obter uma dissolução sob condições ácidas do estômago (OLSON et al., 1997; TERHAAG et al., 1991). Atinge  $C_{m\acute{a}x}$  para preparações não entéricas em torno de 10 a 30 minutos e para preparações entéricas em torno de 2 a 3 horas. Possui alta ligação às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, em torno de 99,5%, o que acaba comprometendo em torno de 50% a 60% de sua biodisponibilidade, seu tempo de meia vida é curto de 1 a 2 horas, tendo tendência a se acumular no líquido sinovial, podendo persistir sua ação terapêutica mesmo quando ocorrer diminuição das concentrações plasmáticas. Quando administrado por via parenteral, apresenta uma área sob a curva (ASC) de concentração plasmática equivalente ao dobro da ASC quando administrado por via oral (SILVA, 2010; WILLIS et al., 1979).

O DPt sofre efeito significativo de primeira passagem, através das reações de hidroxilação aromática e conjugação, transformando-se em 4-hidroxiclofenaco, com atividade anti-inflamatória fraca, e outros metabólitos inativos como 5-hidroxiclofenaco, 3-hidroxiclofenaco, 4,5-dihidroxiclofenaco e 3-hidroxi-4-metoxiclofenaco (Figura 2). Após hidroxilação, aproximadamente 65% de diclofenaco é eliminado na urina e 35% através da bile, sendo 1% do fármaco excretado na urina de forma inalterada (ANDERSON; DAVIES, 1997; BORT et al., 1999; KOROLKOVAS, 2012; SILVA, 2010).

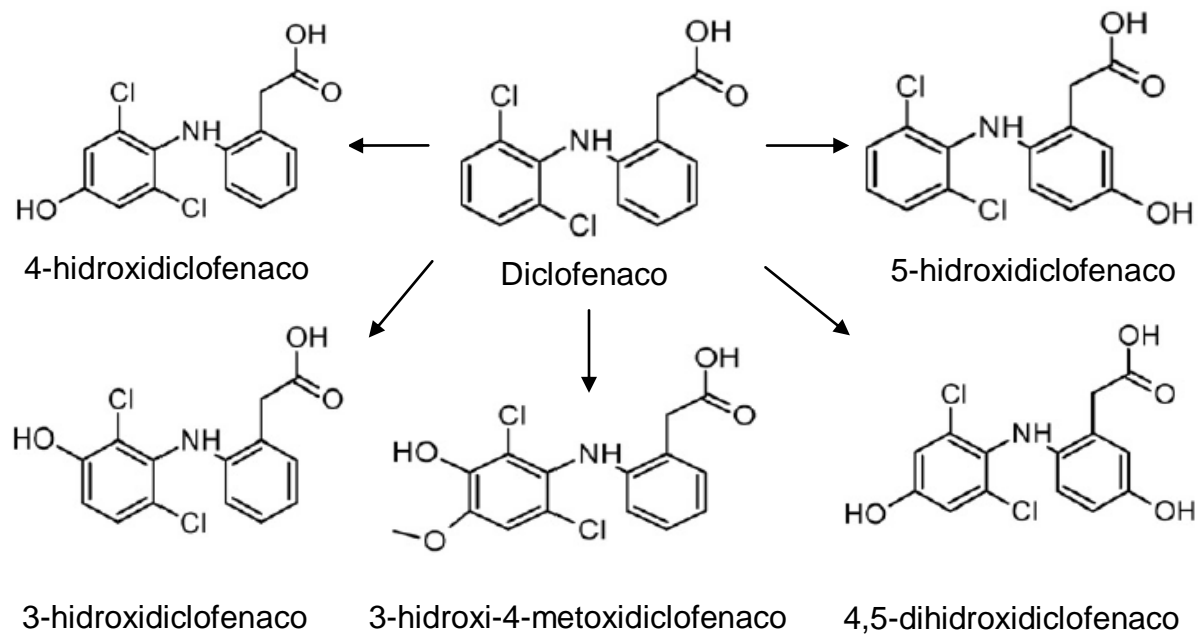


Figura 2 – Estrutura química dos metabólitos do diclofenaco (DEGEN; SCHNEIDER, 1981)

### 2.2.3 Mecanismo de ação

A partir de uma lesão tecidual, fosfolipases A2 liberam o ácido araquidônico das membranas fosfolipídicas, uma vez liberado este composto, o mesmo será metabolizado por duas vias enzimáticas: a via das ciclo-oxigenases COX-1 e 2, produzindo assim as prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina e a via das lipoxigenases produzindo leucotrienos e lipoxinas (MONTEIRO et al., 2008; SANCHES; VILETTI, 2009).

O efeito antipirético do diclofenaco ocorre a partir da sua ação no hipotálamo, já os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios estão relacionados com a inibição da atividade das enzimas COX 1 e 2, devido a sua estrutura química possuir dois anéis aromáticos onde estes possuem uma conformação torcida em relação um ao outro, sendo assim apropriados para se ligarem ao sítio receptor destas enzimas. Acredita-se que o efeito terapêutico do diclofenaco se dê a partir da inibição da COX-2 enquanto que seus efeitos adversos no trato gastrointestinal e inibição da agregação plaquetária, sejam devidos à atuação na COX-1. A partir desta ligação ocorre a diminuição da síntese das prostaglandinas, que são responsáveis pela produção do

eritema, vasodilatação e hiperalgesia (APPLETON, 1997; MOSER; SALLMANN; WIESENBERG, 1990; TODD; SORKIN, 1988).

#### 2.2.4 Indicações e usos

O DPt é indicado para alívio da dor na região lombar, dor pós-operatória, artrite reumatoide, osteoartrite, doença articular degenerativa, dor músculo esquelética e dores crônicas associadas ao câncer e a cálculos renais, assim como em procedimentos endodônticos. O DPt não é indicado para crianças com idade inferior a 14 anos, exceto para casos especiais como artrite juvenil crônica (GEORGOPOULO; ANASTASSIADIS; SYKARAS, 1986; JANBROERS, 1987; KU, 1986).

#### 2.2.5 Contra indicações e reações adversas

Por ano, nos Estados Unidos, mais de 16.000 casos de morte e 100.000 casos de hospitalizações ocorrem devido à toxicidade gastrointestinal em decorrência do uso crônico dos AINE (SINGH; TRIADAFILOPOULOS, 1999).

O DPt é contra indicado para pacientes com úlcera intestinal ou gástrica, gestantes ou mulheres em período de amamentação e para pacientes que possuem conhecida hipersensibilidade ao componente ativo ou a qualquer outro componente da formulação. Também é contra indicado para pacientes que sofrem de asma e renite aguda causadas pelo uso do ácido acetilsalicílico ou outros fármacos que possuam atividade inibidora da produção da enzima prostaglandina sintetase (LACY et al., 2011; McGETTIGAN; HENRY, 2006; SILVA, 2010).

O uso crônico de DPt pode levar a efeitos indesejáveis como produção de úlcera péptica, insuficiência renal, toxicidade hepática, dispepsia, má digestão, falta de apetite, prisão de ventre, hemorragia gastrointestinal, agranulocitose como também a inibição plaquetária (BOELSTERLI, 2003; KHAN; DIONNE, 2002; LARKAI et al., 1987). Acredita-se que a toxicidade causada pelo diclofenaco tenha seu início a partir dos metabólitos 4 e 5-dihidroxiclofenaco (MIYAMOTO; ZAHID; UETRECHT, 1997; SHEN et al., 1999).

Efeitos indesejáveis com a utilização do DPt atingem cerca de 20% dos pacientes, o efeito hepatotóxico também é frequente, chegando a 15% dos

pacientes tratados e em casos mais raros pode ocorrer queda de cabelo, hematúria e anemia hemolítica (SILVA, 2010).

O diclofenaco também pode causar efeitos tóxicos em animais, SWAN e colaboradores (2006a), mencionaram que o diclofenaco possui como DL<sub>50</sub> para abutres na concentração de 0,098-0,225 mg/Kg, sendo responsável por ações devastadoras nestas espécies residentes do continente asiático e africano, atribuindo este fato ao consumo pelos abutres de carcaças de animais previamente tratados com este fármaco antes de suas mortes (PRAKASH et al., 2003; TAGGART et al., 2007).

#### 2.2.6 Principais interações

Devido à frequência da utilização dos AINEs, seu potencial para interações com outras substâncias é muito elevado. Em grande parte estas interações ocorrem com o público idoso, devido à presença de patologias mais frequentes, levando assim a um maior número de fármacos a serem administrados. O DPt, por sua vez, potencializa o efeito dos anticoagulantes (varfarina, heparina) e antiplaquetários (ticlopidina, clopidogrel) devido a sua alta ligação proteica, aumentando assim a fração livre destes fármacos (DUKES, 1990; BATTISTELLA et al., 2005).

Além de reduzir a atividade dos diuréticos, devido a estimularem a reabsorção de sódio, o DPt também pode ter sua própria concentração plasmática aumentada, devido à diminuição do fluxo sanguíneo renal e volume sanguíneo. Por outro lado, o uso concomitante de diclofenaco e misoprostol ou sucralfato, demanda de uma diminuição dos níveis plasmáticos de diclofenaco (TRUC et al., 2000).

#### 2.2.7 Posologia

Para adultos a dose recomendada da suspensão oral é de 50 a 75 mL (100 a 150 mg). Em casos mais leves 50 mL/dia geralmente são suficientes, devendo a dose diária ser fracionada em duas vezes. Não exceder 75 mL/dia (CATAFLAM, 2010; FONSECA, 2011).

### 2.3 Sistema de classificação biofarmacêutica

Proposto por Amidon e colaboradores (1995), o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) está baseado nas características de solubilidade e permeabilidade intestinal dos fármacos, onde estes estão divididos em 4 diferentes categorias, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Sistema de Classificação Biofarmacêutica.

	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV
Solubilidade	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Permeabilidade	Alta	Alta	Baixa	Baixa

Fonte: AMIDON et al., 1995

O SCB pode ser útil no auxílio da previsão da absorção *in vivo* de uma determinada substância e identificar se a biodisponibilidade pode ser ou não afetada devido a alterações do processo de produção, concentração do fármaco e componentes da formulação (KASIM et al., 2003). Este sistema sugere que quando fármacos das classes I e III possuírem mais que 85% de dissolução em ácido clorídrico 0,1 M, em no máximo 15 minutos, pode-se garantir que a biodisponibilidade para estes produtos não é afetada pelo processo de dissolução (AMIDON et al., 1995).

De acordo com *Guidance for Industry* (2000), para as formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata que contenham excipientes que não afetam a taxa ou extensão da absorção, que possuam fármacos de solubilidade elevada e ainda que possuam uma alta permeabilidade, podem ser dispensadas dos ensaios de biodisponibilidade.

Baseado neste sistema o DPt é classificado como um fármaco da classe II. Fármacos pertencentes a esta classe, possuem como características uma elevada permeabilidade, mas com uma baixa solubilidade em meio aquoso, sendo que para estes fármacos a dissolução se torna um fator limitante para a absorção (AULTON, 2005; GUIDENCE FOR INDUSTRY, 2000).



## 2.4 Métodos analíticos

O DPt está disponível em cinco diferentes formas farmacêuticas: suspensão oral 2 mg/mL, drágeas 50 mg, supositório 75 mg, solução injetável 25 mg/mL, comprimido dispersível 44,3 mg, comprimido 50 mg (BULÁRIO ELETRÔNICO ANVISA; KOROLKOVAS, 2012; SILVA, 2010).

As Farmacopeias Brasileira (2010), The United States Pharmacopeia (2012) e British Pharmacopoeia (2012), possuem para análise quantitativa da matéria-prima e forma farmacêutica comprimido, técnicas utilizando a titulação em meio não aquoso, espectrofotometria e cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do ultravioleta, porém não se encontrou na literatura pesquisada metodologias para análise quantitativa e nem para a determinação da porcentagem dissolvida de DPt na forma farmacêutica suspensão oral.

Conforme Tabela 2, estão expostas algumas metodologias analíticas utilizadas para quantificação de DPt em especialidades farmacêuticas e amostras biológicas, encontradas na literatura pesquisada.

Tabela 2 – Metodologias analíticas empregadas para quantificação de DPt em especialidade farmacêutica e amostras biológicas.

Amostra	Método analítico	Fase móvel ou diluente	Coluna	Referência
Plasma	CLAE - UV $\lambda = 275 \text{ nm}$	Tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 4,85) : Acn (42,5 : 57,5)	Synergi® - C18 (80A, 150 x 4,6 mm)	NAIDOO et al., 2009
Plasma	UV $\lambda = 282 \text{ nm}$	Acn : tampão fosfato (pH 7,5) (22,5 : 77,5)	Nucleosil® – C8 (125 x 4 mm)	HINZ et al., 2004
Comprimido	Espec. - Vis $\lambda = 680 \text{ nm}$	Solução de cobre (II) + água	-----	SOUZA; TUBINO, 2005
Plasma	CLAE/EM/EM	Acetato de amônio 8,5 mM e ácido fórmico 0,005% (v/v) em água : MeOH (35 : 65)	Atlantis® – C18 (100 x 2,1 mm)	SPARIDAN S et al., 2008

Plasma	CLAE - UV $\lambda = 282 \text{ nm}$	Fosfato de potássio monobásico 2,36 mM : Acn (pH 2,0) (61 : 39)	Merck® – C8 (12,5 x 4,0 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	SCALLION; MOORE, 2009
Comprimido	CLAE - UV $\lambda = 282 \text{ nm}$	Tampão fosfato (pH 8,0) : Acn (75: 35) - (35 : 75)	Symmetry® – C18 (150 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	ELKADY, 2010

UV: ultravioleta; Acn: acetonitrila; MeOH: metanol; Espec–Vis: espectrometria com detecção na região do visível

## 2.5 Validação de metodologia analítica

Para o controle de qualidade de matérias-primas assim como de formas farmacêuticas é de fundamental importância a utilização de metodologias analíticas adequadas. O processo de validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método analítico atenda às exigências das aplicações, assegurando a confiabilidade dos resultados e se caracteriza por ser um processo contínuo, tendo seu início no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de seu desenvolvimento (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007).

Em nosso país os órgãos que regulamentam o processo de validação de métodos analíticos são o INMETRO e Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Os parâmetros ou figuras de mérito avaliados no processo de validação, descritos na literatura são: intervalo, linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

Segundo BRASIL (2003), os diferentes métodos são classificados nas seguintes categorias, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

Categoria I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias prima.
Categoria II	Testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias prima.

Categoria III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).
Categoria IV	Testes de identificação.

Fonte: BRASIL (2003)

Para cada categoria citada, deverá ser exigido um conjunto de testes, conforme Tabela 4. Para os ensaios de determinação quantitativa de fármacos deve-se considerar os parâmetros de especificidade, intervalo, linearidade, precisão, exatidão e robustez e para testes de performance considerar especificidade, linearidade, precisão e exatidão (BRASIL, 2010).

Tabela 4 – Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* se houver a comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária

Fonte: BRASIL (2003)

Previamente aos ensaios de validação de metodologias analíticas, deve-se realizar uma avaliação do sistema que será utilizado, com o objetivo de verificar se o mesmo é capaz de fornecer dados com exatidão e precisão aceitáveis. Esta avaliação é denominada adequabilidade do sistema e os parâmetros a serem analisados assim como seus critérios de avaliação encontram-se na Tabela 5 (FDA, 1994; ICH, 2005).

Tabela 5 – Parâmetros analisados e seus critérios de avaliação.

Parâmetro	Crítérios
Fator de capacidade (K)	O pico de interesse deve estar separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo morto ( $t_m$ ), $K > 2$
Repetibilidade (DPR)	$RSD < 1\%$ para $n > 5$
Resolução ( $R_s$ )	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente eluido mais próximo (impureza, produto de degradação)
Assimetria	$\leq 2$ , medida da qualidade da coluna cromatográfica
Número de pratos teóricos da coluna (N)	Geralmente o valor de N é $> 2000$ para análises em CLAE

Fonte: RIBANI et al., 2004.

A especificidade é a capacidade do método em medir exatamente o composto de interesse em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito presente na amostra, dentro de um intervalo de concentração especificado (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Esta faixa depende da aplicação pretendida pelo método e geralmente é derivado do estudo de linearidade, conforme Tabela 6 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Tabela 6 – Limites percentuais do teor de analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade (BRASIL, 2003).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste.
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas.
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais de um tempo, o alcance do método deve incluir $-20\%$ sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

Fonte: BRASIL (2003)

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra. Pode ser considerada em três níveis: precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade. A precisão é avaliada através do desvio padrão relativo (DPR) tendo este valor máximo aceitável de até 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A repetibilidade (precisão intradia) é a concordância dos resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e instrumentação. É verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

A precisão intermediária (precisão interdía) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas

diferentes e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes (BRASIL, 2003).

A reprodutibilidade (precisão inter laboratorial) é a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias (BRASIL, 2003).

O limite de detecção (LD) corresponde a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições analíticas estabelecidas pelo ensaio. No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação) esta determinação pode ser feita visualmente. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica) a estimativa do valor de detecção pode ser realizada utilizando o valor do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação corresponde a menor concentração da substância de interesse, que pode ser determinada com precisão e exatidão nas condições analíticas estabelecidas pelo ensaio. Pode ser determinado utilizando o valor do desvio padrão da resposta e da inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

A exatidão é o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito de referencia. Deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, intervalo e especificidade do método, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear, ou seja, 3 concentrações, baixas, médias e altas, com 3 réplicas cada. É expressa através das quantidades (porcentagem) da substância de referencia recuperada na substância amostra após adições em concentrações diferentes (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A robustez corresponde a capacidade de um método de resistir a pequenas modificações dos parâmetros (fatores) analíticos, indicando sua confiança durante o seu uso normal. Fatores como variação do pH, composição e fluxo da fase móvel, assim como da temperatura, podem ser considerados na determinação da robustez do método analítico utilizando-se a CLAE (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Este parâmetro também pode ser avaliado de acordo com (INMETRO, 2007), onde se utiliza o teste de Youden; Steiner (1975) para sua avaliação. São realizados oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos, verificando qual combinação destes efeitos apresenta uma maior variação.

