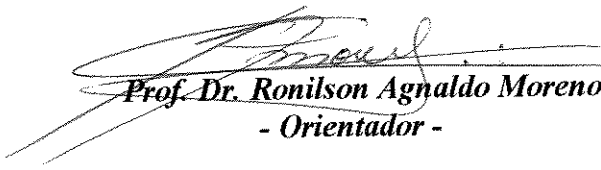


MOISÉS LUÍS PIRASOL VANUNCI

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES
DE DICLOFENACO DE POTÁSSIO USANDO A
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO ACOPLADA
AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA (LC-MS-MS)**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Médico - Moisés Luís Pirasol Vanunci.

Campinas, 19 de março de 2003.


Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno
- Orientador -

**CAMPINAS – SP
2003**

MOISÉS LUÍS PIRASOL VANUNCI

**ESTUDO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE DUAS FORMULAÇÕES
DE DICLOFENACO DE POTÁSSIO USANDO A
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO ACOPLADA
AO ESPECTRÔMETRO DE MASSA (LC-MS-MS)**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: **Prof. Ronilson Agnaldo Moreno**

**CAMPINAS – SP
2003**

UNIDADE	30
Nº CHAMADA	UNICAMP
	V371e
/	EX
COMBO BCI	56296
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	9/11/03
Nº CPD	

CN00191991-1

3ib id 304393

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

V371e

Vanunci, Moisés Luís Pirasol

Estudo de bioequivalência de duas formulações de diclofenaco de potássio usando a cromatografia líquida de alta pressão acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS-MS) / Moisés Luís Pirasol Vanunci. Campinas, SP : [s.n.], 2003.

Orientador : Ronilson Agnaldo Moreno

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Diclofenaco. 2. Medicamentos genéricos - farmacocinética. I. Ronilson Agnaldo Moreno. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Membros:

Prof. Dr. Ronilson Agnaldo Moreno

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Profa. Dra. Maria Cristina de Almeida Ribeiro

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 19/03/2003

Lista de Figuras	xi
Lista de Quadros.	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
Resumo	xvii
Summary	xix
 1. INTRODUÇÃO	 21
1.1 Medicamento Genérico.....	25
1.2 Testes de Bioequivalência.....	28
 2. OBJETIVOS	 39
 3. CASUÍSTICA	 43
 4. ASPECTOS ÉTICOS	 47
4.1 Aprovação do Estudo	49
4.2 Termo de Consentimento Livre Esclarecido	49
4.3 Confidencialidade	49
 5. PROTOCOLO CLÍNICO	 51
5.1 Projeto de Estudo	55
5.2 Programação do Estudo	55
5.3 Seleção de Voluntários.....	37
5.4 Critério de Inclusão.....	56
5.5 Critério de Exclusão	56
5.6 Registro dos Voluntários.....	57
5.7 Dosagem	57
5.8 Restrições aos Voluntários	58
5.9 Critério de Retirada	58
5.10 Efeitos Adversos.....	59
5.11 Produtos Estudados	59

6. MATERIAIS E REAGENTES	61
6.1 Equipamentos.....	63
6.2 Padrões	64
6.3 Reagentes	64
6.4 Coleta das Amostras Sangüíneas	64
6.5 Quantificação do Fármaco nas Amostras de Plasma.....	65
6.5.1 Extração do Fármaco.....	65
6.6 Condições do Cromatógrafo.....	66
6.7 Farmacocinética e Análise Estatística	71
7. RESULTADO	73
8. DISCUSSÃO	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
ANEXOS.....	117

Figura 1: Fórmula estrutural do Diclofenaco	24
Figura 2: Mass Spectrometer: Micromass Quatro II	67
Figura 3: Mass Spectrometer: Z SPREY	68
Figura 4: Curvas dos brancos de diferentes plasma humanos submetidos às condições analíticas	69
Figura 5: Tempo de retenção do Diclofenaco nas condições analíticas.....	70

Lista de Quadros

Quadro 1: Randomização da formulação administrada54

Quadro 2: Quadro comparativo entre produto teste e a referência60

EMEA	The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2000).
O.M.S.	significa Organização Mundial da Saúde;
E.C.A.	significa enzima conversora da angiotensina;
R.O.C.S.	significa canais de cálcio operados por receptor;
C_{max}	significa concentração plasmática máxima;
T_{max}	significa tempo para obtenção de C_{max} ;
A.S.C.	significa área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo;
V_d	significa volume de distribuição;
$t_{1/2}$	significa meia vida de eliminação;
C.L.A.E.	Significa cromatografia líquida de alta eficiência;
A.S.C. _{0-t}	significa área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, desde a administração do fármaco até a última coleta sangüínea;
C_t	significa a última concentração plasmática do fármaco determinada experimentalmente;
k_e	significa a constante de eliminação da fase terminal, estimada pela regressão linear dos pontos que descrevem a fase de eliminação da curva de concentração plasmática pelo tempo, em um gráfico mono logarítmico;
A.S.C.O-inf.	significa a área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, tendendo ao infinito;
A.N.O.V.A.	significa análise de variância;
I.C.	significa intervalo de confiança;

O objetivo desse estudo foi avaliar, em voluntários humanos sadios, a farmacocinética de uma formulação do diclofenaco de potássio revestido (Clofenak 50 mg, Medley S/A Indústria Farmacêutica) em comparação com a formulação referência, Diclofenaco de Potássio comprimido (Cataflam 50 mg, Novartis Biociências S/A., Brasil). O estudo foi aberto, cruzado, randomizado com duas fases, onde vinte e quatro voluntários sadios de ambos os sexos receberam uma dose única de cada medicamento. Foram coletadas amostras de plasma em tempos regulares para a quantificação do fármaco. As amostras do Diclofenaco foram obtidas na pré-dose, em intervalos determinados e 12 h após a medicação. As concentrações plasmáticas totais foram quantificadas, pelo método validado usando, a cromatografia líquida de alta precisão acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS-MS). Através da análise estatística e os parâmetros da EMEA concluiu-se que a formulação do Clofenak 50 mg, produzido pela Medley S/A Indústria Farmacêutica é bioequivalente em relação ao Diclofenaco de Potássio comprimido Cataflam 50 mg, medicamento referência, produzido pela Novartis Biociências S/A.

The aim of this study was to evaluate, on human volunteers, the performance of Potassium Diclofenac tablet formulation (Clofenak coated tablets 50 mg, by Medley S/A Indústria Farmacêutica) as opposed to standard Potassium Diclofenac dragee formulation (Cataflam dragees 50 mg, by Novartis Biociências S/A., Brazil). Twenty-four healthy volunteers, as assessed by clinical and laboratory test evaluations, were enrolled in the study. The study was a single dose, two-way randomized crossover design comparing Potassium Diclofenac tablet formulation (Clofenak coated tablets 50 mg, by Medley S/A Indústria Farmacêutica) to standard Potassium Diclofenac dragee formulation (Cataflam dragees 50 mg, by Novartis Biociências S/A., Brazil). Plasma samples for determination of Diclofenac were obtained during pre-dose in frequent intervals up to 12h after dosing. Total Diclofenac plasma concentrations were quantified by a validated method employing high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS-MS).

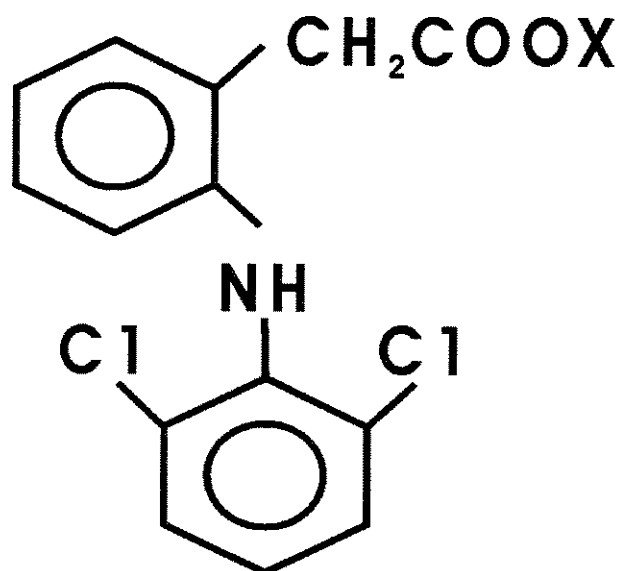
INTRODUÇÃO

1

Os fármacos antiinflamatórios não esteróides estão entre os mais largamente utilizados de todos os agentes terapêuticos. São freqüentemente prescritos para queixas musculoesqueléticas “reumáticas”, bem como tomados sem prescrição para dores menores (HANG & DALE, 1995).

Quase 25% das reações adversas a fármacos relatadas oficialmente no Reino Unido, deve-se aos medicamentos antiinflamatórios não esteróides. Ao serem os FAINes (Fármacos Antiinflamatórios Não Esteróides) empregados em doenças articulares, que geralmente tornam necessárias doses bastante altas e uso continuado, há elevada incidência de efeitos colaterais, mais especificamente no trato digestivo, como também no fígado, rim, baço e medula (RAINSFORD & VELO, 1992).

O diclofenaco é um potente fármaco antiinflamatório não-esteróide (FAINE) que tem demonstrado também propriedades analgésicas e antipiréticas. O Diclofenaco inibe a atividade da ciclo-oxigenase com a redução nos tecidos na produção de prostaglandinas, como as PGF₂ α e PGE₂, que desempenham importante papel na gênese da inflamação dor e febre. O diclofenaco causa gastrite erosiva e prolonga o tempo de sangramento.



Nota: Onde X pode ser H, Na, K, resina

Figura 1: Fórmula estrutural do Diclofenaco

O diclofenaco é uma droga eficaz, antiinflamatória e analgésica, largamente utilizada nos tratamento de artrite reumatóide e osteoartrite. Provou ser eficaz tanto quanto a indomentacina, além de apresentar menos efeitos colaterais. Diclofenaco é metabolizado na forma de componentes fenólicos sendo principalmente excretados na forma de sulfetos conjugados e de metabólito 4'hidroxi , 20%-30% na urina, 10%-20% na bile, quando administrado por via oral. Na forma livre, sem compostos, é encontrado em menos de 1% quando dosado na urina (COLIN DOLLERY,1999).

O diclofenaco é empregado também no tratamento da espondilose aquilosa, que é uma desordem reumática sistêmica caracterizada pela inflamação do esqueleto axial (coluna e articulação sacro-ilíaca) e articulações periféricas (CALABRO, 1983). Ela é de duas a três vezes mais freqüentes em

homens do que em mulheres e usualmente predomina na faixa etária entre 20 a 40 anos (CALLABRO, 1985).

Na espondilose aquilosa o objetivo primário da terapia com drogas antiinflamatórias é suprimir o processo inflamatório na coluna e em outras articulações e não especificamente aliviar a dor. Drogas que são essencialmente analgésicas, como o acetoaminofem, são associadas ao tratamento. Também pode ser prescrito o uso de relaxantes musculares, como a tizanidina para dores intensas e espasmos musculares por um curto período de tempo. Essas drogas, entretanto, não devem ser escolhidas para o tratamento da espondilose aquilosa (CALLABRO & LONDINO, 1985).

O diclofenaco é uma escolha eficaz no tratamento de pacientes com espondilose aquilosa, além de ser seguro para tratamento de curto a longo prazo. Quando comparado com a indometacina, droga de referência no estudo e no tratamento da espondilose aquilosa, o diclofenaco provou eficácia comparável e ainda com melhor tolerabilidade (CALABRO, 1986).

1.1 Medicamento Genérico

Os produtos farmacêuticos são classificados em oficiais, magistrais e especialidades farmacêuticas. Existe uma outra classe de medicamento que não necessita de prescrição médica. Os éticos são, na sua maioria, vendidos com receita médica, o que não é necessário para outra classe. O primeiro grupo é

formado por produtos patenteados e genéricos (KIRIM, 1985; SAPIENZA, 1989; TUCKER, 1984).

Os produtos patenteados são a força motriz, do ponto de vista econômico, para que as empresas farmacêuticas de ponta assumam riscos no desenvolvimento de novos fármacos. A patente impede a imitação e possibilita o monopólio total ou parcial sobre esses produtos por um determinado período de tempo, bem como o recebimento de "Royalties" (BRAGA, 1990; KIRIM, 1985; SAPIENZA, 1989).

Os produtos genéricos representam a menor parcela do mercado, em relação aos patenteados (30% nos Estados Unidos da América), e constituem a última etapa na vida de um fármaco, após a criação e realização dos estudos pré-clínicos para a aprovação da nova molécula, seguida pela utilização desta como produto patentado. Após a patente ou exclusividade expirar, outros produtores poderão fabricar um equivalente farmacêutico ao original patentado (ORMSBY, 1994).

Devido ao importante papel da indústria farmacêutica no âmbito da saúde pública, a atuação desta não é regida simples e independentemente pelas regras do mercado, mas sim permeada pela intervenção do Estado. Esta intervenção ocorre no desenvolvimento, produção e comercialização de fármacos, regulamentando o acesso da população a estes (KIRIM, 1985; SAPIENZA, 1989; TUCKER, 1984).

Em muitos países a existência de medicamentos genéricos é possível após vários estágios a serem seguidos pelos produtores, frente às exigências dos órgãos locais para a aprovação da produção e comercialização. São avaliadas, segundo as boas normas de produção, a obtenção de formulações de qualidade e a reprodutibilidade do processo. A etapa *sine qua non* é a da determinação da bioequivalência entre uma substância referência e uma teste, ou seja, aquela candidata a equivalente de um padrão já aprovado (produto patenteado). A determinação feita *in vitro* ou *in vivo* inclui a mensuração do princípio ativo das diferentes formulações em fluidos biológicos, efeito farmacológico, testes de dissolução *in vitro*, estudos em animais e outros métodos (CHUNG, 1996; HU, 1996; IGA, 1996; LU, 1996; ORSMBY, 1994; POUND, 1996; PRAKONGPAN, 1996; BLUME, 1996; SALMONSON, 1996; WALTERS, 1996; WILLIAMS.a, 1996; WILLIAMS.b, 1996).

O termo genérico é derivado da palavra latina *genus*, que significa classe geral. A razão do grande sucesso dos medicamentos genéricos, em vista da sua participação no mercado mundial, é a econômica, pela ausência dos mesmos encargos da produção de medicamentos patenteados, além de envolver um processo mais curto e menos trabalhoso na sua aprovação. Estes fatores traduzem-se na comprovação da produção de um fármaco de qualidade, com características equivalentes ao produto original, determinadas por processos analíticos de alta precisão e exatidão, nos quais os fármacos e seus metabólitos são identificados e quantificados em diferentes fluidos orgânicos. Deve-se salientar, porém, que duas formulações equivalentes podem não ser idênticas, o

recomendado é que o comportamento dessas drogas não seja significativamente diferentes (ORMSBY, 1994).

