

HAMILTON MODESTO RIGATO

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO
DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO HORMONAIS
APLICADOS À CLÍNICA**

**CAMPINAS
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO HORMONAIS APLICADOS À CLÍNICA

Hamilton Modesto Rigato

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas. Sob orientação do Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R448d Rigato, Hamilton Modesto, 1977
Determinação do perfil farmacocinético de anti-
inflamatórios não hormonais aplicados à clínica. /
Hamilton Modesto Rigato. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ney Carter do Carmo Borges
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Farmacocinética. 2. Antiinflamatórios não
Esteróides. 3. Cromatografia Líquida. 4. Toxicidade de
Drogas. I. Borges, Ney Carter do Carmo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Determination of the pharmacokinetic profile of the non-steroidal anti-inflammatory drugs related with clinic outcomes

Palavras-chave em inglês:

Pharmacokinetics

Anti-Inflammatory Agents, Non-Steroidal

Chromatography, Liquid

Drug Toxicity

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Doutor em Clínica Médica

Banca examinadora:

Ney Carter do Carmo Borges [Orientador]

Wellington Ribeiro

José Cássio de Almeida Magalhães

José Luiz Donato

Gustavo Duarte Mendes

Data da defesa: 12-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da tese de Doutorado

Hamilton Modesto Rigato

Orientador: Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges

Membros:

1. Prof. Dr. Wellington Ribeiro

2. Prof. Dr. José Cássio de Almeida Magalhães

3. Prof. Dr. José Luiz Donato

4. Prof. Dr. Gustavo Duarte Mendes

5. Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges

Dr. Ney Carter do C. Borges
Clamologista
CRM 80.635-SP

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/08/2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os profissionais com quem tive a oportunidade de trabalhar e que buscam através da ética e da informação a melhoria da qualidade de vida das pessoas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãos e esposa Graziela de Oliveira Semenzati pela ajuda em todo o processo da vida.

Ao Exército Brasileiro, representado pelos Comandantes da Segunda Companhia de Comunicações Leve: Major Lúcio Mauro Vilotte Moreira Guerra {2005-2007} e Major Luis Filipe Americano Almada {2007-2009}, pela confiança e liberação para realização das atividades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ney Carter do Carmo Borges pela confiança, oportunidade e paciência.

Ao Prof. Dr. José Cássio de Almeida Magalhães pela importante motivação durante minha formação acadêmica.

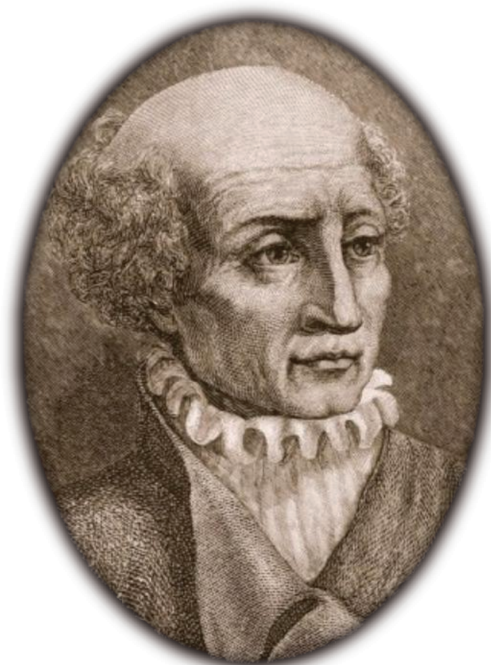
A Henrique Lopes de Faria e José Fernando Taiar pela confiança do trabalho conjunto tanto na Lopes de Faria Odontologia como na CleanOdonto.

Aos meus contemporâneos Cirurgiões Dentistas: Bruno S. Herrera, Leonard Duarte Moreira e Gustavo Duarte Mendes, que estavam sempre de prontidão para minhas solicitações ambulatoriais e teóricas.

A paciência de meus pacientes e amigos pelos momentos de ausência ao longo desses anos.

Agradeço a todas as pessoas que participaram dos estudos de bioequivalência e a equipe da Synchrophar.

A todos o mais sincero muito obrigado.



"DOSE MAKES A POISON" PARACELSUS (1493-1541)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	33
CAPÍTULO I - A simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma: application to a comparative bioavailability study	35
CAPÍTULO II - Bioavailability of two oral suspension and two oral tablet formulations of nimesulide 100 mg in healthy Brazilian adult subjects	46
3. DISCUSSÃO	58
4. CONCLUSÃO	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
ANEXOS	89

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	- Ácido acetilsalicílico
AI	- Anti-inflamatório
AINE	- Anti-inflamatório não esteróide
ALP	- Fosfatase Alcalina
ALT (TGP)	- Alanina aminotransferase
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC_{INF}	- Área sob a Curva extrapolada ao Infinito
ASC_{ULTIMO}	- Área sob a curva ao tempo da última concentração acima do limite de quantificação
AST (TGO)	- Aspartato aminotransferase
CATEME	- Câmara Técnica de Medicamentos
CHMP	- <i>Committee for Medicinal Products for Human Use</i> – Comitê para produtos medicinais de uso humano
C_{MAX}	- Concentração máxima do fármaco
Cox ()	- Cicloxigenase (tipo 1 ou 2)
COXIBE	- Inibidor seletivo de Cox2 ^{1*}
CPMP	- <i>Committee for Proprietary Medicinal Products</i> - Comitê para proprietários de produtos medicinais
CV	- Coeficiente de variação
CYP450	- Citocromo P450
EMA	- <i>European Medicines Agency</i> - Agência Européia de Medicamentos
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i> - Agência Americana de Alimentos e Medicamentos
GGT	- Gama GT
HPLC-MS/MS/CLAE-EM/EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massa

¹ Também empregado para os inibidores altamente seletivos de Cox2

IC	- Intervalo de confiança
IHFI	- Injúria Hepática Fármaco Induzida
IM	- Intramuscular
IV	- Intravenoso
LOQ	- <i>Limit Of Quantification</i> - Limite de quantificação
Min.	- Minuto
RAM	- Reação Adversa ao Medicamento
T_{1/2}	- Tempo de Meia-Vida
TA	- Transaminases
TBL	- Bilirrubina
TGI	- Trato gastrointestinal
T_{MAX}	- Tempo em que ocorre a concentração máxima do fármaco
UI/L	- Unidades internacionais por litro
ULN	- <i>Upper Limit of Normal</i> – Limite máximo do normal
UNICAMP	- Universidade Estadual de Campinas
UV	- Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade comparativa de diversos AINEs quanto a razão Cox2/Cox1.....	17
Tabela 2. Características gerais da metodologia empregada para quantificação dos diferentes fármacos	60
Tabela 3. Farmacocinética dos fármacos estudados.....	62
Tabela 4. Valores das médias geométricas da razão da formulação teste/formulação referência	63
Tabela 5. Dias de cada tomada que antecedeu os exames pós-interação.....	69
Tabela 6. Valores dos IC e P dos exames laboratoriais do painel hepático e da contagem de plaquetas	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do nimesulide..... 31

Figura 2. Estrutura do diclofenaco..... 32

RESUMO

Rigato, Hamilton Modesto – Determinação do perfil farmacocinético de anti-inflamatórios não hormonais aplicados à clínica – Faculdade de Ciências Médicas; Universidade Estadual de Campinas, 2011. Tese de Doutorado.

Objetivo: O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil farmacocinético do diclofenaco de colestiramina (cápsula de 140mg) e de duas apresentações farmacêuticas (comprimidos 100mg e suspensão oral 50mg/mL) de nimesulide realizado em voluntários sadios de ambos os sexos e relacioná-los aos desfechos clínicos em enzimas do painel hepático e da contagem de plaquetas. Materiais e métodos: Os estudos foram do tipo aberto, aleatório, cruzado, em dois períodos. As amostras de sangue foram analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada, a um detector de ultravioleta (UV) para o primeiro fármaco, e a um espectrômetro de massa (EM/EM) para outro. Os valores séricos do painel hepático e contagem de plaquetas foram comparados pré e pós-medicação. Resultados: As razões geométricas e respectivos 90% do IC para a cápsula de diclofenaco de colestiramina/Flotac[®] 140 mg foram 100.22% (84.99 - 118.19%) para a C_{MAX} e 90,53% (82.86–98.91%) para a ASC_{ULTIMO} . Os valores para o comprimido de Nimesulide/Nisulid[®] 100mg foram 85.96% (77.54 – 95.30%) para a C_{MAX} e 93.91% (84.42 – 104.46%) para a ASC_{ULTIMO} , e a formulação de suspensão oral de Nimesulide/Nisulid[®] 50mg/mL obteve 100.1% (91.05 – 110.15%) para C_{MAX} e 107.7% (99.74 – 116.39%) para ASC_{ULTIMO} . Quanto ao desfecho clínico foi observada elevação significativa no parâmetro de ALT para o diclofenaco de colestiramina e na formulação comprimido de nimesulide. A formulação de suspensão oral teve elevação significativa para o parâmetro de ALP. Não foi observada diminuição na contagem de plaquetas. Conclusão: Considerando que 90% dos intervalos de confiança das razões de C_{MAX} e ASC_{ULTIMO} , se encontram dentro de 80-125% do intervalo proposto pelo FDA e aceita pela ANVISA, concluiu-se que a formulação de cápsula de diclofenaco de colestiramina (140mg) e a formulação de suspensão oral (50mg/mL) de nimesulide são bioequivalentes em relação à taxa e extensão de absorção e que a formulação comprimido de nimesulide (100mg) não é bioequivalente ao Nisulid[®] com relação a taxa de absorção. Clinicamente os medicamentos se mostraram seguros mesmo apresentando alterações estatisticamente significantes nos parâmetros clínicos avaliados.

Palavras chave: Farmacocinética; Antiinflamatórios não Esteróides; Cromatografia Líquida; Toxicidade de Drogas.

ABSTRACT

Rigato, Hamilton Modesto – Determination of the Pharmacokinetic profile of the non-steroidal anti-inflammatory drugs related with clinic outcomes - Faculty of Medical Sciences; State University of Campinas, 2011. Doctoral Thesis.

Objective: The present work aims to evaluation the pharmacokinetic profile of the diclofenac-cholestyramine (140mg capsule) and two pharmaceuticals formulations (100mg tablets and 50mg/mL oral suspension) of nimesulide in healthy adult subjects related with clinic outcomes in the hepatic enzymes panel and platelet count. **Method:** The studies were open, randomized, simple crossover balanced with two periods. The blood samples were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detection in diclofenac formulations. For nimesulide a mass spectrometer was performed (MS/MS). Seric enzymes from liver panels and whole blood platelet count was compared with pre and post single dose treatment. **Results:** The geometric mean and 90% confidence intervals (CI) for the diclofenac-cholestyramine/Flotac[®] ratio were 100.22% (84.99 - 118.19%) for C_{MAX} and 90,53% (82.86–98.91%) for AUC_{LAST}. The geometric mean and 90% confidence intervals (CI) for the Nimesulide/Nisulid[®] 100mg tablet were 85.96% (77.54 – 95.30%) for C_{MAX} and 93.91% (84.42 – 104.46%) for AUC_{LAST}, and for the oral suspension 50mg/mL were 100.1% (91.05 – 110.15%) for C_{MAX} and 107.7% (99.74 – 116.39%) for AUC_{LAST}. For the hepatic enzyme panel was observed significant rise in the ALT for diclofenac-cholestyramine and nimesulide tablet. The oral suspension was significant rise in the ALP parameter (p<0.05). No platelet count decrease was observed. **Conclusion:** Since the 90% CI for C_{MAX} and AUC_{LAST} ratios were all inside the 80-125% interval proposed by the US Food and Drug Administration and accepted by ANVISA, it is concluded that the diclofenac-cholestyramine 140mg capsule and the nimesulide oral suspension formulation 50mg/mL are bioequivalent in regard to both extent and rate of absorption. The nimesulide 100mg tablet is not bioequivalent to Nisulid[®] 100mg tablet with respect to the rate of absorption. Clinically all the evaluated pharmaceuticals are safety despite the significant changes in the hepatic enzymes panel observed.

Key Words: Pharmacokinetics; Anti-Inflammatory Agents, Non-Steroidal; chromatography, Liquid; Drug Toxicity.

1. INTRODUÇÃO



Agentes anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios não hormonais, também denominados não esteróides (AINEs) são os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo. Muitos desses fármacos apresentam três tipos de efeitos principais: os **efeitos anti-inflamatórios**, que modificam a reação inflamatória; os **efeitos analgésicos**, que reduzem certos tipos de dores e os **efeitos antipiréticos**, que reduzem a temperatura corpórea elevada⁽¹⁾.

O processo inflamatório é desencadeado normalmente pela ação de um estímulo nocivo externo ou um “corpo estranho” que, causando uma injúria tecidual, resulta na liberação de ácido araquidônico, através da ação da enzima fosfolipase A2 nos fosfolipídios de membrana. Posteriormente, o ácido araquidônico é convertido em prostaglandinas através da ação de um complexo enzimático denominado ciclooxigenase (Cox)⁽²⁻¹²⁾. A ação das prostaglandinas no processo inflamatório agudo é responsável pelos sinais cardinais de rubor, calor, tumor e dor. O processo inflamatório pode ser controlado com a utilização da terapêutica medicamentosa através da inibição da Cox e conseqüentemente da formação das prostaglandinas.

Em 1991 foi descoberta em estudos com embriões de galinhas, uma forma induzível da Cox^(2-5, 8-12), apesar de similar a forma constitutiva já conhecida (ciclooxigenase tipo 1/Cox1)^(4, 8, 10-12), tinha uma estrutura diferente e era codificada por um gene diferente, passando a ser denominada ciclooxigenase tipo 2/Cox2⁽¹³⁾. Deste momento em diante, foi atribuída a enzima Cox1 a responsabilidade em liberar prostaglandinas protetoras e fisiológicas, e que sua inibição resultaria nos efeitos adversos dos AINEs como sangramento e ulceração no trato gastrointestinal (TGI), broncoconstrição, diminuição função plaquetária e

dos efeitos uterotônicos e da função renal⁽¹⁴⁾. Casos de dispepsia, dor abdominal e náusea são reclamações de mais de 50% de pacientes que consumiram AINEs por um curto período de tempo⁽⁸⁾, tal desconforto diminuía quanto mais seletividade para a Cox2 o AINE apresentava.

Durante a inflamação, enquanto a atividade de Cox1 aumenta em 3 vezes a da Cox2 se eleva 20 vezes⁽¹⁵⁾. Desta forma, a enzima Cox2 seria responsável em liberar prostaglandinas relacionadas ao processo inflamatório, e que resultaria em dor, febre e inflamação, ficando sua inibição como benéfica no processo inflamatório, não interferindo na função plaquetária⁽¹⁴⁾. A partir disto, iniciou-se uma corrida industrial para síntese de AINEs inibidores seletivos e altamente seletivos para Cox2, evitando os efeitos colaterais, como a toxicidade do TGI, que a inibição da Cox1 acarretava⁽¹⁶⁾.

Assim, com a presença deste novo tipo de fármaco, surgiu a classificação de seletividade entre os medicamentos inibidores da Cox sendo uma delas: seletivos para Cox1, não-seletivos para Cox1, seletivos para Cox2 e altamente seletivos para Cox2⁽¹⁵⁾.

Porem, esse tipo de classificação vai depender do sistema empregado em cada tipo de estudo ou ensaio, resultando em muitas vezes na inclusão de um mesmo fármaco, em diferentes categorias como a inclusão do celecoxibe, meloxicam, nimesulide e rofecoxibe como fármacos seletivos para Cox2⁽¹⁷⁾, e ficando o diclofenaco com um AINE não seletivo para Cox2⁽¹⁸⁻²⁰⁾, entendendo-se que ele não seria altamente seletivo, entretanto, tendo uma inibição preferencial da Cox2.

A seletividade de um AINE é determinada *in vitro* pela relação de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da máxima inibição da Cox). Quanto menor o IC₅₀

mais potente é a droga. A seletividade para Cox2 de um AINE pode ser definida pela razão entre o IC₅₀ para Cox2 sobre o IC₅₀ para Cox1. Valores menores que 1 (um) são considerados AINEs seletivos de Cox2 e maiores que 1 (um) podem ser considerados seletivos para Cox1, ficando os fármacos com valores próximos a um denominados não seletivos da Cox⁽¹⁵⁾. A tabela 1 compara a atividade de diversos AINEs quanto sua relação Cox2/Cox1⁽¹⁹⁾.

Tabela 1. Atividade comparativa de diversos AINEs quanto a razão Cox2/Cox1.

Fármaco	Cox2/Cox1
Inibidores não seletivos de Cox2	
Piroxicam	600
Tolmetina	175
Aspirina	166
Sulindaco	100
Indometacina	60
Acido Tolfenâmico	16,7
Ibuprofeno	15
Paracetamol	7,4
Salicilato de sódio	2,8
Flurbiprofeno	1,3
Carprofeno	1
Diclofebaco	0,7
Naproxeno	0,6
Inibidores seletivos de Cox2	
Meloxicam	0,8
Nimesulide	0,1
Etodolaco	0,1
Celecoxibe	0,003

No entanto, com o passar do tempo, vários estudos demonstraram que a Cox2 também possui funções fisiológicas, não tendo papel somente em estados patológicos como se pensava, sendo importante na produção de prostaglandinas essenciais no reparo de ulcerações gastrointestinais⁽²¹⁾, produção de prostaglandinas vasodiladoras renais⁽⁵⁾ e cardíacas^(22, 23), reparo ósseo^(4, 9) e na osteointegração de implantes dentários⁽²⁾.

Entretanto o amplo emprego de AINEs altamente seletivos da Cox2 (COXIBEs) na década passada pelos profissionais de saúde era vista como um filão de ouro para as indústrias farmacêuticas. Porém em 30 de setembro de 2004 sua efetividade foi colocada em cheque, pela retirada voluntária do mercado mundial do medicamento *Vioxx*[®] (rofecoxibe) do laboratório *Merck & Co., Inc.*, que até naquele momento, era o fármaco mais vendido no mundo. Tal medida foi atribuída ao aumento do risco de acidentes vasculares cardíacos em pacientes que consumiam o fármaco por mais de 18 meses^(24, 25).

Diante deste cenário e pelo fato das reações adversas aos medicamentos (RAMs) serem relacionados como um efeito de classe dos COXIBEs, em 2005 sua prescrição passou a seguir as recomendações da Câmara Técnica de Medicamentos (CATEME)⁽²⁶⁾, necessitando atualmente de receituário “C1” (duas vias com retenção)⁽²⁷⁾.

Nesse mesmo ano, o mesmo aconteceu com o medicamento *Bextra*[®] (valdecoxibe) fabricado pela *Pfizer* que foi retirado do mercado mundial em 2005 pelo potencial aumento do risco de acidentes cardiovasculares graves e de reações de pele graves como: necrose epidérmica, síndrome de Stevens-Johnson e eritema multiforme. Diante de tais RAMs sua relação risco/benefício ficou desfavorável e farmacologicamente não possuía qualquer vantagem acima dos outros AINEs disponíveis⁽²⁸⁾. No Brasil em 2008 o *Bextra*[®] Intramuscular/Intravenoso (IM/IV) (parecoxibe) ficou restrito para utilização somente em ambiente hospitalar⁽²⁷⁾.

Nesse mesmo ano o *Plexige*[®] (lumiracoxibe) foi retirado do mercado nacional por ter um perfil de segurança, incluindo reações adversas hepáticas

graves, que superava sua relação risco-benefício com eficácia terapêutica similar a outros AINEs⁽²⁷⁾.

Ficaram disponíveis no mercado Brasileiro dois COXIBEs: o *Arcoxia*[®] (etoricoxibe) que cancelou sua apresentação de 120mg por entender que os riscos dessa dosagem superavam seus benefícios, mantendo somente suas formulações de 60mg e 90mg com adequação do texto de sua bula; e o *Celebra*[®] (celecoxibe) que manteve suas apresentações de 100mg e 200mg, também sofrendo modificações em sua bula⁽²⁷⁾.

Diante desta nova avaliação dos COXIBEs somados as recomendações da CATAME, as prescrições de AINEs ditos *Standards* ou padrões, acabaram sendo reavaliadas e apesar de causarem maiores desconfortos no TGI, possuíam comprovadamente boa ação anti-inflamatória (AI). Nesse momento a temática sobre efeitos adversos dos AINEs vieram à tona, gerando um maior cuidado por parte dos prescritores mais conscientes.

Pelo exposto, foram selecionados neste trabalho dois AINEs, seletivos para Cox2, porém com diferentes relações inibitórias de Cox1/Cox2, amplamente conhecidos e empregados a tanto na clínica médica quanto odontológica: o nimesulide (100mg) e o diclofenaco em associação a colestiramina (140mg), sendo o primeiro mais seletivo para Cox2^(20, 29). Ambos são comercializados no Brasil em formulações genéricas e venda sob prescrição médica em receituário “C2” (sem retenção de receita).

O emprego otimizado de AINEs respeitando sua classe farmacológica, seu perfil farmacocinético, sua ação farmacológica e sua posologia é um exercício que envolve muitos conhecimentos ao mesmo tempo e que quando bem empregado,

contribui muito para a efetividade da prescrição bem como para o uso racional de medicamentos.

Neste sentido ressalto a importância dos prescritores médicos e cirurgiões-dentistas quanto ao conhecimento do perfil farmacocinético de AINEs. Na odontologia além de seu uso para controle de odontalgias, seu emprego no preparo do paciente para uma intervenção cirúrgica tem se tornado freqüente. Existem dois mecanismos possíveis para explicação da eficácia da administração de AINEs antes de uma intervenção cirúrgica: primeiro, por uma vantagem farmacocinética, onde sua tomada prévia garante níveis sanguíneos que estarão presentes antes da instalação da dor; e segundo pela presença de um inibidor de Cox estar presente no local cirúrgico, e limitar a produção de prostaglandinas e prostaciclina associadas a hiperalgesia e edema⁽⁷⁾.