## 2.6 Dissolução

A dissolução é o processo no qual uma substância sólida entra em contato com um solvente apropriado para produzir uma solução, sendo este processo controlado pela afinidade entre a substância e o solvente (BANAKAR, 1991; COSTA; LOBO, 1999).

A dissolução de um sólido em um líquido, em geral, é composta por dois estágios, o primeiro sendo uma reação interfacial instantânea que resulta na liberação de moléculas de soluto da fase sólida, ocorrendo uma alteração de fase, de modo que moléculas de sólido tornam-se moléculas de soluto no solvente no qual o cristal está se dissolvendo. Já o segundo estágio é caracterizado pela lenta migração das moléculas do soluto para o seio da solução, isto é, ocorre a difusão de soluto dissolvido através das camadas limítrofes que existem na interface sólido líquido, sendo este estágio, portanto o determinante para a velocidade global da dissolução (AULTON, 2005).

### 2.6.1 Dissolução e absorção

Durante a dissolução, na superfície da partícula sólida do fármaco origina-se a chamada camada de difusão, onde esta é composta por moléculas dissolvidas no fluido de dissolução. Posteriormente, as moléculas do fármaco entram em contato com a mucosa, na qual serão absorvidas. Para que ocorra um efeito terapêutico eficaz, todo fármaco, deve ter uma solubilidade em água, mesmo que limitada, independente da sua via de administração como também, certo grau de permeabilidade através do trato gastrointestinal (ANSEL et al., 2008; AULTON, 2005).

Caso o processo de dissolução do fármaco seja rápido a velocidade com que o fármaco é absorvido depende da capacidade do mesmo em atravessar as membranas biológicas. Por outro lado, se a dissolução for lenta, devido a fatores como formulação ou propriedades do fármaco, a dissolução é considerada um fator limitante para o processo de absorção, influenciando assim na sua biodisponibilidade (AULTON, 2005).

Biodisponibilidade adequada de um fármaco é o pré-requisito fundamental para que o mesmo possua uma desejada ação sistêmica. A dissolução, muitas vezes se

torna um passo limitante para a absorção de certos fármacos quando administrados por via oral, levando a baixos níveis plasmáticos e comprometendo em grande parte a sua biodisponibilidade (DRESSMAN; REPAS, 2000).

## 2.6.2 Fatores que interferem na dissolução e absorção de fármacos

Diversos são os fatores que podem influenciar a velocidade de dissolução de um fármaco bem como o seu transporte através das membranas biológicas, estes fatores podem estar relacionados com as características físico-químicas do fármaco, fatores fisiológicos relacionados ao trato gastrointestinal e fatores relacionados a forma farmacêutica (AULTON, 2005; FARINHA et al., 1997).

### 2.6.2.1 Fatores fisiológicos

Dentre os principais fatores que afetam a velocidade e extensão da absorção de fármacos no TGI, destacam-se o tempo de esvaziamento gástrico, este influenciado pela presença ou não de alimentos, fluxo sanguíneo, presença de tensoativos e volume luminal (DRESSMAN et al., 1998).

Fármacos com características de baixa solubilidade ou com solubilidade pH dependente são afetados devido as alterações pós-prandial, interferindo assim em sua biodisponibilidade. Outros fatores como alteração do pH do meio, ação das enzimas, microbiota presente e área superficial de contato também podem alterar significativamente a absorção de fármacos (MACHERAS; ARGYRAKIS, 1997; ROUGE; BURI; DOELKER, 1996).

### 2.6.2.2 Fatores relacionados ao fármaco

#### 2.6.2.2.1 Solubilidade e pH

A solubilidade de um fármaco está intimamente ligada ao valor de pH do meio no qual se encontra, pois apenas a fração dissolvida do fármaco é que será absorvida. Portanto, valores de pH dos fluidos do trato gastrointestinal, são fatores importantes no grau de ionização da molécula. Cabe salientar que, para o fármaco



transpor as membranas celulares, estas com caráter lipofílico, o fármaco deverá estar em sua forma não ionizada (AULTON, 2005; DESESSO; JACOBSON, 2001).

#### 2.6.2.2.2 Polimorfismo

A capacidade de uma molécula existir em diferentes formas cristalinas é denominada polimorfismo, no entanto, essas diferenças podem produzir cristais com modificações em suas propriedades termodinâmicas, cinéticas, interfaciais, entre outras. Os conhecimentos das propriedades relacionadas ao aspecto biofarmacêutico são de extrema importância, devendo o formulador estar atento as possíveis alterações que o produto poderá sofrer durante seu processo de produção como também em seu armazenamento (BYRN et al., 1999).

Apenas uma das formas polimórficas será estável, sendo as demais denominadas metaestáveis. As formas metaestáveis possuem a propriedade de transformar-se na forma estável ao longo do tempo. Em geral, a forma mais solúvel é aquela que se apresenta no estado amorfo (AULTON, 2005).

Geralmente o polimorfo mais estável é aquele que apresenta um maior ponto de fusão, sendo possível correlacionar o ponto de fusão de um determinado cristal e sua respectiva velocidade de dissolução. Para substâncias que possuem um baixo ponto de fusão, estas possuem uma maior facilidade para liberarem uma molécula durante o processo de dissolução, alterando significativamente sua biodisponibilidade (AULTON, 2005; ANSEL et al., 2008).

#### 2.6.2.2.3 Tamanho da partícula

O aumento do tamanho da área superficial da partícula em contato com o meio provocará um aumento da velocidade de dissolução. Por outro lado, quanto menor a área superficial da partícula, menor será a superfície de contato efetiva com o meio, resultando em uma diminuição da biodisponibilidade (AULTON, 2005; ANSEL et al., 2008). Fármacos com baixa solubilidade e de dissolução lenta, são comercializados em sua forma micronizada, aumentando assim a área superficial de contato e conseqüentemente sua velocidade de dissolução (AULTON, 2005).

### 2.6.2.3 Fatores inerentes à formulação

Devido suas propriedades funcionais, os excipientes, apresentam diversas funções quando fazem parte de uma forma farmacêutica, dentre elas a de diminuir a irritação gástrica provocada por alguns fármacos, proteção e alteração da cinética de liberação do fármaco, dentre outras, devendo ser escolhidos de forma criteriosa para fazer parte de uma formulação (SHARGEL; YU, 1999).

Componentes como amido e croscarmelose sódica, quando utilizados como desintegrantes, favorecem a dissolução, por outro lado, estearato de magnésio e talco, quando utilizados como lubrificante e deslizante respectivamente, diminuem a velocidade de dissolução, devendo assim ser adicionados em quantidades mínimas (AULTON, 2005; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

### 2.6.3 Ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução de formas farmacêuticas é um teste farmacopeico geralmente aplicado a comprimidos e cápsulas, tendo por finalidade, determinar a porcentagem da dose de fármaco liberada no meio de dissolução dentro do período de tempo especificado na monografia de cada produto, quando o mesmo é submetido à ação de equipamento específico, sob condições experimentais específicas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Durante o desenvolvimento de formulações como também na rotina de controle de qualidade, os testes de dissolução são uma ferramenta importante para a otimização das formulações assim como manter um controle de qualidade lote a lote dos produtos fabricados (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007). A partir de 1999, no Brasil, foram introduzidos os medicamentos genéricos e com isso os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos (MARCOLONGO, 2003).

O estudo de dissolução é o método mais apropriado para avaliar, de forma *in vitro*, a cinética de liberação de um fármaco contido em uma forma farmacêutica sólida e/ou forma farmacêutica dispersa/suspensa, onde a quantidade acumulativa de fármaco que passa para a solução é quantificada em função do tempo, sendo assim considerado uma ferramenta importante para avaliar os fatores que influenciam sobre a biodisponibilidade (AULTON, 2005).

Inicialmente os testes de dissolução foram desenvolvidos para o controle de qualidade e desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. Porém, outras apresentações devem ser avaliadas quanto a este ensaio, como por exemplo, supositórios, comprimidos mastigáveis, preparações tópicas semi-sólidas, adesivos transdérmicos e suspensões orais (SIEWERT, 2003).

Para a utilização do teste de dissolução no controle de qualidade de produtos, este, deve inicialmente ser desenvolvido e validado, sendo a especificidade, precisão, exatidão, estabilidade e a influência do tipo de filtro utilizado os principais parâmetros avaliados (MARCOLONGO, 2003).

O estudo de dissolução pode ser avaliado a partir de 3 diferentes categorias de especificação para análise, sendo elas: especificação em um único ponto sendo útil para rotina de testes de controle de qualidade, especificação em dois pontos, adequada para estudo de dissolução para fármacos com baixa solubilidade e por último o perfil de dissolução, muito empregado para o desenvolvimento e otimização de formulações (FDA, 1997a).

De acordo com a forma farmacêutica em análise, condições e critérios de avaliação estão descritos na monografia individual do produto. Diversos são os aparatos utilizados para a realização deste ensaio, porém os aparatos 1 (cesto) e 2 (pás), são os mais utilizados para formas sólidas (SIEWERT, 2003).

Primeiro a ser introduzido em farmacopeias, o aparato 1, apresenta a vantagem de manter a forma farmacêutica suspensa, estando totalmente em contato com o meio de dissolução (DOKOUMETZIDIS; MACHERAS, 2006). Pode apresentar como desvantagem uma grande variabilidade nos resultados, devido a aderência da forma farmacêutica nas aberturas do aparato, formação de bolhas e flutuação do material no interior do aparato (BORST; UGWU; BECKET, 1997).

Com relação ao aparato 2, este sendo o de primeira escolha para análise de suspensões orais, apresenta como desvantagem a não uniformidade de fluxo, devido o material se depositar junto ao fundo da cuba de dissolução (BAI; ARMENANTE, 2008; SIEWERT, 2003).

#### 2.6.4 Comparação dos perfis de dissolução

A comparação de perfis de dissolução entre produtos ou lotes do mesmo produto, é necessária quando se deseja conhecer o comportamento *in vitro* das

formulações antes de submetê-las a ensaios de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência, na isenção destes estudos para menores dosagens e em casos de alterações pós-registro como tamanho do lote, alteração de equipamento, alteração do local de fabricação, alteração do processo de produção, alterações qualitativa e quantitativa de excipientes (BRASIL, 2009).

Para avaliação dos perfis de dissolução são utilizados os métodos modelo dependente e independente (FDA, 1997a). Os métodos modelo dependente mais aplicados a comparação de perfis de dissolução são: ordem zero, primeira ordem, *Hixson-Crowell*, *Higushi*, *Weibull* e *Korsmeyer-Peppas*. Os métodos modelo independente podem ser divididos em testes de razão (tempo de dissolução médio, área sob a curva ou razão da porcentagem dissolvida), testes combinados (fatores  $f_1$  e  $f_2$ ) ou procedimentos baseados em ANOVA (análise de variância) (POLLI, 1996).

#### 2.6.5. Dissolução de suspensões

A forma farmacêutica suspensão oral é caracterizada por possuir partículas sólidas dispersas uniformemente em um meio líquido no qual o fármaco exibe mínima solubilidade, devido a este motivo, estudos de dissolução *in vitro* são muito importantes no que tange a velocidade e extensão da liberação do fármaco (ANSEL et al., 2008; AULTON, 2005; NASH, 1988).

Os fatores relacionados a esta forma farmacêutica que podem interferir no processo de dissolução são: tamanho de partícula, forma cristalina do fármaco, viscosidade da formulação e presença ou ausência de tensoativos (ABDOU, 1989; AULTON, 2005).

Diversos autores utilizam o aparato pá para realização do teste de dissolução em suspensões orais e uma velocidade de rotação de 75 rpm, porém como esta velocidade pode variar de 25 a 75 rpm, fator este que pode ser determinado a partir de dados de viscosidade do produto, geralmente utiliza-se 25 rpm para formulações de baixa viscosidade e 50 a 75 rpm para as formulações de alta viscosidade (SIEWERT, 2003).

Na *The United States Pharmacopeia* (2012) e *British Pharmacopeia* (2012), as monografias dos fármacos alopurinol, indometacina, fenitoína, ibuprofeno, megestrol e meloxicam, requerem ensaios de dissolução para suas respectivas suspensões orais.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é o desenvolvimento de metodologia para avaliação da liberação *in vitro* e determinação quantitativa de diclofenaco potássico suspensão oral.

### 3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta para o doseamento de diclofenaco potássico suspensão oral.
- Desenvolver estudo de degradação forçada utilizando DPt SQR e avaliar a interferência dos possíveis produtos de degradação em relação ao método proposto.
- Desenvolver teste de dissolução para o controle de qualidade de diclofenaco potássico suspensão oral.
- Desenvolver método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção na região do ultravioleta para avaliar a porcentagem de dissolução de diclofenaco potássico suspensão oral.
- Verificar a estabilidade do DPt nas condições propostas no ensaio de dissolução.
- Comparar os perfis de dissolução de diferentes lotes de suspensão oral contendo DPt.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras

#### 4.1.1 Substância química de referência (SQR) e composto relacionado A

Diclofenaco potássico – Produzido pela Farmacopeia Brasileira – Lote: 1053, teor declarado: 99,8%. Diclofenaco composto relacionado A – Produzido pela *The United States Pharmacopeia* - Lote: J0F294, teor declarado: 100,0%

#### 4.1.2 Produto farmacêutico

Suspensão oral contendo diclofenaco potássico 2 mg/mL\*, adquirido no comércio local.

\* (Cataflam<sup>®</sup> produzido pelo laboratório Novartis Biociências, lotes: Z0047 e Z0049A, prazo de validade até 04/2013 e 11/2013 respectivamente, possuindo os seguintes excipientes: ácido cítrico anidro, ácido sórbico, aroma de morango, celulose microcristalina, ciclamato de sódio, hidroxietilcelulose, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol destilado, estearato de glicerilpolioxietilenoglicol, sacarina sódica cristalizada, sorbitol e água deionizada).

#### 4.1.3 Reagentes

- Ácido clorídrico P.A (Merck)
- Água purificada Milli-Q
- Fosfato de sódio monobásico anidro (Sigma Aldrich)
- Hidróxido de sódio (Sigma Aldrich)
- Laurilsulfato de sódio (Alpha Química)
- Metanol grau cromatográfico (Merck)
- Peróxido de hidrogênio (Merck)

#### 4.1.4 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica, Bosch, modelo SAE 200
- Banho ultra-sônico, Unique, USC 1400
- Bomba de vácuo, Primatec<sup>®</sup>, modelo 131
- Centrífuga, Centribio<sup>®</sup>, modelo TDL80-2B
- Coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>8</sub>, 150 x 4,6 mm, porosidade 5 µm
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Shimadzu Prominence equipado com bomba modelo LC-20AT, detector modelo SPD-M20A, controlador CBM-20A, integrador automático computadorizado com *software LC-Solution*<sup>®</sup>, injetor automático SIL-20A e forno para coluna CTO-20AC Shimadzu.
- Dissolutor, Pharmatest<sup>®</sup>, modelo PTWS
- Espectrofotômetro UV/Vis, Shimadzu<sup>®</sup>, modelo 1650PC
- Membrana filtrante RC 0,45 µm, 47 mm, Sartorius<sup>®</sup>
- Papel filtro quantitativo faixa preta, Framex<sup>®</sup>
- Pipetador automático, Brand<sup>®</sup>, modelo Transferpette
- Potenciômetro, Denver<sup>®</sup>, modelo Ultrabasic
- Purificador de água Milli-Q A10, Millipore<sup>®</sup>
- Vidraria calibrada Brand<sup>®</sup>
- Viscosímetro, Broockfield<sup>®</sup>, modelo RV-DV I+

## 4.2 Metodologia

4.2.1 Método cromatográfico através da CLAE para o doseamento de DPt suspensão oral

4.2.1.1 Preparo das soluções padrão contendo DPt SQR, amostra suspensão oral e amostra placebo

Para o preparo da solução contendo DPt SQR, pesou-se analiticamente o equivalente a 10 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume utilizando metanol e água (70:30) como diluente. A seguir, alíquota de 5 mL foi transferida para balão volumétrico de 25 mL completando-se o

volume com diluente. Após, alíquota de 1,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com diluente (30 µg/mL).

Para o preparo da solução amostra, pesou-se analiticamente o equivalente a 2 mg de DPt e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com diluente. Após, alíquota de 1,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL completando-se o volume com diluente (30 µg/mL).

Para o preparo da amostra placebo, pesou-se analiticamente o placebo da formulação referente a 2 mg de DPt e procedeu-se conforme preparo da solução amostra.

#### 4.2.1.2 Determinação dos parâmetros cromatográficos

Baseando-se em metodologias oficiais e em trabalhos publicados por diversos autores, conforme exposto na Tabela 2, testou-se diferentes tipos de fase móvel e proporções entre seus constituintes, colunas contendo diferentes tamanhos e fases estacionárias, assim como diferentes volumes de injeção das soluções, temperaturas do forno e vazão da fase móvel.

Através da avaliação dos parâmetros cromatográficos, desenvolveu-se um método analítico quantitativo para o doseamento de DPt em suspensão oral, utilizando as condições cromatográficas descritas na tabela 7.

Tabela 7 – Condições cromatográficas para o doseamento do DPt em suspensão oral por CLAE.

Parâmetro cromatográfico	Descrição
Fase móvel	Metanol : tampão fosfato pH 2,5 (70:30)
Diluente	Metanol : Água (70:30)
Vazão da fase móvel	1,0 mL/minuto
Temperatura	25 °C
Deteção	Ultravioleta ( $\lambda = 275$ nm)
Volume de injeção	20 µL
Coluna	Phenomenex <sup>®</sup> Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm)



#### 4.2.1.3 Preparo da fase móvel

##### 4.2.1.3.1 Tampão fosfato pH 2,5

Pesou-se 1,38 g de fosfato de sódio monobásico anidro e com auxílio de 800 mL de água ultrapura o mesmo foi dissolvido. Após completa dissolução, ajustou-se o pH para 2,5 com ácido fosfórico e diluiu-se para 1000 mL com água ultrapura.

A solução foi filtrada através de membrana de celulose regenerada 0,45 µm e 47 mm de diâmetro com auxílio de sistema de vácuo e desgaseificada com auxílio de banho de ultrassom durante 10 minutos.