A determinação de diferentes substâncias em fluídos biológicos é realizada através de testes de biodisponibilidade, que começaram a se estabelecer como ferramenta *per se*, no início da década de 70. A biodisponibilidade é a presença da substância ativa no sítio de ação, em decorrência da taxa e extensão da disposição de uma forma farmacêutica com a qual o organismo entra em contato; não é necessariamente um conceito paralelo ao efeito farmacológico decorrente da presença do princípio ativo.

A comparação da biodisponibilidade de diferentes formulações resultou no termo bioequivalência. Este é definido como taxa e extensão de absorção de princípios ativos similares na mesma dose molar quando estudados sob as mesmas condições experimentais, em tal nível de eficácia e segurança sejam essencialmente as mesmas. Alguns produtos tidos como bioequivalentes não necessariamente apresentam a mesma taxa de absorção, quando esta não tem significado clínico importante.

1.2 Testes de Bioequivalência

Os testes de bioequivalência podem ser aplicados na avaliação de qualquer parâmetro farmacocinético ou farmacodinâmico. O parâmetro avaliado é considerado bioequivalente caso os valores da preparação teste estejam dentro do intervalo de equivalência estabelecido em relação à preparação de referência.

As razões pelas quais se conduz um teste de bioequivalência são: caracterizar uma nova formulação escolhida para substituir ou competir com uma mais antiga: avaliar uma nova forma farmacêutica que substitui uma mais antiga ou quando se aumenta a linha de produtos: verificar as novas características físicas de um produto: comparar dois lotes de um mesmo fármaco, dois métodos de produção, dois locais diferentes de produção ou quando um novo fabricante deseja constatar se o novo produto é semelhante a um padrão (pode ser um produtor de genéricos ou um novo fornecedor de um produto patenteado).

Há três diferentes tipos de estudo que abordam aspectos característicos da bioequivalência, uns menos e outros mais abrangentes. São os testes de equivalência terapêutica, farmacocinética e farmacodinâmica. O mais amplo de todos é o de equivalência terapêutica, que além de avaliar o resultado final do fármaco sobre o organismo, também verifica os efeitos adversos. Este não é o primeiro teste a ser utilizado, pois há o problema ético de se administrar um medicamento cuja eficácia é questionada em relação ao padrão e a dificuldade de detectar equivalência frente aos efeitos adversos pouco comuns que podem surgir devido às enormes variáveis que este estudo envolve. Deve ser normalmente precedido pelo de equivalência farmacocinética, que, caso seja positivo, indicará fortemente a equivalência terapêutica. Características farmacodinâmicas podem ser usadas como parâmetros para avaliar a equivalência, ao invés das farmacocinéticas, como quando da avaliação de duas formulações de hipoglicemiantes verificando os níveis glicêmicos após a utilização dos fármacos. As limitações deste processo baseiam-se na força do parâmetro farmacodinâmico

em traduzir a resposta terapêutica e a manipulação desses parâmetros na constatação da equivalência (FDA, 1998; FDA, 1993; HOLFORD, 1994).

A legislação brasileira (BRASIL, 1999) exige, para aceitar a equivalência de fármacos, a existência de bioequivalência farmacocinética. Esta é obtida através do estudo de características específicas.

A especificação e a condução adequadas de um estudo de bioequivalência dá-se pela ação cooperada de farmacologistas, estatísticos, médicos, bioquímicos e outros. Esta caracterização está na dependência do medicamento em estudo, forma farmacêutica e objetivos. No estudo para genéricos, ambas formulações contêm o mesmo princípio ativo, dose e forma, sendo administradas pela mesma via.

Ainda na definição das características do estudo é que se estipula se o número e a frequência da dosagem será um estudo de dose única ou múltipla. A primeira opção é regra, sendo indicada para medicamentos com baixa solubilidade, que exibem transporte saturável, efeito de primeira passagem saturável e ausência de interação entre os metabólitos e o fármaco. Geralmente, este é o modo adequado em predizer o estado de equilíbrio advindo de múltiplas doses para fármacos que exibem distribuição e eliminação saturáveis. Estudos de múltipla dose estão indicados quando:

- há diferença na taxa, mas não na extensão de absorção dos fármacos em questão;

- há excessiva variabilidade na biodisponibilidade dos componentes de cada grupo;
- a concentração analisada do fármaco ou metabólito presente, após dose única, é muito baixa para ser detectada
- a forma farmacêutica é de liberação lenta.

Antes do início do estudo, o conselho de ética da instituição na qual este se realizará – formado por profissionais de diferentes áreas com experiência em estudos clínicos, aspectos éticos e atitudes características da comunidade dos voluntários participantes – deve avaliar e aprovar ou não o estudo, salvaguardando os direitos e bem estar dos participantes (BRASIL, 1999; FDA, 1998; FDA, 1993; JACKSON, 1994; ORMSBY, 1994).

A seleção dos participantes é realizada entre indivíduos saudáveis, com idade entre 18 e 55 anos, pois faixas etárias restritas não têm importância em testes de bioequivalência, que normalmente não procura diferenças na resposta em diferentes idades.

A maioria dos estudos seleciona indivíduos do sexo masculino, porém há uma corrente que tende a realizá-lo com ambos os sexos. A participação de mulheres, porém, implica em alguns problemas de ordem analítica e ética, como a permissão do uso concomitante de contraceptivos orais, as diferenças das características corporais entre os sexos e menstruação. Estes problemas podem alterar bioquimicamente a resposta feminina às diferentes substâncias e a necessidade de comprovada ausência de gravidez no transcorrer do estudo.

Os critérios de inclusão visam reduzir as variações interpessoais ao máximo. O peso corpóreo deve estar dentro de uma faixa previamente estabelecida, o uso de outros fármacos, ingestão de determinadas substâncias, fumo, dieta, estados patológicos e exames prévios aos estudos devem ser controlados, procurando-se a homogeneidade da amostra.

O número de participantes depende da variação do erro associada com a característica estudada, do nível de significância desejado e do desvio padrão compatível com a bioequivalência, segurança e eficácia deve ser calculado por métodos adequados e nunca ser menor do que doze.

O tempo de internação não deve exceder três meias vidas do medicamento e o tempo total de estudo deve ser de três a cinco meias vidas. Tal procedimento permite que o valor da A.S.C. da concentração plasmática em relação ao tempo, obtida após a administração do fármaco até a última coleta, seja um retrato fiel da absorção e eliminação do fármaco do organismo, podendo ser extrapolado para o infinito, contanto que não exceda em vinte por cento da área total. O confinamento parcial é aceitável, em casos de fármacos com meias vidas longas, quando o período de coleta de amostras sanguíneas dura vários dias ou semanas.

O estudo deve ser coberto por seguro, a participação necessariamente ser voluntária e no máximo de quatro vezes ao ano, com intervalo mínimo de três meses (BRASIL, 1999; FDA, 1998; FDA, 1993; JACKSON, 1994; ORMSBY, 1994).

Durante estudos de bioequivalência, os parâmetros farmacocinéticos que avaliam a biodisponibilidade de cada fármaco analisado são obtidos a partir das curvas de concentração plasmática do fármaco em relação ao tempo e analisados estatisticamente para determinação de bioequivalência. São elas (BAUER, 1989; BRASIL, 1999; FDA, 1998; FDA, 1993; JACKSON, 1994; ORMSBY, 1994):

- a **A.S.C.0-t** é útil na mensuração da quantidade total do princípio ativo inalterado que atinge a circulação sistêmica, proporcional à quantidade de fármaco administrado (relação linear ou não linear, num comportamento do tipo Michaelis Menten). É calculada pela integração da área sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo desde a administração do fármaco até a última coleta sangüínea, obtida pela aplicação da regra trapezoidal. Caso tenha adicionado ao seu valor a fração **Ct/ke**, ter-se-á o valor de **A.S.C.** tendendo ao infinito (**A.S.C.0-inf.**), no qual **Ct** é a última concentração do fármaco determinada experimentalmente e **ke** é a constante de eliminação da fase terminal, estimada pela regressão linear dos pontos que descrevem a fase de eliminação da curva de concentração plasmática pelo tempo, em um gráfico mono logarítmico;
- **Cmax**, concentração plasmática máxima, é o pico da concentração plasmática que se registra após a administração de um fármaco, sendo possível para a maioria dos medicamentos demonstrar a

correlação entre concentração plasmática e efeito terapêutico, fornecendo uma indicação da suficiência entre absorção sistêmica e a possível resposta terapêutica. É um parâmetro importante para se avaliar possível risco de reações tóxicas;

- **Tmax**, tempo em que se atinge a concentração plasmática máxima, é o ponto de equilíbrio entre absorção e eliminação e representa a velocidade de absorção do fármaco, após a administração oral, ambos dados obtidos diretamente das curvas.

Deve-se realizar análise de variância (**A.N.O.V.A.**) dos parâmetros farmacocinéticos **A.S.C.0-t** e **Cmax** para avaliar os efeitos de seqüência (grupo), de voluntários, de período e de tratamento.

Para um estudo que emprega dose única dos medicamentos teste e de referência, a **A.N.O.V.A.** é geralmente realizada com as razões de **A.S.C.0-t** e **Cmax**, entre as formulações, aplicando-se as funções transformadas logaritmicamente. A distribuição dos dados transformados se aproxima mais a uma distribuição normal em relação aos dados não transformados. O poder esperado para o teste é acima de 80% e o nível de significância de 5%, construindo-se um intervalo de confiança (I.C.) de 90% para a razão entre as médias dos valores obtidos com os medicamentos teste e referência, para cada um destes parâmetros, utilizando-se dados transformados logaritmicamente. **Tmax** será analisado como diferença individual: teste—referência, construindo-se um intervalo de confiança (I.C.) de 90%, utilizando-se teste não paramétrico.

Dois medicamentos serão considerados bioequivalentes quando o I.C. de 90% para a razão entre as médias de **A.S.C.0-t** e de **Cmax** estiver compreendido entre 80% e 125%. Outros limites de I.C. de 90% poderão ser aceitos mediante justificativas científicas. Quando clinicamente relevante, **Tmax** deverá também ser considerado (BRASIL, 1999; FDA, 2001).

O método analítico aplicado a testes de bioequivalência, na mensuração da concentração de diferentes fármacos em matrizes biológicas deve ser exato, preciso e específico. Não há um consenso quanto ao melhor método, porém, o formado pela C.L.A.E. acoplada à espectrometria de massa, mostra-se de grande valor na análise de fármacos e seus metabólitos, substâncias endógenas polares, apolares e macromoléculas (HOFFMANN, 1996; LESLIE, 1994; USP, 1995).

A C.L.A.E. é um método de separação química, normalmente utilizado para a análise de fármacos em fluídos biológicos, em testes de bioequivalência, servindo como purificador inicial do fluído biológico avaliado e como introdutor das diferentes substâncias separadas para o dispositivo de análise que, neste caso, é o espectrômetro de massa. A técnica da C.L.A.E. acoplada à espectrometria de massas alia o poder de separação da C.L.A.E. à especificidade e sensibilidade do espectrômetro de massas como detector (HOFFMANN, 1996; LESLIE, 1994; USP, 1995).

As amostras biológicas são previamente tratadas antes de serem injetadas no H.P.L.C (cromatógrafo), por precipitação de proteínas do soro ou

plasma, extração líquido-líquido e líquido-sólido. O método extrativo do analisado pode ter importante impacto sobre a exatidão, precisão e seletividade do processo, conseqüentemente, um padrão interno é adicionado a amostra no início do processo para compensar perdas por transferência e variações de volume nas diferentes etapas. A recuperação do analisado não precisa ser necessariamente de 100%, mas a extensão da recuperação do analisado e do padrão interno deve ser consistente, precisa e reprodutiva (FDA, 2001; LESLIE, 1994; USP, 1995).

A C.L.A.E. é uma técnica baseada numa fase líquida móvel que elui através de uma fase sólida estacionária. As separações das diferentes substâncias presentes no fluido biológico analisado na fase móvel, dá-se por interação com a fase estacionária, através de processos de partição, adsorção ou troca iônica. Os dados obtidos são alturas ou áreas de picos da substância eluída, em diferentes tempos, saindo da coluna primeiramente àquela com menor interação e por fim aquela com maior interação com a fase estacionária. A concentração de cada substância é obtida pela relação entre o analisado e o padrão interno (LESLIE, 1994; USP, 1995).

Diferentes interfaces são utilizadas no acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massa, o que pode ser um problema, pois o espectrômetro requer íons em fase gasosa e as substâncias normalmente analisadas pela C.L.A.E. são compostos não voláteis (HOFFMANN, 1996; USP, 1995). Aquele que parece ser o método ideal de ionização entre a C.L.A.E. e a espectrometria de massa é o *eletrospray*. A fase móvel é borrifada após deixar o capilar, na extremidade do qual existe uma diferença de potencial de vários

quilovolts. A natureza da fase móvel, a velocidade do fluxo e a diferença de potencial são parâmetros que influenciam no tamanho das gotículas, bem como a carga de cada uma delas (HOFFMANN, 1996; USP, 1995). As gotículas caminham contra um fluxo de nitrogênio, que as faz diminuir de tamanho por evaporação do solvente, restando várias moléculas do analisado, que, carregadas eletricamente, vão se separando até praticamente sobrares íons isolados, cuja carga dependerá do número de sítios de ionização de cada molécula em questão ou agregados eletricamente carregados (*clusters*) (HOFFMANN, 1996).

Os analisadores dos espectrômetros de massa separam as espécies carregadas eletricamente, de acordo com a relação massa/carga de cada uma, a partir do que determinará a abundância e massa de cada espécie iônica. Um dos quatro tipos mais comuns de analisadores é o quadrupolo. É formado por quatro hastes dispostas de tal forma que configuram um quadrado, pelo centro do qual passam as espécies carregadas eletricamente. Assim, todos os íons formados no *eletrospray* entram no primeiro quadrupolo do espectrômetro, onde será separada, por potencial elétrico e rádio frequência, apenas a molécula com a relação massa/carga desejada. No quadrupolo seguinte do espectrômetro, o íon colide com um gás inerte (argônio) e produz fragmentos também carregados. Estes são denominados íons produto e são característicos para cada substância. Os íons produto são separados no terceiro quadrupolo do espectrômetro, para serem analisados e quantificados no detector. Para cada potencial elétrico, íons de determinada relação massa/carga são selecionados, pois só eles atravessarão o quadrupolo, atingindo o detector eletrônico no final do aparelho. Todos os demais

são refletidos e perdidos nas laterais do aparelho (HOFFMANN, 1996; USP, 1995).