A observância da ação de AINEs em sistemas hemostáticos como a coagulação é de suma importância para seu emprego pré-cirúrgico, pois AINEs seletivos para Cox1, preferenciais para Cox1 e alguns seletivos para Cox2 alteram o tempo de coagulação diminuindo a agregação plaquetária e conseqüentemente prolongando o sangramento. Este efeito é indesejado para uma intervenção cirúrgica porém é muito desejado em pacientes com histórico de infarto do miocárdio, onde se objetiva a diminuição da coagulabilidade do sangue, ação essa muito conhecida pelo AAS cardiológico⁽³⁰⁾. O nimesulide não interfere nesse importante mecanismo hemostático⁽³¹⁾, o diclofenaco pode inibir em até 20% a agregação plaquetária⁽³²⁾. Este conhecimento associado a sua ação farmacológica garante o menor emprego de AIs e analgésicos após o procedimento cirúrgico, e conseqüentemente, menor ocorrência de efeitos adversos. A simples manutenção do estado de equilíbrio farmacológico de um AI realizado pela correta posologia

vai evitar que pacientes façam uso de outros AIs ou analgésicos para controle da dor.

Através do perfil farmacocinético também se permite prescrever uma posologia mais confortável, diminuindo as ingestões das diferentes apresentações farmacêuticas. Nos casos de comprimidos orais podemos encontrar AI de uma tomada diária como é caso o meloxicam 15mg para artrite reumatóide; celecoxibe 200mg para osteoartrite; etoricoxibe 60mg para osteoartrite e dor crônica e etoricoxibe 90mg para artrite reumatóide e espondilite anquilosante.

Outros AINEs precisam ser ingeridos duas vezes ao dia como é o caso do nimesulide 100mg ou três vezes ao dia como o diclofenaco 50mg. Entretanto foram desenvolvidos sistemas de liberação de medicamentos que permitem aumentar sua biodisponibilidade como é o caso da associação com betaciclodextrina ao nimesulide⁽²⁰⁾ e também mudar sua posologia para duas tomadas diárias, como é o caso da associação da colestiramina ao diclofenaco (diclofenaco resinato) que propicia uma melhora farmacológica para sua absorção e proteção gástrica⁽³³⁾, com concentrações plasmáticas por até 12h e equivale a 70mg de diclofenaco⁽³⁴⁾.

Uma das maneiras de determinar o perfil farmacocinético em estudos controlados de medicamentos é através de estudos de bioequivalência. Esses estudos foram estimulados com a Lei N 9.787 de 1999 que instituiu os medicamentos genéricos no Brasil e cuja finalidade era prover medicamentos de qualidade certificada a um custo mais reduzido⁽³⁵⁾.

Medicamentos genéricos e bioequivalência

Definimos medicamento genérico como sendo equivalente farmacêutico em relação ao medicamento de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança, qualidade⁽³⁵⁾

A intercambialidade, ou seja, a segura substituição do medicamento de referência pelo seu genérico é assegurada por testes de bioequivalência apresentados à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde. Essa intercambialidade somente poderá ser realizada pelo farmacêutico responsável, pela farmácia ou drogaria e deverá ser registrada na receita médica⁽³⁶⁾.

Segundo os números de registros de medicamentos genéricos, os fármacos que controlam dor, inflamação e febre representam 24,97% desses registros ficando somente atrás dos antibióticos, que totalizam 31,30% dos registros⁽³⁷⁾.

Para o medicamento genérico, o fabricante deve investir no desenvolvimento farmacotécnico de um produto que cumpra com as mesmas especificações *in vitro*, em relação ao medicamento de referência. Entretanto, aceita-se que a formulação e o processo de fabricação não sejam idênticos, o que geralmente ocorre devido aos diferentes equipamentos e fornecedores de matérias-primas empregados por distintos fabricantes, desde que essas diferenças não comprometam a bioequivalência entre os produtos⁽³⁸⁾.

Nesse contexto, é fundamental ressaltar que diferenças em relação a características físicas e físico-químicas do fármaco e demais componentes da formulação, bem como nos processos de fabricação, podem gerar diferenças na

biodisponibilidade que, no caso do genérico, podem comprometer a bioequivalência e, conseqüentemente, a intercambialidade. Entretanto, tal fato pode ser evitado realizando-se o desenvolvimento farmacotécnico do produto de forma adequada⁽³⁹⁾.

A legislação brasileira, tendo como base a regulamentação técnica e a experiência de diversos países na área de medicamentos genéricos, estabelece que para um medicamento ser registrado como genérico é necessário que se comprove sua equivalência farmacêutica e bioequivalência (mesma biodisponibilidade) em relação ao medicamento de referência indicado pela ANVISA⁽⁴⁰⁾.

Considera-se biodisponibilidade como sendo a taxa e a extensão na qual uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível no sítio de ação do fármaco. Considerando-se que a quantidade do fármaco contida no fluido biológico está em equilíbrio com o sítio de ação, a biodisponibilidade é determinada através da medida da concentração do princípio ativo do fármaco em sangue total, soro ou outro fluido biológico apropriado, em função do tempo⁽⁴¹⁾.

Dois medicamentos são considerados bioequivalentes se as suas quantidades e velocidades de absorção não apresentam diferenças estatisticamente significativas, quando administrados à mesma dose molar do princípio ativo, sob as mesmas condições experimentais. Um estudo de bioequivalência refere-se basicamente à comparação das principais medidas farmacocinéticas observadas no experimento, relativas aos produtos a serem testados⁽⁴¹⁾.

As agências reguladoras usam como principais parâmetros farmacocinéticos para atestar a bioequivalência dos fármacos os valores de C_{MAX}

(ng/ml); T_{MAX} (h); $T_{1/2}$ (h); ASC_{ULTIMO} ((ng x h)/ml); ASC_{INF} ((ng x h)/ml), Essas medidas são obtidas diretamente das curvas de concentração sanguínea versus tempo, construídas no estudo. A bioequivalência é atestada quando 90% do IC das médias geométricas da razão da formulação teste/formulação referencia se encontram dentro da faixa de 80–125 % aceitáveis pelo FDA^(42, 43) e pela ANVISA⁽⁴⁰⁾.

Segurança Farmacológica dos AINEs

Atualmente dispomos de medicamentos mais específicos, mais potentes e de manejo mais delicado, como consequência direta da descoberta de novos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e farmacológicos e do desenvolvimento de novas formulações. Além disso, novos conceitos sobre farmacocinética e biodisponibilidade, como também a descrição de reações adversas e interações medicamentosas cada vez mais complexas, as interferências dos medicamentos na homeostase e nos resultados de exames de laboratório exigem do prescritor uma atualização constante⁽⁴⁴⁾.

A observação de pacientes com comprometimento de suas funções hepático-renal é fundamental para o ajuste de doses a serem administradas, uma vez que esses pacientes sabidamente terão, em diferentes graus, uma metabolização e eliminação diminuídas.

Assim a indicação do tipo de fármaco, posologia e tempo de tomada não está diretamente relacionada somente ao profundo conhecimento do profissional sobre sua farmacocinética e a sua relação de inibição da enzima Cox1/Cox2. Nos dias atuais uma das maiores preocupações com relação ao emprego dos AIs está

relacionada com a “segurança farmacológica” na qual se busca uma melhor ação farmacológica, com uma menor reação adversa.

Entende-se como reação adversa qualquer manifestação clínica ou biológica não desejada que ocorra durante o tratamento com um medicamento. Uma reação adversa grave é um acontecimento associado com morte, hospitalização, prolongamento da hospitalização, deficiência significativa ou persistente, incapacidade, ou que haja ameaça de morte em relação a um medicamento⁽⁴⁵⁾.

O Centro de Vigilância Sanitária Paulista, apontou que cerca de 40% dos casos de intoxicação registrados no Estado dos últimos 10 anos são causados por medicamentos. Dos 128.769 casos, 49.743 foram relacionados a medicamentos. 90% dos casos de intoxicação por medicamentos aconteceram por via oral e, em 85% dos casos, em casa. O problema acomete principalmente as crianças até cinco anos e pessoas do sexo feminino, que representam 59% dos casos⁽⁴⁶⁾.

Nos Estados Unidos RAM graves são responsáveis pela quarta causa de morte, não ficando distante do número de mortes causadas por câncer e doenças cardíacas. A cada ano 2 milhões de pacientes que usaram fármacos comerciais tiveram alguma RAM, e dessas 100.000 resultaram em mortes⁽⁴⁷⁾.

Apesar do avanço da farmacovigilância no mundo as RAMs ainda acarretam grande impacto à saúde dos indivíduos e por isso a utilização racional de medicamentos é muito importante neste cenário mundial. Os AINEs devem empregados somente como prescritos; com a menor dose possível ao tratamento e no menor tempo necessário⁽⁴⁸⁾.

Faz-se lembrar que para um uso racional é preciso que se prescreva o medicamento apropriado, que seja disponível e a um preço acessível, que se

dispense em condições adequadas e que seja tomado na dose prescrita e nos intervalos de tempo regulares. O medicamento apropriado deve ser eficaz e de qualidade e segurança aceitáveis⁽⁴⁹⁾.

Os prescritores que buscam o emprego racional de medicamentos possuem um desafio enorme relacionado com a cultura de automedicação no Brasil. O uso descontrolado de AINEs é facilitado pelo seu grande emprego na população em geral, e em muitas vezes em situações não indicadas, somadas pela venda da maior parte de seus grupos químicos em farmácias, sem a apresentação de receita médica. Tal situação se agrava pela grande disponibilidade de medicamentos disponíveis como “*over the counter*” (ou seja isentos de prescrição) como é o caso do AAS, acetoaminofeno (paracetamol), dipirona sódica e ibuprofeno.

Diante deste cenário desfavorável resta ainda eleger a melhor alternativa terapêutica para cada paciente. É nesse sentido que a temática da segurança farmacológica entre os AINEs vem tomando força, destacando os profissionais de sabem distinguirem os riscos dos benefícios de seu emprego.

Reações Adversas Graves – Injúria Hepática

O fígado é um órgão que atua como uma glândula do corpo humano e como qualquer outro órgão do organismo receberá a ação da medicação, e o mais importante, possui a função de metabolizá-la. Por este motivo, destaca-se a injúria hepática como umas das RAMs graves, juntamente com a ruptura de tendão, a toxicidade muscular e a psicose⁽⁴⁷⁾.

Os antibióticos e os AINEs são as maiores causas de injúria hepática fármaco induzida (IHFI) que pode variar desde moderadas anormalidades

bioquímicas como falha hepática aguda. Os fatores de risco incluem idade, sexo e polimorfismos genéticos de enzimas metabolizadoras de medicamentos como o CYP450⁽⁵⁰⁾.

A IHFI é uma causa freqüente de disfunção hepática⁽⁵¹⁾ e alterações nos valores das enzimas que compõem o painel hepático muitas vezes é identificada anteriormente a manifestações clínicas de doenças relacionadas ao fígado.

As manifestações clínicas da IHFI variam dentro de um amplo espectro, de assintomáticos, como os testes hepáticos anormais, até os sintomáticos como: doença hepática aguda; icterícia e debilidades e falência hepática aguda ou subaguda. Nos Estados Unidos a IHFI é uma significativa causa de morbidade e mortalidade representando pelo menos 13% das falências hepáticas agudas⁽⁵²⁾ e considerada um problema alarmante de saúde pública nos Estados Unidos⁽⁵³⁾.

Entende-se por painel hepático (ou testes de função hepática) a bateria de exames de sangue que visam à quantificação de enzimas e proteínas que estão diretamente relacionados ao fígado e que seus padrões de valores indicam a função normal deste órgão, ainda que possam existir variações significantes nesses valores. Entre elas estão as transaminases (AT): alanina aminotranferase (ALT/TGP); aspartato aminotranferase (AST/TGO); fosfatase alcalina (ALP) e bilirrubina (TBL). A quantificação bioquímica de proteínas como proteínas totais e albumina bem como a gama glutamil transpeptidase ou gama-GT (GGT) e o tempo de protombina são testes que completam as avaliações de função hepática.

A patogênese da IHFI pode ser examinada em dois principais padrões de injúria: o **hepatocelular** que é caracterizado pelo predominante aumento de AT (ALT e AST) resultado da perda dos hepatócitos por apoptose ou necrose e a **colestática** é caracterizada pelo aumento predominante dos valores séricos de

fosfatase alcalina (ALP) e usualmente resulta em injúria das células do ducto biliar, diretamente relacionada ao fármaco ou seus metabólitos ou indiretamente por uma resposta adaptativa imunológica⁽⁵¹⁾.

A toxicidade por fármaco é o principal causa de falha hepática aguda, que neste estado avançado da injúria hepática, muitas vezes é definida por um prolongado tempo de protrombina, associado a qualquer alteração mental ocorrendo em menos de 26 semanas após o início da medicação em um paciente sem cirrose pré-existente⁽⁵¹⁾.

O metabolismo de um fármaco pode afetar diretamente seu perfil de segurança, podendo ser metabolizado, em um metabólito hepatotóxico, sendo que em sua maioria, são metabolizados oxidavelmente pelo sistema CYP450. (ex. acetoaminofeno, halotano, isoniazida)⁽⁵⁴⁾.

Os AINEs têm sido associados à ocorrência de hepatotoxicidade idiossincrática² em pacientes susceptíveis, porém o mecanismo envolvendo sua toxicidade ainda não está totalmente elucidado. Os modelos experimentais sugerem que esses mecanismos estejam associados ao aumento da concentração do fármaco no compartimento hepatobiliar, formando metabólitos reativos que modificam covalentemente as proteínas produzindo estresse oxidativo e injúria mitocondrial^(53, 55).

A incidência de IHFI que resultaram em hospitalização com uso de AINEs varia de 3,1 até 23,4/100.000 pacientes/ano segundo a revisão sistemática realizada por Rubenstein e Laine⁽⁵⁶⁾. Apesar de existirem casos de IHFI envolvendo tanto nimesulide como o diclofenaco⁽⁵⁷⁾, o nimesulide tem sido objeto

² o termo denota uma hipersensibilidade não imunológica para uma substância, sem conexão com toxicidade farmacológica ou seja, é um efeito independente de dose tóxica. *Idiossincrático* reforça o fato que outros indivíduos reagiriam de modo diferente, ou não reagiriam, e que a reação é individual e baseada em uma condição específica daquele que sofreu a reação.

de grandes estudos de segurança farmacológica pós-comercialização após o alerta da Finlândia feito a EMA em 2002.

O nimesulide, diferentemente do diclofenaco, possui assim como outros fármacos (tolcapone, nilutamine, flutamina e nitrofurantoina) o grupo funcional nitroaromático (uma nitrila ligada a um anel aromático) e que tem sido associado à toxicidade órgão-seletiva incluindo casos de injúria hepática idiossincrática. Sua bioativação por nitroredução gera derivados que estão associados a estresse oxidativo que atinge resíduos nucleofílicos de proteínas e ácidos nucleicos⁽⁵⁸⁾.

Diversos trabalhos relatando falência hepática com uso do nimesulide por diferentes períodos de tempo foram encontrados na literatura⁽⁵⁹⁻⁶⁸⁾.

Em um estudo tipo **cohort** realizado de 1997 até 2001, foram levantados pacientes que tomaram pelo menos uma prescrição de AINEs. Foram levantados 2 milhões de prescrições sendo que o nimesulide foi o fármaco mais prescrito (551.000). 42 pacientes, de 176 casos admitidos por hepatopatia, ocorreram durante o uso de AINEs em uma incidência de 29,8 para 100.000 pessoas/ano. O diclofenaco foi o segundo fármaco mais prescrito, entretanto o numero de eventos foi muito baixa, impedindo de fazer a comparação de riscos. Dentre os pacientes, o intervalo médio entre a prescrição e sua admissão no hospital foi de 11 dias sendo que somente 2 pacientes dos 42 tomaram os fármacos mais que 60 dias. O risco de hepatopatia em usuários de nimesulide foi discretamente maior na razão de 1,3 em comparação a outros AINEs, porem a relação de injúria hepática do nimesulide foi de 2,2 (33,1 para 100.000) e 1,5 (22,4 para 100.000) do diclofenaco⁽⁶¹⁾.

No intuito de ampliar os dados existentes de estudos clínicos controlados, envolvendo medicamentos que sabidamente acarretam eventos adversos

hepático-relacionados, como é o caso do nimesulide, e em menor incidência o diclofenaco, o FDA recomenda que seja analisada a incidência de anormalidades nos níveis biológicos de transaminases, bilirrubina e da fosfatase alcalina com pelo menos uma exposição ao fármaco⁽⁵⁴⁾.

Todos os valores obtidos das análises bioquímicas devem ser armazenados em um pool de informações, mesmo que se objetive a comparação de suas diferenças entre experimentos. Para muitos fármacos, uma mínima duração de exposição é necessária antes de ocorrer IHFI. Conseqüentemente é útil descrever esses eventos adversos hepático-relacionados (ex. sujeitos com pelo menos 1 mês de exposição). Para alguns fármacos padrões precoces de injúria após início do tratamento podem ocorrer, e para esses pacientes testes periódicos devem ser adequadamente aplicados⁽⁵⁴⁾.

As anormalidades dos níveis bioquímicos encontrados após a ingestão de fármacos possivelmente hepatotóxicos, devem ser considerados quando atingirem principalmente os seguintes valores:⁽⁵⁴⁾

- **Aumento de 3x, 5x, 10x e 20xULN de AT (AST e ALT) juntas ou separadamente;**
- **Qualquer elevação de bilirrubina (TBL) maior que 2xULN;**
- **Qualquer elevação de fosfatase alcalina (ALP) maior que 1,5xULN;**
- **Aumento de AT (>3xULN) acompanhada da elevação de bilirrubina (>1,5xULN, >2xULN);**
- **Aumento de AT em associação com náusea, vômito, anorexia, dor abdominal e fadiga.**

Drogas estudadas: nimesulide e diclofenaco

O nimesulide (figura 1) é um AINE da classe das sulfanilidas com seletividade preferencial para a Cox2⁽⁶⁹⁾. Além de sua atividade AI, analgésica e antipirética, apresenta muitos empregos clínicos em odontologia, otorrinolaringologia, ginecologia, oftalmologia, no sistema musculoesquelético, na urologia em injúrias relacionadas ao esporte e em condições respiratórias⁽⁷⁰⁾. É principalmente empregada no tratamento de dores agudas como osteoartrite e dismenorreia primária⁽⁷¹⁾.

O nimesulide apresenta uma inibição de Cox2 maior que o diclofenaco e apresenta melhor tolerabilidade gástrica⁽⁷²⁻⁷⁵⁾ e melhor ação analgésica tanto para formulação em gel⁽⁷⁶⁾ como para administração IV⁽⁷⁷⁾.

O nimesulide foi inicialmente comercializado na Itália em 1985 e atualmente é comercializado em mais de 50 países⁽⁷⁸⁾.

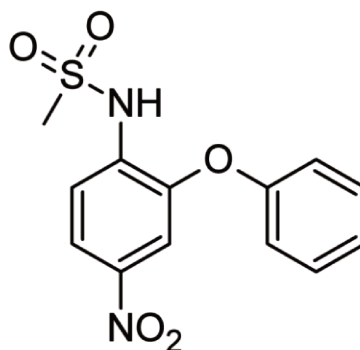


Figura 1. Estrutura do nimesulide

O diclofenaco (figura 2) é um AINE da classe do ácido fenilacético e é um potente inibidor da síntese de prostaglandinas usado para o tratamento de artrite

reumatóide, osteoartrite, espondilite anquilosante e gota⁽⁷⁹⁾. Possui seletividade preferencial para a Cox2⁽⁸⁰⁾.

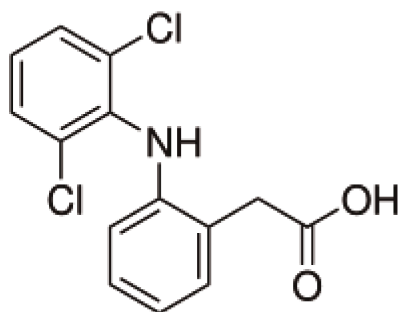


Figura 2. Estrutura do diclofenaco

O diclofenaco é provavelmente o AINE mais empregado em reumatologia e reações hepáticas e taxas de hospitalizações são incomuns⁽⁶⁸⁾.

Uma grande vantagem terapêutica do nimesulide é possuir seu principal metabolito (derivado 4-hidroxi) ativo dotado de ação anti-histamínica, com meia vida plasmática similar ao nimesulide com concentração plasmática de 3,03 microgramas /mL⁽⁸¹⁾ ao passo que o metabolito principal do diclofenaco também é um derivado 4-hidroxi, entretanto, possui 30 vezes menos atividade que seu composto inicial⁽⁸²⁾.

Desta forma, a avaliação da ação de duas tomadas de cada um desses medicamentos dentro de um estudo de bioequivalência, determinará seu perfil farmacocinético bem como sua ação nos parâmetros clínicos e laboratoriais do painel hepático e da contagem de plaquetas.

2. OBJETIVO



O presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil farmacocinético do diclofenaco de colestiramina (cápsula de 140mg) e de duas apresentações farmacêuticas (comprimidos 100mg e suspensão oral 50mg/mL) de nimesulide realizado em voluntários sadios de ambos os sexos e relacioná-los aos desfechos clínicos em enzimas do painel hepático e da contagem de plaquetas.