##### 4.2.1.3.2 Metanol grau cromatográfico

Com auxílio de membrana de celulose regenerada 0,45 µm, 47 mm de diâmetro e sistema de vácuo, o metanol foi filtrado e desgaseificado em banho de ultrassom durante 10 minutos.

#### 4.2.1.4 Validação do método de doseamento do DPt por CLAE

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: intervalo, linearidade, seletividade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e detecção. Também foram analisados os parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico.

##### 4.2.1.4.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Foram avaliados o fator de capacidade (K), assimetria e número de pratos teóricos (N). Os valores obtidos foram calculados pelo *software* do equipamento.

Os testes de adequabilidade do sistema foram realizados a partir da análise de cinco injeções da solução SQR e solução amostra ambas em concentração de 30 µg/mL, conforme preparadas no item 4.2.1.1.

#### 4.2.1.4.2 Intervalo e linearidade

O intervalo foi determinado a partir da análise das soluções de DPt SQR contendo cinco níveis de concentrações entre 50% a 150% em relação à concentração de trabalho de 30 µg/mL.

Preparou-se uma solução de DPt SQR contendo 1 mg/mL em diluente. Com auxílio de pipetador automático, transferiu-se 5 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com diluente. A seguir, alíquotas de 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 mL foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente. Foram obtidas as concentrações do intervalo, respectivamente, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Cada concentração foi injetada em triplicata.

Após a avaliação dos cromatogramas obtidos, foram preparadas três curvas padrão da SQR contendo cinco concentrações onde se determinou a linearidade do método.

Para construção da curva padrão, preparou-se uma solução de DPt SQR contendo 1 mg/mL em diluente. Com auxílio de pipetador automático, transferiu-se 5 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com diluente. A seguir, alíquotas de 0,5, 1, 1,5, 2 e 2,5 mL foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente. Foram obtidas as concentrações da curva, respectivamente, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Cada concentração da curva foi injetada em triplicata.

A curva padrão foi realizada em triplicata e, com a área absoluta média obtida, construiu-se um gráfico plotando-se área média *versus* concentração do fármaco (µg/mL). A curva padrão e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

#### 4.2.1.4.3 Especificidade

Para avaliar a especificidade do método, as soluções de DPt SQR foram submetidas a condições de estresse, com o objetivo da formação de possíveis produtos de degradação.

A pureza do pico cromatográfico referente ao DPt foi determinada com auxílio do detector de arranjo de diodo (DAD). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Também foi avaliada a possível interferência dos excipientes da formulação, sendo que nenhum outro composto deve eluir no mesmo tempo de retenção do DPt.

As condições de estresse e o preparo das soluções analisadas estão descritas a seguir.

a) Hidrólise alcalina (NaOH 0,1 M)

Preparou-se uma solução contendo a SQR em diluente, conforme descrito em 4.2.1.1 (1 mg/mL). Transferiu-se 5 mL desta solução para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com NaOH 0,1 M. A solução foi deixada em repouso e avaliada nos tempos 0, 5 e 24 horas. Após os tempos pré-determinados, alíquota de 1,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, neutralizou-se a solução com HCl 0,1 M e completou-se o volume com diluente (30 µg/mL).

b) Hidrólise ácida (HCl 0,1 M)

Preparou-se uma solução contendo a SQR em diluente, conforme descrito em 4.2.1.1 (1 mg/mL). Transferiu-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com HCl 0,1 M. A solução foi deixada em repouso e avaliada nos tempos 0, 5 e 24 horas. Após os tempos pré-determinados, alíquota de 1,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, neutralizou-se a solução com NaOH 0,1 M e completou-se o volume com diluente (30 µg/mL).

c) Oxidação utilizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%)

Preparou-se uma solução contendo a SQR em diluente, conforme descrito em 4.2.1.1 (1 mg/mL). Transferiu-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (v/v). A solução foi deixada em repouso, ao abrigo da luz, e avaliada nos tempos 0, 5 e 24 horas, após os tempos pré-determinados, alíquota de 1,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente (30 µg/mL).

d) Fotólise (luz ultravioleta  $\lambda = 254 \text{ nm}$ )

Preparou-se uma solução contendo a SQR em diluente, conforme descrito em 4.2.1.1 (1 mg/mL). Transferiu-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com diluente. A solução foi transferida para cubetas de quartzo, expostas à lâmpada de radiação ultravioleta (254 nm) em câmara espelhada e avaliada nos tempos de 5 e 24 horas. Após cada tempo pré-determinado, alíquota de 1,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente (30  $\mu\text{g/mL}$ ).

Preparou-se outra solução contendo SQR da mesma forma descrita acima, no qual foi submetida às mesmas condições, porém protegida da luz com a utilização de papel alumínio.

e) Estufa 80 °C

Preparou-se uma solução contendo a SQR em diluente, conforme descrito em 4.2.1.1 (1 mg/mL). Transferiu-se 5 mL desta solução para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com diluente. A solução foi deixada em estufa pré-aquecida a 80 °C durante 24 horas, após 5 horas e ao final das 24 horas, alíquota de 1,5 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente (30  $\mu\text{g/mL}$ ).

f) Interferência dos excipientes da formulação

Preparou-se uma amostra placebo contendo os excipientes da suspensão oral, conforme item 4.2.1.1. Para o preparo deste placebo, as concentrações de cada excipiente foram baseadas na literatura (ROWE, SHESKEY e QUINN, 2009).

g) Diclofenaco composto relacionado A (N-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona)

Preparou-se uma solução contendo o composto relacionado A em diluente (1 mg/mL). Alíquota de 2 mL foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente. Desta solução, alíquota de 1,5 mL foi

transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com diluente (30 µg/mL).

#### 4.2.1.4.4 Precisão

Para avaliação da repetibilidade do método, foram realizadas três determinações, nas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL, no mesmo dia e nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi obtida através da determinação do diclofenaco potássico, na concentração de 30 µg/mL, em três dias diferentes por dois analistas diferentes. As amostras foram preparadas conforme descrito a seguir.

Para ensaio de repetibilidade, pesou-se, analiticamente, o equivalente a 2 mg de DPt e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com diluente. Alíquotas de 0,5, 1,5 e 2,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se os volumes com diluente, obtendo as respectivas concentrações de 10, 30 e 50 µg/mL.

Para ensaio de precisão intermediária, pesou-se, analiticamente, o equivalente a 2 mg de DPt e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com diluente. Alíquotas de 1,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL completando-se o volume com diluente (30 µg/mL).

As soluções foram injetadas em triplicata nas condições cromatográficas estabelecidas. A quantidade de DPt presente nas amostras foi determinada através da equação da reta, obtida da curva padrão.

A precisão do método foi avaliada através do desvio padrão relativo (DPR).

#### 4.2.1.4.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da adição de quantidade conhecida da SQR na amostra.

Soluções de DPt SQR e amostra foram preparadas ambas na concentração de 0,2 mg/mL em diluente. Transferiu-se 0,5 mL da solução amostra para balões volumétricos de 10 mL denominados A, R1, R2, R3 e R4. Adicionaram-se alíquotas de 0,5, 1, 1,5 e 2 mL da solução SQR nos balões R1, R2, R3 e R4, conforme

descrito na Tabela 8. Completou-se o volume com diluente, a fim de se obter as concentrações finais teóricas de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL.

Tabela 8 – Preparo das soluções para o teste de exatidão.

Balões volumétricos	Volume da amostra (mL)	Volume da solução da SQR (mL)	Concentração teórica final (µg/mL)
A	0,5	-----	10
R1	0,5	0,5	20
R2	0,5	1	30
R3	0,5	1,5	40
R4	0,5	2	50

As soluções A, R1, R2, R3 e R4 foram preparadas e injetadas em triplicata.

As porcentagens de recuperação de DPt SQR foram calculadas através da equação 2:

$$R\% = [(C_f - C_a) / C_{SQR}] \times 100 \quad (2)$$

Onde,

$C_f$ : concentração da solução final, contendo DPt SQR e amostra (µg/mL);

$C_a$ : concentração da solução amostra (µg/mL);

$C_{SQR}$ : concentração da solução padrão contendo DPt (µg/mL).

#### 4.2.1.4.6 Robustez

A robustez foi avaliada através de pequenas modificações nos parâmetros do método original. O planejamento do teste, conforme Tabela 9, foi realizado de acordo com INMETRO (2007) e teste de Youden & Steiner (1975). Os parâmetros (fatores) alterados para avaliação estão listados a seguir:

- Fluxo da fase móvel: A (1,2 mL/minuto), a (0,8 mL/minuto);

- Coluna cromatográfica: B (Phenomenex® Gemini), b (SunFire®);
- Temperatura do forno: C (30 °C), c (20 °C);
- Concentração de metanol da fase móvel: D (73%), d (67%);
- Tempo de ultrassom para o preparo da amostra: E (25 minutos), e (15 minutos).

Tabela 9 – Matriz de fatores para determinação da robustez do método.

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Os parâmetros A, a, B, b, C, c, D, d, E, e, foram calculados conforme equações de 3 a 12.

$$A = (s + t + u + v) / 4 \quad (3) \qquad a = (w + x + y + z) / 4 \quad (8)$$

$$B = (s + t + w + x) / 4 \quad (4) \qquad b = (u + v + y + z) / 4 \quad (9)$$

$$C = (s + u + w + y) / 4 \quad (5) \qquad c = (t + v + x + z) / 4 \quad (10)$$

$$D = (s + t + y + z) / 4 \quad (6) \qquad d = (u + v + w + x) / 4 \quad (11)$$

$$E = (s + u + x + z) / 4 \quad (7) \qquad e = (t + v + w + y) / 4 \quad (12)$$

De acordo com Nogueira e colaboradores (2011), o método será robusto se as condições 1 e 2 forem atendidas:

Condição 1: (para fator A e demais fatores), teor médio de DPt obtido no ensaio de precisão intermediária – 5% deste valor  $\leq A \leq$  teor médio de DPt obtido no ensaio de precisão intermediária + 5% deste valor.

Condição 2: (para fator A e demais fatores),  $A - a \leq 3\%$  em relação ao teor de DPt.

Para avaliação deste ensaio, preparou-se solução contendo amostra conforme item 4.2.1.1.

As amostras foram analisadas, em triplicata em cada uma das combinações ensaiadas e as concentrações de DPt presentes nas amostras foram determinadas a partir da equação da reta, obtida da curva padrão.

#### 4.2.1.4.7 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção e quantificação foi calculado a partir dos dados obtidos da equação da reta da curva analítica, conforme equação 13 e equação 14:

$$LD = \frac{3 \times s}{S} \quad (13)$$

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad (14)$$

onde,

s é o desvio padrão do coeficiente linear da equação e S é o coeficiente angular da curva de calibração (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

#### 4.2.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução

O desenvolvimento do ensaio de dissolução foi realizado com base em informações acerca do DP disponíveis na literatura. Conforme características físico-químicas, farmacocinéticas, estabilidade do DP e testes pré-liminares, se determinou o volume e o tipo de meio de dissolução assim como a velocidade mais apropriada de rotação do aparato. O aparato utilizado para a validação do método foi o 2 (aparato pá), sendo este o recomendado para o estudo de dissolução de suspensões (SIEWERT, 2003).

##### 4.2.2.1 Determinação da solubilidade de DPt em diferentes meios

A solubilidade do DPt foi determinada utilizando uma quantidade equivalente a maior dose do fármaco administrada por dia em 300 mL de meios tampão fosfato pH



6,8 e 7,4, água + laurilsulfato de sódio (LSS) 0,3%, 0,5%, 1,0% e 1,5% (p/v) (BRASIL, 2010; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

Para a realização do ensaio foram transferidos, em triplicata, para béquers, 25 mL de cada meio de dissolução testado. Adicionaram-se quantidade exata de 11,0 mg de DPt SQR em cada meio. Os béquers foram mantidos fechados, sob agitação magnética a 37 °C durante o período de 24 horas. Após este período, alíquotas foram retiradas e filtradas em filtros de membrana 0,45 µm e diluídas até concentração de 10 µg/mL com os respectivos meios testados.

Prepararam-se curvas padrão de DPt SQR nas concentrações de 6, 8, 10, 12 e 14 µg/mL utilizando como diluente os respectivos meios de dissolução testados. As porcentagens dissolvidas foram determinadas utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda de 275 nm.

#### 4.2.2.2 Condições do ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução para DPt suspensão oral foi desenvolvido utilizando o aparato pá (2) e 900 mL de meio de dissolução a 37 °C ± 0,5. A influência dos diferentes meios de dissolução, tipo de filtro utilizado e velocidade de rotação do aparato foram avaliados. Alíquotas de 5 mL da amostra foram coletadas em tempos pré-determinados e filtradas. O volume do meio de dissolução retirado foi repostado, a fim de manter o volume do meio constante.

Para todos os ensaios realizados no desenvolvimento deste método o procedimento a seguir foi seguido: quantidades equivalentes a 10 mg de DPt foram adicionadas a cada cuba contendo 900 mL de meio de dissolução a 37 °C ± 0,5, com auxílio de seringas, sendo as mesmas pesadas antes e depois da adição da suspensão, a diferença de peso foi relacionada com a densidade, para cálculo da dose real adicionada a cada cuba.

As condições cromatográficas para avaliação do ensaio de dissolução para DPt em suspensão oral estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 – Condições cromatográficas utilizadas no ensaio de dissolução de DPt em suspensão oral.

Parâmetro cromatográfico	Descrição
Fase móvel	Metanol : tampão fosfato pH 2,5 (70:30)
Diluyente	Água + 0,3% de LSS
Vazão da fase móvel	1,0 mL/minuto
Temperatura	30 °C
Detecção	Ultravioleta ( $\lambda = 275 \text{ nm}$ )
Volume de injeção	20 $\mu\text{L}$
Coluna	Phenomenex <sup>®</sup> Luna C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )

#### 4.2.2.3 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução

Realizou-se a dissolução da amostra ( $n = 3$ ) sob condições previamente selecionadas. As amostras foram coletadas após 2 horas e injetadas no sistema CLAE nos tempos 0, 12 e 24 horas.

As porcentagens dissolvidas foram determinadas a partir da equação da reta obtida no ensaio de linearidade conforme descrito em 4.2.2.5.2.

#### 4.2.2.4 Influência do filtro

Este estudo tem por finalidade avaliar se o fármaco terá uma adsorção na membrana polimérica filtrante. Para realização da análise, amostra contendo DPt ( $n = 3$ ) foi submetida ao ensaio de dissolução e após o tempo pré-determinado, foram coletadas. A amostra denominada “A” foi filtrada normalmente, utilizando filtros F. Maia código 41 e outra amostra, denominada “B” foi apenas centrifugada. As concentrações das amostras foram determinadas utilizando sistema CLAE previamente validado. Foi utilizado como referencia os resultados obtidos com a solução “B”. O critério de aceitação para a perda por adsorção é de no máximo 5,0% (LINDENBERG et al., 2005).

#### 4.2.2.5 Validação do método CLAE para determinação da porcentagem dissolvida de DPt em suspensão oral

Para a validação do método foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão e precisão (BRASIL, 2003; ICH, 2005; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

##### 4.2.2.5.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada utilizando-se amostra placebo. As concentrações de cada excipiente foram baseadas na literatura (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) e calculadas a partir de um frasco (120 mL) de suspensão oral.

Em cubas ( $n = 3$ ) contendo 900 mL do meio de dissolução selecionado e pré-aquecido a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  foram adicionadas a suspensão placebo. Utilizou-se rotação de 150 rpm por 2 horas. Após este período, alíquota de 5 mL foi retirada e filtrada.

##### 4.2.2.5.2 Intervalo e linearidade

Para construção da curva padrão, pesou-se o equivalente a 10 mg de DPt SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Foram adicionados 2 mL de metanol e completou-se o volume com meio de dissolução (1 mg/mL). Com auxílio de pipetador automático, transferiu-se 2,5 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com meio de dissolução. A seguir, alíquotas de 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 e 4,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e completou-se o volume com mesmo diluente. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente, 2, 6, 10, 14 e 18  $\mu\text{g/mL}$ . Cada ponto foi injetado em triplicata.

A curva padrão e sua respectiva equação da reta foram determinadas através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

##### 4.2.2.5.3 Exatidão e precisão

A exatidão do método foi determinada através do método de recuperação de quantidades conhecidas de DPt SQR adicionadas ao placebo.

Para o preparo da solução padrão, pesou-se o equivalente a 50 mg de DPt e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se 2 mL de metanol e o volume foi completado com meio de dissolução (5 mg/mL). A partir desta solução, alíquotas de 0,36, 1,8 e 3,24 mL, correspondentes a 2, 10 e 18 µg/mL respectivamente, foram adicionadas nas cubas contendo amostra placebo e 900 mL de meio de dissolução selecionado e pré-aquecido a 37 °C ± 0,5. Ao final do ensaio, alíquotas do meio foram coletadas, filtradas e analisadas por CLAE. O ensaio foi realizado durante três dias. A precisão intermediária e repetibilidade foram avaliadas com base no DPR dos dados de recuperação.

#### 4.2.2.6 Comparação dos perfis de dissolução

Devido à ausência no comércio de outros produtos, genéricos e similares, contendo suspensão oral de DPt, se procedeu a aquisição de um novo lote do produto (Lote: Z0049A), a fim de realizar o perfil de dissolução comparativo entre os lotes.

Para comparação dos perfis de dissolução, utilizou-se método modelo independente empregando fator de diferença ( $f_1$ ), sendo este a porcentagem de diferença entre os dois perfis avaliados a cada tempo de coleta, correspondendo a medida do erro relativo entre os perfis, e o fator de semelhança ( $f_2$ ), sendo este a medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas em ambos os perfis (BRASIL, 2010; FDA, 1997a).

Realizou-se o perfil de dissolução ( $n = 12$ ) dos diferentes lotes sob condições previamente selecionadas. As amostras foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, gerando assim o perfil de dissolução de ambos os medicamentos.