Este método analítico tem a característica de ser altamente seletivo. Quando se tem uma mistura de substâncias eluídas e advindas do cromatógrafo, o primeiro quadrupolo irá separar somente a de massa/carga desejada, porém, caso haja mais de uma com a mesma relação, a colisão que se dá no segundo quadrupolo irá formar novas espécies, que serão definitivamente separadas no terceiro, restando somente o íon desejado para o analisador.

O processo analítico citado inicia-se com a infusão da mistura em análise no sistema, pelo *eletrospray*, sem a operação do segundo e terceiro quadrupolo (modo *scan*), gerando espectros de massa totais que registram todas as moléculas. Ajustes são feitos para que o sinal da molécula em estudo seja máximo (energia do cone). Após os ajustes, o gás de colisão é ligado e os espectros de massa por “*collision induced dissociation*” (C.I.D.) são registrados (modo produto). Novos ajustes são realizados posteriormente para que o sinal do íon produto selecionado seja o máximo, principalmente pela energia de colisão.

Há muitas aplicações para a espectrometria de massa na área farmacêutica, seja para obter informações qualitativas do fármaco, identificar impurezas e contaminadores e características estruturais de determinada molécula, bem como quantitativas de determinadas substâncias em matrizes biológicas. Este método é muito favorecido quando se usa concomitantemente um dispositivo cromatográfico (HOFFMANN, 1996; USP, 1995).

OBJETIVOS

2

O objetivo deste estudo foi avaliar em voluntários humanos saudáveis, o desempenho de uma formulação do Diclofenaco de Potássio, comprimidos (Clofenak 50 mg), produzido pela Medley Indústria Farmacêutica S/A., Brasil), versus uma formulação referência do Diclofenaco de Potássio, comprimidos (Cataflan 50 mg), produzidos pela Novartis Biociências S. A., Brasil. Vinte e quatro voluntários saudáveis, conforme avaliação clínica e laboratorial, foram associados ao estudo. O estudo foi uma dose única, em dois sentidos aleatórios cruzados que compara a formulação do Diclofenaco de Potássio, (Clofenak, comprimidos – 50mg, por Medley S. A., Brasil) com uma formulação referência Diclofenaco de Potássio (Cataflan - 50 mg, por Novartis Biociências S/A., Brasil). Amostra de plasma para a determinação de Diclofenaco foi obtida na pré-dose e a intervalos freqüentes de até 12h pós-dose. As concentrações de Diclofenaco no plasma foram quantificadas por um método validado empregado de espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida (LC-MS-MS). Os voluntários foram monitorados ao longo do estudo. A taxa de pressão sanguínea sistólica e diastólica e de pulso foram medidos e tomados na pré-dose e a intervalos de até 12h. A tolerância de ambos os produtos foi boa. Nenhuma reação adversa significativa foi relatada ou observada.

CASUÍSTICA

3

Vinte e quatro voluntários sadios de ambos os sexos, adultos, com idade entre 18 e 45 anos, entre os 10% do peso corporal ideal, foram seleccionados para o estudo. O grupo masculino foi composto por 12 voluntários com idade entre: 28.3 ± 8.1 anos. [19 – 42], altura: 170.4 ± 6.1 cm [160.0 - 178.0], peso: 68.6 ± 7.3 kg [57.5 – 82.8]. O grupo feminino foi composto por 12 voluntárias com idade entre: 33.8 ± 6.3 anos. [21 - 41], altura: 158.0 ± 6.2 cm [145.0 – 165.0], peso: 66.8 ± 8.8 kg [52.8 – 81.6].

ASPECTOS ÉTICOS

4

4.1. Aprovação do Estudo

O protocolo foi submetido ao Comitê de Ética da Universidade de São Paulo para aprovação. Qualquer mudança principal requereu aprovação do Comitê.

O estudo foi administrado conforme as providências da Declaração de Helsinki (1965) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983) e África do Sul (1996).

4.2 Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Os voluntários receberam uma explicação completa da natureza e o que se propõem na investigação do estudo. Foi compreendido que o estudo só serviria para propósitos de pesquisa e não se esperava que provesse qualquer benefício terapêutico aos indivíduos. O voluntário também entendeu que ele poderia se retirar a qualquer hora do estudo sem nenhum constrangimento. A cada voluntário foi exigido informar seu consentimento por escrito para a participação no estudo. O investigador principal manteve uma cópia do consentimento livre esclarecido de cada voluntário.

4.3 Confidencialidade

Os resultados dos testes de laboratório e exames médicos foram registrados nas folhas clínicas dos voluntários e no arquivo de pacientes do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Toda a informação obtida

durante a conduta do estudo em cumprimento ao estatuto de voluntários da saúde estava disponível para o pessoal médico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Uma cópia dos exames de laboratoriais executadas para o estudo pós-clínico foi dada aos voluntários.

PROTOCOLO CLÍNICO

5

5.1 Projeto de Estudo

O estudo clínico consistiu em um estudo aberto, delineamento aleatório, aberto, cruzado de dois períodos com 24 (vinte e quatro) voluntários saudáveis de ambos os sexos (12 masculinos e 12 femininos). Após o período de seleção, os voluntários que se qualificaram foram hospitalizados por dois períodos de aproximadamente 24 horas. Cada hospitalização teve um intervalo de uma semana. Em cada período, os voluntários foram hospitalizados às 22 horas da noite anterior ao início do estudo, já tendo recebido dieta a que estavam habituados, quando iniciaram jejum de no mínimo 8 horas. O jejum foi mantido por mais três horas após a administração de uma dose de 50 mg de Diclofenaco de Potássio, com 200 ml de água potável, por via oral, o que ocorreu por volta das 7 horas da manhã seguinte.

A seqüência randômica de administração das diferentes formulações está descrita no Quadro 1. Às dez horas, todos os voluntários receberam 200ml de suco de laranja e um sanduíche. Almoço e jantar foram fornecidos 5 e 12 horas após a medicação, respectivamente. Nenhum outro alimento foi permitido durante a permanência no hospital. Líquidos foram liberados à vontade, sendo evitados aqueles contendo xantinas, como chás, café e bebidas à base de cola.

Quadro 1: Randomização da formulação administrada

VOLUNTÁRIOS		SEQÜÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO	
NÚMERO	INICIAIS	1	2
I	APS	T	R
II	ACR	R	T
III	CEPF	T	R
IV	MAMG	R	T
V	MCTL	T	R
VI	MFCFL	R	T
VII	SMF	R	T
VIII	AMD	T	R
IX	ESS	R	T
X	NSS	T	R
XI	MLS	T	R
XII	VBS	R	T
XIII	AAP	R	T
XIV	JCS	T	R
XV	JSS	R	T
XVI	CCPC	T	R
XVII	PCS	R	T
XVIII	LCM	R	T
XIX	ELB	T	R
XX	VO	T	R
XXI	MS	R	T
XXII	JMN	T	R
XXIII	FCT	R	T
XXIV	MBS	T	R

A cada coleta sangüínea, pressões arterial sistólica e diastólica foram medidas não invasivamente pelo uso de esfigmomanômetro, além de serem anotadas também a temperatura axilar corporal e freqüência cardíaca.

5.2 Programação do Estudo

- Período de Pré-Estudo:**
- História Médica
 - Exame físico geral
 - Eletrocardiograma
 - Exame Clínico Laboratorial
- Período Confinado:**
- Foi coletado antes da dose uma amostra de sangue e 0.25:, 0.5:, 1:, 1.5:, 2:, 2.5:, 3:, 4:, 5:, 6:, 8 e 12 horas após administração do medicamento.
- Período Pós-estudo:**
- Exame físico geral
 - Eletrocardiograma
 - Exame Clínico Laboratorial
- T-Formulação Teste:**
- Diclofenaco de Potássio (Clofenak 50 mg) comprimidos - Medley S/A Indústria Farmacêutica.
- R-Formulação Referencial:**
- Diclofenaco de Potássio (Cataflan 50 mg) comprimidos – Novartis Biociências S.A.

5.3 Seleção de Voluntários

Os voluntários serão aceitos no estudo somente se eles forem considerados saudáveis, conforme determinado pela história médica, exame físico e os exames laboratoriais que antecedem ao início do estudo. Os voluntários realizarão eletrocardiograma (ECG) na avaliação inicial, pré-estudo, e após o último estudo de internação (pós-estudo).

Antes do início do estudo os voluntários serão avaliados quanto as suas condições emocionais para participarem da investigação. Serão esclarecidas

todas as dúvidas restantes e, caso concordem, assinarão o termo de consentimentos para participação no estudo.

5.4 Critério de Inclusão

1. Voluntários masculinos saudáveis ou voluntários femininos saudáveis que não estiverem grávidas ou estivessem amamentando.
2. Idade entre 18 e 45 anos.
3. Livre de doença cardíaca, hepática, renal, pulmonar, neurológica, gastrointestinal, hematológica e psiquiátrica significativa como determinada pela história, exames físicos e psicológicos, eletrocardiograma e as grades laboratoriais.
4. Disponibilidade para terminar o estudo.

5.5 Critério de Exclusão

1. Aqueles que participaram em um estudo voluntário dentro dos três meses precedentes.
2. Voluntários receberam regularmente porções de medicamentos durante as quatro semanas anteriores ao estudo.
3. Voluntários que estiveram em hospital por qualquer razão durante as oito semanas antes do estudo.
4. Voluntários que doaram sangue nos três meses precedentes.

5. Voluntários que tiveram uma história de abuso de álcool e/ou de droga.
6. Voluntários que bebem regularmente mais de 2 unidades de álcool por dia (1 unidade = a ½ cerveja / 1 copo de vinho / 1 medida de aguardente).
7. Peso acima 100 quilogramas ou 15% do peso acima do peso ideal.
8. Voluntários que fumam 15 ou mais cigarros/dia.
9. Voluntários com conhecida alergia a penicilina.

5.6 Registro dos Voluntários

Os voluntários foram registrados no estudo somente se considerados adequados e saudáveis por determinação do histórico médico, exame físico e psiquiátrico e testes de segurança de laboratório desempenhados dentro de oito semanas antes do início do estudo.

5.7 Dosagem

Os voluntários foram orientados a estar presentes a unidade hospitalar aproximadamente às 21h da noite antes de cada dose e permanecer na unidade até 12 horas depois da dosagem.

5.8 Restrições aos voluntários

Todos os voluntários chegaram a unidade tendo jantado normalmente e foram obrigados a permanecer em jejum até duas horas após a administração da dose da manhã, quando um desjejum foi servido. Uma refeição completa foi providenciada após três horas e outra seis horas após a dose. Nenhuma outra alimentação foi permitida durante o período “em casa”.

O refresco líquido foi permitido depois do almoço, mas outras bebidas (incluindo chá, café, cola) foram evitadas.

Fumar não foi permitido durante o período.

Uma possível medicação concomitante foi evitada durante o estudo. Toda medicação, incluída sobre a medicação contrária, foi registrada.

O consumo do álcool era limitado durante todo o período do estudo e foi evitado completamente durante 48 horas antes de cada dose.

5.9 Critério de Retirada

Os seguintes critérios foram usados para a retirada dos voluntários da pesquisa:

1. Voluntários que não desejaram continuar com o estudo por diferentes razões, como por exemplo: indisponibilidade e intolerância para o procedimento de estudo.
2. Quando os efeitos não fossem os desejados da droga em estudo.

3. Quando o teste de laboratório de significado clínico fosse julgado anormal.
4. Quando existisse doença concomitante que requeresse medicação.

5.10 Efeitos Adversos

Foi pedido aos voluntários para relatarem todo o evento adverso e o momento da sua ocorrência. Também foi pedido que notificassem ao investigador caso fosse necessário levar medicamento adicional.

Qualquer evento adverso que tenha ocorrido durante o período de estudo foi registrado em detalhes, por conclusão, na página pertinente nas Folhas Clínicas Voluntárias. Foram feitas investigações sobre o caso do voluntário ter experimentado qualquer evento adverso. Estas investigações limitaram-se a uma pergunta genérica do tipo: “Como você está?”.

Qualquer voluntário com um evento adverso seria acompanhado clinicamente através de estudos de laboratório apropriado, até que todos os parâmetros voltassem ao normal.

5.11 Produtos Estudados

Os produtos do teste que contêm a informação abaixo foram fornecidos por Medley S/A. Indústria Farmacêutica. O produto da referência foi adquirido comercialmente pelo investigador principal.

Quadro 2: Quadro comparativo entre o produto teste e o de referência.

Nome	Produto em Teste	Produto Referencial
	Clofenak	Cataflan
Ingrediente Ativo	Diclofenaco de Potássio	Diclofenaco de Potássio
Forma de Dosagem	Comprimido revestido	Drágeas
Dosagem	50mg	50mg
Número de lote	CLK 03/00-1	Z 62592
Data de Expiração	03/2005	04/2005
Fabricante	Medley S/A.	Novartis Biociências S. A.

MATERIAIS E REAGENTES

6

6.1 Equipamentos

- Pipetas ajustáveis (100 uL, 200 uL e 1000 uL), obtidas da Gilson "Pipetman", França;
- Vórtex mixer, modelo Fisher Vortex Genie 2, obtido da Fisher Scientific Laboratory Equipment, Estados Unidos da América (E.U.A.);
- Ponteiras de plástico, LabTips, modelos LabTip Yellow (5 a 200 uL), e LabTip Blue (200 a 1000 uL), adquiridos da Unilab, São Paulo, Brasil;
- Coluna analítica gênese C₈ 4µm (150 x 4,6 mm de diâmetro interno);
- Tubos de teste de vidro, descartáveis, 120 x 11 mm, adquiridos da Unilab, São Paulo, Brasil;
- Pipetas "Pasteur" (5,75") ou capilares (9");
- Tubos "Eppendorf", adquiridos da Unilab, São Paulo, Brasil;
- Vials de vidro para "Autosampler" (1,1 CTVG) e tampas da Chromacol, E.U.A.;
- Pontenciômetro Quims, número 610874, modelo Q400P, Singapura;
- Centrifuga de várias velocidades, refrigerada, Beckman, número 349702, modelo GPS, E.U.A.;
- Sistema HPLC, modelo Hewlett-Packard 1100 (tabela 6);
- Espectrômetro de massa, modelo Micromass Quattro II, com *electrospray* como fonte, número 6418E;

- o software de análise foi o MassLynx (versão 2,3) executando sobre o Windows NT (versão 4,0) em PC Digital Celeris GL 6200.

6.2 Padrões

Diclofenaco	Análise
Aceto-phenetidine	Padrão Interno

6.3 Reagentes

- Acetonitrila - HPLC obtida da Nuclear, Brasil;
- Dichloromethane;
- Ácido Acético;
- Água –Purificada usando sistemas(Mili-Q ou Elga UHQ);
- Plasma humano para as preparações das curvas de calibração e para os controles de qualidade, cedidos pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, Brasil.