CAPÍTULO I



A simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma: application to a comparative bioavailability study

**H.M. Rigato¹, R.A. Moreno^{2,3}, E.Z. Orpinelli³, B.C. Borges⁴, C.E. Sverdloff²,
J. Pedrazzoli Jr.⁵ and N.C. Borges^{1,3}**

¹Department of Medical Clinic, State University of Campinas, SP;

²Department of Pharmacology, State University of Campinas, SP;

³Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos, Campinas, SP;

⁴College of Medicine, Pontificia Universidade Católica, Sorocaba, SP;

⁵Integrated Unit of Pharmacology and Gastroenterology, São Francisco University Medical School, Bragança Paulista, SP, Brazil



A simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma: application to a comparative bioavailability study

H.M. Rigato¹, R.A. Moreno^{2,3}, E.Z. Orpinelli³, B.C. Borges⁴, C.E. Sverdlhoff², J. Pedrazzoli Jr.⁵ and N.C. Borges^{1,3}

¹Department of Medical Clinic, ²Department of Pharmacology, State University of Campinas, ³Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos, Campinas, SP, ⁴College of Medicine, Pontificia Universidade Católica, Sorocaba, SP, ⁵Integrated Unit of Pharmacology and Gastroenterology, Sao Francisco University Medical School, Bragança Paulista/SP, Brazil

Key words

diclofenac-cholestyramine – pharmacokinetics – high-performance liquid chromatography – bioavailability

Abstract. A rapid, sensitive and specific method to quantify diclofenac in human plasma using indomethacin as the internal standard (IS) is described. Samples were extracted using protein precipitation protocol and analyzed by high performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detection at 276 nm. Chromatography was performed isocratically with a run time of 8.0 min and the retention time observed for diclofenac and IS was 6.0 and 7.0 min, respectively. The calibration curve was linear over the range 50 – 4,000 ng/ml ($r^2 > 0.9995$). The mean recovery of diclofenac ranged from 88.76 to 99.14% and the limit of quantification was 50 ng/ml. Intrabatch precision and accuracy (%CV) of the method ranged from 0.86 to 7.60%, and 99.34 to 103.8%, respectively. Interbatch precision (%CV) and accuracy ranged from 0.26 to 11.4%, and 92.00 to 105.34%, respectively. This HPLC method was used to determine the relative pharmacokinetics of two diclofenac-cholestyramine 140 mg capsule formulations. The study was conducted using an open, randomized and crossover design with a 1-week washout interval. A single 140 mg dose (equivalent to 70 mg of diclofenac) of each formulation was administered to 26 healthy volunteers (13 males and 13 females) and blood samples were obtained over 12-h interval. The geometric mean of diclofenac-cholestyramine/Flotac[®] ratio was 90.53% for AUC₀₋₁₂ and 100.22% for C_{max}. Since the 90% CI for C_{max} and AUCs ratios were all inside the 80 – 125% interval, it was concluded that the diclofenac-cholestyramine test formulation is bioequivalent to Flotac[®] regarding both the rate and the extent of absorption.

Introduction

Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are among the most frequently consumed drugs worldwide. NSAIDs exert their action by inhibiting the prostaglandin synthesis that is catalyzed by cyclooxygenase activity. Because of their efficacy in relieving pain and inflammation, the use of NSAIDs is growing in proportion to the age-related increase in musculoskeletal disorders and osteoarthritis. Diclofenac, ([2-(2,6-dichloroanilino)phenyl] acetic acid) is a potent nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID) that shows preferential inhibition of the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme [Hinz et al. 2003], widely used for analgesic, antipyretic and antiinflammatory activities [Small 1989].

The oral bioavailability of diclofenac is approximately 60% [Hinz et al. 2005, Willis et al. 1979], and it is extensively metabolized to a number of hydroxylated metabolites. The major oxidative metabolite of diclofenac is 4'-hydroxy-(OH)-diclofenac with 3'-OH-, 5'-OH-, and 4',5'-diOH-diclofenac being minor metabolites [Stierlin et al. 1979]. Both diclofenac and its hydroxylated metabolites are conjugated and excreted in urine and bile. Less than 1% of the diclofenac dose is excreted unchanged into urine [Geiger et al. 1975]. The combination with cholestyramine represents a relatively new dosage form of diclofenac designed to provide rapid onset of

Received
March 11, 2008;
accepted
September 2, 2008

Correspondence to
N. Carter Borges,
MD, MSc, PhD
24 Cesar Bierrenbach
Street, Campinas, SP
13015-025, Brazil
medney@
synchrophar.com

absorption coupled with measurable plasma concentrations over 12 h [Farker et al. 2002].

Diclofenac-cholestyramine is an improved formulation, from a pharmacokinetic-pharmacodynamic point of view, compared to diclofenac sodium [Suarez-Otero et al. 2002]. Cholestyramine is an ion exchange resin that forms a complex with diclofenac [Sriwongjanya and Bodmeier 1998] and, thus, helps to reduce mucosal damage by direct contact in the gastric lumen. Diclofenac-cholestyramine yields a high peak of plasma concentration and a short half-life in blood of about 2 h [Silva et al. 1999]. Its action, however, is long lasting, as the drug remains in the synovial fluid of inflamed joints, i.e., at the effect compartment [Torres-Lopez et al. 1997]. Diclofenac-cholestyramine exhibits a similar analgesic efficacy and safety in patients with osteoarthritis, compared to the selective COX-2 inhibitor celecoxib [Suarez-Otero et al. 2002].

HPLC has been the technique of choice for separation and determination of diclofenac in biological fluids during pharmacokinetics studies. Thus so far, several HPLC methods have been described to analyze diclofenac sodium in various body fluids using different clean-up procedures including direct injection, protein precipitation [Avgerinos et al. 1993, el-Sayed et al. 1988, Moncrieff 1992], solid-phase extraction (SPE) [Millership et al. 2001, Zecca et al. 1991], liquid-liquid extraction (LLE) [Blagbrough et al. 1992, Chmielewska et al. 2006, Roskar and Kmetec 2003], and column switching [Lee et al. 2000], either with UV [Avgerinos et al. 1993, el-Sayed et al. 1988, Lee et al. 2000, Millership et al. 2001], fluorimetric [Moncrieff 1992] or electrochemical detection [Chmielewska et al. 2006, Zecca et al. 1991]. In the present study, it was of interest to develop a reliable, simple and sensitive HPLC method using UV detection and protein precipitation for determination of diclofenac in human plasma using indomethacin as the internal standard. The described method utilizes neither SPE nor an electrochemical detector and yet is sensitive, making it a rapid, simple and appropriate procedure for assessing the pharmacokinetics and bioequivalence of formulations of this drug. This method was employed in a bioequivalence study of two diclofenac-cholestyramine 140 mg capsule formulations (equivalent to 70 mg diclo-

fenac): diclofenac-cholestyramine generic formulation and Flotac[®]) from Novartis Bio-ciências S.A. standard reference formulation.

Methods

Test products

A validated HPLC-UV method was applied to evaluate the pharmacokinetics of two capsule formulations of diclofenac-cholestyramine 140 mg, corresponding to 70 mg of diclofenac: generic formulation diclofenac-cholestyramine from Medley S.A. Indústria Farmacêutica (batch number DCC02/02-5) as the test formulation, and Flotac[®] from Novartis Bio-ciências S.A. (batch number Z82879) as the reference formulation.

Subjects

26 healthy volunteers aged between 20 and 40 years and within 15% variation in the ideal body weight were selected for the study (IMC 23.6 ± 2.1 kg, mean $\pm$ SD, range 19.4 – 26.9 kg). The male group comprised 13 volunteers (31.9 ± 6.0 years, range 23 – 40 years), height between 165 and 182 cm (172.3 ± 5.3 cm), weighing between 59.6 and 79.6 kg (70.6 ± 6.8 kg). The female group comprised 13 volunteers (26.7 ± 5.1 years, range 20 – 36 years), height between 152 and 177 cm (163.0 ± 8.5 cm), weighing between 51.5 and 75.7 kg (62.7 ± 8.2 kg).

All volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal and hematological diseases, as assessed by general physical examination, ECG and the following laboratory tests: blood glucose, urea, uric acid, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase, L- γ -glutamyl-transferase (γ -GT), total bilirubin, albumin and total protein, triglycerides, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, platelet count, total and differential white cell counts, feces parasitological examination and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HBV (except for serological scar) and HCV. Testing (BHCG) of all female volunteers determined that none was pregnant.

The study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996), Edinburgh (2000) revisions and the Resolutions No.196/96 and 251/97 of National Health Council – Health Ministry, Brazil. The clinical protocol was also approved by the State University of Campinas ethics committee and all participants provided written, informed consent.

Study design

The study was conducted in an open, randomized, single crossover balanced design with 7-day washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 7:00 p.m. having an evening meal at 7:30 and after an overnight fast they received (at approximately 7:00 a.m.) a single dose of 140 mg diclofenac-cholestyramine capsule of either formulation. Water (200 ml) was given immediately after drug administration. All volunteers were required to remain fasting until 2 h after dose when a standard breakfast was available. A standard meal was provided after 5 (lunch), 8 (coffee break), 12 (evening meal) h after dosing. No other food was permitted during the “in-house” period. Liquid consumption was permitted *ad libitum* 6 h before and 2 h after drug but xanthine-containing drinks including tea, coffee, and cola were prohibited. Food was also xanthine-free. Smoking was prohibited during the “in-house” period. All subjects were requested to stay in the clinic for a 24-h period after drug administration.

Systolic and diastolic arterial pressure was measured noninvasively with a sphygmomanometer, while heart rate and temperature were recorded just before drug administration and hourly afterwards.

Blood samples (8 ml) from a suitable antecubital vein were collected by indwelling catheter into heparin containing tubes before and 0:15 h, 0:30 h, 0:45 h, 1 h, 1:15 h, 1:30 h, 2 h, 2:30 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h and 12 h post dosing. The blood samples were centrifuged at approximately $2,000 \times g$ for 10 min at 4°C and the plasma stored at -20°C until assayed for diclofenac content.

Analytical method

Frozen human plasma samples were thawed at room temperature and aliquots of 200 μl of each calibrator, QC or volunteer sample were added to appropriate glass test tubes with 400 μl of the internal IS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluted in pure acetonitrile. After vortex mixing for approximately 1 min, samples were centrifuged at approximately $12,000 \times g$ for 10 min at $4 \geq \text{C}$. A total of 200 μl of the supernatant were transferred into individual vials and 20 μl were injected into the chromatographic system.

A liquid chromatograph system coupled to an ultraviolet detector (Shimadzu HPLC SPD-10 AV VP system, Japan) was used for all analyses. Samples were injected into a Phenomenex[®] Luna C₁₈, 10 μm (150 $\times$ 4.6 mm i.d.) analytical column coupled to a Securityguard[®] C₁₈ (4.0 $\times$ 3.0 mm i.d.) guard-column, operated at 25°C operated at room temperature. The autosampler was kept at room temperature and the pressure of the system was maintained between 50 – 65 bars. The mobile phase was a mixture of acetonitrile/sodium acetate buffer pH 5.0 (55/45 v/v). Peaks were monitored by UV absorbance at 276 nm. A flow rate of 1.5 ml/min was used for sample analysis and the total run time was set to 8.0 minutes.

Calibration standards and quality control

Diclofenac stock solutions were prepared in methanol at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Work solutions were prepared by serial dilutions of the stock solutions in methanol. Internal standard indomethacin was prepared in acetonitrile at 4°C at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Calibration curves for diclofenac were prepared by spiking blank plasma with work solutions to obtain the final concentrations of 50, 100, 400, 800, 1,000, 2,000 and 4,000 ng/ml. The analyses were carried out in duplicate for each concentration.

Quality control (QC) plasma samples were prepared by spiking blank plasma with the above working solutions to provide four different concentrations, namely: at the limit of quantification (LOQ, 50 ng/ml), at low concentration (QCL 150 ng/ml), at medium

concentration (QCM 1,500 ng/ml) and at high concentration (QCH 2,500 ng/ml). The spiked plasma samples (standards and quality controls) were extracted in each analytical batch along with the unknown samples.

The standard calibration curves were constructed using the peak area ratios of diclofenac and IS vs diclofenac nominal concentrations of the eight plasma standards in duplicate. Linear regression analysis was performed to assess the linearity, as well as to generate the standard calibration equation: $y = ax + b$, where y is the peak-area ratio, x the concentration, a the slope and b is the intercept of the regression line. In addition, a blank (nonspiked sample) and a zero plasma sample (only spiked with IS) were run to eliminate the presence of interferences.

Recovery

The recovery was evaluated by calculating the mean of the response of five replicates of each QCL (50 ng/ml), QCM (1,500 ng/ml) and QCH (2,500 ng/ml) concentration and dividing the extracted sample mean response by the unextracted standard solution sample mean of the corresponding concentration.

Precision and accuracy of this method were evaluated using three different batches of QCL, QCM and QCH of diclofenac, also including the lowest limit of quantification, LOQ. For intrabatch assay precision and accuracy, five replicates of quality control samples at the three concentration levels were assayed all at once within a day to obtain CV(%) and accuracy values. The interbatch assay precision and accuracy were determined by analyzing mean values of quality control samples from three plasma batches, yielding the corresponding interbatches CV(%) and accuracy values.

The lower limit of quantification (LOQ) was determined for diclofenac, based on two criteria:

- the analyte response at LOQ had to be at least 3 times baseline noise,
- the analyte response at LOQ being determined with sufficient precision and accuracy, i.e., precision of 20% and accuracy of 80 – 120%.

Calculations were based on five replicates of three blank plasma batches.

Stability assays

All stability assays were performed using five replicates of plasma spiked with diclofenac at low, medium and high QCs concentrations (150, 1,500 and 2,500 ng/ml, respectively). Samples stored at each specified condition were compared to fresh prepared ones at equivalent concentration and expressed in percentage of degradation.

Postprocessing stability was evaluated in QC samples thawed at room temperature (22 °C) and extracted. All samples remained on the bench top for a time exceeding the maximum period of time expected for routine sample analysis (16 h).

For freeze-thaw stability of diclofenac standards plasma samples were subjected to three freeze-thaw cycles of –20 °C during 24 h. In each cycle, frozen samples were allowed to thaw at controlled ambient temperature (22 °C) and were subsequently refrozen for 24 h. Aliquots of all samples were quantified at the end of the third freeze-thaw cycle.

The storage time of long-term stability was assessed by keeping the QC samples at –20 °C during the entire period covered by the bioequivalence study, i.e., from the first day of volunteer sample collection up to the last day of sample analysis (73 days). Storage stability was defined, comparing sample concentration to the mean values obtained at first-day analysis.

To assess the stock solution stability, diclofenac stock and work solutions were prepared and stored at room temperature or at –20 °C. Sample aliquots of QCs samples were evaluated after 6 h at room temperature and also after 14 days at –20 °C.

Pharmacokinetic analysis

The first-order terminal elimination rate constant (k_e) was estimated by linear regression from the points describing the elimination phase in a log-linear plot. Half-life ($t_{1/2}$) was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2)/k_e$).

Bioequivalence between the two formulations was assessed by calculating individual test/reference ratios for the peak of concentration (C_{max}), area under curve (AUC) of plasma concentration until the last concentration observed (AUC_{last}), and the area under

Table 1. Accuracy and precision data for diclofenac quantification in human plasma. Results were obtained during the validation of QC samples, including the LOQ in human plasma.

	Intra-run accuracy ^a	Inter-run accuracy ^b	Intra-run precision ^c (%CV)	Inter-run precision ^b (%CV)
QC samples				
QC-LOQ	99.34	92.00	7.6	11.4
QCL	111.69	105.34	1.97	4.62
QCM	102.83	99.99	0.86	1.52
QCH	105.42	99.14	0.90	0.26

QC = Quality control; LOQ = Limit of quantification (50 ng/ml); QCL = QC at low concentration (150 ng/ml); QCM = QC at medium concentration (1500 ng/ml); QCH = QC at high concentration (2500 ng/ml). ^a(n = 5), expressed as (found concentration/nominal concentration) × 100. ^bValues obtained from all 3 runs (n = 15). ^cn = 5.

curve between the first sample (pre-dosage) and infinite ($AUC_{0-\infty}$). The C_{max} and the time taken to achieve this concentration (t_{max}) were obtained directly from the curves. The areas under the diclofenac-cholestyramine plasma concentration vs. time curves from 0- to the last detectable concentration (AUC_{last}) were calculated by applying the linear trapezoid rule. Extrapolation of these areas to infinity ($AUC_{0-\infty}$) was done by adding the value C_{last}/k_e to the calculated AUC_{last} (where C_{last} = the last detectable concentration). Log-transformed AUC_{0-t} and C_{max} data for the two formulations were analyzed using ANOVA and the 2 one-sided t-test to establish whether the 90% CI of the ratios was within the 80 – 125% interval indicating bioequivalence as proposed by the US Food and Drug Administration. Parametric analyses of ln-transformed arithmetic means between test and reference formulations were also performed.

The software used included WinNonLin Professional Network Edition (Scientific Consulting, v. 1.5), Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies (Herman P. Wijnand, v.3.4), Microsoft Excel (v. 7.0) and GraphPad Prism (v. 3.02).

Results

HPLC analysis

Specificity or selectivity

Under the conditions applied in this work, the retention times for diclofenac and IS were 6.0 and 7.0 min, respectively. All chromatograms were free from interferences at the

retention times of diclofenac or internal standard. Both compounds eluted as completely resolved peaks and no peak tailing was noticed enabling the use of either peak height or peak area in the calculation of standard curves. The absence of any peak in the blank plasma at the retention time of diclofenac standard indicates the specificity or selectivity of the method of analysis from plasma.

Linearity

Good linear relationships were found when the peak area ratios of diclofenac to the internal standard were plotted versus the diclofenac plasma concentration in all concentration applied to construct the standard curve.

The simplest regression method for the calibration curves of the diclofenac was $Y = a + bx$ from 50 to 4,000 ng/ml. Correlation coefficient was above 0.9995. The LOQ for diclofenac was 50 ng/ml at a signal to noise ratio of 3 : 1.

Precision and accuracy

The intra- and interdays accuracy and precision values of the assay methods are presented in Table 1. Intrabatch precision and accuracy of the assay was measured for diclofenac at each QC level (150, 1,500 and 2,500 ng/ml), including the LOQ sample (50 ng/ml). Calculated intrabatch precision and accuracy (%CV) of the method ranged from

Table 2. Freeze and thaw stability test.

Theoretical concentration (ng/ml)	Initial mean concentration (ng/ml)	Final mean concentration (ng/ml)	Variation (%)
150	146.49	158.46	8.17
1,500	1,442.89	1,554.89	7.76
2,500	2,367.29	2,577.12	8.86

Table 3. Post-processing stability test after 16 h at room temperature.

Theoretical concentration (ng/ml)	Initial mean concentration (ng/ml)	Final mean concentration (ng/ml)	Variation (%)
150	129.45	128.16	-1.00
1,500	1,400.25	1,523.71	8.82
2,500	2,358.24	2,551.29	8.19

Table 4. Long term stability test after 73 days at -20 °C.

Theoretical concentration (ng/ml)	Initial mean concentration (ng/ml)	Final mean concentration (ng/ml)	Variation (%)
150	149.20	148.95	-0.17
1,500	1,524.81	1,457.91	-4.39
2,500	2,494.66	2,360.37	-5.38

0.86 to 7.60%, and 99.34 to 103.8%, respectively. Method interbatch precision (%CV) and accuracy ranged from 0.26 to 11.4%, and 92.00 to 105.34%, respectively. These results, as well as the respective values for the percentage accuracy, were within the acceptance criteria for precision and accuracy.

Recovery

The extraction efficiency was determined by comparison of the peak areas of the spiked plasma samples with those of unextracted diclofenac solution in solvent. The mean recoveries for diclofenac in spiked blank plasma samples were found to be 94.06% for QCL, 99.14% for QCM and 88.76% for QCH. The recoveries were consistent throughout the replicates as demonstrated by CV% ranging from 2.07 to 6.82%, considering the analysis of the five samples in each run. Recoveries were not dependent on the concentration, and

consequently resulted in good linearity of the calibration curve.

Stability

Stability tests showed that the samples did not suffer significant degradation after three cycles of freeze and thaw (freeze and thaw stability test), under the conditions of analysis (postprocessing stability test) or after 73 days storage at -20 °C (long-term stability test). The standard solutions were also stable after 6 h at room temperature or 14 days at -20 °C. Tables 2 – 5 show the results for the stability tests.

Pharmacokinetic evaluation

Applicability of this method was confirmed by analyzing true samples obtained after administration of 140 mg of diclofenac-cholestyramine to healthy volunteers. The

Table 5. Stock solution stability after 6 h at room temperature or after 14 days at -20°C.

Theoretical concentration (ng/ml)	Initial mean concentration (ng/ml)	6 h (RT)		14 days (-20 °C)	
		Final mean concentration (ng/ml)	Variation (%)	Final mean concentration (ng/ml)	Variation (%)
150	146.49	157.94	7.82	146.03	-0.31
1500	1442.89	1407.35	-2.46	1546.40	7.17
2500	2367.29	2368.66	0.06	2507.22	5.91

RT = room temperature.

Table 6. Arithmetic mean pharmacokinetic parameters obtained from 26 volunteers after administration of each 140 mg diclofenac-cholestyramine tablet formulation.