O fator ( $f_1$ ) e ( $f_2$ ) foram calculados conforme equações 15 e 16, respectivamente:

$$f_1 = \{ [ \sum_{t=1}^n | R_t - T_t | ] / [ \sum_{t=1}^n R_t ] \} \times 100 \quad (15)$$

$$f_2 = 50 \times \log \{ [ 1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 ]^{-0,5} \times 100 \} \quad (16)$$

onde,

n = número de tempos de coleta;

$T_t$  = valor da porcentagem dissolvida do segundo lote do medicamento, no tempo  $t$ ;  
 $R_t$  = valor da porcentagem dissolvida no tempo  $t$ , obtido com o medicamento em que o método foi desenvolvido e validado.

Para que os perfis de dissolução sejam considerados semelhantes os valores encontrados para  $f_1$  e  $f_2$  deverão estar compreendidos entre 0 a 15 e 50 a 100, respectivamente. O coeficiente de variação (CV) para os dois primeiros pontos de coleta deve ser inferior a 20% e para os demais considerar o máximo de 10% (BRASIL, 2010; FDA, 1997a).

#### 4.2.2.7 Cinética de dissolução

Quatro diferentes modelos matemáticos foram utilizados para avaliar a cinética de liberação do DPt: ordem zero, primeira ordem, *Hixson-Crowell* e *Higuchi*, sendo suas respectivas equações demonstradas na Tabela 11. Para construção das curvas de liberação, utilizou-se apenas um ponto acima de 80% de fármaco dissolvido. Determinou-se o melhor modelo matemático com base nos valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Para caracterização do perfil de liberação do DPt o cálculo da eficiência de dissolução (ED%) foi utilizado (COSTA; LOBO, 2001).

Tabela 11 – Modelos matemáticos utilizados para representar o perfil de dissolução de suspensão oral contendo DPt.

Cinética de ordem zero	$Q_t = Q_0 + K_0t$
Cinética de primeira ordem	$\log Q_t = \log Q_0 + (K_1t) / 2.303$
Modelo de <i>Hixson-Crowell</i>	$F_t = K_h t^{1/2}$
Modelo de <i>Higushi</i>	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$

$Q_t$  = quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$ ;  $Q_0$  = quantidade inicial de fármaco na solução;  $K_0$  e  $K_1$  = constantes de zero e primeira ordens, respectivamente.

$f_t$  = quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$  por unidade de superfície;  $K_h$  = constante de dissolução de Higushi

$W_0$  = quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica;  $W_t$  = quantidade remanescente de fármaco na forma farmacêutica no tempo  $t$ ;  $K_s$  = constante de integração da relação superfície-volume

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise quantitativa do diclofenaco potássico suspensão oral

#### 5.1.1 Validação de metodologia analítica para forma farmacêutica suspensão oral

Para o desenvolvimento da metodologia para quantificação de DPt, foram realizados testes preliminares com o objetivo de otimizar as condições cromatográficas, sendo testados diferentes tipos e proporções de solventes da fase móvel, colunas cromatográficas, fluxos e comprimento de onda.

##### 5.1.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

As condições utilizadas para a determinação de DPt em suspensão oral estão descritas na Tabela 7. Estas condições foram selecionadas com base nos melhores valores encontrados em relação ao número de pratos teóricos, assimetria do pico de retenção, fator de capacidade e tempo de retenção do fármaco.

Os valores médios dos parâmetros cromatográficos obtidos após cinco injeções das soluções SQR e amostra, ambas na concentração de 30 µg/mL, encontram-se respectivamente nas Tabelas 10 e 11. Os cromatogramas obtidos com estas soluções encontram-se respectivamente nas Figuras 3 e 4.

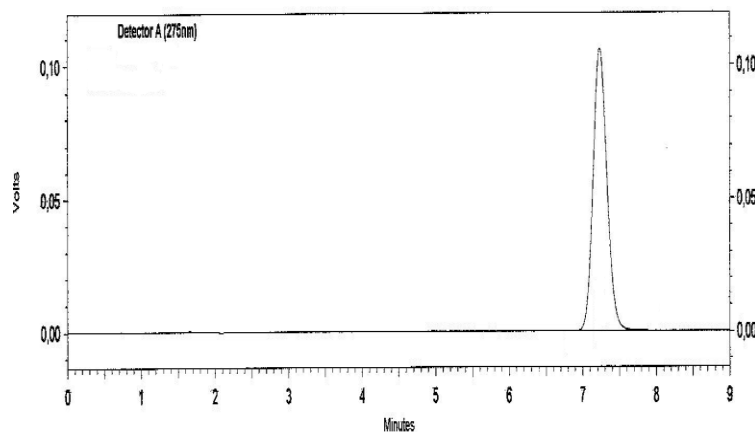


Figura 3 – Cromatograma da solução SQR de DPt (30 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ = 275 nm.

Tabela 12 – Parâmetros cromatográficos obtidos com a solução SQR de DPt (30 µg/mL), Figura 3.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor observado</b>	<b>Valor recomendado (FDA, 1994)</b>
Número de pratos teóricos	7000	> 2000
Fator de capacidade	7,07	> 2
Assimetria	1,13	≤ 2
Tempo de retenção (minutos)	7,2	-----

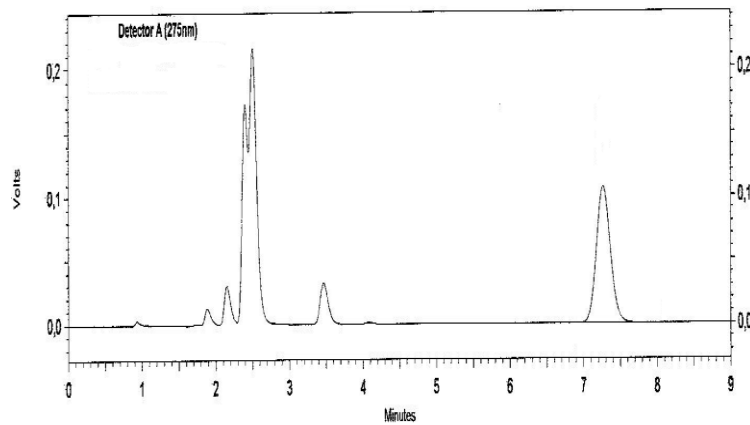


Figura 4 – Cromatograma da solução amostra de DPt (30 µg/mL). Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® Luna C<sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ = 275 nm.

Tabela 13 – Parâmetros cromatográficos obtidos com a solução amostra de DPt (30 µg/mL), Figura 4.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor observado</b>
Número de pratos teóricos	6910
Fator de capacidade	7,06
Assimetria	1,13
Tempo de retenção (minutos)	7,2

Os testes de adequabilidade do sistema cromatográfico são essenciais para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados com precisão e exatidão confiáveis. Os parâmetros a serem determinados assim como seus limites aceitáveis encontram-se na Tabela 5.

Conforme exposto nas Tabelas 10 e 11, após cinco injeções consecutivas das soluções, os valores médios encontrados, estão de acordo com os valores preconizados pelo FDA, 1994.

#### 5.1.1.2 Especificidade

A especificidade de um método analítico é a capacidade que o mesmo possui de analisar a substância de interesse mesmo quando esta se encontra em presença de outros componentes, tais como excipientes, outros ingredientes ativos, impurezas e produtos de degradação (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

##### 5.1.1.2.1 Interferência dos excipientes da formulação

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam os cromatogramas referentes às soluções contendo os excipientes, amostra suspensão oral e SQR respectivamente, preparadas conforme item 4.2.1.1.

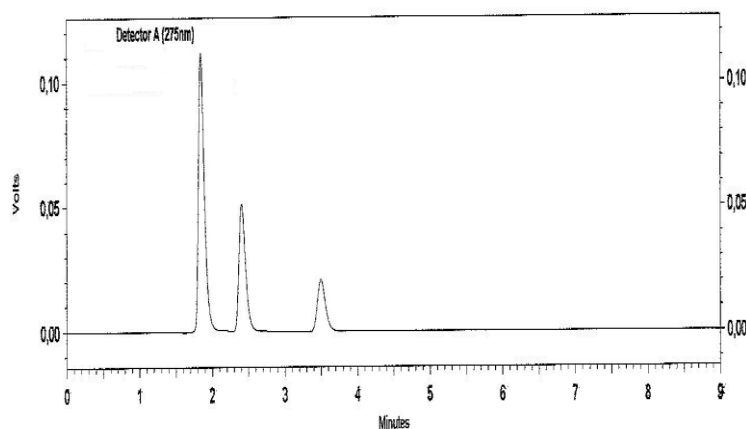


Figura 5 – Cromatograma dos excipientes. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min;  $\lambda$ = 275 nm.



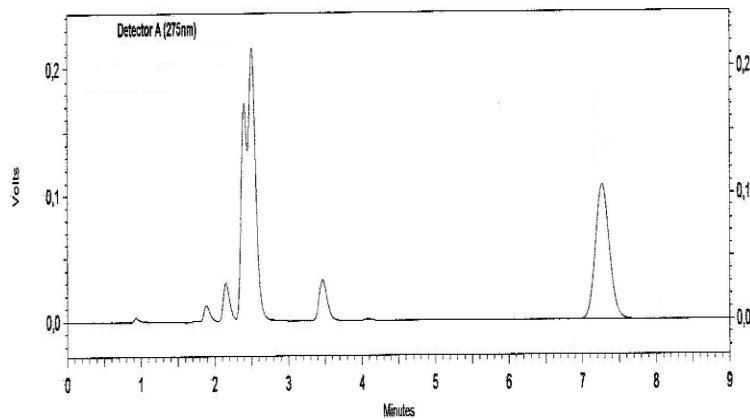


Figura 6 – Cromatograma da solução amostra suspensão oral de DPt. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min;  $\lambda = 275$  nm.

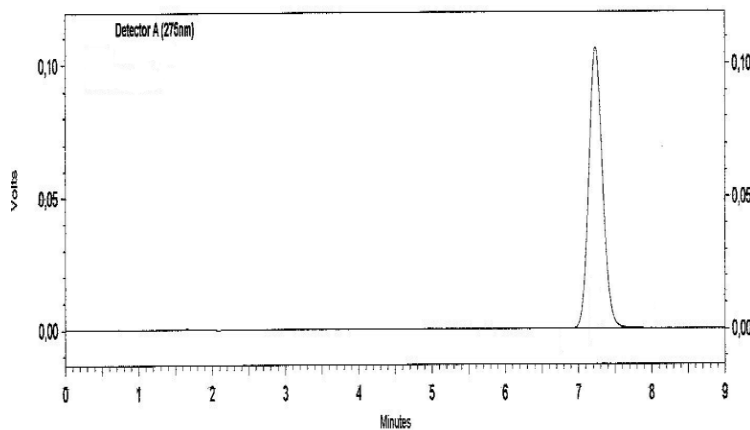


Figura 7 – Cromatograma da solução de DPt SQR. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min;  $\lambda = 275$  nm.

A partir dos cromatogramas pode-se observar que nenhum dos excipientes da formulação eluiu no mesmo tempo de retenção referente ao pico do DPt, não interferindo assim em sua determinação.

No intuito de investigar a interferência de potenciais produtos de degradação, submeteram-se as soluções contendo DPt SQR a condições de estresse conforme item 4.2.1.4.3. Com auxílio de detector de arranjo de diodo (DAD) verificou-se a pureza do pico cromatográfico referente ao fármaco.

a) Hidrólise alcalina (NaOH 0,1 M)

A Figura 8 apresenta os cromatogramas referentes às soluções contendo DPt SQR submetidas à hidrólise alcalina (NaOH 0,1 M) por um período de 24 horas. O teste de estresse não apresentou a formação de picos secundários no cromatograma, além disso, a área média do pico referente ao DPt manteve-se constante durante os tempos 0, 5 e 24 horas. Para esta análise a pureza do pico do DPt foi de 1,0000.

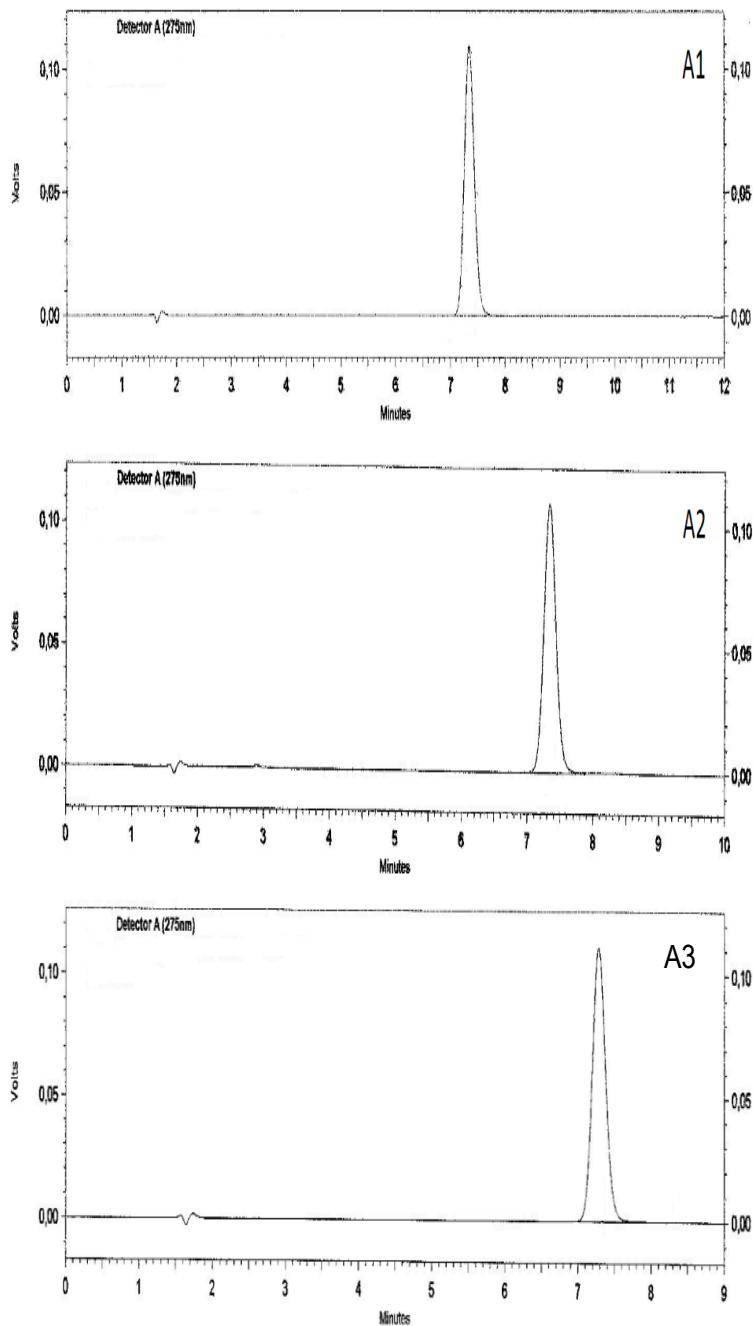
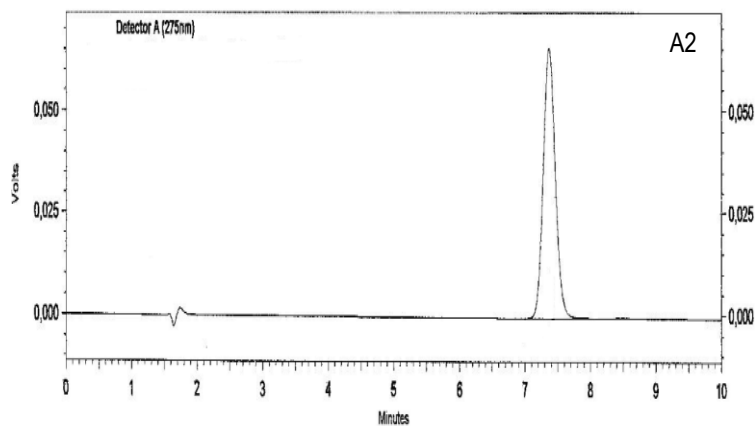
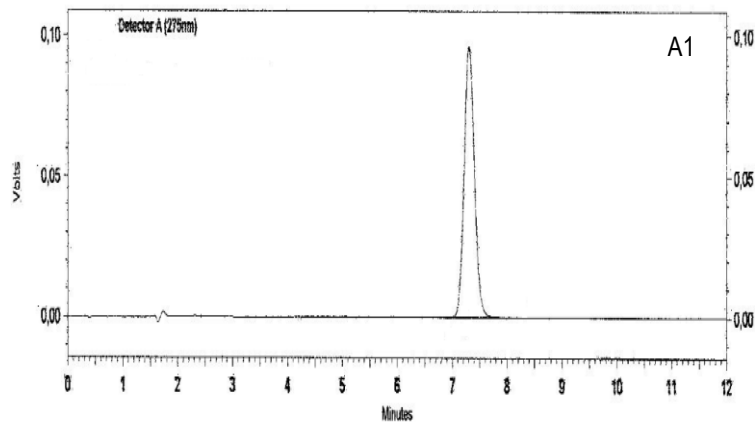


Figura 8 – Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a hidrólise alcalina tempo zero; A2: solução de DPt SQR submetida a hidrólise alcalina tempo 5 horas; A3: solução de DPt SQR submetida a hidrólise alcalina tempo 24 horas.

b) Hidrólise ácida (HCl 0,1 M)

A Figura 9 apresenta os cromatogramas referentes às soluções contendo DPt SQR submetidas a hidrólise ácida (HCl 0,1 M) por um período de 24 horas. O teste de estresse não apresentou a formação de picos secundários no cromatograma, porém, no tempo zero e nos demais tempos 5 e 24 horas, houve uma diminuição respectivamente em torno de 8,3%, 39,0% e 45,6% em relação a área média referente ao pico do DPt indicando que o fármaco possa ter sofrido certa degradação. A ausência de picos secundários possa ser justificada devido a não presença de grupo(s) cromóforo(s) nos possíveis produtos de degradação formados. Para esta análise a pureza do pico do DPt foi de 1,0000.