6.4 Coleta das Amostras Sangüíneas

Amostras sangüíneas, para análise da concentração do fármaco no plasma, foram retiradas através de abocate instalado em veia calibrosa do antebraço, previamente à ingestão de um comprimido de 50mg de Diclofenaco de Potássio 0.25; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 4; 5; 6; 8 e 12 horas após a administração do medicamento. Em cada um destes momentos, foram aspirados 6,0 ml de sangue

através de uma seringa e acondicionados em tubos de vidro limpos contendo anticoagulante (EDTA).

As amostras sangüíneas foram centrifugadas a 4000 rpm por dez minutos, em temperatura ambiente e o plasma decantado, removido e armazenado a -20 °C até a análise.

As concentrações plasmáticas do diclofenaco foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa, acoplada a um espectrômetro de massa com ionização por *eletrospray* positivo, sob condições de monitoramento de reação múltipla (M.R.M.).

6.5 Quantificação do Fármaco nas Amostras de Plasma

6.5.1 Extração do Fármaco

Foi realizada uma extração líquida - líquido do fármaco.

A 0,2ml da amostra plasmática armazenada e previamente reconstituída (aquecida até a temperatura ambiente) e homogeneizada (centrifugada a 3500rpm por 5 minutos a 4°C para precipitar solutos) ou ao plasma utilizado para as curvas de calibração (*pool* de plasma humano preparado e obtido do Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo).

Para a extração das amostras foram seguidos os seguintes passos:

Foram dispostos tubos de ensaios 10x75 não siliconados em uma raque. Adicionou-se (400µL) de plasma humano e procedeu-se ao controle de qualidade de amostras, QCs em tubos apropriados.

Cada tubo recebeu (50µL de Aceto-phenetidine 1µg/mL) padrão interno, usando-se um EPPENDORF. Repetiu-se a pipetagem e as amostras foram encaminhadas para o vortex-mix por 10s. Após, adicionou-se 4ml de Diethyl-ether/dichloromethane (70:30), usando-se uma pipeta de vidro calibrada e novamente se encaminhou às amostras para o vortex-mix por 40s.

As amostras permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos e o conteúdo orgânico foi transferido, utilizando-se pipetas Pasteur, para outro tubo limpo. Na sequência, foi removido o solvente usando-se fluxo de nitrogênio a 40 °C.

As amostras foram reconstituídas de fase móvel A (80% CH₃CN, 20% H₂O 10mM ácido acético) (150µL) e reconstituído os resíduos pelo vórtex-mix durante 10s.

A nova solução foi transferida, com uso de pipetas automáticas de pontas plásticas descartáveis, para *vials* que foram fechados e colocados em bandejas do *autosampler* do H.P. 1100.

6.6 Condições do Cromatógrafo

A cromatografia foi realizada utilizando-se de uma coluna modelo Gênesis C₈ 4µm, coluna analítica (150mm x 4,6mm) de diâmetro interno,

adquirido da Jones Chromatography, Thames Valley, (Inglaterra), acoplado a um Mass Spectrometer (Espectrômetro de Massa), modelo Micromass Quatro II. A Cromatografia foi realizada usando uma fase móvel composta (10% *acetonitrile* / 90% de água contendo 10mM ácido acético) a um fluxo de 1.0 mL/min. O sistema operou a uma temperatura de 26°C. A pressão do sistema esteve entre 50bar a 90bar e o tempo total transcorrido de 4.5min. O tempo de retenção observado foi de 2.74min para o diclofenaco e para o controle interno, *Aceto-phnetidine* de 2.11min.

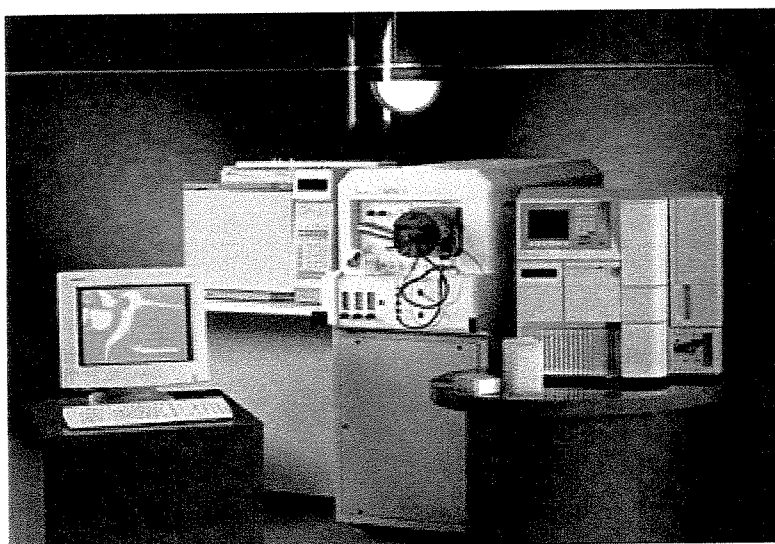
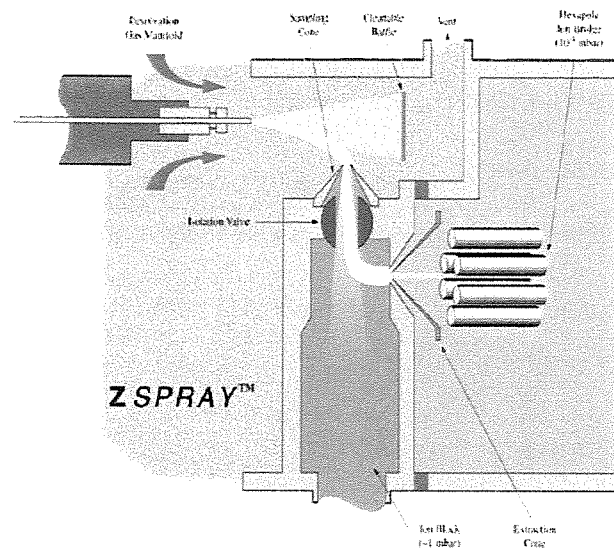
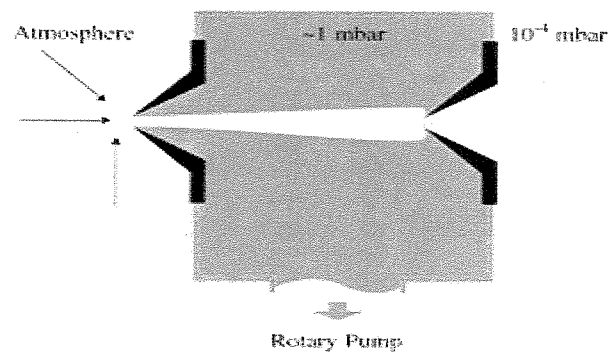


Figura 2: Mass Spectrometer: Micromass Quatro II



On-axis cone system



Z SPRAY™ orthogonal cone system

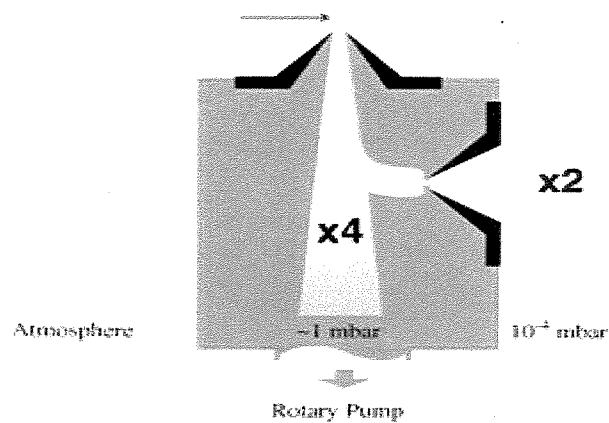


Figura 3: Mass Spectrometer: Z SPREY

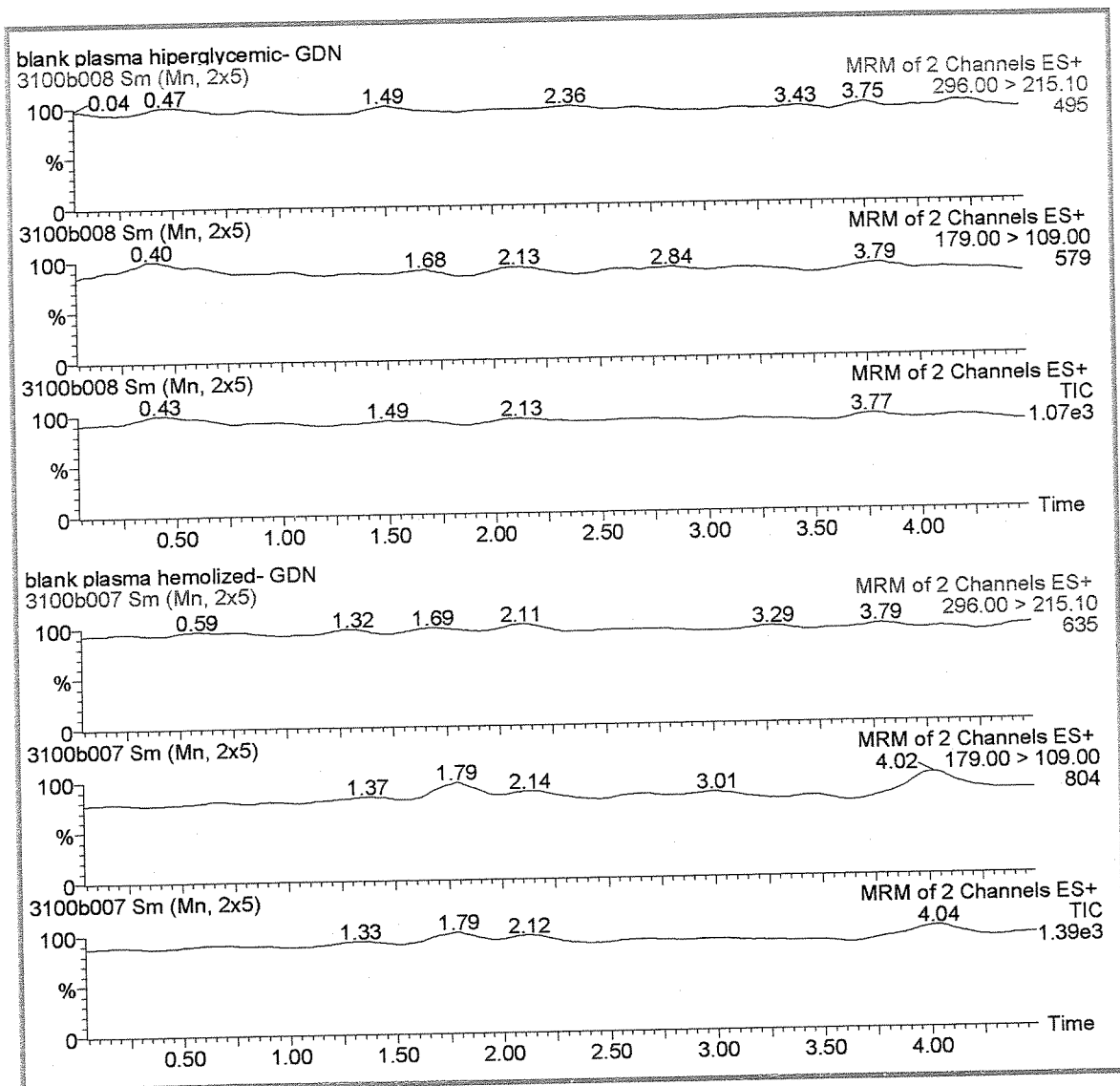


Figura 4: Curvas dos brancos de diferentes plasma humanos submetidos às condições analíticas

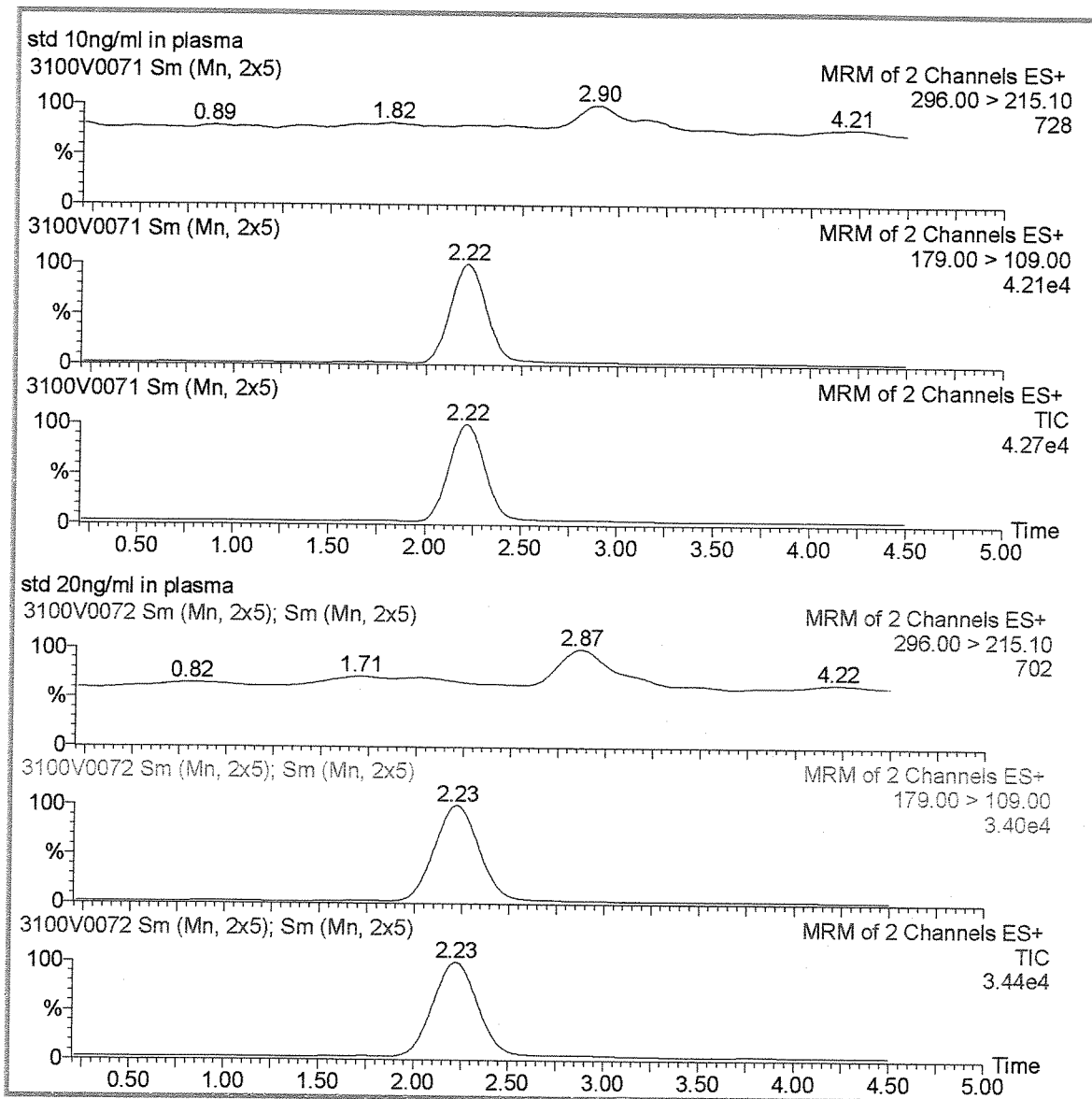


Figura 5: Tempo de retenção do Diclofenaco nas condições analíticas

6.7 Farmacocinética e Análise Estatística

A constante de eliminação de primeira ordem (**ke**) foi estimada pela regressão linear dos pontos da fase de eliminação em gráfico linear-log. A meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) foi obtida pela equação $t_{1/2} = \ln(2)/ke$, onde $\ln$ é o logaritmo neperiano. A concentração plasmática máxima (**Cmax**) e o respectivo tempo para atingir esta concentração (**Tmax**) foram obtidos diretamente das curvas. As áreas sob a curva da concentração plasmática em relação ao tempo, de zero até a última concentração detectada (**A.S.C.0-t**) foram calculadas pela aplicação da regra trapezoidal. Extrapolação dessas áreas para o infinito (**A.S.C.0-inf.**) foi feita pela adição do valor de Ct/ke às **A.S.C.0-t** calculadas, onde **Ct** é a última concentração plasmática do fármaco detectada após a administração deste.