	Diclofenac-cholestyramine		Flotac®	
	Mean	IC 90%	Mean	IC 90%
C _{max} (ng/ml)	459.55	396.84 – 522.27	454.32	394.64 – 514.00
t _{max} (h)	1.91	1.68 – 2.14	2.09	1.72 – 2.45
t _{1/2} (h)	2.40	1.47 – 3.34	2.58	1.76 – 3.39
AUC _{0-t} ((ng x h)/ml)	1098.34	952.67 – 1,244.01	1195.96	1,059.77 – 1,332.14
AUC _{inf} ((ng x h)/ml)	1318.04	1,115.30 – 1,520.78	1399.18	1,216.32 – 1,582.03

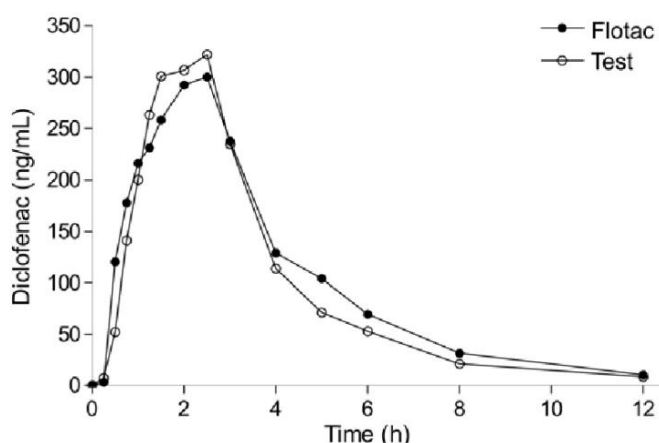


Figure 1. Mean plasma concentration vs. time curve after single oral dose administration of both diclofenac-cholestyramine formulations (test or reference Flotac®) in the form of 140 mg tablet.

mean diclofenac plasma concentration vs time curves obtained after a single oral dose of each formulation are shown in Figure 1. The plasma concentration of diclofenac did not differ significantly after administration of both formulations (test and reference).

The mean pharmacokinetic parameters for both brands of diclofenac sodium tablets are also summarized in Tables 6 and 7. Briefly, the geometric mean and respective 90% CI of diclofenac test/reference percent ratios were 100.22% (84.99 – 118.19%) for C_{max} and 90.53% (82.86 – 98.91%) for AUC_{0-t}. These results were found to be within the FDA acceptable range of 80 – 125% for evaluation of bioequivalence.

Clinical observations

The post-study clinical and laboratory evaluations showed no significant variations that could be attributed to treatment. Both formulations were well-tolerated at the administered doses and no significant adverse reactions were observed or reported. No clinically relevant change was observed in any measured biochemical parameter. All 26 volunteers finished the study.

Discussion

The present study demonstrates that diclofenac-cholestyramine is reproducibly and

Table 7. Geometric mean of the individual AUC_{0-t} and C_{max} ratios (test/reference formulation) and the respective 90% CIs. Log transformed data for the two formulations were analyzed using ANOVA and two-one sided *t*-test.

Diclofenac/Flotac®	Parametric (n = 26)	
	Geometric mean (%)	90% CI
AUC_{0-t} % ratio	90.53	82.86 – 98.91
C_{max} % ratio	100.22	84.99 – 118.19

well-absorbed after oral administration of a 140 mg dose. Diclofenac was detected in plasma within 15 min after oral administration of diclofenac-cholestyramine, suggesting a rapid absorption. Diclofenac has been shown to undergo considerable first-pass metabolism, limiting its oral bioavailability (50–60%) following single oral administration [John 1979, Willis et al. 1979]. The combination of diclofenac with the ion-exchange resin cholestyramine produces a longer-lasting absorption and consequently a prolonged effect [Silva et al. 1999, Sriwongjanya and Bodmeier 1998]. It can also be assumed that effective concentrations of active substance are present in the target tissue for a longer period [Fowler et al. 1986, Todd and Sorkin 1988].

A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method with UV detection at 280 nm has been the method of choice for the determination of diclofenac in different body fluids. However, a very high variability of sensitivity was observed, for example 10 ng/ml [Blagbrough et al. 1992, Godbillon et al. 1985], 50 ng/ml [Lansdorp et al. 1990] and 200 ng/ml [Avgerinos et al. 1993].

In different works, authors reported considerably lower limits of diclofenac quantification in plasma [Miller 1993] or in ocular fluid [Riegel and Ellis 1994]. However, these methods were not fully validated and these very low limits of detection using UV detection appear unrealistic near the full validated ones. Full validated methods include fluorescence detection, directly (limit of quantification 40 ng/ml in serum [Moncrieff 1992] or after derivatization (limit of detection 6 ng/ml in plasma [Wiese and Hermansson 1991]), or electrochemical detection, where the limit of detection is ≥ 1 ng/ml in plasma, synovial fluid and cerebrospinal fluid [Zecca et al. 1991].

Chmielewska et al. [2006] also described a full validated and very sensitive method

based on HPLC with electrochemical detection. The limit of quantification was 5 ng/ml and the detection limit was 2 ng/ml. However, this method applied a longer chromatographic run time and the extraction consumed 2.5 times more plasma than the method described in this work. Considering the high number of samples obtained in relative pharmacokinetics studies and the invariable need for speed associated with lower amount of human blood collected, the shorter chromatographic run and only 200 μ l of plasma used for sample extraction can be critical.

It is noteworthy that the protein precipitation extraction procedure was simple and cheaper and faster than SPE or even LLE. The method provides excellent analytical performance for diclofenac extraction providing mean analytical recovery of above 88.76% from spiked plasma containing 150, 1,500 and 2,500 ng/ml diclofenac. The extraction procedure proved to be appropriate for analyzing plasma samples containing different amounts of diclofenac. The reported analytical method has been successfully applied to human pharmacokinetic investigations. Moreover, bioequivalence was confirmed by the 90% CI for the ratios of the C_{max} and AUC_{0-t} values being within the acceptance range of 80–125%.

Conclusion

A protein precipitation extraction followed by HPLC with UV detection allows direct, rapid and sensitive quantification of diclofenac-cholestyramine in human plasma samples. Data obtained by this approach show that the method is reliable and was suitable for studies of pharmacokinetics after oral administration of 140 mg of diclofenac-cholestyramine and satisfactory quantitative determination of diclofenac in human plasma was achieved within therapeutic range. Using the protocol developed in this work, hundreds of samples can be analyzed daily, while only small quantities of plasma and solvent are consumed.

Based on the calculated 90% CI for C_{max} and AUC_{last} diclofenac-cholestyramine/Flotac® individual ratios are within 80–125% interval defined by the US Food and Drug Administration, it can be concluded that tested

diclofenac-cholestyramine formulation (70 mg diclofenac) is bioequivalent to Flotac® (Novartis Biociências S.A.), in regard to both extent and rate of absorption.

References

- Avgerinos A, Karidas T, Malamataris S. Extractionless high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma and urine. *J Chromatogr.* 1993; 619: 324-329.
- Blagbrough IS, Daykin MM, Doherty M, Patrick M, Shaw PN. High-performance liquid chromatographic determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in plasma and synovial fluid in man. *J Chromatogr.* 1992; 578: 251-257.
- Chmielewska A, Konieczna L, Plenis A, Bieniecki M, Lamparczyk H. Determination of diclofenac in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20: 119-124.
- el-Sayed YM, Abdel-Hameed ME, Suleiman MS, Najib NM. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in serum and its use in pharmacokinetic studies. *J Pharm Pharmacol.* 1988; 40: 727-729.
- Farker K, Merkel U, Schweer H, Haerting J, Madani SF, Eggers R, Muller UA, Seyberth HW, Hoffmann A. Effects of short-term treatment with diclofenac-colestyramine on renal function and urinary prostanoid excretion in patients with Type 2 diabetes. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002; 58: 85-91.
- Fowler PD, Dawes PT, John VA, Shotton PA. Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its hydroxylated metabolites during once-daily administration of a 100 mg slow-release formulation. *Eur J Clin Pharmacol.* 1986; 31: 469-472.
- Geiger UP, Degen PH, Sioufi A. Quantitative assay of diclofenac in biological material by gas-liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1975; 111: 293-298.
- Godbillon J, Gauron S, Metayer JP. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac and its monohydroxylated metabolites in biological fluids. *J Chromatogr.* 1985; 338: 151-159.
- Hinz B, Chevts J, Renner B, Wuttke H, Rau T, Schmidt A, Szelenyi I, Brune K, Werner U. Bioavailability of diclofenac potassium at low doses. *Br J Clin Pharmacol.* 2005; 59: 80-84.
- Hinz B, Rau T, Auge D, Werner U, Ramer R, Rietbrock S, Brune K. Aceclofenac spares cyclooxygenase 1 as a result of limited but sustained biotransformation to diclofenac. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 74: 222-235.
- John VA. The pharmacokinetics and metabolism of diclofenac sodium (Voltarol) in animals and man. *Rheumatol Rehab.* 1979; Suppl 2: 22-37.
- Lansdorp D, Janssen TJ, Guelen PJ, Vree TB. High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr.* 1990; 528: 487-494.
- Lee HS, Jeong CK, Choi SJ, Kim SB, Lee MH, Ko GI, Sohn DH. Simultaneous determination of aceclofenac and diclofenac in human plasma by narrowbore HPLC using column-switching. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 23: 775-781.
- Miller RB. High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma using automated column switching. *J Chromatogr.* 1993; 616: 283-290.
- Millership JS, Hare LG, Farry M, Collier PS, McElnay JC, Shields MD, Carson DJ. The use of hydrophilic lipophilic balanced (HLB) copolymer SPE cartridges for the extraction of diclofenac from small volume paediatric plasma samples. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 25: 871-879.
- Moncrieff J. Extractionless determination of diclofenac sodium in serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr.* 1992; 577: 185-189.
- Riegel M, Ellis PP. High-performance liquid chromatographic assay for antiinflammatory agents diclofenac and flurbiprofen in ocular fluids. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994; 654: 140-145.
- Roskar R, Kmetec V. Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 788: 57-64.
- Silva LC, Simoes IG, Lerner FE, Belem GR, de Moraes ME, De Nucci G. Comparative bioavailability of two different diclofenac formulations in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung.* 1999; 49: 920-924.
- Small RE. Diclofenac sodium. *Clin Pharm.* 1989; 8: 545-558.
- Sriwongjanya M, Bodmeier R. Effect of ion exchange resins on the drug release from matrix tablets. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998; 46: 321-327.
- Stierlin H, Faigle JW, Sallmann A, Kung W, Richter WJ, Kriemler HP, Alt KO, Winkler T. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. I. Isolation and identification of principal metabolites. *Xenobiotica.* 1979; 9: 601-610.
- Suarez-Otero R, Robles-San Roman M, Jaimes-Hernandez J, Oropeza-De La Madrid E, Medina-Penaloza RM, Rosas-Ramos R, Castaneda-Hernandez G. Efficacy and safety of diclofenac-cholestyramine and celecoxib in osteoarthritis. *Proc West Pharmacol Soc.* 2002; 45: 26-28.
- Todd PA, Sorkin EM. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1988; 35: 244-285.
- Torres-Lopez JE, Lopez-Munoz FJ, Castaneda-Hernandez G, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effect of diclofenac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282: 685-690.
- Wiese B, Hermansson J. Bioanalysis of diclofenac as its fluorescent carbazole acetic acid derivative by a post-column photoderivatization high-performance liquid chromatographic method. *J Chromatogr.* 1991; 567: 175-183.
- Willis JV, Kendall MJ, Flinn RM, Thornhill DP, Welling PG. The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979; 16: 405-410.
- Zecca L, Ferrario P, Costi P. Determination of diclofenac and its metabolites in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 1991; 567: 425-432.

CAPÍTULO II -



Bioavailability of two oral suspension and two oral tablet formulations of nimesulide 100 mg in healthy Brazilian adult subjects

H.M. Rigato¹, B.C. Borges², C.E. Sverdloff³, R.A. Moreno^{3,4}, E. Orpineli⁴ and N. Carter Borges^{1,4}

¹Department of Medical Clinic, State University of Campinas, Campinas;

²College of Medicine, Pontificia Universidade Católica, Sorocaba;

³Department of Pharmacology, State University of Campinas, and

⁴Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos, Campinas, SP, Brazil



Bioavailability of two oral suspension and two oral tablet formulations of nimesulide 100 mg in healthy Brazilian adult subjects

H.M. Rigato¹, B.C. Borges², C.E. Sverdlhoff³, R.A. Moreno^{3,4} and N. Carter do Carmo Borges^{1,4}

¹Department of Medical Clinic, State University of Campinas, Campinas,

²College of Medicine, Pontificia Universidade Católica, Sorocaba,

³Department of Pharmacology, State University of Campinas, and ⁴Synchrophar Assessoria e Desenvolvimento de Projetos Clínicos, Campinas, SP, Brazil

Key words
nimesulide –
pharmacokinetics –
HPLC – mass
spectrometry –
bioavailability

Abstract. A specific, fast and sensitive high performance liquid chromatography coupled to an electro spray tandem triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS) assay was developed for the determination of nimesulide in human plasma using carbamazepine as the internal standard. The lower limit of quantification (LLOQ) was 50 ng/ml and the calibration curves were linear in the concentration range of 50 – 6,000 ng/ml. Method inter-batch precision and accuracy ranged from 2.78 to 10.80%, and 94.92 to 102.46%, respectively. Intra-batch precision ranged from 2.44 to 7.74%, while intra-batch accuracy ranged from 91.70 to 104.73%. The analytical method was applied to evaluate the pharmacokinetic and relative bioavailability of two different pharmaceutical formulations containing nimesulide, one tablet and one oral suspension, manufactured by the same pharmaceutical factory, comparing with two reference Nisulid[®] formulations in 52 volunteers of both sexes previously divided in two groups of 26 subjects (13 men and 13 females each group). The test tablet formulation was not bioequivalent to the Nisulid[®] 100 mg tablet with respect to the rate of absorption, but was bioequivalent according to the extent of drug absorption. On the other hand, since the 90% CI for C_{max} , AUC_{0-1} and AUC_{inf} were within the 80 – 125% interval in the oral suspension study, it was concluded that test oral suspension were bioequivalent to Nisulid[®] 50 mg/ml with respect to both the rate and extent of absorption.

Introduction

Nimesulide (4-nitro-2-phenoxyethanesulfonamide) is a potent sulfonamide non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID).

Unlike most traditional NSAIDs that inhibit both cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 isoforms, nimesulide selectively blocks COX-2 which is induced in inflammatory conditions [16, 17]. By selectively inhibiting the activity of COX-2, nimesulide exerts potent anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities with much lower risk of gastrointestinal adverse effects [4, 5, 16, 17].

Nimesulide also exerts other actions including inhibition of oxygen-free radicals, decrease in the production of cytokines and degradative enzymes and possibly activation of glucocorticoid receptors [3, 4, 16, 17].

It is usually given in oral doses of 100 – 200 mg/daily. After single oral administration of the drug to fasting healthy volunteers at the doses of 100 and 200 mg, peak plasma concentrations are reached between 2 – 4 hours and 1 – 6 hours, respectively, accounting for the plasma concentrations of about 4 – 9 µg/ml and 6 – 14 µg/ml. The reported plasma elimination half-life is about 5 hours for both doses [1, 6, 19]. After oral administration, about 70% of the dose is excreted in feces and the remaining part in urine as hydroxynimesulide metabolite.

Nimesulide has been normally quantified in plasma samples or in pharmaceutical preparations using high-performance liquid chromatographic methods coupled to UV detection [8, 11]. The first method describing the quantification of nimesulide in human plasma using mass spectrometric detection was reported in 2001 [2]. Because of the high selectivity and sensitivity of LC/MS/MS, this method has been currently accepted as the

Received
July 11, 2008;
accepted
December 22, 2008

Correspondence to
N. Carter do Carmo
Borges, MD? ■■■
24 Cesar Bierrenbach
Street, Campinas,
SP 13015-025, Brazil
medney@
synchrophar.com

CP 200968 /23.11.2009

method of choice for the determination of organic molecules from complex biological matrices [10, 12, 13, 20].

Here, we describe a fast, sensitive and specific LC/MS/MS method for the quantification of nimesulide using carbamazepine as internal standard. This method was applied to evaluate the comparative bioavailability of two oral suspensions at 50 mg/ml (test formulation) against Nisulid[®] oral suspension and two 100 mg tablet formulations of nimesulide (test against the reference Nisulid[®] tablet).

Methods

Clinical study

Test products

A validated LC-MS/MS method was applied to evaluate the comparative bioavailability of two oral suspensions at 50 mg/ml (test formulation against the reference Nisulid[®]) and two 100 mg tablet formulations of nimesulide (test against the reference Nisulid[®]).

Subjects

52 volunteers (26 men and 26 females) aged between 18 and 50 years and within 15% variation in the ideal body weight were selected for the study. The volunteers were divided in two groups of 26 subjects (13 men and 13 females) and designated to take part in the oral suspensions formulations comparative bioavailability study (Group 1) or in the tablet one (Group 2). The Group 1 suspension consisted of individuals with the following characteristics (mean $\pm$ SD): 31.2 $\pm$ 7.9 years (range 18 – 48 years), IMC 23.6 $\pm$ 2.1 kg (range 19.4 – 26.9 kg), height between 154 and 189 cm (169 $\pm$ 10 cm) and weight between 50 and 88.3 kg (68.9 $\pm$ 10.0 kg). Group 2 consisted of individuals with the following characteristics: 30.0 $\pm$ 8.4 years (range 19 – 46 years), IMC 23.4 $\pm$ 2.6 kg (range 19.1 – 27.7 kg), height between 152 and 183 cm (166 $\pm$ 8.0 cm) and weight between 50.6 and 88.5 kg (66.1 $\pm$ 12.2 kg).

All volunteers were free from significant cardiac, hepatic, renal, pulmonary, neurological, gastrointestinal and hematological diseases, as assessed by general physical exami-

nation, ECG and the following laboratory tests: blood glucose, urea, uric acid, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase, L- γ -glutamyl-transferase (γ -GT), total bilirubin, albumin and total protein, triglycerides, total cholesterol, hemoglobin, hematocrit, platelet count, total and differential white cell counts, feces parasitological examination and routine urinalysis. All subjects were negative for HIV, HBV (except for serological scar) and HCV. All female volunteers were negative for pregnancy test (β HCG).

The study was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (1964), Tokyo (1975), Venice (1983), Hong Kong (1989), Somerset West (1996), Edinburgh (2000) revisions and the Resolutions No.196/96 and 251/97 of National Health Council – Health Ministry, Brazil. The clinical protocol was also approved by the State University of Campinas ethics committee and all participants provided written, informed consent.

Study design

The study was conducted in an open, randomized, single crossover balanced design with 14 days washout period between doses. During each period, the volunteers were hospitalized at 8:00 p.m. having an evening meal at 8:30 and after an overnight fast they received the medication starting at 7:00 a.m. Group 1 received a single oral dose of 2 ml of the test nimesulide suspension or reference formulation (100 mg of nimesulide). Group 2 received a single 100 mg nimesulide tablet. Water (200 ml) was given immediately after drug administration in both studies. All volunteers were required to remain fasting until 4 hours after dose when a standard meal was provided after 5 (lunch), 8 (coffee break) and 12 (evening meal) hours after dosing. No other food was permitted during the “in-house” period. Liquid consumption was permitted ad libitum 6 hours before and 2 hours after drug, but xanthine-containing drinks including tea, coffee and cola were prohibited. Food was also xanthine-free. Smoking was prohibited during the “in-house” period. All subjects were requested to stay in the clinic for a 24-h period after drug administration.

Blood samples (8 ml) from a suitable ante-cubital vein were collected by indwelling catheter into heparin containing tubes before and 0:10 h, 0:20 h, 0:30 h, 0:45 h, 1 h, 1:20 h, 1:40 h, 2 h, 2:30 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 14 h and 24 h post-dosing for Group 1 (oral suspension) study or 0:15 h, 0:30 h, 0:45 h, 1 h, 1:30 h, 2 h, 2:30 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 14 h and 24 h for Group 2 study (tablet formulations). The blood samples were centrifuged at approximately $2,000 \times g$ for 10 min at 4 °C and the plasma was stored at -20 °C until assayed for nimesulide content.

Analytical method

Chemicals and materials

Nimesulide and carbamazepine were obtained from Fundação Oswaldo Cruz-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saude (Brasil) as chemical reference standards (batches 1049 and 1038, respectively). All reagents and solvents were HPLC grade. Human plasma samples (normal, hyperlipemic and hemolyzed) came from distinct drug free subjects (six different lots) and were obtained from HEMORIO (Rio de Janeiro, Brazil).

Instrumentation

An LC/MS/MS system consisting of a liquid chromatograph (PS 210, Varian, Lexington, MA, USA) coupled to an electrospray tandem triple quadrupole mass spectrometer (model 1200L, Varian, Lexington, MA, USA) was used for detection and mass analysis operating with MS Workstation 6.42 software.

Chromatographic conditions

The liquid chromatography runs were performed on a Polaris MS Varian C18, 3 μ m analytical column (50 $\times$ 2.0 mm i.d.) coupled to a Polaris MS Varian, 3 μ m (2.0 $\times$ 2.0 mm i.d.) guard-column operating at 28 °C. The autosampler (Varian PS 410) was kept at 24 °C and the pressure of the system was maintained between 60 and 62 bars. Nimesulide and carbamazepine were eluted isocratically with a mixture of acetonitrile/water (60:40, v/v) and 12.22 mM formic acid. A

flow rate of 0.25 ml/min was used for sample analysis and the total run time was set to 3.0 minutes. Under these conditions, the retention times for nimesulide and carbamazepine were 1.35 and 0.89 min, respectively.