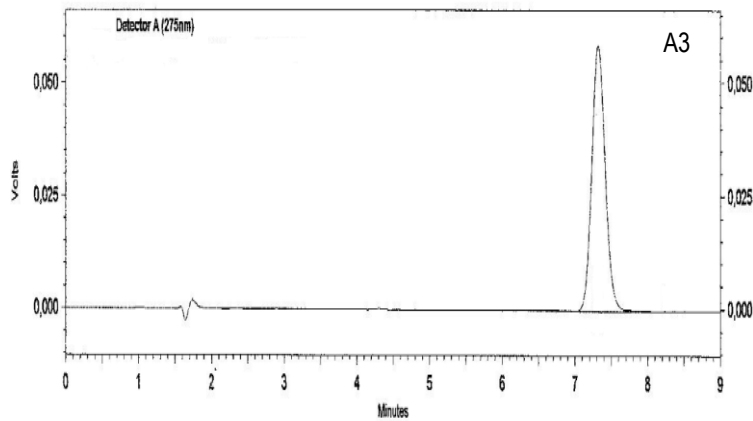
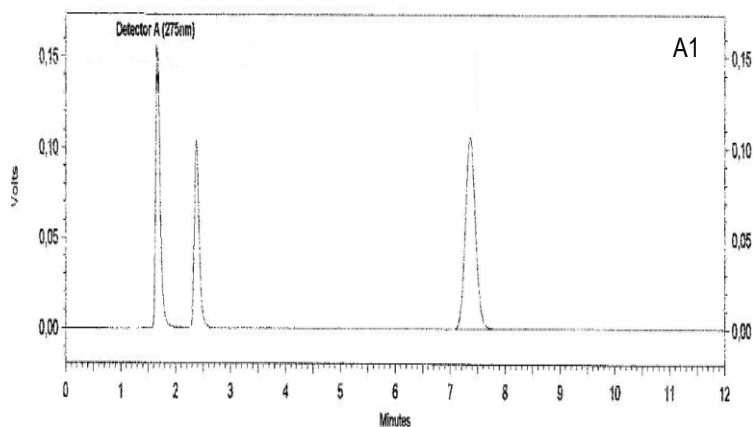


Figura 9 – Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a hidrólise ácida tempo zero; A2: solução de DPt SQR submetida a hidrólise ácida tempo 5 horas; A3: solução de DPt SQR submetida a hidrólise ácida tempo 24 horas.

c) Oxidação ( $H_2O_2$  a 3%)

A Figura 10 apresenta os cromatogramas referentes as soluções contendo DPt SQR submetidas a oxidação ( $H_2O_2$  a 3%) por um período de 24 horas. O teste de estresse não apresentou a formação de picos secundários no cromatograma, porém, nos tempos de 5 e 24 horas, houve uma diminuição respectivamente em torno de 14,6% e 43,0% em relação a área média referente ao pico do DPt indicando que o fármaco possa ter sofrido certa degradação. A ausência de picos secundários possa ser justificada devido a não presença de grupo(s) cromóforo(s) nos possíveis produtos de degradação formados. Para esta análise a pureza do pico do DPt foi de 0,9999.



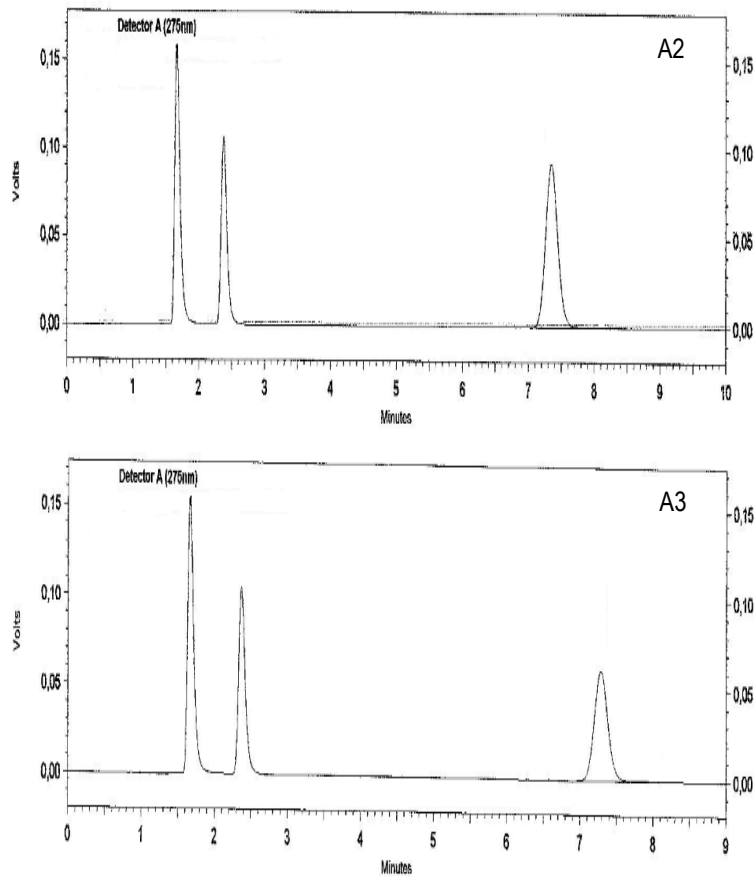


Figura 10 – Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a oxidação tempo zero; A2: solução de DPt SQR submetida a oxidação tempo 5 horas; A3: solução de DPt SQR submetida a oxidação tempo 24 horas.

d) Estufa (80 °C)

A Figura 11 apresenta os cromatogramas referentes às soluções contendo DPt SQR submetidas a uma temperatura de 80 °C por um período de 24 horas. O teste de estresse não apresentou a formação de picos secundários no cromatograma, além disso, a área média do pico referente ao DPt manteve-se constante durante os tempos de 5 e 24 horas. Para esta análise a pureza do pico do DPt foi de 0,9999.

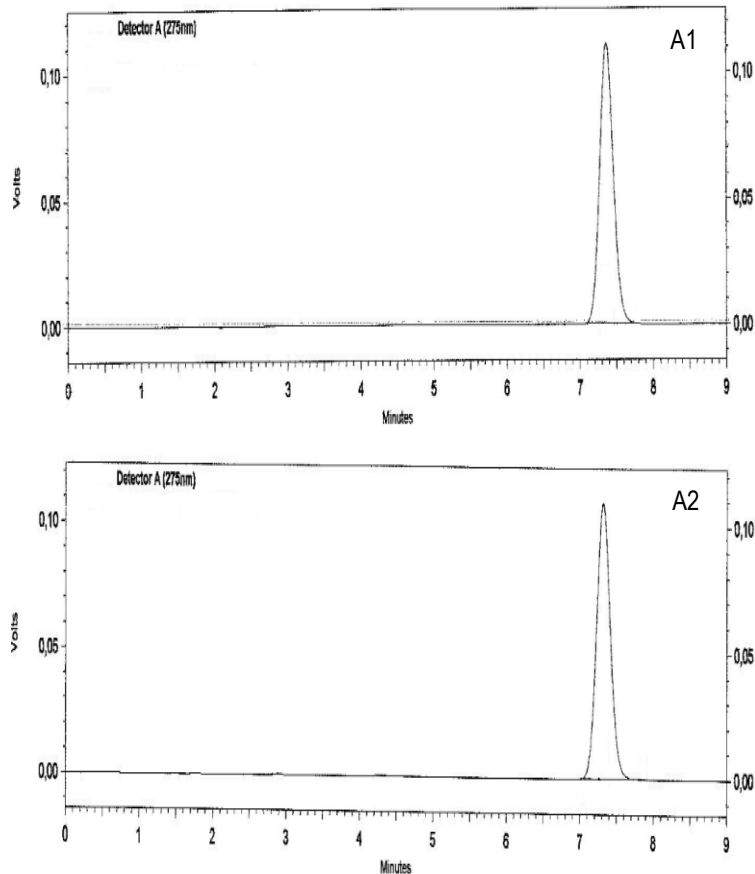


Figura 11 – Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a temperatura de 80 °C tempo 5 horas; A2: solução de DPt SQR submetida a temperatura de 80 °C tempo 24 horas.

e) Fotólise ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ )

A Figura 12 apresenta os cromatogramas referentes às soluções contendo DPt SQR submetidas a fotólise ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) por um período de 24 horas. Conforme Figura 12-A1, após 5 horas de exposição ocorreu uma diminuição em torno de 34,6% em relação a área média referente ao pico do DPt, como também houve o aparecimento de um pico secundário com tempo de retenção em torno de 3,6 minutos, sendo este um possível produto de degradação.

Após 24 horas de exposição, Figura 12-A2, a área média do pico do DPt apresentou uma redução em torno de 86,5%. A área média do pico secundário, tempo de retenção de 3,6 minutos, aumentou, assim como ocorreram o aparecimento de outros picos. Para esta análise a pureza do pico do DPt foi de 1,0000.

Com a finalidade de demonstrar que o aparecimento de possíveis produtos de degradação foram originados a partir da exposição à radiação ultravioleta e não ao aquecimento produzido pela câmara de foto-estabilidade, também foi colocada no interior da câmara uma solução contendo DPt SQR protegida da radiação por papel alumínio. A área média após período de 24 horas manteve-se constante, indicando assim que a temperatura produzida no interior da câmara não é capaz de formar produtos de degradação.

A Figura 13 apresenta o cromatograma referente à solução de diclofenaco substância relacionada A, no qual o tempo de retenção para esta substância foi em torno de 3,6 minutos, sendo muito próximo ao tempo de retenção do pico do possível produto de degradação apresentado na figura 12-A2. A partir disso, sugere-se que a substância originada a partir desta condição de estresse seja a (N-(2,6-diclorofenil)indolin-2-ona).

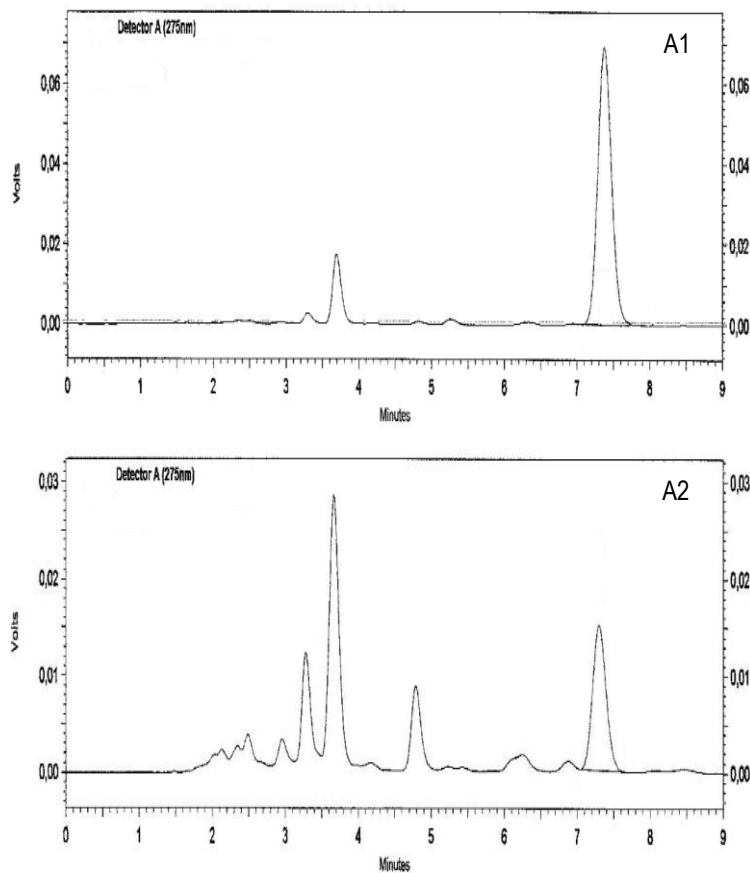


Figura 12 – Cromatogramas A1: solução de DPt SQR submetida a fotólise ( $\lambda = 254$  nm) tempo 5 horas; A2: solução de DPt SQR submetida a fotólise ( $\lambda = 254$  nm ) tempo 24 horas.

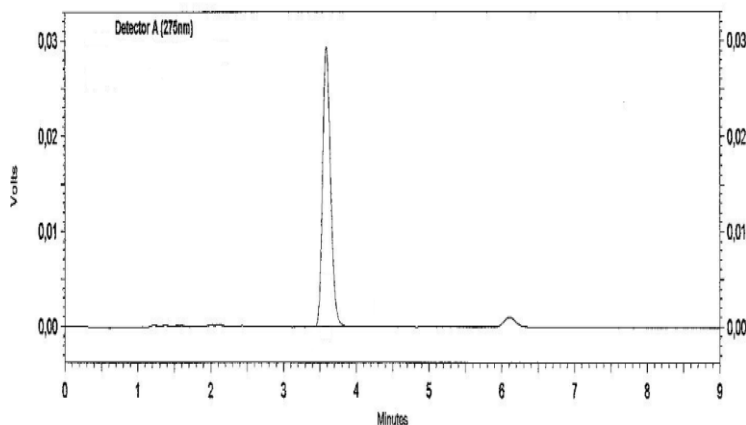


Figura 13 – Cromatograma da solução contendo substância relacionada A, (N–(2,6–diclorofenil)indolin–2–ona) do DPt. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® Luna C<sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: metanol, tampão fosfato pH 2,5 (70:30); fluxo: 1 mL/min; λ=275 nm.

Com auxílio de detector DAD, os estudos de degradação forçada do fármaco e possível interferência dos excipientes foram avaliados, demonstrando-se assim que o método desenvolvido utilizando CLAE é seletivo para determinação de DPt em suspensão oral.

#### 5.1.1.3 Intervalo e linearidade

Corresponde à capacidade da metodologia em demonstrar que os valores obtidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco presente na amostra dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja composta de no mínimo 5 níveis de concentração dentro de um intervalo especificado, conforme Tabela 6 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

A linearidade do método foi determinada a partir da construção de 3 curvas padrão da SQR nas concentrações de 10,0 a 50,0 µg/mL em fase móvel conforme item 4.2.1.4.2.

A Tabela 14 apresenta os valores das áreas obtidas para cada nível de concentração da curva padrão.



Tabela 14 – Valores de área obtidos a partir da curva padrão de DPt SQR por CLAE.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área*	Média das áreas $\pm$ epm	DPR
10,0	491992 485818 493213	490341 $\pm$ 2288,87	0,80
20,0	911843 932410 936322	926858 $\pm$ 7592,35	1,41
30,0	1386080 1386549 1387810	1386813 $\pm$ 516,57	0,06
40,0	1809658 1861590 1831307	1834185 $\pm$ 15060,82	1,42
50,0	2275684 2277328 2297086	2283366 $\pm$ 6876,60	0,52

\* Resultado de três ensaios  
e.p.m. - erro padrão da média

A curva padrão média obtida para o método foi determinada a partir de cinco concentrações e está representada na Figura 14, assim como seu coeficiente de correlação ( $r$ ) e equação da reta, determinados através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

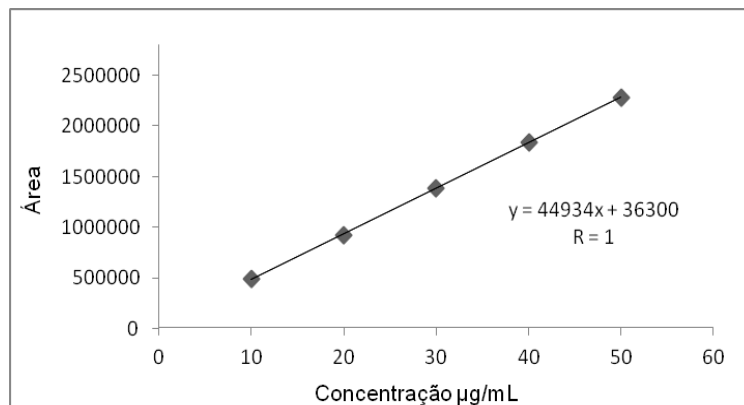


Figura 14 – Representação gráfica da curva padrão média de DPt SQR.

A partir da análise de variância (ANOVA) dos resultados da curva média padrão, Tabela 15, a curva padrão não apresentou desvio de linearidade e apresentou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ). Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação ( $r = 1$ ), demonstram que esta curva média padrão, na faixa de concentração de 10,0 a 50,0  $\mu\text{g/mL}$ , pode ser utilizada para a interpolação dos valores experimentais, visando à determinação quantitativa desta substância.

Tabela 15 – Análise de variância da curva padrão do DPt.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado*
Entre	4	6059495743440	1514873935860	4498,43575	4,53
Regressão linear	1	6059222457392	6059222457392	17992,9315	5,99
Desvio de linearidade	3	273286048,132	91095349	0,27051	4,76
Resíduo	6	2020534275	336755712		
Total	14	6,06152E+12			

\*significativo para  $p < 0,05$

#### 5.1.1.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LQ representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis. O LD representa a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado (BRASIL, 2003).

Para este método o LD e LQ foram calculados a partir dos dados obtidos da equação da curva padrão pelas equações 13 e 14, descritas no item 4.2.1.4.7. Os resultados obtidos foram: LD= 0,02  $\mu\text{g/mL}$  e LQ= 0,05  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 5.1.1.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre diferentes ensaios, repetidos a partir de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

Em validação de metodologias, a precisão é avaliada em três diferentes níveis: precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade. A precisão intermediária representa a concordância dos resultados do mesmo laboratório, obtidos em dias diferentes, pelo menos dois dias, com equipamentos e/ou analistas diferentes (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

A precisão do método foi avaliada através dos valores de DPR da precisão intermediária e repetibilidade, conforme descrito em 4.2.1.4.4.

Os valores experimentais obtidos para determinação da precisão intermediária do método desenvolvido encontram-se descritos na tabela 16. O DPR médio entre os analistas neste ensaio foi de 0,85%, estando assim abaixo do limite preconizado de 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 16 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de precisão intermediária de DPt suspensão oral.