A bioequivalência entre as formulações foi calculada através das razões individual teste/referência de **ASC0-t**, **ASC0-inf.**, **Cmax**, **ke** e $t_{1/2}$ e as diferenças individuais teste-referência para **Tmax**. O intervalo de confiança de 90% para as razões individuais, com uma variação limite dentro do intervalo de 80% a 125% e a inclusão do valor "zero" dentro do intervalo de confiança de 90% para as diferenças de **Tmax**, foram avaliados empregando teste paramétrico (A.N.O.V.A.) e não paramétrico (teste de Wilcoxon). No teste paramétrico foram realizados os cálculos das razões individuais para **Cmax** e **A.S.C.0-t**. Já para **Tmax**, foram realizados os cálculos das diferenças individuais. Os resultados não paramétricos foram estimados pelo intervalo de confiança de 90% das razões individuais,

exceto para **T_{max}**, que foi expresso como ponto estimado e intervalo de confiança de 90% das diferenças individuais.

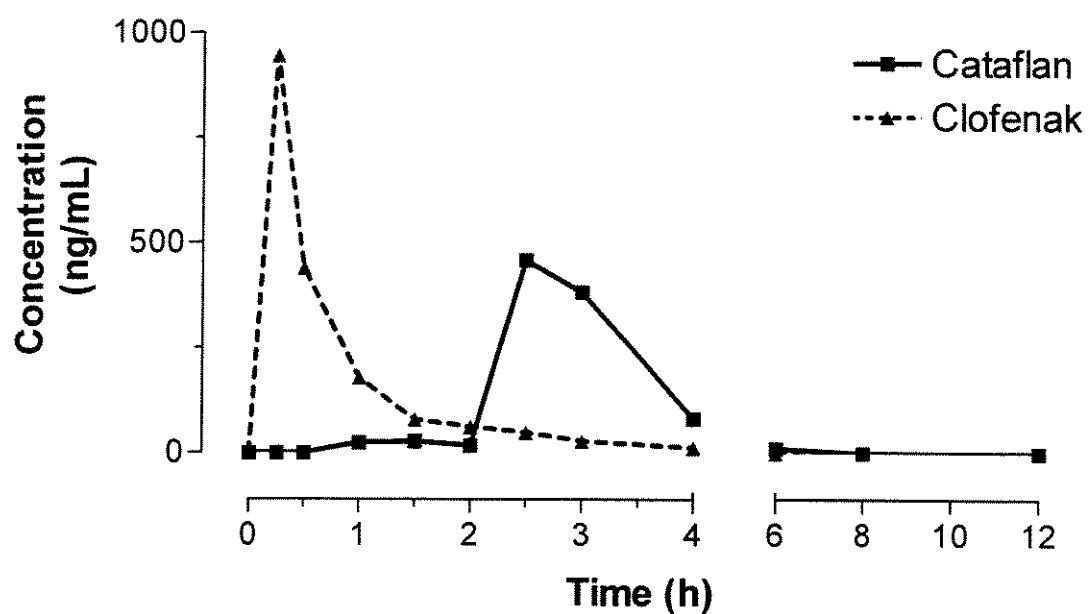
Os programas utilizados de computador foram o "*WinNonlin Professional Network Edition*", versão 1.5 (Pharsight, Mountain View, Ca, EUA), "*Bioequivalence Program for Two-Period Crossover Studies*", versão 3.4 (Hreman P., Wijnand, Oss, Holanda), "*Microsoft Excel*", versão 7 (Microsoft, Redmond, WA, EUA), "*GraphPad Prism*", versão 3.00 (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA) e WinSTAT, versão 3.1 (Kalmia Co, inc, Kalsruhe, Alemanha).

RESULTADOS

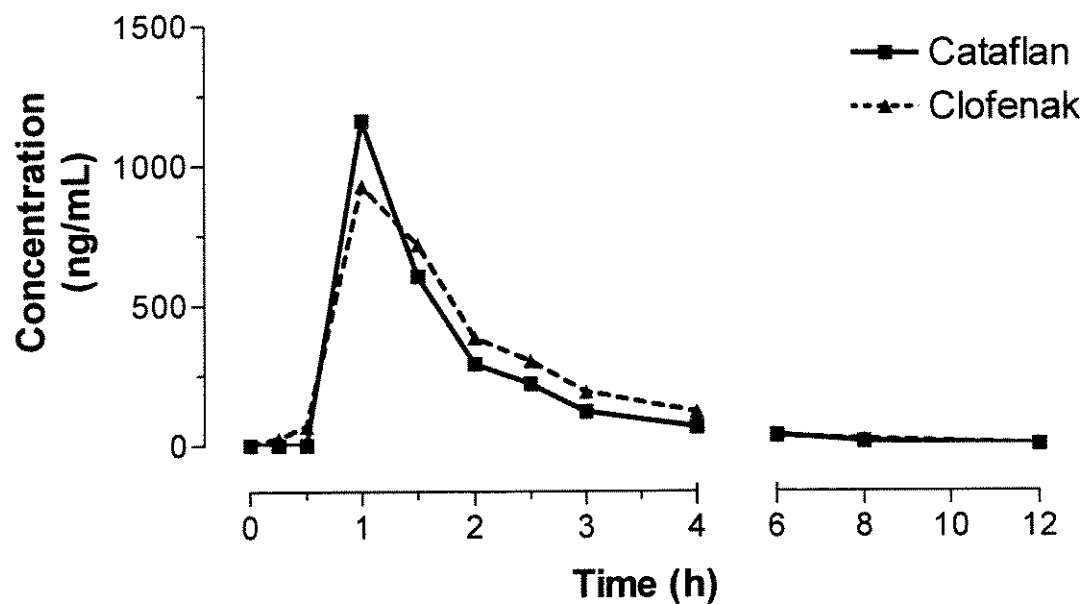
7

CROMATOGRAMAS INDIVIDUAIS

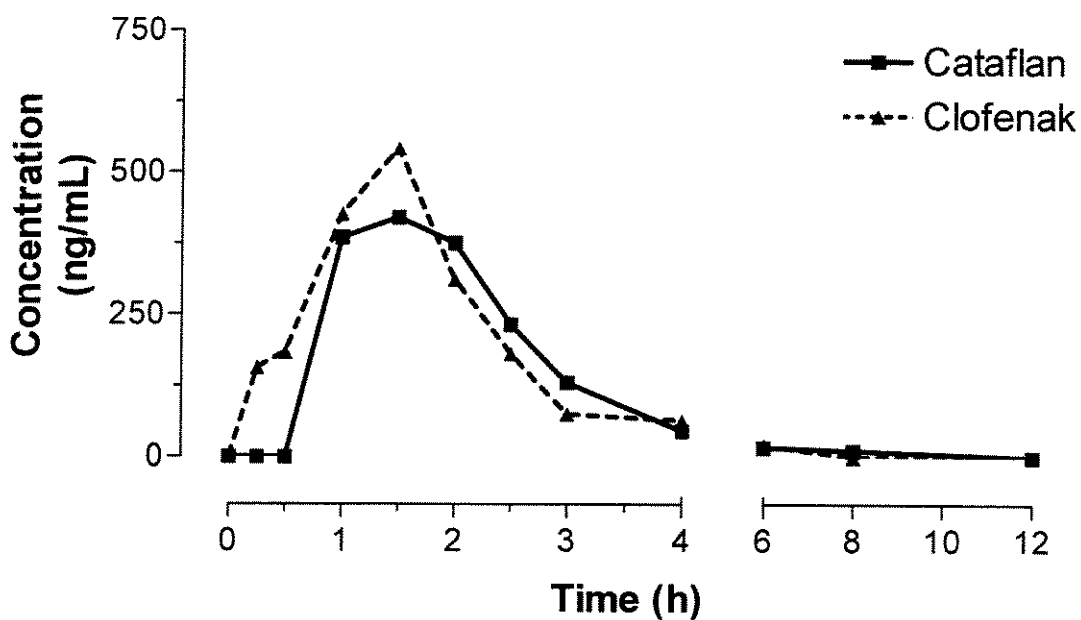
Concentrações individuais do diclofenaco versus tempo (figura) e parâmetros farmacocinéticos (tabela).



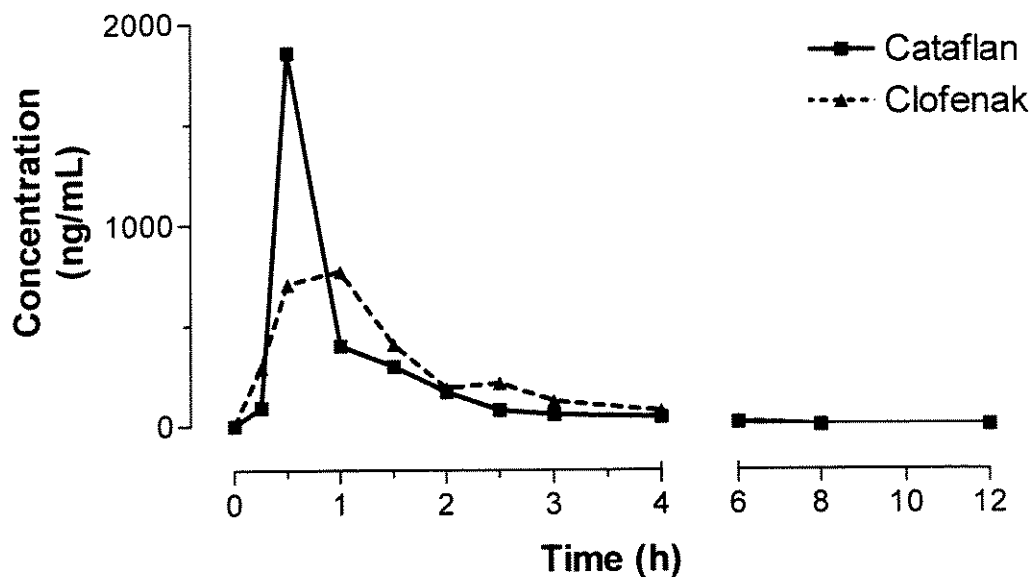
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	4	4
AUC last ([ng * h]/ml)	596	616
AUC Inf ([ng * h]/ml)	681	632
AUC last / Inf (%)	87.5	97.5
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	681	623
AUC all (0-12h) / Inf (%)	100.0	98.6
Cmax (ng/ml)	461	946
Tmax (h)	2.50	0.25
T _{1/2} (h)	0.7	0.8
Ke (1/h)	1.00	0.86



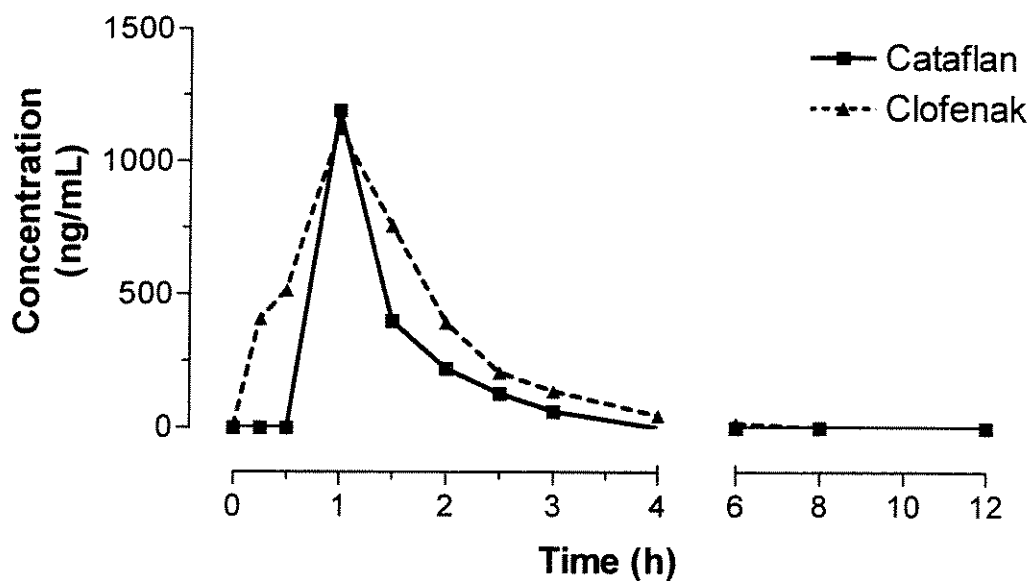
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	8	8
AUC last ([ng * h]/ml)	1409	1572
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1436	1633
AUC last / Inf (%)	98.1	96.2
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1433	1609
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.8	98.5
Cmax (ng/ml)	1160	927
Tmax (h)	1.00	1.00
T _{1/2} (h)	1.6	2.3
Ke (1/h)	0.44	0.30