Mass spectrometric conditions

The mass spectrometer equipped with electrospray ionization (ESI) source was operated in the positive ion mode (ES+) and multiple reactions monitoring (MRM) mode. The tuning parameters were optimized for nimesulide and carbamazepine by infusing the standard solution of each compound into the stainless steel sample capillary of the electrospray source. The detector was set to 1,800 eV and Nitrogen was used as drying gas for solvent evaporation. The drying gas temperatures were kept at 398.5 °C and the housing temperature was set at 45 °C. The time scan was set to 1,200 msec for both compounds. The collision energies were -14 and -35, for nimesulide and carbamazepine, respectively. Based on the full scan MS/MS spectrum of each drug, the most abundant ions were selected and the mass spectrometer was set to monitor the transitions of the precursors to the product ions, as follows: m/z 309.2 $\rightarrow$ 154.0 for nimesulide and m/z 237.2 $\rightarrow$ 194.0 for carbamazepine. Data acquisition and analysis were performed using the MS Workstation 6.42 software.

Calibration standards and quality control

Standard stock solutions of nimesulide and carbamazepine were prepared, from separate weighting, in methanol/water (50/50, v/v) at concentration of 1.0 mg/ml, transferred to a dark glass flask and kept at -20 °C. Work solutions of nimesulide were prepared in methanol/water (50:50, v/v), applying a series of appropriate dilutions of stock solutions. Carbamazepine work solution was prepared diluting the stock solution in methanol/water (50:50, v/v) to obtain the final concentration of 4 μ g/ml.

All calibration curve samples (non-zero samples), except blank plasma, were prepared by spiking different blank plasma batches of the work nimesulide solutions to

yield final plasma concentrations of 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 4,000, 5,000 and 6,000 ng/ml. The analyses were carried out in duplicate for each concentration.

Quality control samples were prepared in blank plasma using a separate set of nimesulide work solution to obtain the final concentrations of 50, 100, 4,000, and 5,000 ng/ml (LLOQ, QCL, QCM and QCH, respectively). The spiked plasma samples (standards and quality controls) were extracted in each analytical batch along with the unknown samples.

The standard calibration curves were constructed using the peak area ratios of nimesulide and IS vs. nimesulide nominal concentrations of the nine plasma standards in duplicate. Linear regression analysis was performed to assess the linearity, as well as to generate the standard calibration equation: $y = ax + b$, where y is the peak-area ratio, x the concentration, a the slope and b is the intercept of the regression line. In addition, a blank (non-spiked sample) and a zero plasma sample (only spiked with IS) were run to eliminate the presence of interferences.

Sample extraction

The analyte was extracted from plasma samples, using a single liquid/liquid extraction technique. Frozen human plasma samples were thawed at room temperature and aliquots of 200 μ l of each calibrator, QC or volunteer sample were transferred to polypropylene tubes (Eppendorff) with 50 μ l of the internal IS (4 μ g/ml) diluted in methanol/water (50/50 v/v). After mixing, 1.5 ml of ethyl-acetate was added to all the tubes and extraction was performed by vortex mixing for 1 min. Samples were centrifuged at 2,000 g for 5 min at 4 °C. The organic phase was transferred to another set of clean glass tubes and evaporated to dryness under N₂ at 40 °C. The dry residues were reconstituted in 800 μ l of acetonitrile/water (50/50 v/v) and 5 mM ammonium acetate.

Method validation

Specificity

Presence of non-specific peaks and interference from plasma components were evalu-

ated in normal, lipemic and hemolyzed blank plasma samples. All samples were processed by the liquid-liquid extraction procedure and submitted to the described LC-MS-MS procedure to determine the extent to which endogenous plasma components may contribute to the interference at retention time of analyte and internal standard. Blank samples were compared to spiked normal plasma with nimesulide at LLOQ concentration and carbamazepine. On the day of the study all volunteers had a blank plasma sample collected before drug administration. Any interference at the analyte and IS retention time should not account for more than 20% of LLOQ and 5% of the peak response area in the IS concentration used in the method.

Recovery

The recovery was evaluated by calculating the mean of the response of five replicates of each QCL, QCM and QCH concentration and dividing the extracted sample mean response by the unextracted (spiked blank plasma extract) sample mean of the corresponding concentration. Comparison with the unextracted samples, spiked on plasma residues obtained after performing the full extraction process in blank plasma samples, was done in order to eliminate matrix effects, giving a true recovery.

Precision and accuracy

Precision and accuracy of this method were evaluated using three different batches of QCL, QCM and QCH of nimesulide, also including the lowest limit of quantification, LLOQ. For intra-batch assay precision and accuracy, eight replicates of quality control samples at the three concentration levels were assayed all at once within a day to obtain %CV and accuracy values. The inter-batch assay precision and accuracy were determined by analyzing mean values of quality control samples from three plasma batches, yielding the corresponding inter-batches %CV and accuracy values. The following criteria were used to assess the suitability of precision and accuracy: the %CV determined at each concentration level should not exceed 15%, except at the limit of quantification.

The LLOQ was determined for nimesulide, based on two criteria: (a) the analyte response at LLOQ had to be at least three times baseline noise; (b) the analyte response at LLOQ being determined with sufficient precision and accuracy, i.e., precision of 20% and accuracy of 80 – 120%. Calculations were based on five replicates of three blank plasma batches.

Stability assays

All stability assays were performed using five replicates of plasma spiked with nimesulide at low, medium and high QC concentrations. To be considered stable, the final results should reach the following acceptance condition: the %CV of both precision and accuracy determined at each concentration level should not exceed 15%. The percent of degradation was defined comparing sample concentration to the mean values obtained from fresh prepared ones at equivalent concentration.

Post-processing stability was evaluated in QC samples thawed at room temperature (22 °C) and extracted. All samples remained on the bench top for a time exceeding the maximum period of time expected for routine sample analysis (24 h).

For freeze-thaw stability of nimesulide plasma samples spiked with nimesulide were subjected to three freeze-thaw cycles of –20 °C. In each cycle, samples were frozen for 24 hours and allowed to thaw at controlled ambient temperature (22 °C). After complete thawing, samples were refrozen at –20 °C for additional 24 hours. This cycle was repeated three times. Aliquots of all samples were quantified at the end of the third freeze-thaw cycle.

The short-term storage stability was evaluated in spiked plasma samples kept at room temperature (22 °C) on the bench top for a time exceeding the maximum period of time expected for routine sample preparation (6 h). The long-term storage stability was assessed keeping the spiked plasma samples stored at –20 °C during 1, 2, 4, 8, 16 and 179 days, covering the entire period needed for the bioequivalence study, i.e., from the first day of volunteer sample collection up to the last day of sample analysis.

Nimesulide stock and work solutions were prepared and stored at –20 °C. Sample aliquots were analyzed after 179 days.

Pharmacokinetic analysis

The first-order terminal elimination rate constant (k_e) was estimated by linear regression from the points describing the elimination phase in a log-linear plot. Half-life ($t_{1/2}$) was derived from this rate constant ($t_{1/2} = \ln(2)/k_e$).

Bioequivalence between the two formulations was calculated for both oral suspension study and tablet formulation study by calculating individual test/reference ratios for the peak of concentration (C_{max}), area under curve (AUC) of plasma concentration until the last quantified nimesulide concentration (AUC_{0-t}), and the area under curve between the first sample (pre-dosage) and infinite (AUC_{inf}). The C_{max} and the time taken to achieve this concentration (t_{max}) were obtained from the data fitting analysis of the curves. The areas under the nimesulide plasma concentration vs. time curves from 0 to the last detectable concentration (AUC_{0-t}) were calculated by applying the linear trapezoid rule. Extrapolation of these areas to infinity (AUC_{inf}) was done by adding the value C_{last}/k_e to the calculated AUC_{0-t} (where C_{last} = the last detectable concentration). The AUC and C_{max} data for the two formulations were analyzed by ANOVA to establish whether the 90% CI of the ratios was within the 80 – 125% interval indicating bioequivalence as proposed by the US Food and Drug Administration. Parametric analyses of ln-transformed arithmetic means between test and reference formulations were also performed.

The software used included R2.2, Microsoft Excel (v. 7.0), Tinn-R, Win-Edit, Scientific Work Place and Equivtest.

Results

Clinical observations

The post-study clinical and laboratory evaluations showed no significant variations that could be attributed to treatment. Both formulations were well tolerated at the adminis-

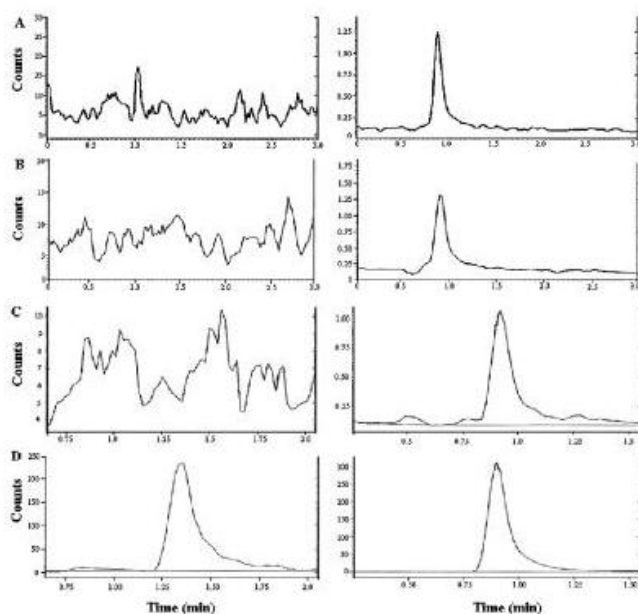


Figure 1. Representative ion chromatograms (MRM) illustrating the retention times for nimesulide (right panels; m/z 309.2 – 154.0) and carbamazepine (left panels; m/z 237.2 – 194.0) in: (A) blank normal human plasma; (B) blank lipemic human plasma; (C) blank hemolyzed human plasma and (D) normal human plasma spiked with nimesulide (50 ng/ml) or carbamazepine (1 µg/ml). The retention times for nimesulide and carbamazepine were 1.35 and 0.89 min, respectively. When a significant peak was identified the chromatogram was zoomed close to the specific retention time.

Table 1. Accuracy and precision data for nimesulide QC samples, including the LLOQ, obtained during the method validation in normal human plasma.

	Intra-run accuracy ^a	Inter-run accuracy ^b	Intra-run precision ^c (%CV)	Inter-run precision ^b (%CV)
QC samples				
QC-LLOQ	91.70	96.68	7.47	10.80
QCL	104.73	102.46	4.01	2.78
QCM	102.23	97.74	2.44	4.23
QCH	100.29	94.92	7.74	5.08

^a(n = 8), expressed as (found concentration / nominal concentration) × 100, ^bvalues obtained from all 3 runs (n = 24), ^cn = 8.

tered doses and no significant adverse reactions were observed or reported. No clinically relevant change was observed in any measured biochemical parameter. A total of 50 volunteers finished the study, 25 for Group 1

and 25 for Group 2. One volunteer did not participate in the second period and dropped out. The second volunteer showed a pregnancy-positive result before the second confinement period and also dropped out.

HPLC analysis

Specificity or selectivity

Under the conditions applied in this work, the retention times for nimesulide and IS were 1.35 and 0.89 min, respectively. All chromatograms were free from interferences at the retention times of nimesulide or internal standard carbamazepine. Both compounds eluted as completely resolved peaks and no peak tailing was noticed enabling the use of either peak height or peak area in the calculation of standard curves. The absence of any peak in the normal, lipemic and hemolyzed blank plasma samples at the retention time of nimesulide and IS indicates the specificity and selectivity of the analytical method in plasma (Figure 1).

Linearity

Good linear relationships were found when the peak area ratios of nimesulide to the internal standard were plotted versus the nimesulide plasma concentration in all concentration applied to construct the standard curve. The simplest regression method for the calibration curves of the nimesulide was $Y = a + bx$ from 50 – 6,000 ng/ml. Correlation coefficient was between 0.995 and 0.998 for all independent analytical runs. The LOQ for nimesulide was 50 ng/ml at a signal to noise ratio over 5.

Precision and accuracy

The intra- and inter-days accuracy and precision values of the assay methods are presented in Table 1. Intra-batch precision and accuracy of the assay were measured for nimesulide at each QC level (100, 4,000 and 5,000 ng/ml), including the LLOQ sample (50 ng/ml). Calculated intra-batch precision and accuracy (%CV) of the method ranged from 2.44 to 7.74%, and 91.70 to 104.73%,

CP 200968 /23.11.2009

Table 2. Stability tests showing the nimesulide concentrations before and after three cycles of freeze and thaw (freeze and thaw stability), post-processing test, after 6 h at room temperature (short term) or after 179 days stored at -20°C (long-term stability). The standard stock solutions were also analyzed after 179 days at -20°C .

	QCL (100 ng/ml)	QCM (4,000 ng/ml)	QCH (5,000 ng/ml)
Freeze-thaw			
Fresh conc. (%CV)	105.55 (7.96)	4,079.54 (9.04)	4,799.55 (6.55)
Test samples (%CV)	94.39 (3.58)	3,791.38 (6.06)	4,863.15 (6.24)
Variation (%)	-10.58	-7.06	1.33
Post-processing			
Fresh conc. (%CV)	108.74 (6.92)	4,074.15 (3.38)	5,298.22 (6.08)
Test samples (%CV)	104.52 (4.32)	4,037.92 (8.84)	4,849.54 (2.24)
Variation (%)	-3.88	-0.89	-8.47
Short-term			
Fresh conc. (%CV)	90.75 (5.34)	4,144.96 (3.47)	4,739.27 (3.75)
Test samples (%CV)	93.47 (7.55)	3,756.14 (3.43)	4,687.96 (6.19)
Variation (%)	3.01	-9.38	-1.08
Long-term			
Fresh conc. (%CV)	95.89 (6.73)	3,858.65 (1.76)	4,750.17 (3.58)
Test samples (%CV)	89.03 (4.01)	4,032.94 (4.02)	4,799.69 (5.14)
Variation (%)	-7.15	4.52	1.04
Stock solution			
Fresh conc. (%CV)	102.11 (7.69)	3,858.39 (7.66)	4,590.00 (3.62)
Test samples (%CV)	90.83 (8.08)	4,162.47 (6.25)	4,782.10 (4.66)
Variation (%)	-11.05	7.88	4.18

respectively. Method inter-batch precision (%CV) and accuracy ranged from 2.78 to 10.80%, and 94.92 to 102.46%, respectively. These results, as well as the respective values for the percentage accuracy, were within the acceptance criteria for precision and accuracy.

Recovery

The extraction efficiency was determined by comparison of the peak areas of the spiked plasma samples with those of unextracted nimesulide solution in solvent. The mean recoveries for nimesulide in spiked blank plasma samples were found to be 79.71% (%CV 8.80) for QCL, 74.59% (%CV 4.00) for QCM and 73.09% (%CV 4.65) for QCH. The recoveries were consistent throughout the replicates as demonstrated by the %CV observed throughout the analysis of the five

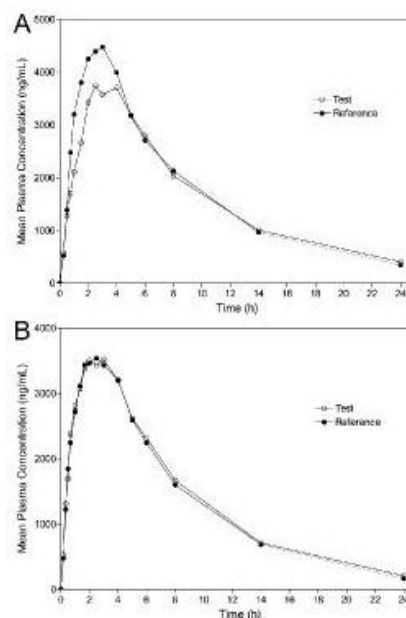


Figure 2. Mean plasma nimesulide concentration vs. time curves obtained from 25 healthy volunteers following the oral administration of a single 100 mg dose in a comparative bioavailability study of two tablet formulations (A) or two oral suspension formulations (B).

samples in each run. Recoveries were not dependent on the concentration, and consequently resulted in good linearity of the calibration curve.

Stability

Stability tests showed that nimesulide samples did not suffer significant degradation in spiked plasma after three cycles of freeze and thaw (freeze and thaw stability test), under the conditions of analysis (post-processing stability test), after 6 h at room temperature or after 1, 2, 4, 8, 16 and 179 days stored at -20°C (long-term stability test). The standard stock solutions were also stable after 179 days at -20°C . Table 2 show the results for the stability tests. In this table, the long term stability is represented by the results obtained after 179 days at -20°C .

Pharmacokinetic evaluation

Applicability of this method was confirmed by analyzing true samples obtained af-

Table 3. Arithmetic mean and 90% CI of the pharmacokinetic parameters of nimesulide obtained from 25 volunteers after administration of each 100 mg nimesulide tablet formulation.

Pharmacokinetics parameters	Test formulation		Reference formulation	
	Mean	SD	Mean	SD
C_{max} (ng/ml)	4,520.34	1,201.54	5,306.88	1,632.55
t_{max} (h)	3.32	1.48	2.23	0.99
$t_{1/2}$ (h)	5.56	4.03	4.80	3.48
AUC_{0-1} ((ng x h)/ml)	39,148.71	18,910.76	41,833.69	21,900.48
AUC_{inf} ((ng x h)/ml)	45,746.54	30,318.02	47,185.58	33,100.93

Table 4. Arithmetic mean and 90% CI of the pharmacokinetics parameters of nimesulide obtained from 25 volunteers after administration of each 100 mg nimesulide oral suspension formulation.

Pharmacokinetics parameters	Test formulation		Reference formulation	
	Mean	SD	Mean	SD
C_{max} (ng/ml)	4,307.58	980.55	4,305.56	1,031.80
t_{max} (h)	2.85	1.23	1.92	1.00
$t_{1/2}$ (h)	4.54	2.49	4.52	3.00
AUC_{0-1} ((ng x h)/ml)	35,072.73	14,029.68	32,288.21	12,602.18
AUC_{inf} ((ng x h)/ml)	37,069.82	16,416.64	35,013.14	19,496.32

Table 5. Nimesulide geometric mean of the individual C_{max} , AUC_{0-1} , AUC_{0-inf} and ratios (test/reference formulation) and the respective 90% confidence intervals (CI) obtained from 25 volunteers after administration of each 100 mg nimesulide tablet formulation or 100 mg nimesulide oral suspension.

Nimesulide/Nisulid® tablet formulation				
	Geometric mean (%)	90% CI	Power (%)	%CV
C_{max} % ratio	85.96	77.54 – 95.30	97.09	21.49
AUC_{0-1} % ratio	93.91	84.42 – 104.46	95.45	22.96
AUC_{inf} % ratio	96.62	85.18 – 109.59	88.12	27.43
Nimesulide/Nisulid® oral suspension formulation				
	Geometric mean (%)	90% CI	Power (%)	%CV
C_{max} % ratio	100.1	91.05 – 110.15	98.46	19.82
AUC_{0-1} % ratio	107.7	99.74 – 116.39	99.79	16.02
AUC_{inf} % ratio	107.6	98.24 – 117.90	98.83	18.97

ter administration of 100 mg of nimesulide to healthy volunteers. The mean nimesulide plasma concentration vs. time curves obtained after a single oral dose of each tablet

formulation are shown in Figure 2A and the mean nimesulide plasma concentration vs. time curves obtained after a single oral dose of each oral suspension formulation are shown in Figure 2B. In the case of the tablet formulations, significantly lower concentrations for the test formulation compared to the reference Nisulid®, mainly in the region of the C_{max} concentration, were observed. On the other hand, the plasma concentration of nimesulide did not differ significantly after administration of both oral suspension formulations (test formulation and reference formulation).

The mean pharmacokinetic parameters for the both brands of nimesulide tablets are summarized in Tables 3 and 5. Briefly, the geometric mean and respective 90% CI of nimesulide test/reference percent ratios were 85.96% (77.54 – 95.30%) for C_{max} and 93.91% (84.42 – 104.46%) for AUC_{0-1} . The C_{max} results were found to be outside the FDA acceptable range of 80 – 125% for evaluation of bioequivalence.

The mean pharmacokinetic parameters for both brands of nimesulide oral suspensions are summarized in Tables 4 and 5. Briefly, the geometric mean and respective 90% CI of nimesulide test/reference percent ratios were 100.1% (91.05 – 110.15%) for C_{max} and 107.7% (99.74 – 116.39%) for AUC_{0-1} . In this case, the results were found to be within the FDA acceptable range of 80 – 125% for evaluation of bioequivalence.

Discussion

Switching the patient from one pharmaceutical formulation of the same drug to another, may lead to therapeutic failure in some cases. To minimize the risk, careful pharmacokinetic studies are desired in the pre-registration period and afterwards. A randomized, crossover design with a 2-week wash-out period between each dose was applied. Plasma samples obtained before dosing and at various appropriate time points up to 24 h, were analyzed for nimesulide content by a high-performance liquid chromatographic method with LC-MS-MS detection. The pharmacokinetics and relative bioavailability of two different pharmaceutical formulations containing nimesulide, one tablet and one oral

suspension, manufactured by the same pharmaceutical factory, were compared with two reference Nisulid[®] formulations. These studies require highly selective and sensitive analytical methods that provide high accuracy and precision for the determination of drug levels.

The combination liquid chromatography/mass spectrometry is currently accepted as being a powerful means of determining organic molecules from complex biological matrices [10, 12, 13, 20]. LC/MS/MS was the method of choice because it offers high specificity and sensitivity, good precision and accuracy, and a wide dynamic range, in addition to high throughput, which is an essential characteristic in bioequivalence studies. Several analytical methods for the quantitative determination of nimesulide using UV [7, 8, 14, 18] and UV/Vis [11, 15] have been reported. Some of these methods validated higher LLOQ [11, 14, 15, 18]. In spite of using UV detection, the validated method described by Giachetti and Tenconi [7] describes a lower limit of quantification (25 ng/ml). However, the chromatographic run was accomplished in 30 min, 10 times longer than our method. The same time problem is observed in a 2006 publication of Pavan Kumar et al. [14], showing a 35 min chromatographic run and LLOQ (500 ng/ml) 10 times higher than the LLOQ presented in this work.