<b>Dia</b>	<b>n</b>	<b>Analista 1 teor da amostra (%)</b>	<b>Analista 2 teor da amostra (%)</b>
1	1	100,56	100,73
	2	102,86	100,84
	3	100,71	103,52
2	1	100,89	101,87
	2	100,09	101,92
	3	100,61	101,99
3	1	99,85	101,16
	2	99,13	101,15
	3	101,26	102,51
Média (%) ± DP		100,66 ± 0,9246	101,74 ± 0,8063
DPR dos analistas		0,92	0,79
Teor médio do ensaio (%)		101,20	
DPR do ensaio		0,85	
ANOVA		<i>F calculado</i>	<i>F tabelado*</i>
Entre dias		0,58	3,68

\* $p < 0,05$

DP – desvio padrão

DPR – desvio padrão relativo

Os resultados experimentais obtidos para precisão intermediária foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), com a finalidade de determinar se existe diferença significativa entre os valores encontrados entre os diferentes dias. Conforme demonstrado na Tabela 16, o valor encontrado para *F calculado* é menor que o valor de *F tabelado*, indicando assim não haver diferença significativa entre os resultados para um  $p < 0,05$ .

A repetibilidade do método foi avaliada através do doseamento de DPt em suspensão oral, em três concentrações diferentes, em um único dia ( $n = 3$ ), conforme descrito em 4.2.1.4.4.

Os valores experimentais obtidos para determinação da repetibilidade do método desenvolvido encontram-se descritos na Tabela 17. O DPR médio para os teores, neste ensaio foi de 1,21%, estando assim abaixo do limite máximo preconizado de 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 17 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade de DPt suspensão oral.

Concentração da amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área	Teor (%)	Média (%)	DPR (%)
10	491669	101,34	99,81	1,33
	481432	99,06		
	481302	99,04		
30	1407622	101,73	100,54	1,55
	1367818	98,78		
	1399419	101,12		
50	2279153	99,83	100,87	0,91
	2311230	101,26		
	2317424	101,53		
Média do ensaio (%) $\pm$ DP		100,41 $\pm$ 1,2145		
DPR médio do ensaio (%)		1,21		
ANOVA		<i>F calculado</i>	<i>F tabelado</i> *	
Entre concentrações		0,52	5,14	

\* $p < 0,05$

DPR – desvio padrão relativo

Os resultados experimentais obtidos para o ensaio de repetibilidade foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), com a finalidade de

determinar se existe diferença significativa entre os valores encontrados nas diferentes concentrações analisadas. Conforme demonstrado na Tabela 17, o valor encontrado para  $F$  calculado foi menor que o valor de  $F$  tabelado, indicando assim não haver diferença significativa entre os resultados para um  $p < 0,05$ .

A partir dos valores de DPR obtidos, verifica-se que o método desenvolvido apresenta uma determinação precisa quando realizada em dias e por analistas diferentes e uma repetibilidade adequada para análises no mesmo dia.

#### 5.1.1.6 Exatidão

A exatidão de um método representa a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003).

A exatidão do método proposto foi determinada através da adição de quantidade conhecida da SQR na amostra, em quatro diferentes níveis de concentração, conforme descrito em 4.2.1.4.5. Os resultados experimentais obtidos estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18 – Valores experimentais obtidos para o ensaio de exatidão de DPt suspensão oral.

Balão volumétrico 10 mL	Quantidade de SQR adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média da quantidade de SQR recuperada*	
		( $\mu\text{g/mL}$ )	(%)
R1	10	20,39	101,95
R2	20	29,48	98,28
R3	30	39,79	99,48
R4	40	49,45	98,90

\*média de 3 determinações

Os resultados obtidos no ensaio demonstram que o método proposto é exato, uma vez que, as concentrações determinadas estão próximas aos valores verdadeiros. O valor médio da porcentagem de recuperação da SQR foi de 99,65%. O valor recomendado para os diferentes níveis de concentração deve ser de 98,0% a 102,0% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

### 5.1.1.7 Robustez

A robustez de um método analítico mede a capacidade que o mesmo apresenta em resistir a pequenas variações em seus parâmetros, indicando assim sua confiança durante sua utilização (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

A avaliação da robustez deste método foi realizada conforme descrito em 4.2.1.4.6, utilizando método descrito por Youden & Steiner (1975), permitindo assim não apenas avaliar a robustez do método, mas também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais (INMETRO, 2007).

Para cada um dos parâmetros (fatores) de avaliação da robustez, foram realizadas injeções em triplicata da amostra.

O método será robusto se as condições abaixo forem atendidas:

Condição 1: (para parâmetro A e demais parâmetros)

Teor de DPt – 5% deste valor  $\leq A \leq$  teor de DPt + 5% deste valor.

101,20 – 5% deste valor  $\leq A \leq$  101,20 + 5% deste valor.

96,14%  $\leq A \leq$  106,26%

Condição 2: (para parâmetro A e demais parâmetros)

$A - a \leq 3\%$  do teor de DPt

$A - a \leq 3\%$  de 101,20

$A - a \leq 3,04$

Os resultados experimentais obtidos para as condições 1 e 2 estão descritas nas Tabelas 19 e 20 respectivamente. Conforme Tabela 19, o teor médio de DPt encontrado foi de 100,56%, estando este valor muito próximo ao valor encontrado na análise de precisão, 101,20%. Em relação à condição 2, as variações realizadas não foram capazes de influenciar significativamente os resultados, estando todos os valores obtidos, abaixo do limite máximo de 3,04 conforme Tabela 20.

Tabela 19 – Combinações ensaiadas para avaliação da robustez do método analítico, avaliando-se a condição 1.

<b>Combinação ensaiada</b>								
<b>Resultados</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>
<b>Teor (%)*</b>	99,52	101,50	99,76	100,43	101,34	101,14	98,43	102,34
<b>Teor médio de DPt (%): 100,56</b>								
<b>DPR (%): 1,26</b>								
<b>Faixa aceitável para teor de DPt (%): <math>96,14 \leq 101,20 \leq 106,26</math></b>								
*média de 3 determinações								
DPR: desvio padrão relativo								

Tabela 20 – Combinações ensaiadas para avaliação da robustez do método analítico, avaliando-se a condição 2.

<b>Teor de DPt (%)</b>		<b>Diferenças (%)</b>	<b>Limites para diferenças% (3% * 101,20%)</b>	
A = 100,30	a = 100,81	A – a = - 0,51	3,04	Robusto
B = 100,87	b = 100,24	B – b = 0,63	3,04	Robusto
C = 99,76	c = 101,35	C – c = - 1,59	3,04	Robusto
D = 100,44	d = 100,66	D – d = - 0,22	3,04	Robusto
E = 100,69	e = 100,42	E – e = 0,27	3,04	Robusto
<b>Média (%)* (A,a,B,b,C,c,D,d,E,e): 100,55</b>				
<b>DP: 0,43</b>				
<b>DPR (%): 0,43</b>				
*média de 3 determinações				

Os cromatogramas referentes a cada parâmetro (fator) de variação avaliados no método proposto estão demonstrados na Figura 15.

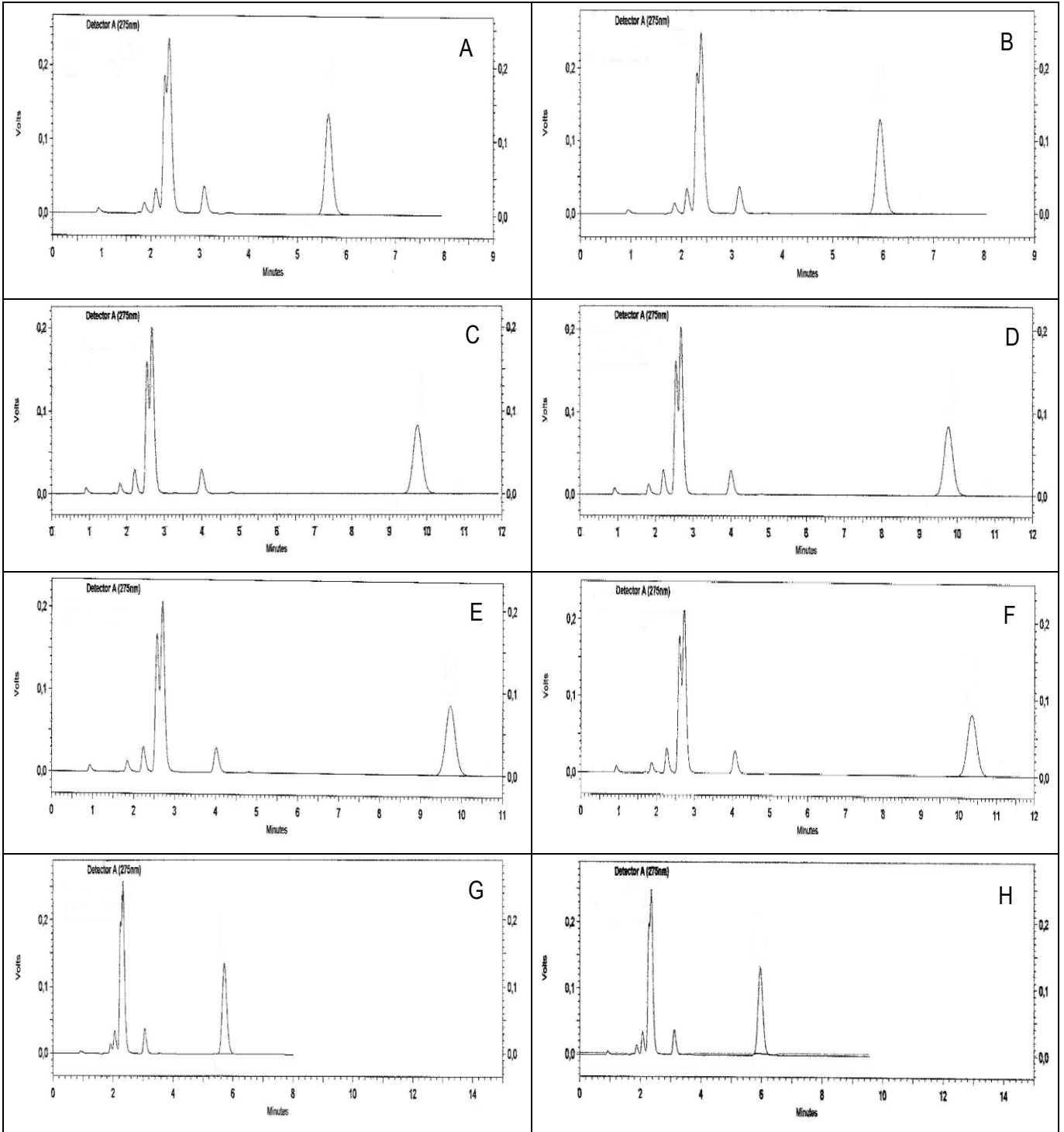


Figura 15 – Robustez: cromatograma A: fator s; cromatograma B: fator t; cromatograma C: fator u; cromatograma D: fator v; cromatograma E: fator w; cromatograma F: fator x; cromatograma G: fator y e cromatograma H: fator z.

As variações realizadas no método proposto não foram capazes de alterar significativamente os teores de DPt na amostra, sendo que, em média, os teores de DPt variaram de 98,43% a 102,34% em relação a condição 1 e em relação a



condição 2 todos os valores obtidos pela diferença entre os parâmetros avaliados foram inferiores a 3,04. Os resultados obtidos experimentalmente atenderam as condições 1 e 2, sendo portanto considerado um método robusto para determinação de DPt em suspensão oral.

## 5.2 Desenvolvimento do ensaio de dissolução

A avaliação e determinação das condições para a realização dos testes de dissolução para fármacos classe II é de extrema importância, pois fármacos desta classe podem apresentar velocidade de dissolução como sendo a etapa limitante do processo de absorção. O desenvolvimento de um teste de dissolução confiável, simulando as condições do trato gastrintestinal, pode demonstrar informações relevantes a respeito da liberação do fármaco *in vivo* (FORTUNATO, 2005; QURESHI, 2006).

### 5.2.1 Determinação da solubilidade de DPt em diferentes meios

A solubilidade do fármaco foi determinada conforme item 4.2.2.1 sendo expressa através da porcentagem dissolvida da dose. Os dados obtidos foram utilizados como critério de escolha para o meio de dissolução, estando estes apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Porcentagem dissolvida de DPt SQR em diferentes meios de dissolução.

Meio de dissolução*	Porcentagem dissolvida após 24 horas
Tampão fosfato (pH 6,8)	98,07
Tampão fosfato (pH 7,4)	99,93
Água + 0,3% de LSS**	98,41
Água + 0,5% de LSS	98,05
Água + 1,0% de LSS	98,49
Água + 1,5% de LSS	98,96

\*Volume de meio: 25 mL

\*\*LSS: laurilsulfato de sódio

De acordo com os resultados obtidos o DPt apresentou alta solubilidade nos diferentes meios testados, sendo assim, estes meios foram escolhidos para estudos iniciais do ensaio de dissolução de DPt suspensão oral.

Baseado nos resultados de solubilidade e dosagem do fármaco, a condição *sink* foi satisfeita. O termo condição *sink* é definido como sendo o volume de no mínimo três vezes o necessário para obter uma solução saturada do fármaco (ROHRS, 2001; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012). Esta condição deve ser mantida a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste (MARQUES; BROWN, 2002).

### 5.2.2 Determinação das condições para o ensaio de dissolução

Parâmetros como a introdução da amostra e velocidade de agitação devem ser estabelecidos com base na viscosidade e na composição da formulação (SIEWERT, 2003).

Inicialmente os ensaios foram realizados utilizando o aparato pá com velocidade de 75 rpm, contendo o volume de 900 mL dos seguintes meios: tampão fosfato pH 6,8 e 7,4 e água contendo laurilsulfato de sódio (LSS) nas concentrações de 0,3%, 0,5%, 1,0% e 1,5% (p/v). Todos os diferentes meios de dissolução foram aquecidos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ . As amostras foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos gerando as curvas dos perfis de dissolução *versus* o tempo.

Os perfis de dissolução obtidos nos meios contendo tampão pH 6,8 e 7,4 estão representados na Figura 16 e nos meios contendo água + LSS em diferentes concentrações na Figura 17.

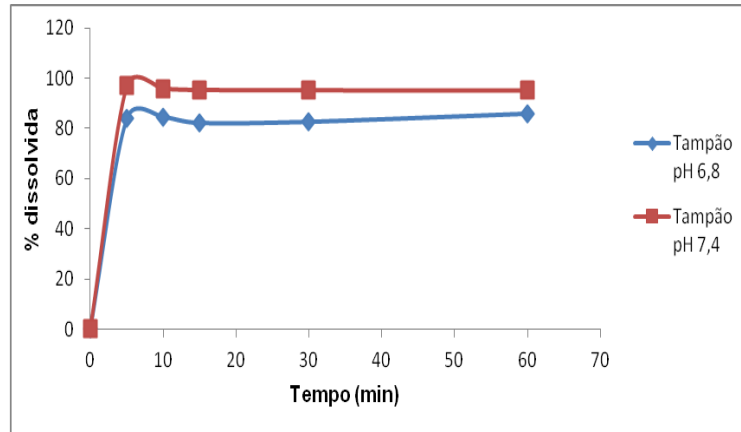


Figura 16 – Perfil de dissolução médio das suspensões de DPT (n = 12) nos meios de dissolução tampão fosfato pH 6,8 e pH 7,4 utilizando velocidade de rotação de 75 rpm.

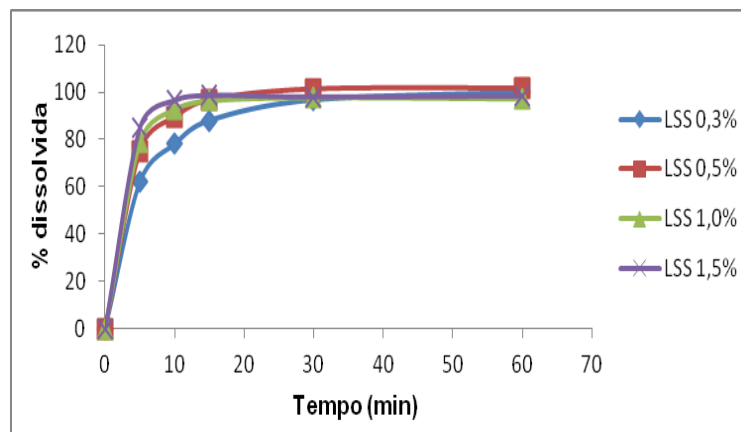


Figura 17 – Perfil de dissolução médio das suspensões de DPT (n = 12) nos meios de dissolução contendo água + 0,3%, 0,5%, 1,0% e 1,5% de LSS utilizando velocidade de rotação de 75 rpm.

Os valores em porcentagem obtidos experimentalmente após os ensaios de dissolução utilizando os meios citados anteriormente e velocidade de agitação do aparato de 75 rpm encontram-se nas Tabelas 22 e 23.

Tabela 22 – Teor de DPt dissolvido após perfil de dissolução utilizando tampão fosfato pH 6,8 e 7,4 como meio de dissolução e velocidade do aparato de 75 rpm.

Tempo (minutos)	(% ) dissolvida de DPt (n = 12)	
	Tampão fosfato pH 6,8	Tampão fosfato pH 7,4
0	0	0
5	83,98	96,96
10	84,59	95,91
15	82,23	95,45
30	82,70	95,31
60	85,90	95,23

Tabela 23 – Teor de DPt dissolvido após perfil de dissolução utilizando água + 0,3%, 0,5%, 1,0% e 1,5% de LSS como meio de dissolução e velocidade do aparato de 75 rpm.

Tempo (minutos)	(% ) dissolvida de DPt			
	Água + 0,3% de LSS	Água + 0,5% de LSS	Água + 1,0% de LSS	Água + 1,5% de LSS
0	0	0	0	0
5	62,10	75,24	78,92	85,06
10	78,09	89,37	92,75	96,57
15	88,01	96,68	96,54	98,75
30	96,68	101,24	97,89	98,05
60	99,92	101,69	97,38	98,44

Para os ensaios utilizando velocidade de rotação do aparato de 75 rpm e meios de dissolução contendo tampão pH 6,8 e pH 7,4, verificou-se uma liberação muito rápida do fármaco nos primeiros 5 minutos, 83,98%, 96,96%, respectivamente. Ao compararmos a quantidade de DPt dissolvido utilizando água + 0,3%, 0,5%, 1,0% e 1,5% de LSS, podemos perceber que a extensão da liberação do DPt aumenta quando a concentração de tensoativo no meio de dissolução aumenta, conforme mostrado na Tabela 23.