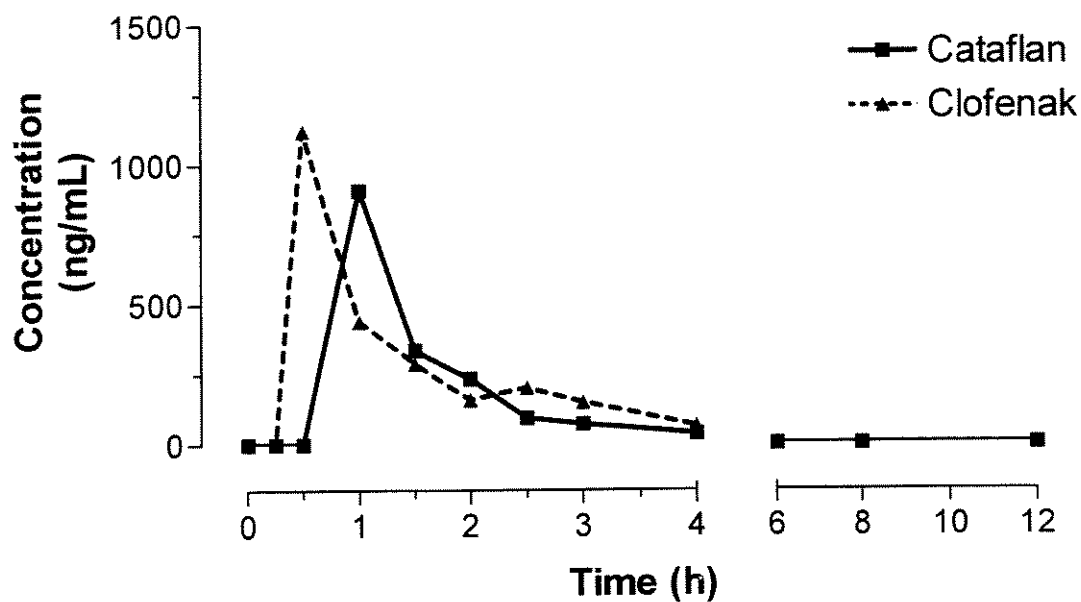
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	6	6
AUC last ([ng * h]/ml)	894	1005
AUC Inf ([ng * h]/ml)	946	1041
AUC last / Inf (%)	94.4	96.6
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	945	1026
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.8	98.6
Cmax (ng/ml)	420	542
Tmax (h)	1.50	1.50
T _{1/2} (h)	1.5	1.2
Ke (1/h)	0.47	0.58



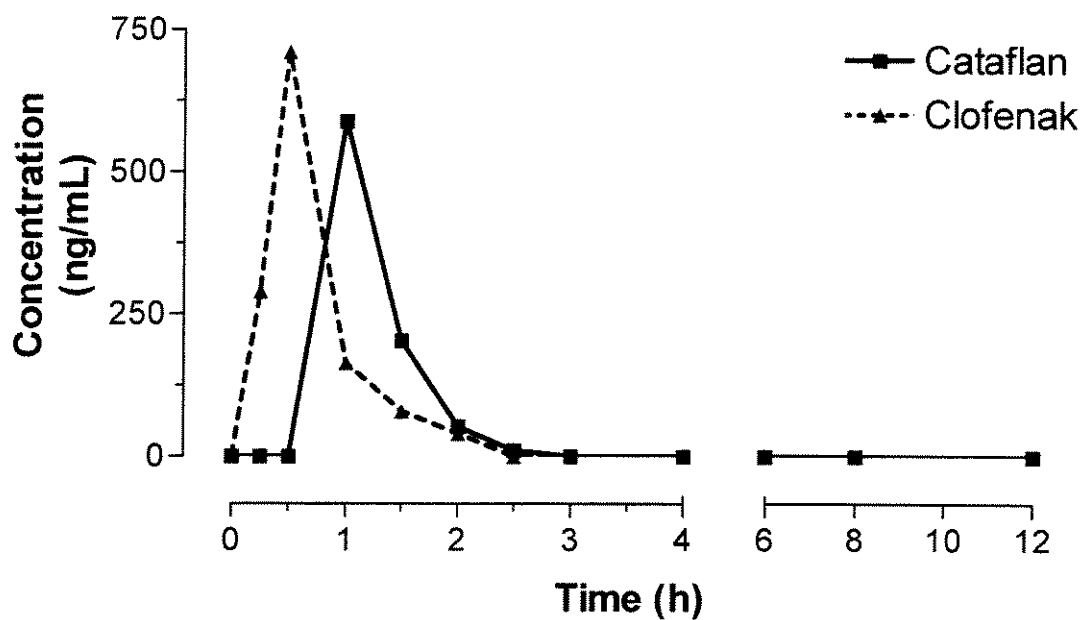
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	6	6
AUC last ([ng * h]/ml)	1311	1334
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1344	1367
AUC last / Inf (%)	97.5	97.6
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1326	1355
AUC all (0-12h) / Inf (%)	98.6	99.2
Cmax (ng/ml)	1856	769
Tmax (h)	0.50	1.00
T _{1/2} (h)	1.6	1.1
Ke (1/h)	0.45	0.65



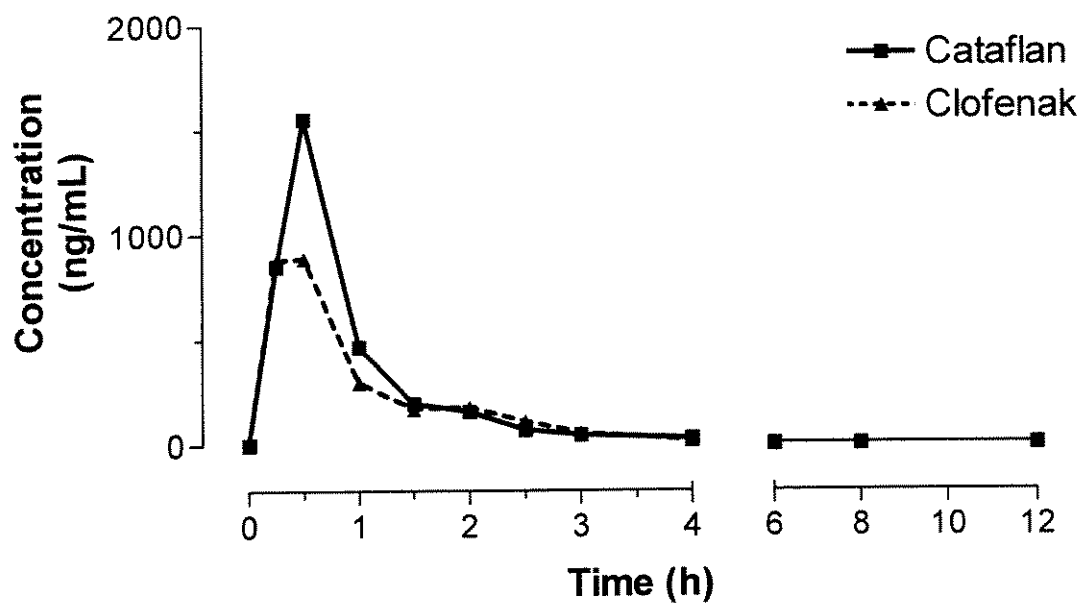
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	5	5
AUC last ([ng * h]/ml)	1064	1697
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1082	1733
AUC last / Inf (%)	98.3	97.9
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1072	1732
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.1	99.9
Cmax (ng/ml)	1190	1126
Tmax (h)	1.00	1.00
T _{1/2} (h)	0.8	0.8
Ke (1/h)	0.90	0.91



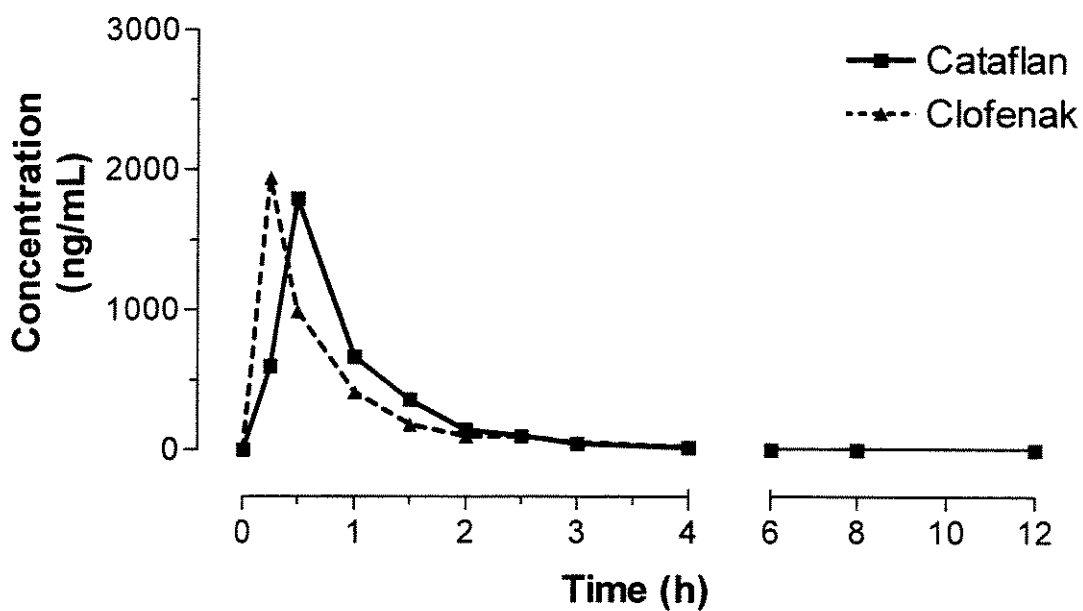
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	5	5
AUC last ([ng * h]/ml)	886	1161
AUC Inf ([ng * h]/ml)	898	1209
AUC last / Inf (%)	98.7	96.0
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	892	1178
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.3	97.5
Cmax (ng/ml)	908	1121
Tmax (h)	1.00	0.50
T _{1/2} (h)	0.7	1.0
Ke (1/h)	0.95	0.72



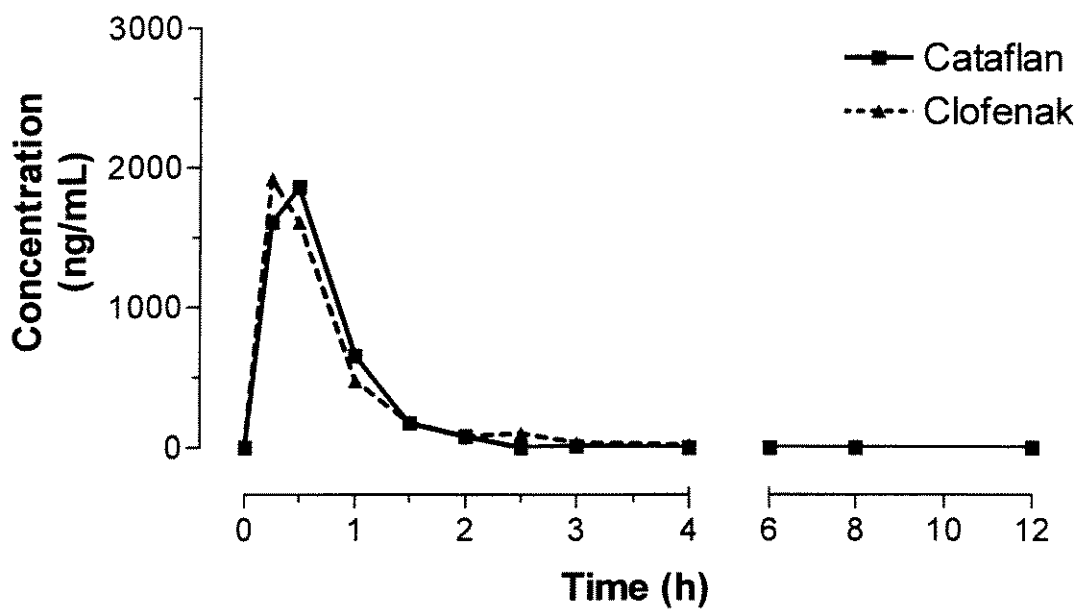
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	2	2
AUC last ([ng * h]/ml)	409	471
AUC Inf ([ng * h]/ml)	429	501
AUC last / Inf (%)	95.4	94.2
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	428	482
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.8	96.2
Cmax (ng/ml)	588	711
Tmax (h)	1.00	0.50
T _{1/2} (h)	0.2	0.5
Ke (1/h)	2.92	1.40



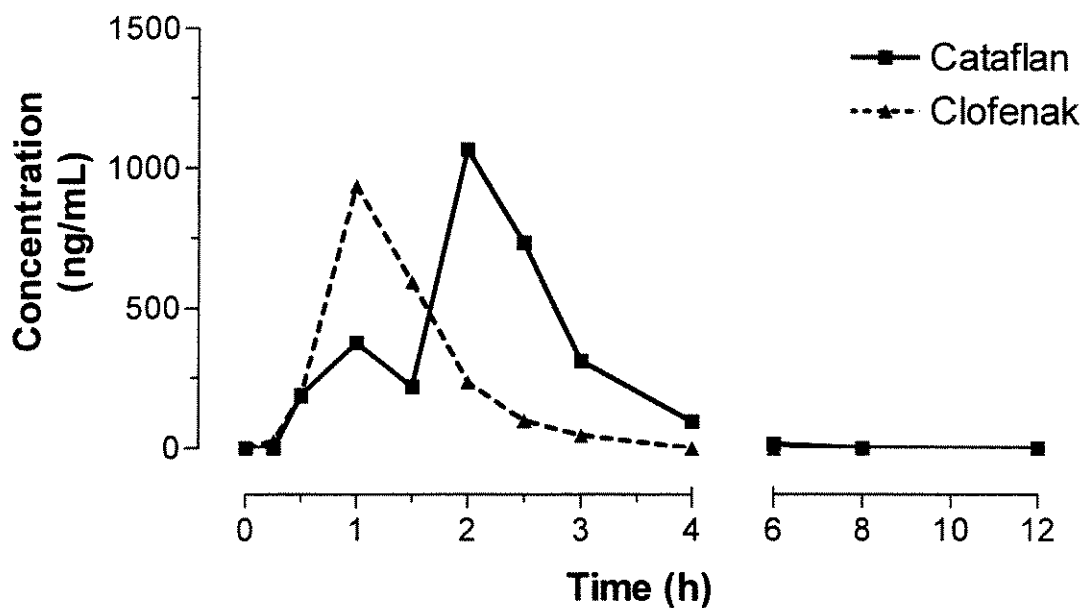
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	4	4
AUC last ([ng * h]/ml)	1285	979
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1346	996
AUC last / Inf (%)	95.5	98.3
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1324	989
AUC all (0-12h) / Inf (%)	98.4	99.3
Cmax (ng/ml)	1552	888
Tmax (h)	0.50	0.50
T _{1/2} (h)	0.9	0.6
Ke (1/h)	0.73	1.14