A pharmacokinetic study reporting the quantification of nimesulide in human plasma by LC/MS/MS was published in 2001 [2]. In that work, the authors described a lower limit of quantification for nimesulide (10 ng/ml) compared to the LOQ described in this work (50 ng/ml). However, this difference in sensitivity does not compromise the analysis of plasma samples after administration of the therapeutic nimesulide dose applied in the pharmacokinetic studies described in this work.

To compare the bioavailability of two nimesulide oral suspension (50 mg/ml) formulations and two nimesulide tablet (100 mg) formulations (Nisulid[®] as reference formulation), 52 volunteers of both sexes were divided in two groups of 26 subjects (13 men and 13 females each group) and a single 100-mg oral dose of nimesulide was given in both pharmacokinetic studies. The tolerability of all preparations was excellent as in-

dicated by the absence of any significant side effect.

The respective 90% confidence intervals of the ratios of geometric means of nimesulide C_{max} were out of acceptable limits for the test tablet in comparison with the reference formulation. In spite of the 90% confidence interval for the AUC_{0-t} and AUC_{0-inf} values of nimesulide absorbed from both test and reference tablets were included in the 80 – 125% interval proposed by the Food and Drug Administration (FDA), the test tablet formulation was considered not bioequivalent to the reference Nisulid[®]. On the other hand, the study comprising the oral suspension formulations, confidence intervals of the ratios of geometric means of C_{max} , AUC_{0-t} and AUC_{inf} values of nimesulide absorbed from both test and reference formulations were included in the 80 – 125% interval.

In this study, the oral suspension and the tablet formulations were not compared to each other. However, Jovanovic et al. [9] compared the pharmacokinetics and relative bioavailability of three different pharmaceutical formulations containing nimesulide, manufactured by the same pharmaceutical factory. This study was performed prospectively in only 12 healthy subjects of both sexes. A single 100-mg oral dose of nimesulide was given to the volunteers in the form of conventional tablets, mouth dissolving tablets or as a reference suspension. They found that only the mouth dissolving tablets were considered bioequivalent to the suspension according to only the extent of drug absorption. A statistically significant difference between C_{max} values was also observed. In addition, the respective confidence intervals of the ratios of geometric means of C_{max} and AUC_{0-inf} of nimesulide were out of acceptable limits either for conventional tablets in comparison with suspension or for mouth dissolving tablets when compared with conventional tablets [9].

Conclusion

A very simple and fast method involving the LLE protocol and LC/MS/MS analysis for the nimesulide quantification in human plasma using carbamazepine as the internal standard was fully validated. This method is

in agreement with the high sensitivity, specificity and high throughput analysis required for pharmacokinetic studies and hundreds of samples can be analyzed daily, while only small quantities of plasma and solvent are consumed. The method developed here was linear over the concentration ranges of 50 – 6,000 ng/ml.

Since the 90% CI for the $C_{\max}$ ratio was outside the 80 – 125% interval proposed by the US Food and Drug Administration, it is concluded that the nimesulide 100 mg tablet formulation is not bioequivalent to the Nisulid® 100 mg tablet with respect to the rate of absorption. This formulation is bioequivalent to the reference tablet according to only the extent of drug absorption.

On the other hand, since the 90% CI for $C_{\max}$, AUC_{0-12h} and $AUC_{0-\infty}$ were within the 80 – 125% interval in the oral suspension study, it was concluded that test 50 mg/ml oral suspension were bioequivalent to Nisulid® 50 mg/ml oral suspension with respect to both the rate and extent of absorption. Indeed, concerning the comparable amounts of nimesulide available in the systemic circulation after application of these formulations, one might not expect therapeutic failure after switching the patient from one to another.

References

- [1] Alessandrini A, Ballarin E, Bastianon A, Miglia-vacca C. Comparison of the bioavailability of 2 different equal-dosage oral pharmaceutical forms of nimesulide in healthy volunteers. *Clin Ter.* 1986; 118: 177-182.
- [2] Barrientos-Astigarraga RE, Vannuchi YB, Sucupira M, Moreno RA, Muscara MN, De Nucci G. Quantification of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence studies. *J Mass Spectrom.* 2001; 36: 1281-1286.
- [3] Bennett A. Overview of nimesulide. *Rheumatology (Oxford).* 1999; 38 (Suppl): 1-3.
- [4] Bennett A, Vila D. Nimesulide – a non-steroidal anti-inflammatory drug, a preferential cyclooxygenase-2 inhibitor. *Vutr Boles.* 2000; 32: 33-36.
- [5] Bennett A, Villa G. Nimesulide: an NSAID that preferentially inhibits COX-2, and has various unique pharmacological activities. *Expert Opin Pharmacother.* 2000; 1: 277-286.
- [6] Gandini R, Montalto C, Castoldi D, Monzani V, Nava ML, Scaricabarozzi I, Vargiu G, Bartosek I. First dose and steady state pharmacokinetics of nimesulide and its 4-hydroxy metabolite in healthy volunteers. *Farmaco.* 1991; 46: 1071-1079.
- [7] Giachetti C, Tenconi A. Determination of nimesulide and hydroxynimesulide in human plasma by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 1998; 12: 50-56.
- [8] Jaworowicz DJ Jr, Filipowski MT, Boje KM. Improved high-performance liquid chromatographic assay for nimesulide. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 723: 293-299.
- [9] Jovanovic D, Kilibarda V, Todorovic V, Potrebic O. A pharmacokinetic comparison of three pharmaceutical formulations of nimesulide in healthy volunteers. *Vojnosanit Pregl.* 2005; 62: 887-893.
- [10] Kerns EH, Di L. Utility of mass spectrometry for pharmaceutical profiling applications. *Curr Drug Metab.* 2006; 7: 457-466.
- [11] Khaksa G, Udupa N. Rapid and sensitive method for determination of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 727: 241-244.
- [12] Marzo A, Bo LD. Tandem mass spectrometry (LC-MS-MS): a predominant role in bioassays for pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung.* 2007; 57: 122-128.
- [13] Maurer HH. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 388: 1315-1325.
- [14] Pavan Kumar VV, Vinu MC, Ramani AV, Mullangi R, Srinivas NR. Simultaneous quantitation of etoricoxib, salicylic acid, valdecoxib, ketoprofen, nimesulide and celecoxib in plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20: 125-132.
- [15] Ptacek P, Macek J, Klima J. Rapid and simple high-performance liquid chromatographic determination of nimesulide in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001; 758: 183-188.
- [16] Rainsford KD. Nimesulide – a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. *Curr Med Res Opin.* 2006; 22: 1161-1170.
- [17] Rainsford KD. Relationship of nimesulide safety to its pharmacokinetics: assessment of adverse reactions. *Rheumatology (Oxford).* 1999; 38 (Suppl): 4-10.
- [18] Rolim CM, Porta V, Storpirtis S. Quantitation of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection and its application to a bioequivalence study. *Arzneimittelforschung.* 2007; 57: 537-541.
- [19] Ward A, Brogden RN. Nimesulide. A preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in inflammation and pain states. *Drugs.* 1988; 36: 732-753.
- [20] Zhong D, Chen X, Gu J, Li X, Guo J. Applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in drug and biomedical analyses. *Clin Chim Acta.* 2001; 313: 147-150.

3. DISCUSSÃO



O maior objetivo dos estudos de bioequivalência é garantir fármacos com padrões farmacocinéticos e qualidades comprovadas. No presente trabalho foram utilizados como matriz biológica o plasma humano para quantificação farmacocinética dos fármacos através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (**CLAE**).

A quantificação do diclofenaco de colestiramina descrito no **Capítulo 1** foi feita com um espectrofotômetro de ultravioleta visível (**UV-VIS**) e a das duas formulações de nimesulide descrito no **Capítulo 2**, com espectrômetro de massa (**EM/EM**).

O primeiro é baseado na **absorbância** da luz pelo analito, cujo espectrofotômetro só detecta os compostos que absorvem no comprimento de onda em que estiver ajustado. É muito utilizado em CLAE, pois a grande maioria das substâncias absorve radiação UV. O segundo é determinado pela **abundância** da massa molecular de compostos químicos através da separação pela razão massa/carga (m/z) das moléculas ionizadas que são formadas após vaporização e aplicação de um potencial elétrico.

Devido sua alta seletividade, especificidade e precisão atualmente é o método de quantificação mais utilizado em estudos de bioequivalência. Apesar do alto custo do CLAE-EM/EM e de sua assistência técnica é compensado pelo seu curto tempo de operação no processamento das amostras⁽⁸³⁾.

A utilização do padrão interno nos estudos determina uma compensação de diferenças no comportamento do analito durante todo o processo desde sua extração, eventuais falhas no processo de injeção e em diferenças na quantificação. Padrões internos mais utilizados são fármacos de estrutura química semelhante ao analito.

A quantificação das amostras de medicamentos foi realizada de acordo com os parâmetros apresentados na **Tabela 2** e **Capítulos 1 e 2**. Nesses capítulos encontram-se os dados e resultados, gráficos, tabelas e análise estatística correspondentes.

Tabela 2. Características gerais da metodologia empregada para quantificação dos diferentes fármacos

	Diclofenaco	Nimesulide Comprimidos	Nimesulide Suspensão Oral
Método	CLAE – UV-VIS	CLAE-EM/EM	CLAE-EM/EM
Matriz Biológica	Plasma	Plasma	Plasma
Padrão Interno	Indometacina	Carbamazepina	Carbamazepina
Tipo de Extração	Precipitação de proteína	Líquido-líquido	Líquido-líquido
Fase Móvel	Acetonitrila	Acetonitrila/Água	Acetonitrila/Água
Volume Injetado	20µL	20µL	20µL
Tempo de retenção Analito (min.)	6	1,35	1,35
Tempo de retenção Padrão Interno (min.)	7	0,89	0,89
Tempo corrida analítica (min.)	8	3	3
LOQ	50ng/mL	50ng/mL	50ng/mL
Detector	UV (276nm)	TRANSIÇÃO m/z 309.2 > 154.0	TRANSIÇÃO m/z 309.2 > 154.0

Apesar de serem apresentados diferentes métodos de extração e quantificação, o limite de quantificação (LOQ) de 50ng/mL obtido nos estudos foi suficiente para aplicação nos estudos de bioequivalência. A extração por

precipitação de proteínas é mais simples e barata ao passo que a líquido-líquido envolve mais etapas e reagentes.

O tempo de retenção do analito e do seu padrão interno resulta em diferentes tempos de corrida analítica e desempenha um papel fundamental na velocidade de processamento das amostras de plasma, tal velocidade foi mais rápida com o método validado para o nimesulide de detecção com espectrômetro de massas, sendo 2,7 vezes mais veloz que o método validado para do diclofenaco de colestiramina.

Foi apresentado no **Capítulo 1** pela primeira vez na literatura um estudo de bioequivalência do diclofenaco de colestiramina, apesar de já terem sido realizados estudos de biodisponibilidade relativa entre diferentes formulações farmacêuticas do diclofenaco⁽⁸⁴⁾.

O tempo de *washout* dos estudos respeitou o intervalo mínimo de sete meias-vidas de eliminação do fármaco⁽³⁶⁾, resultando em um intervalo de uma semana entre as tomadas do diclofenaco de colestiramina e duas semanas para o nimesulide. A quantidade de voluntários para os três estudos foram suficientes para assegurar dentro do coeficiente de variação do fármaco, um número estatisticamente significativo⁽³⁶⁾ de voluntários. 26 voluntários de ambos os sexos foram selecionados em cada, ocorrendo um *dropout* para cada formulação de nimesulide, não ultrapassando o limite de 5% dos voluntários do estudo⁽⁸⁵⁾.

Depois da quantificação de 780 amostras para o estudo do diclofenaco de colestiramina e 1664 dos estudos do nimesulide foram traçados as curvas individuais de concentração versus tempo para cada voluntário, cuja média da curva esta exposta nos respectivos **Capítulos**. Através da determinação do perfil farmacocinético dos medicamentos comprovamos que em duas tomadas diárias

obtemos a concentração em níveis terapêuticos. A simplificação da prescrição de comprimidos duas vezes ao dia oferece vantagens em termos de conforto e adesão ao tratamento, particularmente em pacientes que tomam múltiplas medicações⁽⁸⁶⁾.

Estão consolidados na **Tabela 3** os dados farmacocinéticos dos **Capítulos**. Observamos que a apresentação farmacêutica de suspensão oral nos permite uma velocidade de absorção mais rápida que a formulação comprimido. A Meia-vida das formulações de nimesulide é aproximadamente o dobro da formulação de diclofenaco. Entretanto é devido a sua associação com a colestiramina que permite concentrações plasmáticas terapêuticas para duas tomadas diárias⁽³³⁾.

Relativamente ao nimesulide, o diclofenaco de colestiramina demonstra uma rápida eliminação do plasma, contudo possui uma longa Meia-vida no local de inflamação o que pode explicar a duração de seu efeito terapêutico⁽⁷⁹⁾.

Tabela 3. Farmacocinética dos fármacos estudados.

	Diclofenaco Média / IC 90%	Nimesulide Comprimidos Média / SD	Nimesulide Suspensão Oral Média /SD
C_{MAX} (ng/ml)	459,55 396,84 – 522,27	4.520,34 / 1,201,540	4.307,58 / 980,55
T_{MAX}	1,91 1,68 – 2,14	3,32 / 1,48	2,85 / 1,23
T_{1/2} (Meia-Vida)	2,40 1,47 – 3,34	5,56 / 4,03	4,54 / 2,49
ASC_{ULTIMO} ((ngxh)/ml)	1098,34 952,67 – 1.244,01	39.148,71 / 18.910,76	35.072,73 / 14.029,68
ASC_{INF} ((ngxh)/ml)	1318,04 1.115,30 – 1.520,78	45.746,54 / 30,3185,58	37.069,82 / 16.416,64

Na **Tabela 4** estão colocados os valores das médias geométricas da razão da formulação teste / formulação referência.

Tabela 4. Valores das médias geométricas da razão da formulação teste / formulação referência

	Média Geométrica T/R (%)	IC 90%	CV (%)
DICLOFENACO			
C_{MAX}	100,22	84,99 – 118,19	~ 35,82
ASC_{ULTIMO}	90,53	82,86 – 98,91	~18,82
NIMESULIDE COMPRIMIDOS			
C_{MAX}	85,96	77,54 – 95,30	21,49
ASC_{ULTIMO}	93,91	84,42 – 104,46	22,96
ASC_{INF}	96,62	85,18 – 109,59	27,43
NIMESULIDE SUSPENSÃO ORAL			
C_{MAX}	100,1	91,05 – 110,15	19,82
ASC_{ULTIMO}	107,7	99,74 – 116,39	16,02
ASC_{INF}	107,6	98,24 – 117,90	18,97

O parâmetro do C_{MAX} para a formulação comprimidos de nimesulide não se enquadrou dentro do intervalo de confiança aceito pela ANVISA⁽⁴⁰⁾, desta forma não foi atestada sua bioequivalência. Para atestá-la, 90% do IC devem se encontrar dentro da faixa de 80–125%. Dentro do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) o nimesulide é um fármaco que tem a classificação II no critério de solubilidade (baixa solubilidade e alta permeabilidade) podendo gerar problemas para suas formulações comprometendo sua biodisponibilidade⁽⁸⁷⁾.

Os estudos de bioequivalência obrigatórios para as formulações genéricas desde sua criação em 1999⁽⁸⁸⁾, também passaram a ser obrigatórios para as formulações de similares em 2003^(89, 90), estima-se que até 2014 todos os fabricantes de medicamentos similares já terão atendidos aos critérios de adequação⁽⁹¹⁾, ou seja, tenham comprovação da biodisponibilidade relativa, através do estudo de bioequivalência. Com isso teremos disponíveis em médio prazo mais medicações de confiabilidade comprovada, evitando que uma medicação referência ou genérica sejam substituídas erroneamente por uma formulação que não seja considerada equivalente terapêutico.

Desde a criação da lei dos genéricos, seu emprego pelos prescritores e pela população tem sido cada vez maior, gerando uma grande economia com gastos com medicamentos. Após 3 anos decorridos dos primeiros registros, observou-se que o preço dos genéricos era cerca de 40% menor em comparação aos medicamentos referência⁽⁹²⁾. Atualmente a biodisponibilidade e a bioequivalência entre as formulações genéricas são vistos como temas mais comuns e a sua confiabilidade aumenta diretamente com o aumento de sua produção e consumo. Os AINEs são fármacos de tratamento sintomático não interferindo diretamente na evolução da doença, desta forma sua equivalência terapêutica não é tão crítica quanto os medicamentos de ação cardiovascular⁽⁹³⁾.

Em contraste com o grande avanço da qualidade e confiabilidade das formulações genéricas o controle sobre sua dispensação ainda é motivo de preocupação, pois em sua maioria podem ser facilmente adquiridos nas farmácias sem receituário, permitindo que a população leiga faça uso de AINEs sem ao menos ter passado por orientação de um profissional habilitado.

Depois de alertas de reações adversas envolvendo os COXIBEs feitos por órgãos de controle de medicamentos em níveis mundiais (FDA e EMA), em 2008 os COXIBEs comercializados no Brasil (*Arcoxia*[®] e *Celebra*[®]) foram reclassificados de venda sob **prescrição médica** para **venda sob retenção de receita médica** (receituário C1) e tiveram adequação do texto da bula notadamente quanto aos aspectos pressóricos, no caso do *Arcoxia*[®] e quanto os aspectos de uso em gravidez, amamentação e limitação do tempo de tratamento para as diferentes indicações no caso do *Celebra*[®](27). Tais medidas refletiram diretamente no controle de dispensação desses fármacos.

Dentre os fármacos estudadas, clinicamente, o nimesulide requer uma atenção maior, pois desde 2002 a EMA está emitindo constantes avisos, desenvolvendo estudos, modificando apresentações comerciais e bulas culminando na retirada do mercado de alguns países membros devido sua toxicidade hepática.

Pelo fato do nimesulide não ser comercializado nos Estados Unidos devido sua hepatotoxicidade⁽⁵³⁾ tampouco no Canadá por também não ser solicitada sua comercialização⁽⁹⁴⁾, as observações sobre suas reações adversas se concentram nos países da União Européia onde a EMA faz sua monitorização desde 2002. Esse monitoramento teve início após a Finlândia emitir um alerta de 109 reações adversas relacionados ao nimesulide sendo que, 66 eram reações hepáticas, incluindo RAM graves como: hepatite e falência hepática que resultaram em dois transplantes. Essas morbidades levaram à Finlândia a suspensão de comercialização em Março de 2002⁽⁷⁸⁾.

Em 10 de Abril de 2002 a Finlândia notificou a CPMP e a EMA foi aberta uma reavaliação sobre risco/benefício do nimesulide principalmente no que se

relaciona a sua toxicidade hepática. Simultaneamente a Espanha suspendeu sua comercialização. A CHMP após ampla discussão e revisões, estabeleceu que a dose máxima diária fosse à posologia oral de 100mg duas vezes ao dia, retirando do mercado dosagem oral de 200mg e contra indicando seu uso em pacientes com problemas hepáticos⁽⁷⁸⁾. No Brasil a formulação similar oral em cápsula de 200mg está disponível no mercado⁽⁹⁵⁾ e nenhum alerta foi dado com relação ao risco deste fármaco causar problemas hepáticos graves.

Em 2007 a EMA finalizou a revisão da segurança hepática do nimesulide e concluiu que os benefícios superam os riscos, porem seria necessário limitar a duração de sua prescrição e restringir seu uso para garantir que o risco de pacientes desenvolverem problemas hepáticos se mantenha no mínimo. Em Maio deste mesmo ano, a Irlanda suspendeu a comercialização do nimesulide⁽⁹⁶⁾ devido notificações de reações adversas graves que afetam o fígado e novamente a EMA e o CHMP foram notificadas. Tal notificação culminou na abertura de uma nova avaliação para concluir se a ação tomada pela Irlanda deveria ser implementada em toda a União Européia. Depois de analisadas todas as evidências disponíveis concluíram que as informações não suportavam a suspensão de todas as autorizações de comercialização na União Européia, entretanto seria necessário adequar às autorizações e informar tanto os médicos quanto os pacientes quanto ao risco de injúria hepática. O CHMP recomendou que o tratamento com nimesulide fosse limitado em 15 dias e que os *blisters* contenham no máximo 30 doses⁽⁹⁷⁾.

Em 2009 uma nova revisão foi concluída e o CHMP limitou o emprego do nimesulide como um fármaco de **segunda linha** (usada quando pelo menos outro fármaco falhou)⁽⁹⁸⁾.

Devido ao estudo de simulação Italiano⁽⁹⁹⁾ no qual a diminuição das prescrições de nimesulide aumentariam os efeitos adversos envolvendo o estômago e intestino o comitê iniciou um novo acompanhamento dos riscos e benefícios tanto da segurança gastrointestinal como hepática⁽⁷¹⁾. Em Junho deste ano EMA contra-indicou a prescrição de nimesulide para tratamento de osteoartrite e recomendou aos prescritores que o substituam por uma alternativa apropriada, devendo ser empregado como fármaco de segunda linha somente em casos de dores agudas e dismenorreia⁽¹⁰⁰⁾.