Devido à alta taxa de liberação do fármaco *in vitro*, talvez uma correlação *in vivo* não seja possível de ser estabelecida para os meios testados anteriormente. Por este motivo, optou-se por dar continuidade nos ensaios utilizando os meios de dissolução contendo água + 0,3% e 0,5% de LSS.

Buscando retardar a velocidade de dissolução do fármaco nos meios de dissolução contendo água + 0,3% e 0,5% de LSS, a velocidade de rotação do aparato foi alterada para 50 rpm. Os perfis de dissolução comparativos entre os diferentes meios de dissolução contendo água + 0,3% e 0,5% de LSS e velocidade de 50 rpm, estão demonstrados na Figura 18.

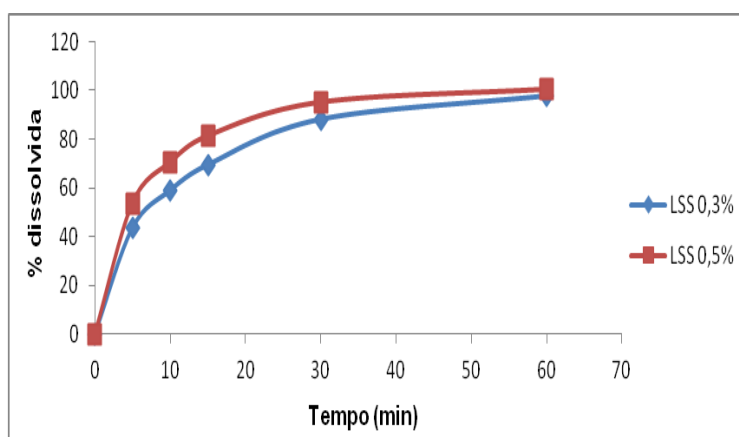


Figura 18 – Perfis de dissolução das amostras de DPt (n = 6) nos meios de dissolução água + 0,3% e 0,5% LSS, utilizando velocidade do aparato de 50 rpm.

Os valores em porcentagem obtidos experimentalmente após os perfis de dissolução utilizando água + 0,3% e 0,5% de LSS como meios de dissolução e velocidade de agitação do aparato de 50 rpm encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24 – Teor de DPt dissolvido após perfis de dissolução utilizando LSS 0,3% e 0,5% como meios de dissolução e velocidade do aparato de 50 rpm.

Tempo (minutos)	Água + 0,3% de LSS teor de DPt (%)	Água + 0,5% de LSS teor de DPt (%)
0	0	0
5	43,60	53,76
10	58,92	70,59

15	69,39	81,43
30	88,00	95,24
60	97,56	100,52

LSS – Laurilsulfato de sódio

Para ambos os meios de dissolução testados a velocidade de agitação do aparato foi capaz de influenciar significativamente a taxa de liberação do fármaco em cada tempo de coleta.

A partir da utilização de água + 0,3% de LSS como meio de dissolução e agitação do aparato de 50 rpm, obteve-se um perfil de liberação mais lento do fármaco estando este tipo de liberação, talvez o mais próximo de uma possível correlação *in vitro* – *in vivo* (CIVIV). Recomendações do FDA (1997a) são feitas para utilização da menor quantidade de tensoativo possível no meio de dissolução, pois quanto maior a concentração do tensoativo maior será a dificuldade da obtenção de uma (CIVIV).

A partir dos resultados encontrados, foram selecionadas as melhores condições para realização do ensaio de dissolução *in vitro* para suspensão oral contendo DPt, conforme Tabela 25.

Tabela 25 – Condições selecionadas para o ensaio de dissolução para suspensão oral contendo DPt.

Meio de dissolução	Temperatura (°C)	Volume de meio (mL)	Velocidade de agitação (rpm)	Tempo final do teste
Água + 0,3% de LSS (p/v)	37 ± 0,5	900	50	30

### 5.2.3 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução

Após o teste de estabilidade da amostra, utilizando água + 0,3% de LSS como meio de dissolução, o DPt permaneceu estável durante 24 horas, quando armazenada a temperatura ambiente. Todos os resultados obtidos durante os tempos de análise apresentaram-se de forma muito próximas ao valor inicial,

conforme Tabela 26, sendo que nenhum produto de degradação foi observado através da análise com detector DAD.

Tabela 26 – Estabilidade da amostra após teste de dissolução.

Água + 0,3% de LSS (p/v)	Área média do pico principal			DPR (%)
	Tempo zero	Após 12 horas	Após 24 horas	
Amostra suspensão oral (n = 3)	477268	479444	475039	0,46

DPR: desvio padrão relativo

#### 5.2.4 Interferência do tipo de filtro utilizado

O filtro utilizado na filtração das amostras após ensaio de dissolução foi o F.Maia<sup>®</sup> código 41. Os resultados obtidos após filtração das amostras com este filtro (solução A) e após a centrifugação (solução B) estão demonstrados na Tabela 27.

Tabela 27 – Avaliação da adsorção do DPt no filtro utilizado.

	% dissolvida de DPt*	
	Solução A	Solução B
<b>Suspensão oral contendo DPt</b>	99,42	97,71
<b>DP (%)</b>	0,2914	0,6879
<b>DPR (%)</b>	0,29	0,70

\* média de 3 análises

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

Conforme os resultados obtidos, os valores de adsorção do fármaco estão abaixo do máximo recomendado, sendo este de 5%, demonstrando assim que o filtro utilizado não é capaz de adsorver o fármaco em estudo, podendo ser utilizado com segurança nos testes de dissolução para o controle de qualidade do produto (LINDENBERG et al., 2005).

### 5.2.3 Desenvolvimento e validação do método por CLAE para determinação de DPt no ensaio de dissolução

#### 5.2.3.1 Especificidade

Os resultados de especificidade sugerem que o método cromatográfico pode ser usado para determinação de DPt ao final do ensaio de dissolução, visto que após a injeção da amostra placebo e o meio de dissolução, não houve a interferência dos mesmos na análise conforme Figura 19.

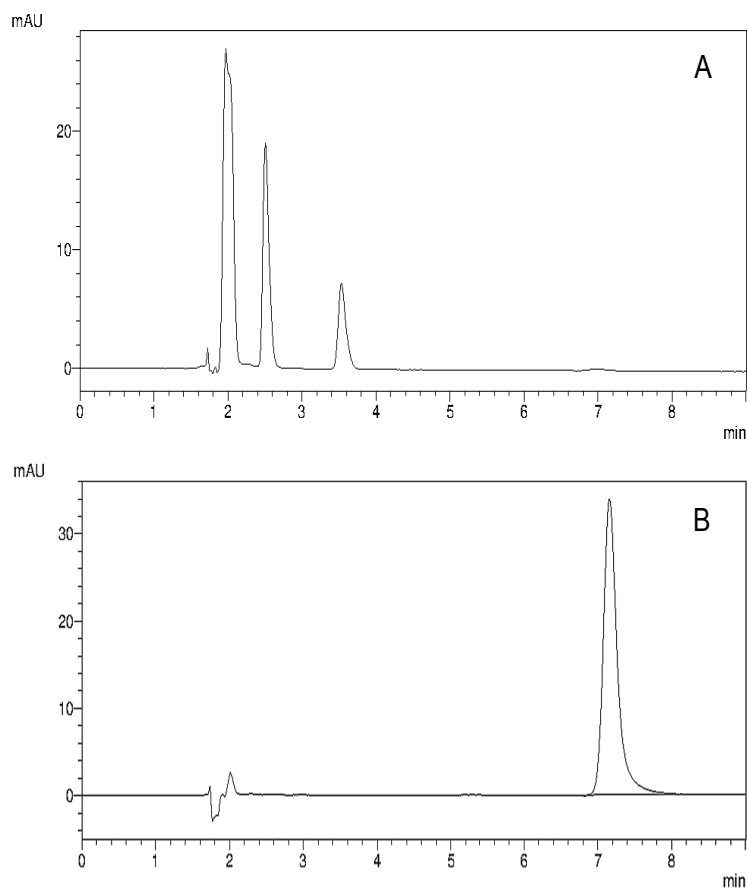


Figura 19 – Especificidade do método após teste de dissolução utilizando água + 0,3% de LSS (p/v) como meio de dissolução: cromatograma da amostra placebo (A) e do DPt SQR (B).

#### 5.2.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada a partir da construção de 3 curvas padrão da SQR nas concentrações de 2,0 a 18,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em água + 0,3% de LSS (p/v), conforme item 4.2.2.5.2.



A Tabela 28 apresenta os valores das áreas obtidas para cada nível de concentração da curva padrão.

Tabela 28 – Valores de área obtidos a partir da curva padrão de DPt SQR por CLAE.

<b>Concentração (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área</b>	<b>Média das áreas <math>\pm</math> epm</b>	<b>DPR (%)</b>
2,0	93267 86491 91880	90546 $\pm$ 2066,71	3,95
6,0	269419 255830 255997	260415 $\pm$ 4502,22	2,99
10,0	445113 430531 428255	434633 $\pm$ 5281,18	2,10
14,0	620563 597373 596170	604702 $\pm$ 7938,33	2,27
18,0	776441 767140 766455	770012 $\pm$ 3220,67	0,72

e.p.m.: erro padrão da média

DPR: desvio padrão relativo

A curva média padrão obtida para o método foi determinada a partir de cinco concentrações e está representada na Figura 20, assim como seu coeficiente de correlação ( $r$ ) e equação da reta, determinados através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados.

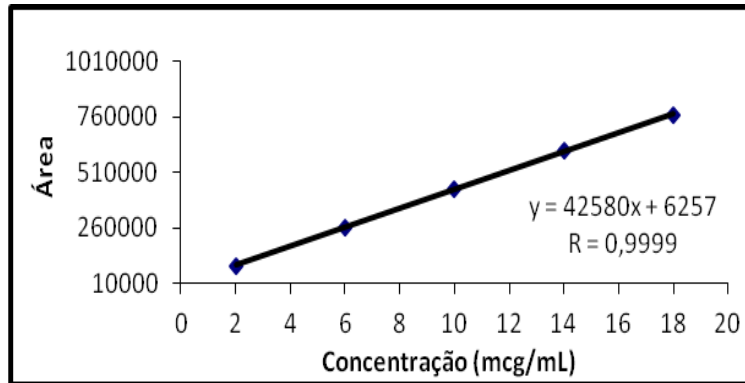


Figura 20 – Representação gráfica da curva padrão média de DPt SQR

A partir da análise de variância (ANOVA) dos resultados da curva média padrão, Tabela 29, a curva padrão não apresentou desvio de linearidade e apresentou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ). Estes resultados, juntamente com o coeficiente de correlação ( $r = 0,9999$ ), demonstram que esta curva, na faixa de concentração de 2,0 a 18,0  $\mu\text{g/mL}$ , pode ser utilizada para a interpolação dos valores experimentais, visando à determinação quantitativa do DPt a partir do teste de dissolução.

Tabela 29 – Análise de variância da curva padrão do DPt.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	F tabelado*
Entre	4	870351415	217587853	1729,43078	4,53
Regressão linear	1	870286147	870286147	6917,2044	5,99
Desvio de linearidade	3	65267778,1	21755926,04	0,17292	4,76
Resíduo	6	754888334	125814722		
Total	14	8,71106E+11			

\*significativo para  $p < 0,05$

### 5.2.3.3 Exatidão e precisão

Para avaliação da exatidão em testes de dissolução o critério de recuperação é de 95,0% a 105,0% da quantidade adicionada de SQR (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012). A exatidão do método foi considerada adequada no intervalo de 95,43% a 103,14%, Tabela 30. Para avaliação da precisão do método, determinou-se a repetibilidade e precisão intermediária em três níveis de concentração (2,0; 10,0 e 18,0 µg/mL) durante três dias. Os valores de DPR encontrados, conforme Tabela 31, estão de acordo com as especificações para este parâmetro (DPR ≤ 5%).

Tabela 30 – Exatidão do teste de dissolução da suspensão oral contendo DPt.

<b>Solução padrão (µg/mL)</b>	<b>Recuperação (%) (n = 6)</b>
2	97,85
10	99,99
18	100,08
Recuperação média (%) ± e.p.m. (n = 18)	99,31 ± 0,3 (95,43 – 103,14)

e.p.m.: erro padrão da média

Tabela 31 – Precisão do teste de dissolução da suspensão oral contendo DPt.

<b>Intradia (n=6)</b>	<b>Teor médio (%) ± e.p.m</b>	<b>DPR (%)</b>
dia 1	101,13 ± 1,02	2,46
dia 2	97,82 ± 0,38	0,96
dia 3	98,98 ± 0,83	2,06
Interdias (n=3)	99,31 ± 0,75	1,7

e.p.m.: erro padrão da média

DPR: desvio padrão relativo

### 5.2.4 Comparação dos perfis de dissolução

A comparação do perfil de dissolução é importante quando se deseja conhecer o comportamento de dois produtos antes de submetê-los ao Estudo de

Biodisponibilidade relativa/Bioequivalência, para alterações pós-registro, isenção de estudos *in vivo* para menores dosagens assim como otimizar o processo farmacotécnico no desenvolvimento de novas formulações (BRASIL, 2010). Os perfis de dissolução comparativos entre os diferentes lotes avaliados estão demonstrados na Figura 21.

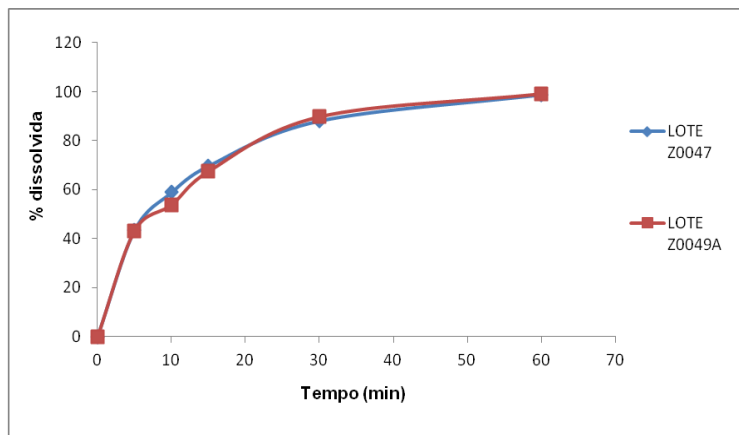


Figura 21 – Comparação dos perfis de dissolução ( $n = 12$ ): Cataflam® lote Z0047 e Cataflam® lote Z0049A. Condições do ensaio de dissolução: meio de dissolução contendo água + 0,3% de LSS a  $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Para a comparação dos perfis de dissolução através do fator de diferença ( $f_1$ ) e fator de semelhança ( $f_2$ ) utilizou-se as equações descritas em 4.2.2.6. Os valores encontrados foram:  $f_1 = 2,55$  e  $f_2 = 72,65$ .

Os valores em porcentagem obtidos experimentalmente após os perfis de dissolução dos lotes de suspensão oral contendo DPt assim como os valores de DPR para cada tempo de coleta encontram-se na Tabela 32.

Tabela 32 – Porcentagens dissolvidas de DPt após perfil de dissolução.

Tempo (min)	% Média dissolvida Lote Z0047 *	DPR (%)	% Média dissolvida Lote Z0049A *	DPR (%)
0	0	0	0	0
5	43,48	2,05	43,26	3,49
10	58,91	2,23	53,76	1,09
15	69,74	1,41	67,44	2,18

<b>30</b>	88,16	1,49	89,73	2,54
<b>60</b>	98,89	1,38	99,06	1,81

\*Média de 12 unidades testadas  
DPR: desvio padrão relativo

Os resultados obtidos demonstram que os dois perfis de dissolução são considerados semelhantes, uma vez que os valores encontrados para  $f_1$  e  $f_2$  e os valores de (DPR) estão dentro das especificações permitidas. No entanto, apesar da semelhança entre os perfis de dissolução *in vitro*, isto não garante que os produtos sejam bioequivalentes.

#### 5.2.5 Cinética de dissolução e eficiência de dissolução

A partir dos resultados obtidos no perfil de dissolução do lote ZOO47 a cinética de liberação foi avaliada. De acordo com os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) o perfil de dissolução foi mais bem descrito através do modelo de Hixson-Crowell (1931) conforme Tabela 33. A partir deste modelo, pressupõe-se que a liberação é limitada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco e não pelo processo de difusão que ocorre na matriz polimérica (COSTA E LOBO, 2001).

Tabela 33 – Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) dos modelos matemáticos utilizados.

Coeficiente de determinação	Modelos matemáticos			
	Ordem zero	Primeira ordem	Hixson-Crowell	Higushi
$R^2$	0,8429	0,7604	0,9981	0,9380

A eficiência de dissolução (ED) encontrada foi de 77,93%, esta ED pode ser definida como a área sob a curva de dissolução até um determinado tempo  $t$ , pode ser relacionada teoricamente com dados *in vivo* desde que a extensão da absorção do fármaco seja proporcional a concentração dissolvida e ao tempo que o mesmo permanece em contato com o trato gastrointestinal (FARINHA, PAIS, BICA, 1997; KHAN, 1975).

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ O método desenvolvido por CLAE para determinação quantitativa de DPt em suspensão oral foi validado, dentro das condições estabelecidas demonstrando ser linear, específico, preciso, exato e robusto.
- ✓ A análise de degradação forçada do DPt SQR, frente a diferentes condições de estresse, demonstrou que o fármaco em solução é estável a alta temperatura e a hidrólise alcalina.
- ✓ O DPt SQR se mostrou sensível quando submetido a condições de hidrólise ácida, oxidação e radiação UV 254 nm.
- ✓ Nenhum produto de degradação formado foi capaz de interferir na quantificação do DPt suspensão oral.
- ✓ O método de dissolução desenvolvido por CLAE mostrou-se adequado, cumprindo com as exigências de linearidade, especificidade, precisão e exatidão.
- ✓ As condições selecionadas para o desenvolvimento do ensaio de dissolução empregando aparato pás a 50 rpm e água + 0,3% de LSS com volume de 900 mL como meio de dissolução, pode ser utilizado para o controle de qualidade de rotina para o produto.
- ✓ O DPt demonstrou ser estável por 24 horas nas condições propostas no ensaio de dissolução.
- ✓ Após a comparação dos perfis de dissolução dos diferentes lotes de suspensão oral contendo DPt, empregando o fator de diferença ( $f_1$ ) e o fator de semelhança ( $f_2$ ), os resultados demonstraram haver semelhança entres os perfis.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M. Dissolution, bioavailability & bioequivalence. Easton: Mack Publishing Company, 1989. 554 p.