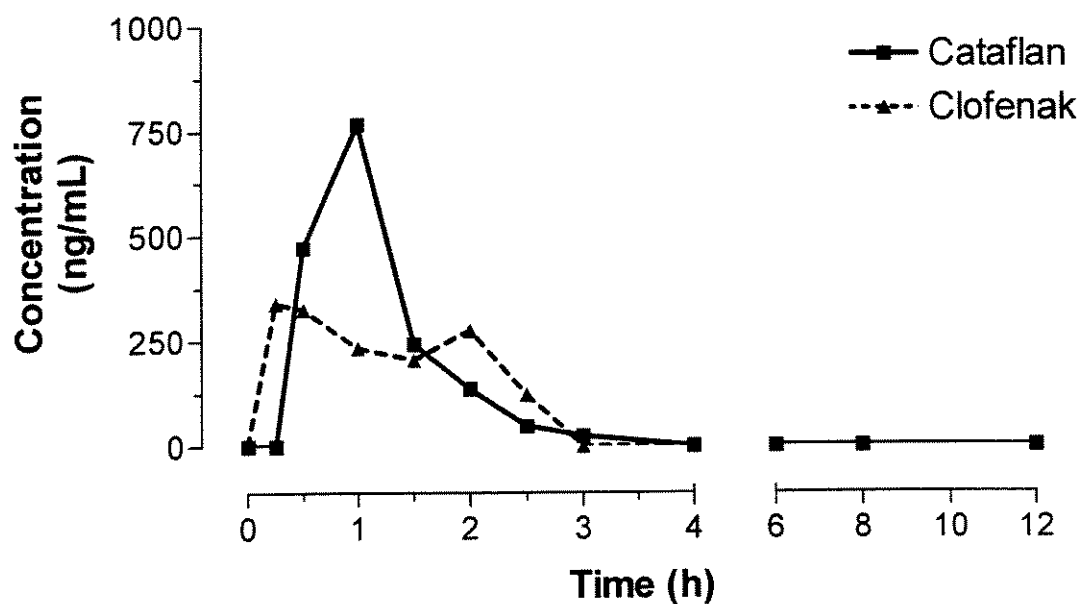
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	4	4
AUC last ([ng * h]/ml)	1514	1318
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1543	1344
AUC last / Inf (%)	98.1	98.1
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1535	1330
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.5	99.0
Cmax (ng/ml)	1797	1943
Tmax (h)	0.50	0.25
T _{1/2} (h)	0.9	0.7
Ke (1/h)	0.77	0.95



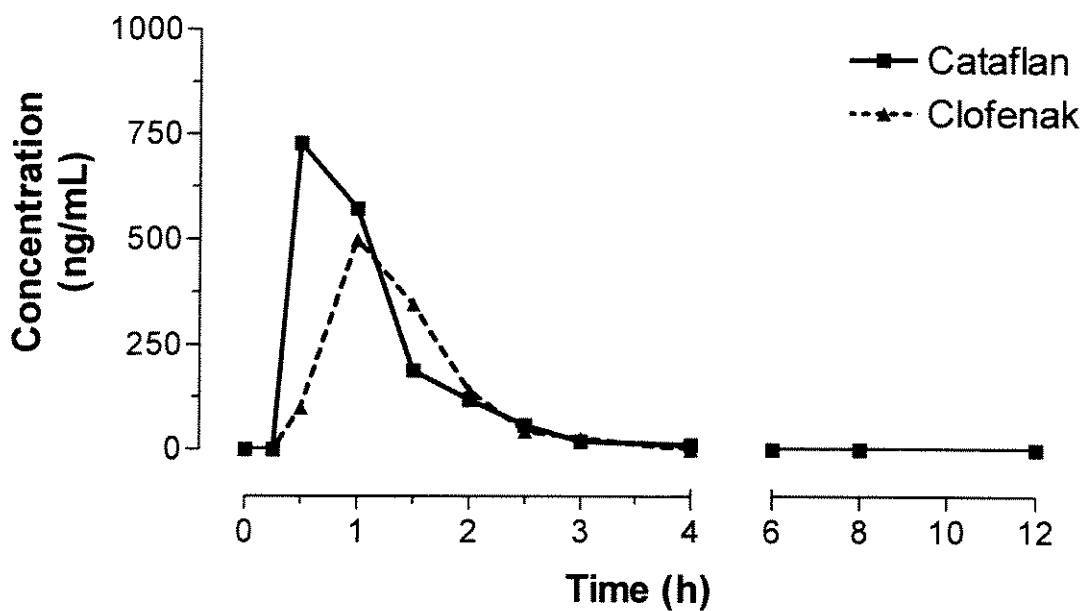
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	1562	1516
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1568	1561
AUC last / Inf (%)	99.6	97.1
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1568	1555
AUC all (0-12h) / Inf (%)	100.0	99.6
Cmax (ng/ml)	1864	1921
Tmax (h)	0.50	0.25
T _{1/2} (h)	0.4	0.6
Ke (1/h)	1.97	1.25



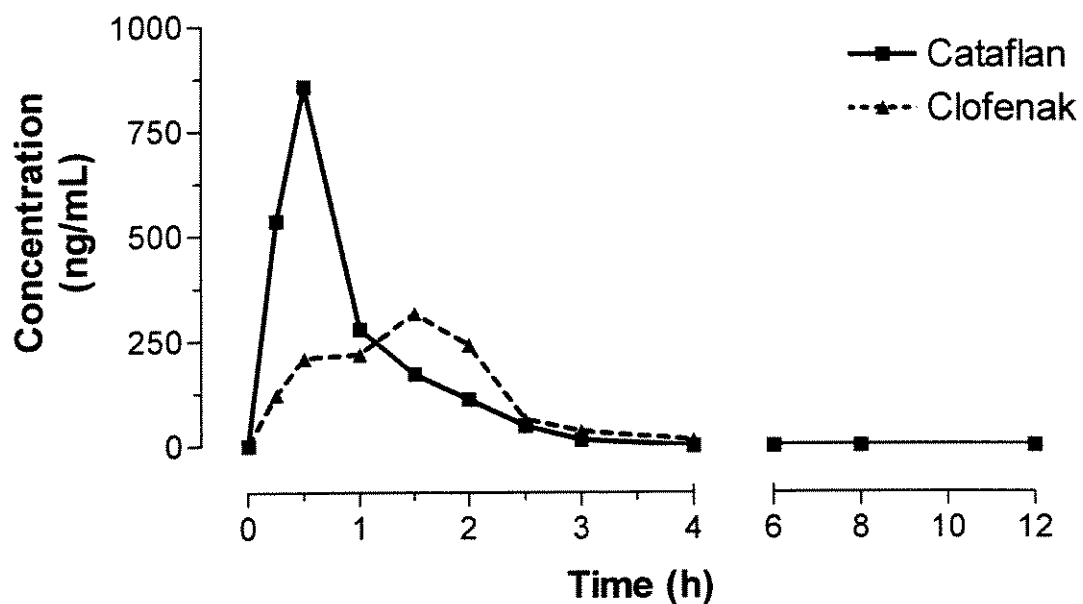
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	1349	1024
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1638	1050
AUC last / Inf (%)	82.3	97.4
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1640	1047
AUC all (0-12h) / Inf (%)	100.1	99.6
Cmax (ng/ml)	1067	937
Tmax (h)	2.00	1.00
T _{1/2} (h)	0.6	0.4
Ke (1/h)	1.17	1.71



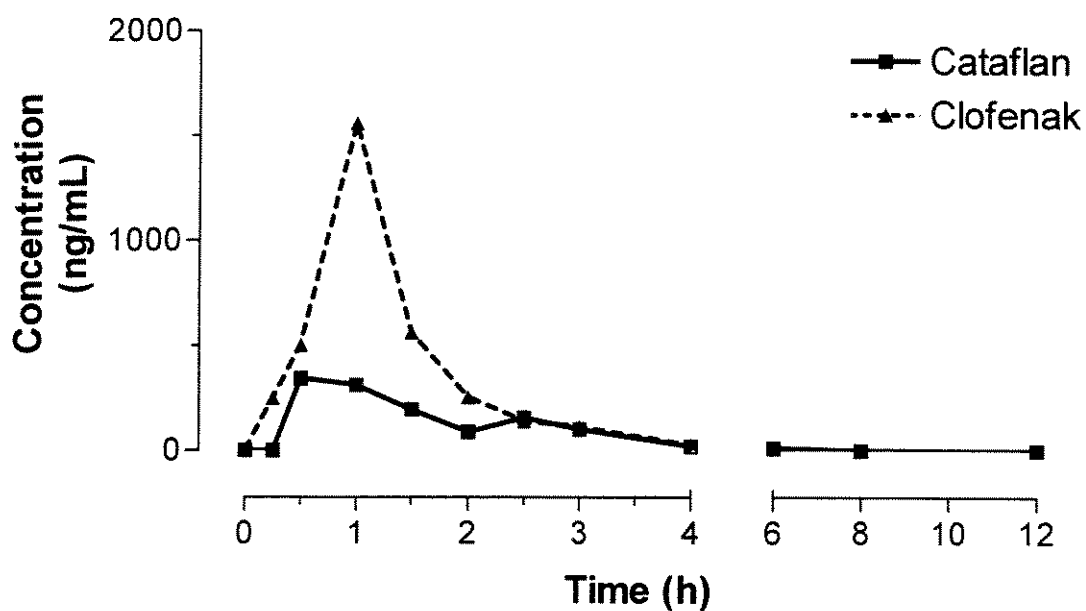
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	763	595
AUC Inf ([ng * h]/ml)	795	941
AUC last / Inf (%)	95.9	63.2
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	793	626
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.7	66.5
Cmax (ng/ml)	768	340
Tmax (h)	1.00	0.25
T _{1/2} (h)	0.4	2.0
Ke (1/h)	1.70	0.35



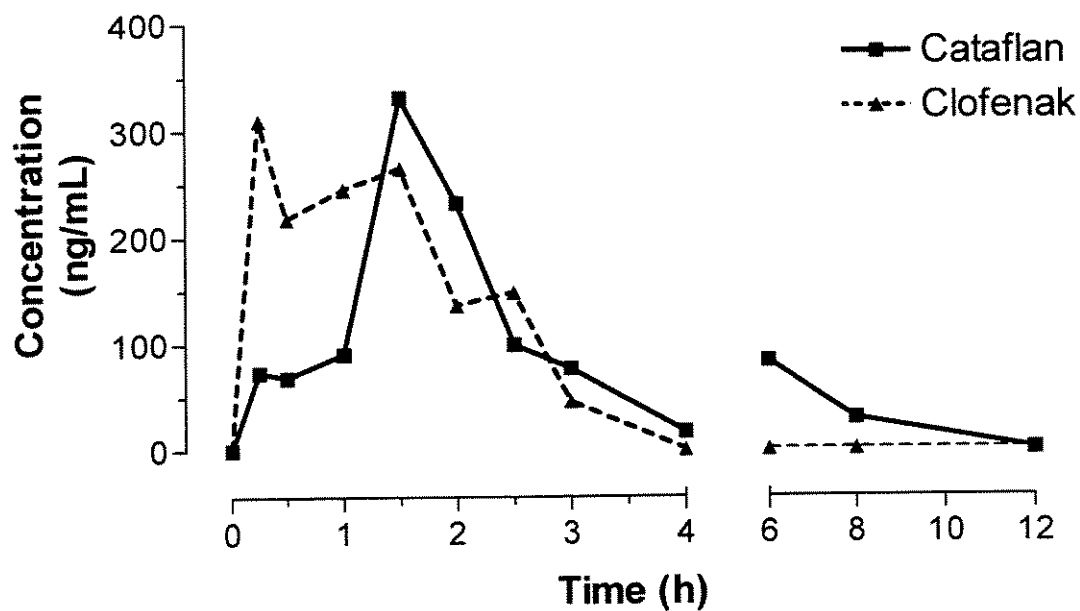
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	748	559
AUC Inf ([ng * h]/ml)	773	574
AUC last / Inf (%)	96.7	97.4
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	770	573
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.6	99.7
Cmax (ng/ml)	729	500
Tmax (h)	0.50	1.00
T _{1/2} (h)	0.5	0.4
Ke (1/h)	1.29	1.77



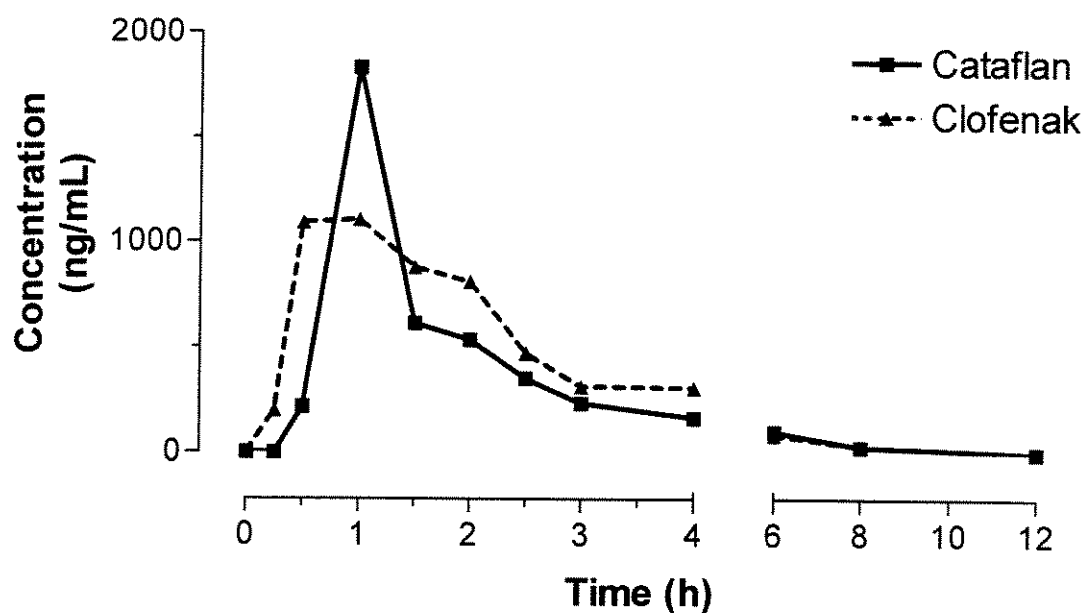
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	765	539
AUC Inf ([ng * h]/ml)	773	578
AUC last / Inf (%)	99.0	93.2
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	773	571
AUC all (0-12h) / Inf (%)	100.0	98.8
Cmax (ng/ml)	857	317
Tmax (h)	0.50	1.50
T _{1/2} (h)	0.3	0.7
Ke (1/h)	2.02	0.99