Atualmente o nimesulide esta disponível na União Européia nos seguintes países membros: Bulgária, República Checa, Chipre, França, Grécia, Hungria, Itália, Letônia, Lituânia, Malta, Polônia, Portugal, Romênia, Eslováquia e Eslovênia. Medicamentos contendo nimesulide são autorizados, porem não comercializados na Áustria e Irlanda⁽¹⁰⁰⁾.

Em um levantamento do emprego de nimesulide realizado no mundo inteiro, o Brasil se encontra entre os três maiores consumidores, ficando atrás de Itália e Portugal em números de unidades vendidas. Entretanto a quantidade de RAMs relacionadas ficam em décimo lugar, tal discrepância esta relacionada a falta de notificações de RAMs quando o emprego deste fármaco⁽¹⁰¹⁾. Tal discrepância ocorre pelas informações de reações adversas estarem incompleta ou indisponível. Sua subnotificação no sistema de farmacovigilância somado a incerteza em estimar o número de pacientes que fazem uso do medicamento impedem de definir a freqüência com que ocorre uma reação adversa⁽⁴⁵⁾.

Apesar dos modernos avanços terapêuticos salvarem e melhorarem muitas vidas humanas, suas RAMs graves representam atualmente o maior desafio para os profissionais da saúde, agências reguladoras e companhias

farmacêuticas. Essas RAMs podem tirá-las do mercado e infelizmente privar alguns pacientes de seus efeitos benéficos. Desde 1998, dezenove fármacos foram retirados do mercado Norte Americano devido a efeitos adversos pós-comercialização. O que realmente constitui um efeito adverso inaceitável não é facilmente definido, pois depende da gravidade da doença que esta sendo tratada e a disponibilidade de uma alternativa terapêutica segura⁽⁴⁷⁾. A IHFI é a causa mais comum das retiradas de fármacos do mercado farmacêutico⁽¹⁰²⁾.

Alguns fármacos apesar de sua hepatotoxicidade serem reconhecidas, eles ainda são mantidos no mercado como fármacos de **segunda linha**. Algumas reações adversas de hepatotoxicidade e outras toxidades são aceitas para anticonvulsivantes, fármacos antivirais, e para tratamentos anti-câncer onde as respostas individuais são variáveis e a necessidade de muitos fármacos é grande⁽¹⁰³⁾.

A elevação de TA em diferentes graus é um marcador biológico seguro, e sempre que ocorrerem devem ser tratadas com seriedade. Um dos indicadores seguros de fármacos quanto sua hepatotoxicidade é a aplicação da regra de *Hy* ou *Hy's Law* (em referência ao Dr. Hy Ziemerman nos anos 80). Um fármaco potencialmente hepatotóxico precisaria evidenciar sua injúria hepatocelular como o aumento de 3 vezes ou mais do limite superior da normalidade para as TAs somado ao aumento de pelo menos duas vezes o valor normal de bilirrubina, sem que possua obstrução intra ou extra hepática. A elevação de TAs é mais sensível que a aplicação do *Hy's Law* que é mais específica⁽¹⁰³⁾.

Muitas vezes o aumento de TAs antecede a manifestações clínicas e sua dosagem em estudos controlados, pode ser útil na identificação prematura de pacientes com maior susceptibilidade a tais fármacos.

Como objetivo secundário de nosso trabalho, levantamos dados dos exames laboratoriais realizados para investigar alguma mudança nos parâmetros clínicos relacionada ao medicamento. Ambos os fármacos possuem potencial para causar injúria hepática, e sua monitorização pós-comercialização neste sentido é desejável, avaliando seus riscos contra os benefícios ao longo do tempo. O diclofenaco e outros AINEs possuem raras hepatotoxicidades graves⁽¹⁰³⁾.

Os critérios de inclusão dos voluntários nos estudos foram apresentados nos **Capítulos 1 e 2**, mostrando os exames laboratoriais realizados pré e pós-internação. Foram incluídos indivíduos com função hepática normal sem serem portadores de injúria hepática devido a hepatites virais, pois todos foram examinados contra Hepatite B e C. Neste estudo controlado, randomizado, duplo cego, foram feitos os exames laboratoriais pré-internação e pós-internação dentro de um intervalo de um mês (28 dias) no qual o voluntário declarou que não fez uso de nenhuma outro fármaco ou álcool no período do estudo. Foram feitas duas administrações, uma para cada internação, tanto do diclofenaco como do nimesulide, cujos intervalos de dias de cada tomada para o dia do exame pós-estudo esta no quadro abaixo (**Tabela 5**).

Tabela 5. Dias de cada tomada que antecedeu os exames pós-internação

	DICLOFENACO	NIMESULIDE COMPRIMIDOS	NIMESULIDE SUSPENSÃO ORAL
Primeira tomada	12	19	21
Segunda tomada	5	5	7

Durante a etapa clínica que envolveu dois períodos de internação de 24h não foram relatados efeitos adversos. Analisando os resultados laboratoriais pré e pós-internação, quanto aos parâmetros de transaminases (**ALT e AST**), gama GT

(GGT), fosfatase alcalina (ALP) e bilirrubina (TBL), todas essas do painel hepático e ainda a contagem de plaquetas demonstrados nos gráficos do Anexo I. Obtivemos os valores dos intervalos de confiança e o valor de P (<0.05) após aplicação do teste de significância de *Student* (Tabela 6).

Tabela 6. Valores dos IC e P dos exames laboratoriais do painel hepático e da contagem de plaquetas

	DICLOFENACO	NIMESULIDE COMPRIMIDOS	NIMESULIDE SUSPENSÃO ORAL
ALT / TGP	(3.00931; 7.06761) P 0.0001	(0.85238; 8.53224) P 0.019	(-2.951486; 4.259179) P 0.712
AST / TGO	(-1.038849; 2.885003) P 0.342	(-6.91376; 2.91376) P 0.410	(-5.71917; -1.66544) P 0.001
GamaGT (GGT)	(-5.58226; -0.57159) P 0.018	(-6.80235; -0.27458) P 0.035	(-2.48620; 7.64004) P 0.305
Fosfatase alcalina (ALP)	(-28.0065; -11.0704) P 0.0001	(-11.13553; 21.44322) P 0.521	(21.9514; 49.4332) P 0.0001
Bilirrubina (TBL)	(-0.381172; -0.222674) P 0.0001	(-0.080579; 0.066733) P 0.848	(-0.108267; 0.005960) P 0.077
Plaquetas	(-2,450.1; 24,296.3) P 0.105	(-20,875.96; 5,337.50) P 0.234	(5,321.8; 26,908.9) P 0.005

$p < 0.05$ Existe diferença significativa

Valores em azul mostram aumento significativo e vermelho diminuição significativa

Examinando a significância dos valores dos exames obtidos depois da administração das drogas, obtivemos desfechos clínicos variados. Não se encontrou uniformidade de variações significantes entre as diferentes drogas nem mesmo entre as duas formulações de nimesulide. Apesar de encontrarmos alterações estatisticamente significantes para alguns parâmetros, clinicamente não representam alterações significantes, porém conseguimos com esse resultado fazer as seguintes ponderações:

Nenhuma das formulações apresentou correlação com a diminuição de plaquetas. Tal observação corroboram com os resultados de Marbet *et al.* em seus estudos de hemostasia com o nimesulide⁽³¹⁾.

A administração de nimesulide entre as duas formulações não mostrou alterações clínicas laboratoriais uniformes. Apresentou correlação entre dose e aumento de enzimas para sua formulação de comprimido na **ALT**, tendo no parâmetro **GGT** diminuição. Sua formulação de suspensão oral mostrou diferença estatisticamente significativa na diminuição dos valores de **AST**, e no aumento de **ALP**. O diclofenaco apresentou aumento estatisticamente significativo para o parâmetro de **ALT**, porem foi observado diminuição dos parâmetros de **GGT**, **ALP** e **TBL**.

É possível correlacionar com a literatura o aumento do **ALT** tanto para o nimesulide comprimido quanto para o diclofenaco, sendo que essa enzima hepática é a mais sensível quando da metabolização de drogas. Apesar do aumento ser significativo ele não representou valor superior a 3 vezes o ULN, o que significaria toxicidade hepática⁽⁵¹⁾. Seria muito raro identificar grandes mudanças nos parâmetros avaliados com apenas duas tomadas de drogas dos estudos de bioequivalência.

Porem dentro de um processo investigativo os valores que graficamente são considerados *outliers* existentes nos gráficos em anexo, podem ser questionados diante de seu aumento dentro do estipulado por *Hy's Law* e serem atribuídos a uma ação idiopática ao fármaco do referido indivíduo e ser de base para um processo de investigação em fármaco genética.

Atualmente a seleção de fármacos para os pacientes é um exercício empírico, e que o fator de risco para muitos efeitos adversos seja em particular

fatores genéticos que ainda permanecem amplamente desconhecidos. Uma alternativa possível seria o desenvolvimento de testes genéticos preditivos. Porém interações com outras drogas e estados de morbidade como doenças cardíacas ou hepáticas seriam dificilmente identificados⁽⁴⁷⁾.

Mesmo um aumento significativo de enzimas hepáticas pode não indicar clinicamente uma injúria hepática importante; elevações de significantes de enzimas hepáticas fármaco induzidas são reversíveis mesmo com a continuidade do uso do fármaco e pode não levar a uma injúria permanente, por isso que os verdadeiros casos de IHFI precisam de cuidados em sua monitorização⁽⁶⁸⁾.

Por esse motivo um monitoramento de casos controlados de drogas potencialmente hepatotóxicas poderia reunir dados para um estudo comparativo e/ou para uma base de dados para a população brasileira, visando identificar populações de alto risco. Porém a utilidade de testes de monitorização de hepatotoxicidade é discutível frente à raridade de toxicidade clinicamente significativa⁽¹⁰⁴⁾.

No trabalho de Bessone F⁽⁶⁸⁾ mostrou que o tempo de latência para a tomada de nimesulide para o acometimento clínico tarda de 15 a 90 dias em 66% dos casos. Van Steenberg *et al.* registrou injúria hepática com uma e três semanas de ingestão da dosagem de 200mg/dia⁽⁶⁰⁾. Apesar do emprego na odontologia ser de curto prazo, existe situações clínicas que a manutenção deste fármaco é feita por mais tempo como no caso de disfunção da articulação têmporo-mandibular⁽¹⁰⁵⁾, na manutenção da doença periodontal crônica⁽¹⁰⁶⁾ e em cirurgia bucomaxilofacial⁽¹⁰⁷⁾. Entretanto no tratamento sintomático de desordens músculo-esqueléticas sua administração a longo prazo é freqüente^(18, 73, 75) e por isso requer maior atenção.

Existem alguns países que o risco de hepatopatias por nimesulide é maior entre sua população em comparação com outros AINEs, como é o caso da Espanha e Finlândia, no caso da Finlândia esse risco é estimado em 100 vezes mais⁽⁹⁹⁾.

Entendendo que alterações de enzimas hepáticas em estudos controlados como o de bioequivalência e em tratamentos com drogas hepatotóxicas monitorados, podem trazer elementos favoráveis para um futuro em que caminha para o desenvolvimento de testes genéticos predictivos, dando aos prescritores e pacientes mais opções para eleger um fármaco mais adequado evitando que um paciente que tenha uma reação adversa grave ao fármaco seja catastrófica.

4. CONCLUSÃO



Quanto ao perfil farmacocinético:

Diclofenaco de colestiramina

A formulação testada (Cápsula 140 mg) é bioequivalente ao Flotac[®] para sua velocidade e sua extensão de absorção.

Nimesulide

A formulação testada (Comprimido 100mg) não demonstrou bioequivalência, dentro dos critérios (IC 80-125%) estabelecidos pelo FDA e ANVISA para o critério de velocidade de absorção (C_{MAX}) ao Nisulid[®].

A formulação testada (Suspensão oral 50mg/mL) é bioequivalente ao Nisulid[®] para sua velocidade e sua extensão de absorção.

Quanto a segurança farmacológica

Ambos medicamentos apresentam amplo emprego e muitos estudos positivos sobre sua eficácia.

Apesar do nimesulide apresentar vantagens clínicas por oferecer uma melhor tolerância ao TGI que o diclofenaco de colestiramina, seu emprego deve ser feito como um fármaco de segunda linha.

Caso seja empregada, deve seguir as recomendações da EMA quanto sua indicação, dose máxima diária de 100mg duas vezes ao dia por no máximo 15 dias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmacologia. 5. ed. ed: Elsevier; 2004.
2. Chikazu D, Tomizuka K, Ogasawara T, Saijo H, Koizumi T, Mori Y, et al. Cyclooxygenase-2 activity is essential for the osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007 May;36(5):441-6.
3. Donnelly MT, Hawkey CJ. Review article: COX-II inhibitors--a new generation of safer NSAIDs? *Aliment Pharmacol Ther*. 1997 Apr;11(2):227-36.
4. Einhorn TA. Do inhibitors of cyclooxygenase-2 impair bone healing? *J Bone Miner Res*. 2002 Jun;17(6):977-8.
5. Shah AA, Murray FE, Fitzgerald DJ. The in vivo assessment of nimesulide cyclooxygenase-2 selectivity. *Rheumatology (Oxford)*. 1999 May;38 Suppl 1:19-23.
6. Laureano Filho JR, Maurette PE, Allais M, Cotinho M, Fernandes C. Clinical comparative study of the effectiveness of two dosages of Dexamethasone to control postoperative swelling, trismus and pain after the surgical extraction of mandibular impacted third molars. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Feb;13(2):E129-32.
7. Moore PA, Brar P, Smiga ER, Costello BJ. Preemptive rofecoxib and dexamethasone for prevention of pain and trismus following third molar surgery *. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb;99(2):E1-7.
8. Noble S, Balfour JA. Meloxicam. *Drugs*. 1996 Mar;51(3):424-30; discussion 31-32.

9. Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002 Jun;17(6):963-76.
10. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1996;102:9-21.
11. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 15;91(6):2046-50.
12. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest.* 2002 Jun;109(11):1405-15.
13. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Apr 1;88(7):2692-6.
14. Vane J. Towards a better aspirin. *Nature.* 1994 Jan 20;367(6460):215-6.
15. Silva P. *Farmacologia.* 6. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
16. Hawkey CJ. Cyclooxygenase inhibition: between the devil and the deep blue sea. *Gut.* 2002 May;50 Suppl 3:III25-30.
17. Laporte JR, Ibanez L, Vidal X, Vendrell L, Leone R. Upper gastrointestinal bleeding associated with the use of NSAIDs: newer versus older agents. *Drug Saf.* 2004;27(6):411-20.
18. Ilic KV, Sefik-Bukilica M, Jankovic S, Vujasinovic-Stupar N. Efficacy and safety of two generic copies of nimesulide in patients with low back pain or knee osteoarthritis. *Reumatismo.* 2009 Jan-Mar;61(1):27-33.

19. Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res*. 1998 Oct;47 Suppl 2:S78-87.
20. Singla AK, Chawla M, Singh A. Nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol*. 2000 May;52(5):467-86.
21. Wallace JL, Reuter BK, McKnight W, Bak A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: are they really effective, selective, and GI-safe? *J Clin Gastroenterol*. 1998;27 Suppl 1:S28-34.
22. Vane JR. Biomedicine. Back to an aspirin a day? *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):474-5.
23. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):539-41.
24. FDA. FDA Issues Public Health Advisory on Vioxx as its Manufacturer Voluntarily Withdraws the Product FDA NEWS RELEASE 2004 September 30, 2004;P04-95.
25. Simon LS, White WB. COX-2 selective inhibitors and heart health. *Postgrad Med*. 2005 Jan;117(1 Suppl):7-20.
26. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2005 [cited 03/13/2005]; Available from: http://anvisa.gov.br/farmacovigilância/informes/2005/informe_1.htm
27. ANVISA. Informe acerca da decisão da ANVISA sobre os antiinflamatórios não esteroidais inibidores da Ciclooxygenase 2. 2008;2011(18/05/2011).
28. FDA. Information for Healthcare Professionals: Valdecoxib (marketed as Bextra). 2005 04/07/2005.

29. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*. 2001 Aug 9;345(6):433-42.
30. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest*. 1982 Jun;69(6):1366-72.
31. Marbet GA, Yasikoff Strub ML, Macciocchi A, Tsakiris DA. The effect of nimesulide versus placebo on hemostasis in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998 Jul;54(5):383-7.
32. Van Hecken A, Schwartz JI, Depre M, De Lepeleire I, Dallob A, Tanaka W, et al. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2000 Oct;40(10):1109-20.
33. Kurowski M, Menninger H, Pauli E. The efficacy and relative bioavailability of diclofenac resinate in rheumatoid arthritis patients. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1994 Aug;32(8):433-40.
34. Farker K, Merkel U, Schweer H, Haerting J, Madani SF, Eggers R, et al. Effects of short-term treatment with diclofenac-colestyramine on renal function and urinary prostanoid excretion in patients with type-2 diabetes. *Eur J Clin Pharmacol*. 2002 May;58(2):85-91.
35. BRASIL. Lei nº 9.787 de 10 de fevereiro de 1999. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília*; 1999.
36. Araujo LU, Albuquerque KT, Kato KC, Silveira GS, Maciel NR, Sposito PA, et al. [Generic drugs in Brazil: historical overview and legislation]. *Rev Panam Salud Publica*. 2010 Dec;28(6):480-92.

37. ANVISA. Números de registros de medicamentos genéricos: por ação geral do medicamento. 2010 [cited 28/06/2010]; Available from: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/estatistica/2_acaoGeral.pdf
38. Dighe SV. A review of the safety of generic drugs. Transplant Proc. 1999 May;31(3A Suppl):23S-4S.
39. Storpirtis S, Oliveira PG, Rodrigues D, Maranhão D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. Rev Bras Cien Farm São Paulo. 1999;v.35(n.1,):p.1-16,.
40. BRASIL. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. RDC nº 135 de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2003.
41. BRASIL. Manual de boas práticas em biodisponibilidade: bioequivalência/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. In: ANVISA, editor.: Gerência-Geral de Inspeção e Controle de Medicamentos e Produtos.; 2002.
42. FDA. In vivo bioequivalence guidances. Pharmacopeial Forum; 1993. p. 6501-8.
43. FDA. Bioavailability and Bioequivalence Requirements. Washington DC; 1985. p. 154-73.
44. Vidotti CCF. Centros de Informação sobre Medicamentos no Brasil: passada, presente e perspectivas do sistema brasileiro de informação sobre medicamentos. Campinas: UNICAMP; 1999.
45. Figueiredo P, Costa A, Cruz F, Melo J, Nogueira M, Góes T, . Reações Adversas a Medicamentos. Fármacos & Medicamentos. 2005;p 32-9.

46. CVS. Medicamentos causam 40% dos casos de intoxicação. 2007 20/06/2011 [cited; Available from: <http://portal.saude.sp.gov.br/content/hevemijesw.mmp>
47. Giacomini KM, Krauss RM, Roden DM, Eichelbaum M, Hayden MR, Nakamura Y. When good drugs go bad. *Nature*. 2007 Apr 26;446(7139):975-7.
48. FDA. Medication Guide for Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). 2011 [cited 2011 18/05/2011]; Available from:
49. O.M.S. Uso racional de los medicamentos. Informe de la Conferencia de Expertos. Ginebra; 1986.
50. Hussaini SH, Farrington EA. Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview. *Expert Opin Drug Saf*. 2007 Nov;6(6):673-84.
51. Abboud G, Kaplowitz N. Drug-induced liver injury. *Drug Saf*. 2007;30(4):277-94.
52. Au JS, Navarro VJ, Rossi S. Review article: drug-induced liver injury - its pathophysiology and evolving diagnostic tools. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Jul;34(1):11-20.
53. Xu JJ, Henstock PV, Dunn MC, Smith AR, Chabot JR, de Graaf D. Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. *Toxicol Sci*. 2008 Sep;105(1):97-105.
54. FDA. Drug-Induced Liver Injury: Premarketing Clinical Evaluation. 2007.
55. Boelsterli UA. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. *Drug Saf*. 2002;25(9):633-48.