AMIDON, G. L. et al. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, Michigan, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANDERSON, K. E.; DAVIES, N. M. Clinical Pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. **Clinical Pharmacokinetics**, Alberta, v. 33, n. 3, p. 184-213, 1997.

ANSEL, C. H.; ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Farmacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 776 p.

APPLETON, I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. In: DICKENSON, A. BESSON, J. M. The pharmacology of pain. Germany: Library of Congress, 1997, p. 42-54.

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

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspective in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, Alberta, v. 328, n. 1, p. 12-21, 2007.

BAI, G.; ARMENANTE, P. M. Hydrodynamic, mass transfer, and dissolution effects induced by tablet location during dissolution testing. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New Jersey, v. 98, n. 4, p. 1511-1531, April, 2009.

BANAKAR, U. V. Introduction, Historical Highlights, and the Need for Dissolution Testing. **Pharmaceutical Dissolution Testing**, New York, v. 49, p. 1-18, 1991.

BARTOLOMEI, M. et al. Physico-chemical characterization and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Roma, v. 40, n. 5, p. 1105-1113, Marc. 2006.

BATTISTELLA, M. et al. Risk of upper gastrointestinal hemorrhage in warfarin users treated with nonselective NSAIDs or COX-2 inhibitors. **Archives of Internal Medicine**, Toronto, v. 165, n. 2, p. 189-192, Jan. 2005.

BOELSTERLI, A. Diclofenac-induced liver injury: a paradigm os idiosyncratic drug toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Basileia, v. 192, v. 3, p. 307-322, 2003.

BORST, I.; UGWU, S.; BECKET, A. H. New and extend application for USP drug released apparatus 3. **Dissolution Technologies**, v. 4, n. 1, p. 11-15, 1997.

BORT, R. et al. Hepatic metabolism of diclofenac: Role of human CYP in the minor oxidative pathways. **Biochemical Pharmacology**, Valencia, v. 58, n. 5, p. 787-796, Sept. 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”; Publicada no D.O.U. de 02 de junho de 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. Publicada no D.O.U. de 12 de agosto de 2010.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não hormonais. **Pediatria**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 181-193, 2005.

**British Pharmacopeia**. London: DSI, 2012. CD-ROM.

Bulário Eletrônico da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diclofenaco. Disponível em <http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/default.asp?txtPrincipioAtivo=diclofenaco> acesso em: 9 mar. 2012.

BYRN, S. R.; PFEIFFER, R. R.; STOWELL, J. G. Solid State Chemistry of Drugs. 2ª. ed. West Lafayette, IN: SSCI Inc; 1999.

CATAFLAM: suspensão oral. Responsável técnico Bárbara Santos de Sousa. Taboão da Serra: Novartis Biociências S.A., ANO 2011. Bula de remédio.

CHUASUWAN, B. et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Diclofenac sodium and Diclofenac potassium. **Journal of Pharmaceutical Science**, Bilthoven, v. 98, n. 4, p. 1206-1219, April. 2008.

CLARK, D. W.; LAYTON, D.; SHAKIR, S.A. Do some inhibitors of COX-2 increase the risk of thromboembolic events? Linking Pharmacology with Pharmacoepidemiology. **Drug Safety**, Dunedin, v. 27, n. 7, p. 427-456, 2004.

CORRER, C. J. et al. Riscos de Problemas Relacionados com Medicamentos em Pacientes de uma Instituição Geriátrica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Apucarana, v. 43, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2007.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Portuguesa de Farmácia**, Lisboa, v. 59, n. 4, p. 181-190, 1999.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolutions profiles. **European Journal of Pharmaceutical Science**, Porto, v. 13, n. 2, p. 123-133, 2001.



DEGER, P. H.; SCHNEIDER, W. Simultaneous determination of diclofenac sodium and its hydroxyl metabolites by capillary column gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, Basle, v. 217, n. 6, p. 263-271, Nov. 1981.

DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 209-228, Mar. 2001.

DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutical Classification System. **International Journal Pharmaceutics**, Athenas, v. 321, n. 1, p. 1-11, Sept. 2006.

DRESSMAN, J. B. et al. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. **Pharmaceutical Research**, Frankfurt, v. 15, n. 1, p. 11-22, Sept. 1998.

DRESSMAN, J. B.; REPPAS, C. In vitro-in vivo correlation of lipophilic, poorly water-soluble drugs. **European Journal Pharmaceutical Science**, Frankfurt, v. 11, n. 2, p. 73-80, 2000.

DUKES, M. N. Health implications of drug interactions. **Drug Safety**, v. 5, n. 1, p. 84-87, 1990.

ELKADY, E. F. Simultaneous determination of diclofenac potassium and methocarbamol in ternary mixture with guaifenesin by reverse phase liquid chromatography. **Talanta**, Cairo, v. 82, n. 4, p. 1604-1607, Set. 2010.

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

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 1, p. 545.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 2, p. 904.

FDA Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994.

FDA Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Rockville, 1997a.

FDA Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Rockville, 2000.

FILHO, A. I. L. et al. Prevalência e fatores associados à automedicação: resultados do projeto Bambuí. **Revista Saúde Pública**, Minas Gerais, v. 36, n. 1, p. 55-62, 2002.

FILHO, M. A.; LIMA, H. C. Anti-inflamatórios não esteroides e o uso indiscriminado: um estudo em drogarias no município de Pimenta Bueno – RO. **UNINGÁ Review**, Maringá, v. 3, n. 04, p. 13-20, Out. 2010.

FONSECA, A. L. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2011. 924 p.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms “Quick Start Guidelines for Early Phase Development Compounds”. **Dissolution Technology**, v. 12, n. 3, p. 12-14, Aug. 2005.

GEORGOPOULO, M.; ANASTASSIADIS, P.; SYKARAS, S. Pain after chemomechanical preparation. **International Endodontic Journal**, v. 19, n. 6, p. 3-9-314, 1986.

GOTTLIEB, N. L. The art and science of nonsteroidal anti-inflammatory drug selection. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 15, n. 2, p. 1-3, Nov. 1985.

GUIDENCE FOR INDUSTRY. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification Systems. **FDA**, Rockville, 2000, 16 p.

HINZ, B. et al. Bioavailability of Diclofenac potassium at low doses. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Erlangen, v. 59, n. 1, p. 80-84, Jan. 2004.

HIXSON, A. W.; CROWELL, J. H. Dependence of Reaction Velocity upon Surface and Agitation. **Industrial & Engineering Chemistry**, New York, v. 23, n. 10, p. 1160-1168, Oct. 1931.

**ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedures-Methodology**, 2005.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

ISSY, A. M.; SAKATA, R. K. **Fármacos para o tratamento da dor**. São Paulo: Manole, 2008. 325 p.

JACQZ-AIGRAIN, E. ; LITALIEN, C. Risks and Benefits of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Children: A comparison with paracetamol. **Pediatric Drugs**, Paris, v. 3, n. 11, p. 817-858, 2001.

JANBROERS, M. Review of the toxicology, pharmacodynamics and pharmacokinetics of thiocolchicoside, a GABA-agonist muscle relaxant anti-inflammatory and analgesic action. **Acta therapeutic**, Bruxelas, v. 13, n. 3, p. 221-250, 1987.

JIJUN, F. et al. Preparation and in vitro-in vivo evaluation of double layer coated and matrix sustained release pellets formulations of diclofenac potassium. **International Journal of Pharmaceutics**, Liaoning, v. 406, n. 1, p. 84-90, Jan. 2011.

KASIM, N. A. et al. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. **Molecular Pharmaceutics**, Michigan, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2003.

KHAN, K. A. Concept of dissolution efficiency. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 48-49, Jan. 1975.

KHAN, A. A.; DIONNE, R. A. Cox-2 inhibitors for endodontic pain. **Endodontic Topics**, v. 3, p. 31-40, 2002.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011-2012. 700 p.

KU, E. C. et al. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. **The American Journal of Medicine**, New Jersey, v. 80, n. 4, p. 18-23, Abr. 1986.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. Anti-inflamatórios Não Esteroides Inibidores da Ciclo-oxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Recife, v. 52, n. 4, p. 498-512, jul./Agos. 2002.

LACY, C. F. et al. **Drug Information Handbook with International Trade Names Index**. Ohio: Lexicomp, 2011. 2263 p.

LARKAI, E. N. et al. Gastroduodenal mucosa and dyspeptic symptoms in arthritic patients during chronic steroidal anti-inflammatory drug use. **The American Journal of Gastroenterology**, Texas, v. 82, n. 11, p. 1153-1158, 1987.

LINDERBERG, M.; Wiegand, C.; Dressman, J. B. Comparison of the Adsorption of Several Drugs to Typical Filter Materials. **Dissolution Technologies**, Frankfurt, v. 12, n. 1, p. 22-25, 2005.

MACHERAS, P.; ARGYRAKIS, P. Gastrointestinal absorption drug: is it time to consider heterogeneity as well as homogeneity? . **Pharmaceutical Research**, Atenas, v. 14, n. 7, p. 842-847, Jul. 1997.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 127 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento de validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. **Revista Analytica**, p. 48-51, 2002.

McGETTIGAN, P.; HENRY, D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2, **JAMA**, New South Wales, v. 296, n. 13, p. 1633-1644, Set. 2006.

MITCHELL, J. A. et al. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, London, v. 90, n. 24, p. 11693-11697, Dec. 1993.

MIYAMOTO, G.; ZAHID, N.; UETRECHT, J. P. Oxidation of diclofenac to reactive intermediates by neutrophils, myeloperoxidase, and hypochlorous acid. **Chemical Research in Toxicology**, Toronto, v. 10, n. 4, p. 414-419, April. 1997.

MONTEIRO, E. C. A. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 53-63, Maio. 2008.

MOSER, P.; SALLMANN, A.; WIESENBERG, I. Synthesis and quantitative structure-activity relationship of diclofenac analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, Basel, v. 33, n. 9, p. 2358-2368, Sept. 1990.

NAIDOO, V. et al. Veterinary diclofenac threatens Africa`s endangered vulture species. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Onderstepoort, v. 53, n. 3, p. 205-208, Apr. 2009.

NASH, R. A. Pharmaceutical suspensions. In: LIEBERMANN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse System**. New York and Basel: Mercer Dekker, 1988. p. 151-198.

NOGUEIRA, R. et al. Validation of a Liquid chromatographic method for determination of related substances in a candidate certified reference material of captopril. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v.47, n. 2, p. 351-362, Apr/Jun. 2011.

OLSON, N. Z. et al. Onset and duration of analgesia of diclofenac potassium in the treatment of postepisiotomy pain. **American Journal of Therapeutics**, v. 4, n. 7, p. 239-246, July. 1997.

PIOTTO, F. R. S. B. et al. Prevalência da dor e do uso de analgésicos e anti-inflamatórios na automedicação de pacientes atendidos no Pronto Socorro Municipal de Taubaté. **Revista Dor: Pesquisa, clínica e terapêutica**, Taubaté, v. 10, n. 4, p. 313-317, Out./Nov./Dez. 2009.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug Information Journal**, v. 30, n. 4, p. 1113-1120, Oct. 1996.

PRAKASH, V. et al. Catastrophic Collapse of Indian White-backed *Gyps bengalensis* and long-billed *Gyps indicus* vulture populations. **Biological Conservation**, Mumbai, v. 109, n. 3, p. 381-390, Mar. 2003.

- QURESHI, S. A. Comparative Impact of Stirring and Shearing in Drug Dissolution Testing with USP Paddle and Crescent-Shape Spindles. **Dissolution Technology**, v. 13, n. 1, p. 18-23, Fev. 2006.
- RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, Jun. 2004.
- RODRIGUES, M. A. P. et al. Uso de Serviços Básicos de Saúde por Idosos Portadores de Condições Crônicas, Brasil. **Revista Saúde Pública**, Pelotas, v. 43, n. 4, p. 604-612, 2009.
- ROHRS, B. R. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, v. 8, p. 1-5, Aug. 2001.
- ROUGE, N.; BURI, P.; DOELKER, E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 136, n. 1, p. 117-139, Jun. 1996.
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6<sup>a</sup> ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 855 p.
- SALLMANN, A. R. The History of Diclofenac. **The American Journal of Medicine**, Basle, v. 80, n. 4, p. 29-33, April. 1986.
- SANCHES, A. C. C.; VILETTI, F. Uso indiscriminado e/ou irracional de antiinflamatórios não esteroidais (AINES) observados em uma farmácia de dispensação. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 69-76, Jan./Jun. 2009.
- SCALLION, R.; MOORE, K. A. Effects of Food Intake on the Pharmacokinetics of Diclofenac Potassium Soft Gelatin Capsules: A Single-Dose, Randomized, Two-Way Crossover Study. **Clinical Therapeutics**, Durham, v. 31, n. 10, p. 2233-2241, Oct. 2009.
- SCULLY, L. J.; CLARKE, D.; BARR, R. J. Diclofenac induced hepatitis 3 cases with features of autoimmune chronic active hepatitis. **Digestive Diseases and Sciences**, Ottawa, v. 38, n. 4, p. 744-751, Apryl. 1993.
- SHARGEL, L. YU, A. Biopharmaceutic consideration in drug product desing. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 4 ed. Stamford: Appleton & lange, 1999.
- SHEN, S. J. et al. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. **Chemical Research in Toxicology**, New Jersey, v. 12, n. 2, p. 214-222, Jan. 1999.
- SIEWERT, M. et al. Guidelines for dissolution/*in vitro* release testing of novel/*special* dosage forms. **Dissolution Tech**. v. 10, n. 1, p. 6-15, 2003. Disponível em: [http://www.dissolutiontech.com/DTresour/0203art/DTFeb03\\_Art1.pdf](http://www.dissolutiontech.com/DTresour/0203art/DTFeb03_Art1.pdf) .
- SILVA, Penildon. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1325 p.

SINGH, G.; TRIADAFILOPOULOS, G. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. **The Journal of Rheumatology**, California, n. 56, p. 18-24, 1999.

SOUZA, R. L.; TUBINO, M. Spectrophotometric Determination of Diclofenac on Pharmaceutical Preparation. **Journal Brazilian Chemistry Society**, Campinas, v. 16, n. 5, p. 1068-1073, 2005.

SPARIDANS, R. W. et al. Liquid Chromatography-tandem mass spectrometric assay for diclofenac and three primary metabolites in mouse plasma. **Journal of Chromatography B**, Sorbonnelaan, v. 872, n. 2, p. 77-82, Set. 2008.

SWAN, G. E. et al. Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. **Biology Letters**, Pretoria, v. 2, n. 2, p. 279-282, Jun. 2006a.

TAGGART, M. A. et al. Diclofenac residues in carcasses of domestic ungulates available to vultures in India. **Environment International**, Bedfordshire, v. 33, n. 6, p. 759-765, Aug. 2007.

TERHAAG, B. et al. The influence of food on the absorption of diclofenac as a pure substance. **International Journal of Clinical Pharmacology, therapy and toxicology**, Dresden, v. 29, n. 10, p. 418-421, Oct. 1991.

TODD, P. A.; SORKIN, E. M. Diclofenac sodium. A reappraisal of pharmacodynamic and pharmaco-kinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 35, p. 244-285, 1988.

*The United States Pharmacopeia*, 35<sup>o</sup> ed., United States Pharmacopeial Convention: Rockville: 2012.

TRUC, C. et al. Non-steroidal anti-inflammatory agents and diuretics: a combination with nephrotoxic risks. **Annales françaises d'anesthésie et de réanimation**, v.19, n. 9, p. 675-677, Nov. 2000.

VANE, J.R. Inhibition prostaglandin synthesis as mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.

YODEN, W. J.; STEINER, E. H. Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. **The Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, VA, 1975, pp. 33-36, 70-71, 82-83.

WANNMACHER, W.; PASSOS, L. F. S. Anti-inflamatorios não esteroides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. (Eds.) **Farmacologia Clínica**: fundamentos da terapêutica racional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 408-421.

WILLIS, J. V. et al. The Pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. **European Journal Clinical Pharmacology**, v. 16, p. 405-410, 1979.

WOLF, M. M.; LICHTENSTEIN, D. R.; SINGH, G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 340, n. 24, p. 1888-1899, jun. 1999.

ZALDIVAR, F. et al. Constitutive pro-and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **Journal of Applied Physiology**, San Diego, v. 100, p. 1124-1233, dec. 2005.

**APÊNDICE A – ARTIGO 1****BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL  
SCIENCES****RECIBO****Nº de Registro: 223/12**

Acusamos o recebimento do trabalho para publicação no **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

Autores: RUBIM, A. M.; RUBENICK, J. B.; LAPORTA, L. V.; ROLIM, C. M. B.

Título do Artigo: “A simple method for the quantification of diclofenac potassium in oral suspension by high-performance liquid chromatography with UV-detection”

São Paulo, 13 de Novembro de 2012.

Profa. Elizabeth Igne Ferreira  
Editoria Científica



**APÊNDICE B – ARTIGO 2****EQFAR**

---

**De:** "Alexandre rubim" <rubim9@hotmail.com>  
**Para:** <eqfar30@unifra.br>  
**Enviada em:** quinta-feira, 13 de dezembro de 2012 17:06  
**Assunto:** FW: Article for publication  
**From:** vgray@dissolutiontech.com  
**To:** rubim9@hotmail.com  
**Subject:** Re: Article for publication  
**Date:** Thu, 13 Dec 2012 13:53:06 -0500

Hello Alexandre, Your article is going through the prescreening process right now. There may be editorial corrections needed at this point to the format. You should hear from us in two weeks. Then after these corrections are made (if needed) they will go out to the reviewers.

There is no number at this point and you can use this email as documentation that the article is received and going through a prescreening process.

Please let me know if you have any questions.

Best regards, Vivian

**APÊNDICE C – Participação no 1º Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas com apresentação do trabalho:**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY ANALYTICAL FOR DETERMINATION OF DICLOFENAC POTASSIUM IN SUSPENSION ORAL**