56. Rubenstein JH, Laine L. Systematic review: the hepatotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Aug 15;20(4):373-80.
57. Sabate M, Ibanez L, Perez E, Vidal X, Buti M, Xiol X, et al. Risk of acute liver injury associated with the use of drugs: a multicentre population survey. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007 Jun 15;25(12):1401-9.
58. Boelsterli UA, Ho HK, Zhou S, Leow KY. Bioactivation and hepatotoxicity of nitroaromatic drugs. *Curr Drug Metab.* 2006 Oct;7(7):715-27.
59. Noauthorslisted. Nimesulide: patients still exposed to a risk of severe hepatitis. *Prescrire Int.* 2011 May;20(116):125-6.
60. Van Steenberghe W, Peeters P, De Bondt J, Staessen D, Buscher H, Laporta T, et al. Nimesulide-induced acute hepatitis: evidence from six cases. *J Hepatol.* 1998 Jul;29(1):135-41.
61. Traversa G, Bianchi C, Da Cas R, Abraha I, Menniti-Ippolito F, Venegoni M. Cohort study of hepatotoxicity associated with nimesulide and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bmj.* 2003 Jul 5;327(7405):18-22.
62. Licata A, Calvaruso V, Cappello M, Craxi A, Almasio PL. Clinical course and outcomes of drug-induced liver injury: nimesulide as the first implicated medication. *Dig Liver Dis.* 2010 Feb;42(2):143-8.
63. Tan HH, Ong WM, Lai SH, Chow WC. Nimesulide-induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure. *Singapore Med J.* 2007 Jun;48(6):582-5.
64. Walker SL, Kennedy F, Niamh N, McCormick PA. Nimesulide associated fulminant hepatic failure. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2008 Nov;17(11):1108-12.
65. Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Pelaez G, Pachkoria K, Garcia-Ruiz E, et al. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences

- submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology*. 2005 Aug;129(2):512-21.
66. Stadlmann S, Zoller H, Vogel W, Offner FA. COX-2 inhibitor (nimesulide) induced acute liver failure. *Virchows Arch*. 2002 May;440(5):553-5.
67. Polimeni G, Salvo F, Cutroneo P, Morreale I, Patrizio Caputi A. Adverse reactions induced by NSAIDs and antibacterials: analysis of spontaneous reports from the Sicilian regional database. *Drug Saf*. 2006;29(5):449-59.
68. Bessone F. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: What is the actual risk of liver damage? *World J Gastroenterol*. 2010 Dec 7;16(45):5651-61.
69. Famaey JP. In vitro and in vivo pharmacological evidence of selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide: an overview. *Inflamm Res*. 1997 Nov;46(11):437-46.
70. Tognella S. Nimesulide. New clinical opportunities. *Drugs*. 1993;46 Suppl 1:275-6.
71. EMEA. Press Release 25 February 2010. Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/press/pr/10885010en.pdf>; 2010.
72. Wober W, Rahlfs VW, Buchl N, Grassle A, Macciocchi A. Comparative efficacy and safety of the non-steroidal anti-inflammatory drugs nimesulide and diclofenac in patients with acute subdeltoid bursitis and bicipital tendinitis. *Int J Clin Pract*. 1998 Apr-May;52(3):169-75.
73. Sizova LV, Bagirova GG, Chernysheva TV. [Comparative analysis of effectiveness and safety of diclofenac and nimesulide in patients with early rheumatoid arthritis]. *Klin Med (Mosk)*. 2009;87(10):62-6.
74. Omololu B, Alonge TO, Ogunlade SO, Aduroja OO. Double blind clinical trial comparing the safety and efficacy of nimesulide (100mg) and diclofenac in

- osteoarthritis of the hip and knee joints. West Afr J Med. 2005 Apr-Jun;24(2):128-33.
75. Huskisson EC. Nimesulide, a balanced drug for the treatment of osteoarthritis. Clin Exp Rheumatol. 2001;19(1 Suppl 22):S21-5.
76. Sengupta S, Velpandian T, Kabir SR, Gupta SK. Analgesic efficacy and pharmacokinetics of topical nimesulide gel in healthy human volunteers: double-blind comparison with piroxicam, diclofenac and placebo. Eur J Clin Pharmacol. 1998 Sep;54(7):541-7.
77. Gupta SK, Velpandian T, Mathur P, Sengupta S. Comparative analgesic activity of nimesulide and diclofenac by intramuscular route: correlation with pharmacokinetic profile of nimesulide. Pharmacology. 1998 Mar;56(3):137-43.
78. EMEA. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Committee for proprietary medicinal products (CPMP) opinion following an article 31 referral. 2004. CPMP / 1724 / 04. (<http://www.emea.eu.int/pdfs/human/referral/nimesulide/172404en.pdf>). 2004.
79. Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. Clin Pharmacokinet. 1997 Sep;33(3):184-213.
80. Hinz B, Rau T, Auge D, Werner U, Ramer R, Rietbrock S, et al. Aceclofenac spares cyclooxygenase 1 as a result of limited but sustained biotransformation to diclofenac. Clin Pharmacol Ther. 2003 Sep;74(3):222-35.
81. Gandini R, Montalto C, Castoldi D, Monzani V, Nava ML, Scarcabarozi I, et al. First dose and steady state pharmacokinetics of nimesulide and its 4-hydroxy metabolite in healthy volunteers. Farmaco. 1991 Sep;46(9):1071-9.

82. Menasse R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, et al. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1978(22):5-16.
83. Marzo A, Bo LD. Tandem mass spectrometry (LC-MS-MS): a predominant role in bioassays for pharmacokinetic studies. *Arzneimittelforschung.* 2007;57(2):122-8.
84. Walter K, von Nieciecki A. [Relative bioavailability of diclofenac after a single administration of a new multiple-unit formulation of enteric-coated pellets]. *Arzneimittelforschung.* 2001;51(8):643-50.
85. Storpirtis S, Marcolongo R, Gasparotto F, Villanova C. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. 2004 [cited; Available from: Disponível em: www.anvisa.gov.br/divulga/artigos/genericos_referencia.pdf
86. Le Loet X, Dreiser RL, Le Gros V, Febvre N. Therapeutic equivalence of diclofenac sustained-released 75 mg tablets and diclofenac enteric-coated 50 mg tablets in the treatment of painful osteoarthritis. *Int J Clin Pract.* 1997 Sep;51(6):389-93.
87. da Fonseca LB, Labastie M, de Sousa VP, Volpato NM. Development and validation of a discriminative dissolution test for nimesulide suspensions. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10(4):1145-52.
88. ANVISA. Portaria no 6 de 29 de janeiro de 1999. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 1999.
89. BRASIL. Resolução ANVISA RDC nº 134/2003. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências; 2003.

90. BRASIL. Resolução ANVISA RDC nº 133, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de Medicamento Similar e dá outras providências.; 2003.
91. Storpirtis S, Mori A, Yochiy A, Ribeiro E, Porta V. Farmácia clínica e atenção farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
92. Hasenclaver. O Mercado de Medicamentos Genéricos no Brasil. 2004 [cited 25 de julho de 2004]; Available from: http://www.deolhonaspontentes.org.br/media/file/Patentes/hasenclever_ufrj_%20mercado_medicamentos_genericos.PDF
93. Foster TS. Drug product selection--Part 4: Selecting therapeutically equivalent products: special cases. Am Pharm. 1991 Nov;NS31(11):49-54.
94. Bissoli F. Comment on: nimesulide and adverse drug reactions: time for a database. J Postgrad Med. 2009 Jan-Mar;55(1):73.
95. Internet. Consulta Remédios. 2011 [cited 15/05/2011]; Available from: <http://www.consultaremedios.com.br/cr.php?uf=SP&tp=nome&or=&nome=arflex>
96. WHO. Information Exchange System Alert No. 113,. 2007 [cited; Available from: http://www.who.int/medicines/publications/drugalerts/Alert-113_Nimesulide1.pdf
97. EMEA. Press Release 21 September 2007. Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/press/pr/32370307en.pdf>; 2007.
98. EMEA. Questions and answers on the outcome of the review of nimesulide-containing medicines. 2009.
99. Venegoni M, Da Cas R, Menniti-Ippolito F, Traversa G. Effects of the European restrictive actions concerning nimesulide prescription: a simulation study on hepatopathies and gastrointestinal bleedings in Italy. Ann Ist Super Sanita. 2010;46(2):153-7.

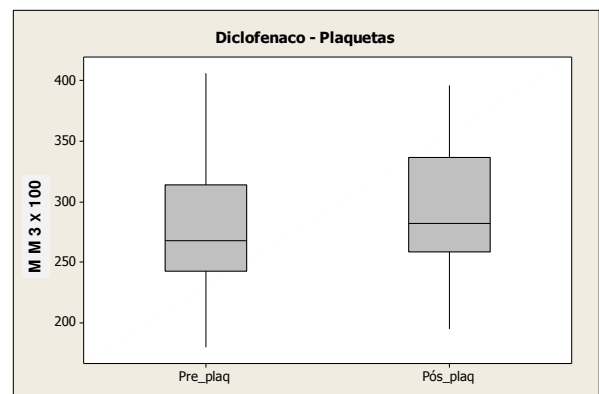
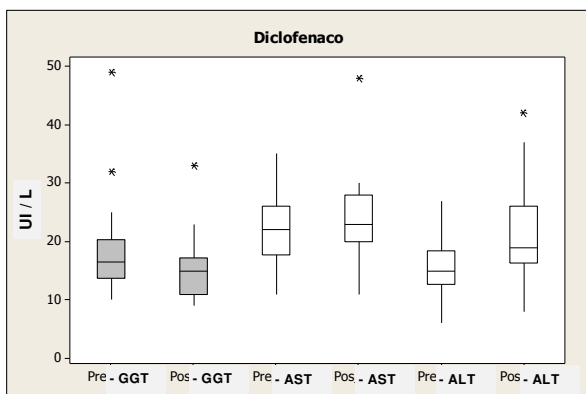
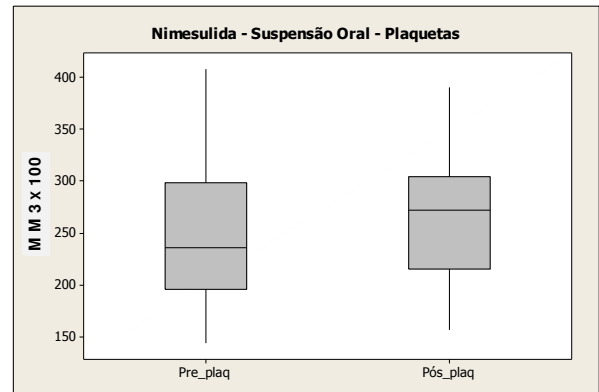
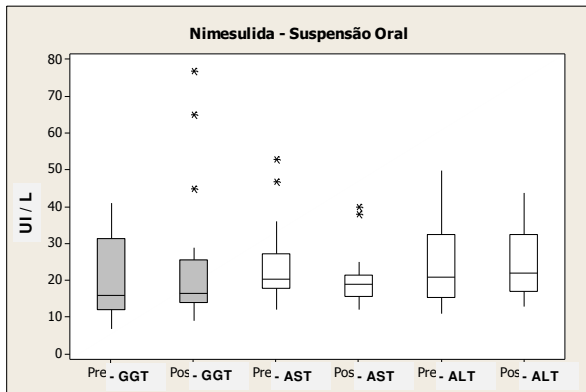
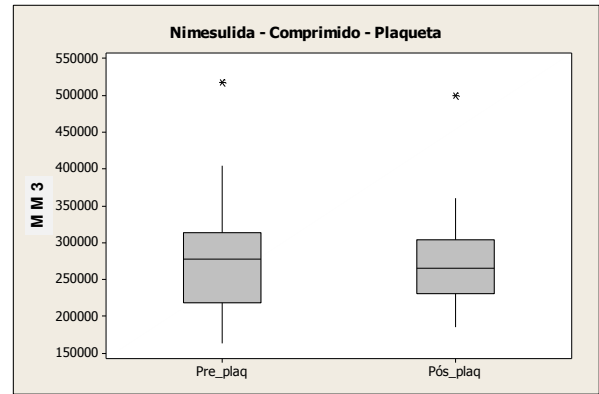
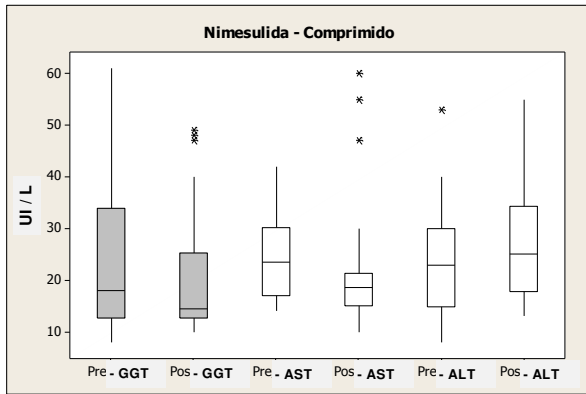
100. EMA. Questions and answers on the review of systemic medicines containing nimesulide. EMA/CHMP/382884/2011 2011 23 June 2011 [cited; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Referrals_document/Nimesulide_31/WC500107957.pdf
101. Rainsford KD. Relationship of nimesulide safety to its pharmacokinetics: assessment of adverse reactions. *Rheumatology (Oxford)*. 1999 May;38 Suppl 1:4-10.
102. Holt MP, Ju C. Mechanisms of drug-induced liver injury. *Aaps J*. 2006;8(1):E48-54.
103. Temple R. Hy's law: predicting serious hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2006 Apr;15(4):241-3.
104. Bissoli F. Nimesulide-induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure. *Singapore Med J*. 2008 May;49(5):436-7; author reply 8.
105. Hersh EV, Balasubramaniam R, Pinto A. Pharmacologic management of temporomandibular disorders. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2008 May;20(2):197-210, vi.
106. Vardar S, Baylas H, Huseyinov A. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on gingival tissue levels of prostaglandin E2 and prostaglandin F2alpha and clinical parameters of chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2003 Jan;74(1):57-63.
107. Ferrari Parabita G, Zanetti U, Scalvini F, Rossi D, Scaricabarozzi I. A controlled clinical study of the efficacy and tolerability of nimesulide vs naproxen in maxillo-facial surgery. *Drugs*. 1993;46 Suppl 1:171-3.

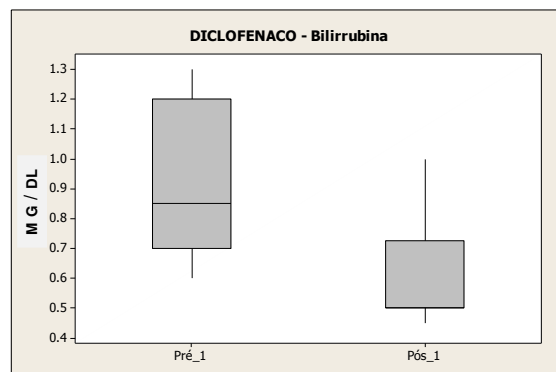
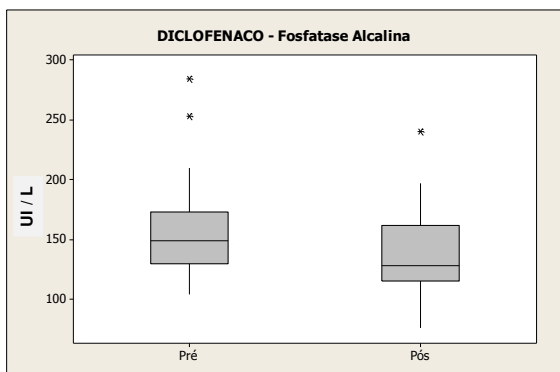
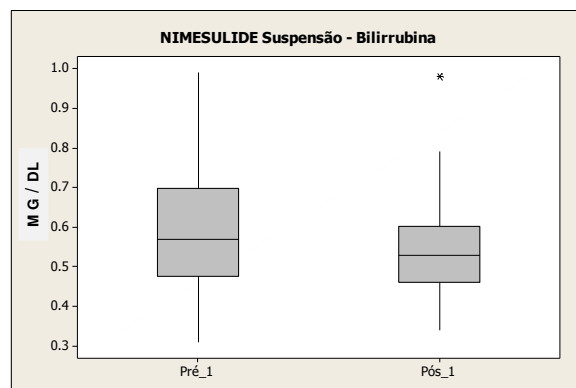
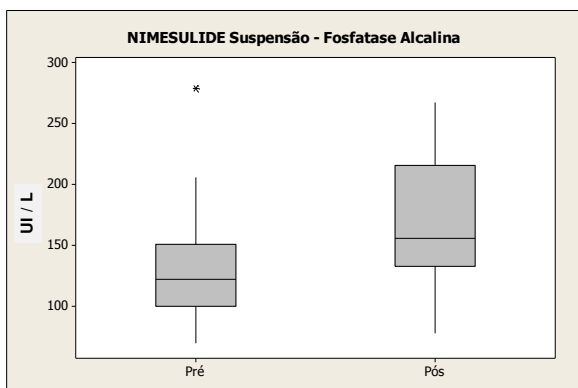
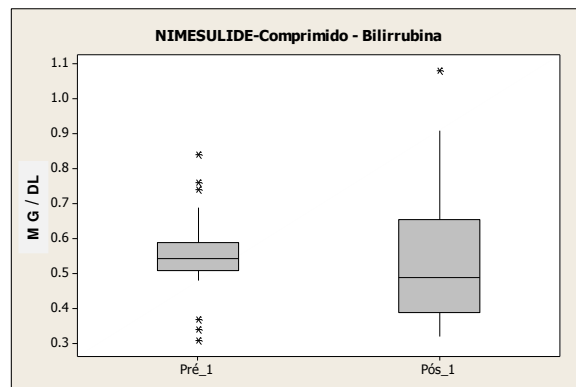
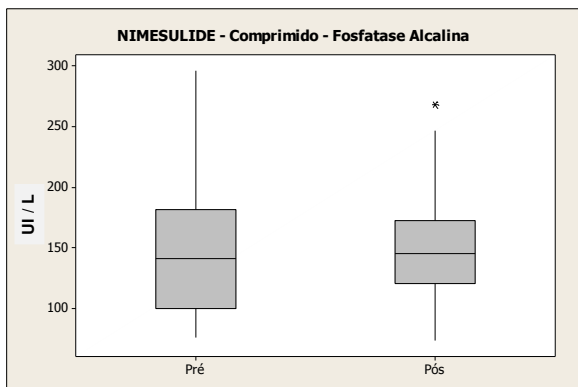
ANEXOS



ANEXO I

Resultados dos parâmetros clínicos laboratoriais avaliados





ANEXO II

Publicações durante o período de doutorado

A- – Borges NC, **Rigato HM**, de Oliveira PR, Nogueira DR, Moreno RA, Dalmora SL. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the determination of Propranolol in Human Plasma and its Application to a Bioequivalence Study. J Liq Chrom Relat Tech*, 2008, 31:19, 2927 - 2941

Abstract: A rapid, sensitive and specific method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) was developed and validated for the determination of propranolol in human plasma using metoprolol as internal standard. The drugs were extracted from plasma by liquid-liquid extraction and separated isocratically on a Phenomenex Synergi Fusion-RP C₁₈ analytical column, 4 µm (150 mm x 4.6 mm i.d.) maintained at 30 °C, with acetonitrile /water (95/5, v/v): 100 mM ammonium acetate: 100 mM acetic acid (65:15:20 v/v/v) as mobile phase, run at a flow rate of 1 mL min⁻¹ (split 1:3). Detection was carried out by positive electrospray ionization (ESI+) in selected reaction monitoring (SRM) mode. The chromatographic separation was obtained within 3.0 min and was linear in the concentration range of 2-150 ng mL⁻¹ (r²=0.9969). The method was successfully applied for the bioequivalence study of two tablet formulations (test and reference) of propranolol 80 mg after single oral dose administration to 36 healthy human volunteers, using an open, randomized, two period crossover design with one week wash out interval. The geometric means ratios of C_{max} and AUC_(0-∞) were 99.77 and 103.70%, respectively, with both the confidence intervals between 90.12 – 112.92% demonstrating the bioequivalence of the two formulations.

B – Moreira RF, **Rigato HM**, Borges BC, Sverdloff CE, Oliveira RA, Moreno RA, Borges NC. Effect of Hyperlipemic Food on the Comparative Bioavailability of Two Bupropion Formulations after Administration of a Single Oral Dose of 150 mg in Healthy Human Volunteers. *J Bioequiv Availab* Volume 1(4): 103-111 (2009) – 103.

Abstract: A specific, fast and sensitive LC–MS/MS assay was developed for the determination of bupropion and its metabolite hydroxybupropion in human plasma using lidocaine as the internal standard. The limit of quantification was 3.13 ng/ml for bupropion and 7.81 ng/ml for hydroxybupropion. The method was linear in the studied range of 3.13 – 400.00 ng/ml for bupropion and 7.81 – 1000 ng/ml for hydroxybupropion. This analytical method was applied to a comparative pharmacokinetic study, in which seventy eight volunteers (39 men and 39 female) aged between 18 and 50 years received a single oral dose of 150 mg of reference and test bupropion formulation, in an open, two-period, balanced randomized, crossover protocol. Group 1 received the medication without any additional meal. Group two received a hyperlipemic meal 30 min before the medication. Based on the 90% confidence interval of the individual ratios for C_{max} and AUC_{0-inf}, it was concluded that the test formulation is bioequivalent to the reference formulation with respect to the rate and extent of absorption of both bupropion and hydroxybupropion and that food intake before the drug administration had no effect in the relative pharmacokinetic parameters. However, the hyperlipemic meal significantly increased the bupropion absorption.

ANEXO III

Autorização para uso dos artigos publicados pela revista.

Hamilton Modesto Rigato

De: Jörg Feistle [joerg.feistle@dustri.de]
Enviado em: terça-feira, 31 de maio de 2011 04:51
Para: hamodesto@uol.com.br
Assunto: AW: Permissions Department

Dear Doctor Rigato,

Dustri-Verlag grants permission to include the following articles in your PhD thesis dissertation:

H.M. Rigato, R. A. Moreno, E.Z. Orpinelli, B.C. Borges, C.E. Sverdloff, J. Pedrazzoli Jr and N.C. Borges: A simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma: Application to a comparative bioavailability study

of our *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 47, no. 2/2009, pp. 132-140

AND

H.M. Rigato, B.C. Borges, C.E. Sverdloff, R. Agnaldo Moreno and N. Carter do Carmo Borges: Bioavailability of two oral suspension and two oral tablet formulations of nimesulide 100 mg in healthy Brazilian adult subjects

of our *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 48, no. 3/2010, pp. 233-242

This thesis is for academic use only and it is not going to be used for commercial, advertising or promotion purposes. Dustri-Verlag grants also permission to make 10 (TEN) copies of your thesis. One of this copies will be displayed in the University (State University of Campinas SP, Brazil) library. In addition, an electronic version of the thesis will be available at the *University Thesis database*.

We request to give full credit to the author and publisher, either as a foot note, or as a reference within the text or both.

Sincerely yours,

Joerg Feistle
Dustri-Verlag, Inc.
P.O. Box 561205
Rockledge, FL 32956-1205
Phone (321)594-4340
Fax (321)414-0219
Email Joerg.Feistle@dustri.com
<http://www.dustri.com>, <http://www.clinnephrol.com>, <http://www.clinpharmacol.com>