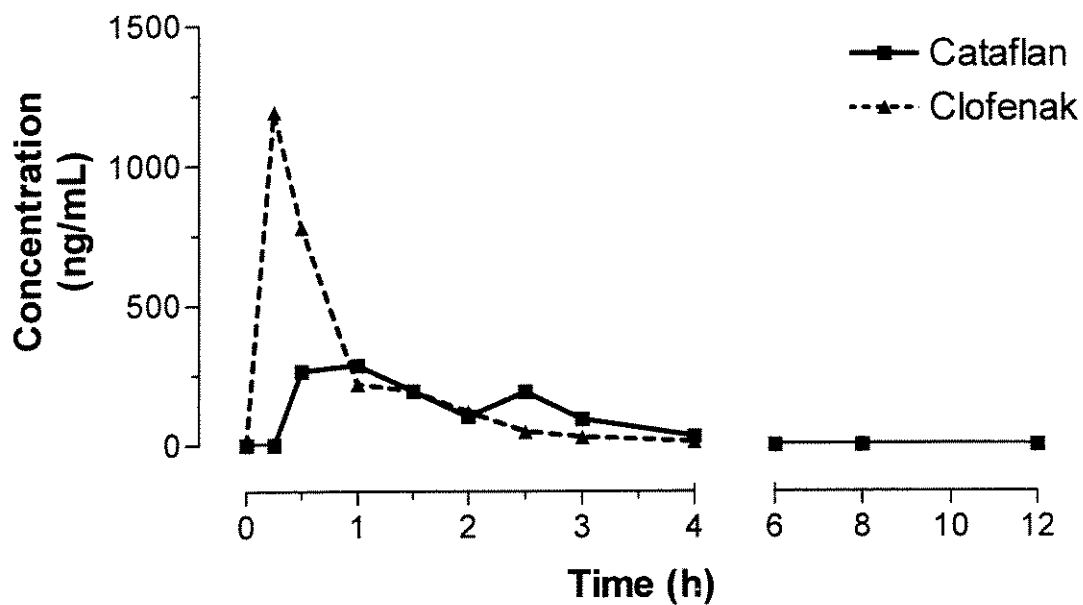
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	6	6
AUC last ([ng * h]/ml)	629	1653
AUC Inf ([ng * h]/ml)	650	1668
AUC last / Inf (%)	96.9	99.1
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	643	1665
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.0	99.9
Cmax (ng/ml)	348	1562
Tmax (h)	0.50	1.00
T _{1/2} (h)	1.0	0.8
Ke (1/h)	0.69	0.84



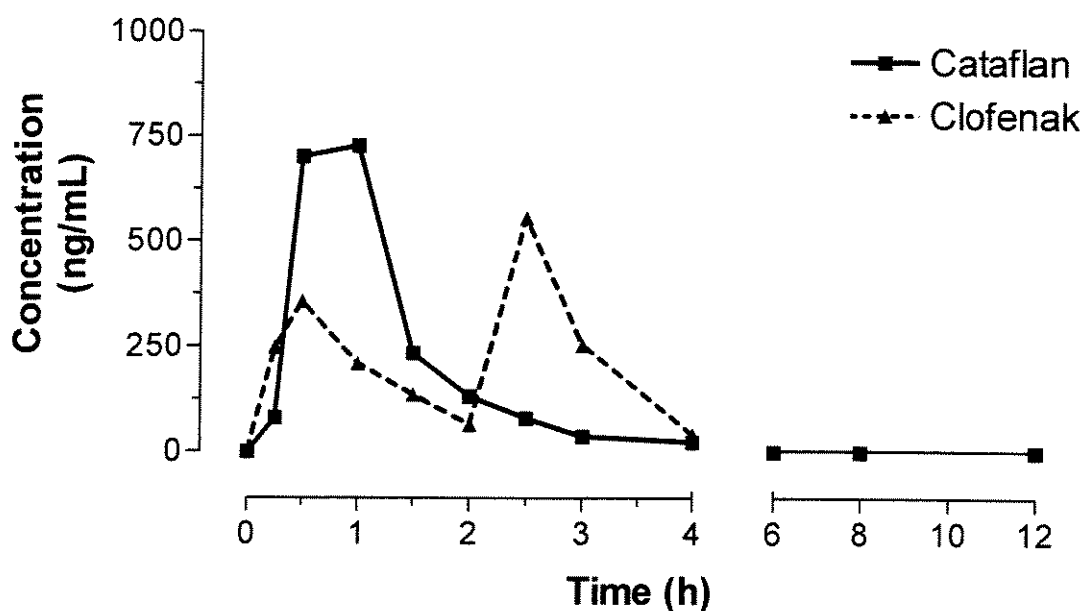
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	440	568
AUC Inf ([ng * h]/ml)	821	612
AUC last / Inf (%)	53.6	92.7
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	813	591
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.1	96.5
Cmax (ng/ml)	331	310
Tmax (h)	1.50	0.25
T _{1/2} (h)	1.6	0.7
Ke (1/h)	0.44	1.03



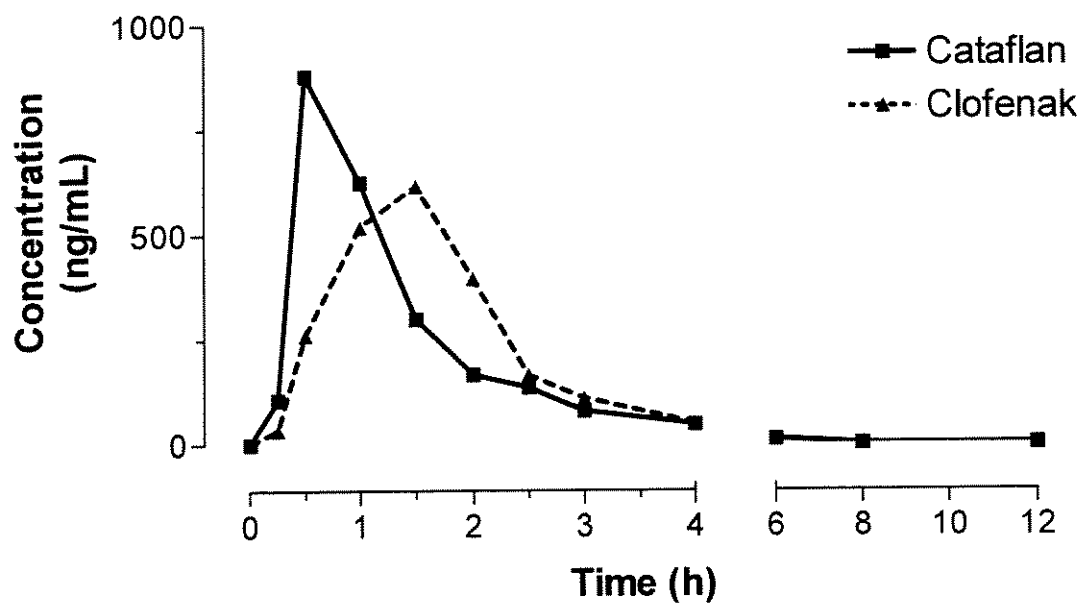
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	8	8
AUC last ([ng * h]/ml)	2385	2912
AUC Inf ([ng * h]/ml)	2451	2971
AUC last / Inf (%)	97.3	98.0
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	2444	2974
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.7	100.1
Cmax (ng/ml)	1833	1106
Tmax (h)	1.00	1.00
T _{1/2} (h)	1.6	1.3
Ke (1/h)	0.45	0.52



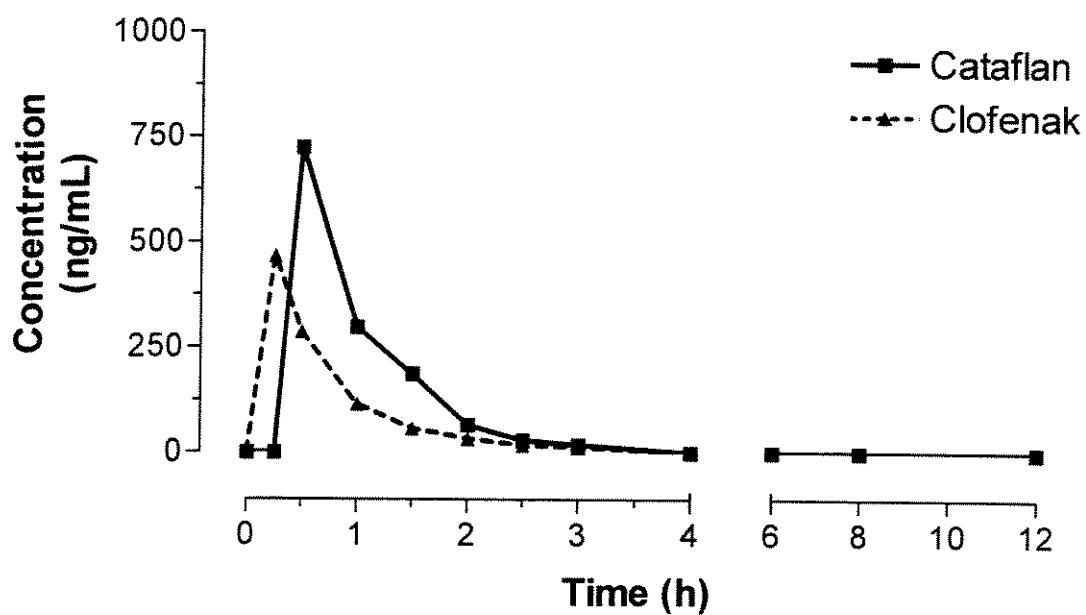
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	4	4
AUC last ([ng * h]/ml)	574	911
AUC Inf ([ng * h]/ml)	622	927
AUC last / Inf (%)	92.4	98.2
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	590	918
AUC all (0-12h) / Inf (%)	94.9	99.0
Cmax (ng/ml)	286	1192
Tmax (h)	1.00	0.25
T _{1/2} (h)	1.0	0.8
Ke (1/h)	0.67	0.83



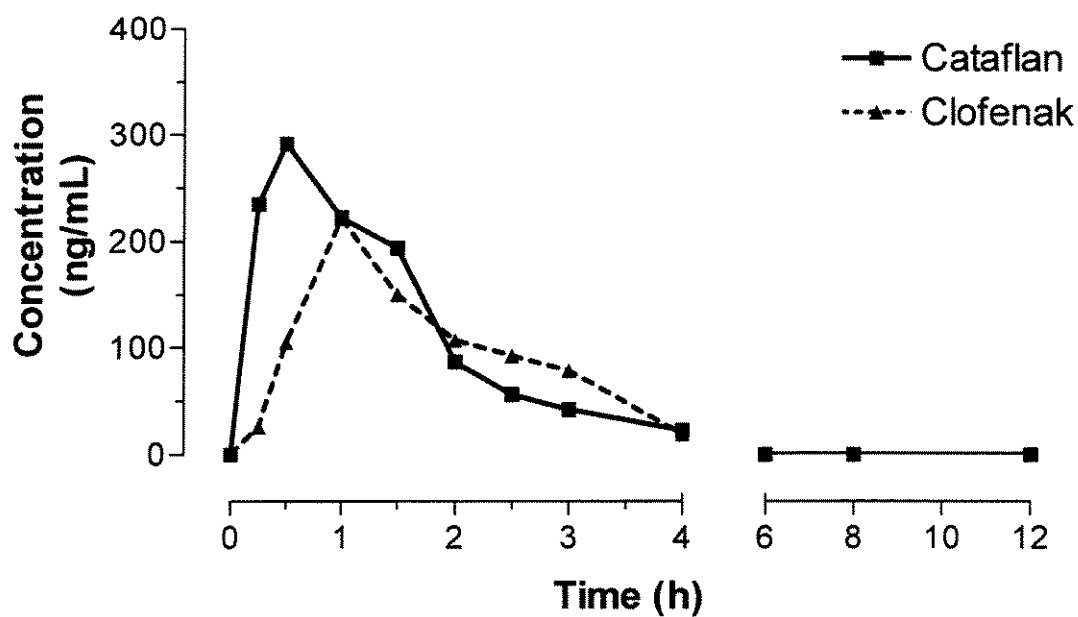
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	4	4
AUC last ([ng * h]/ml)	911	892
AUC Inf ([ng * h]/ml)	934	946
AUC last / Inf (%)	97.5	94.2
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	924	939
AUC all (0-12h) / Inf (%)	98.9	99.2
Cmax (ng/ml)	727	556
Tmax (h)	1.00	2.50
T _{1/2} (h)	0.6	0.5
Ke (1/h)	1.08	1.27



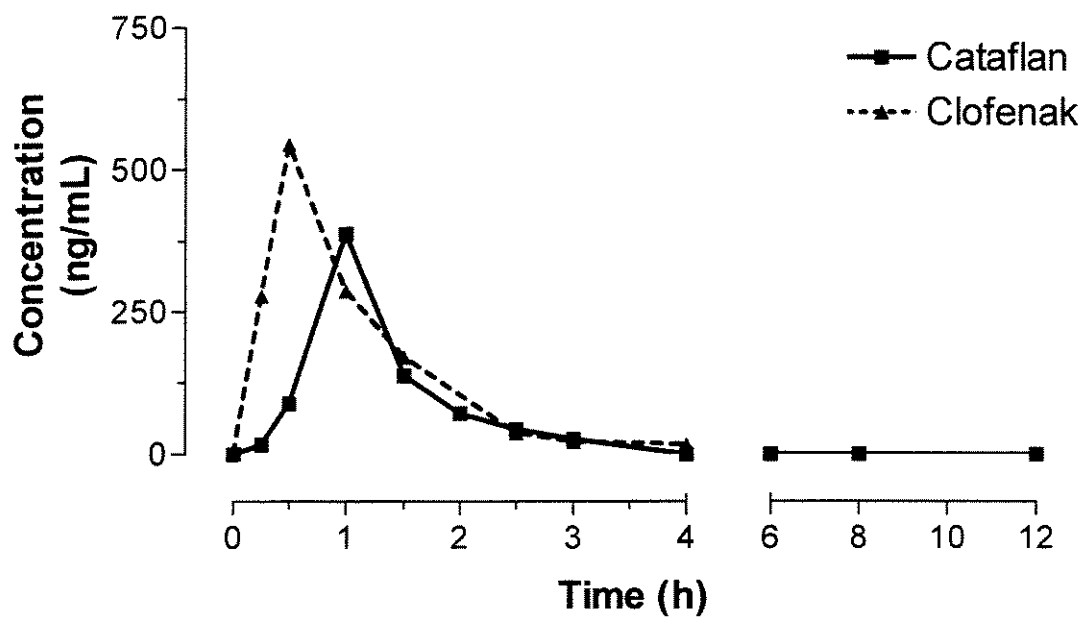
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	6	6
AUC last ([ng * h]/ml)	1104	1126
AUC Inf ([ng * h]/ml)	1121	1144
AUC last / Inf (%)	98.5	98.4
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	1116	1139
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.5	99.5
Cmax (ng/ml)	879	617
Tmax (h)	0.50	1.50
T _{1/2} (h)	1.0	1.0
Ke (1/h)	0.69	0.71



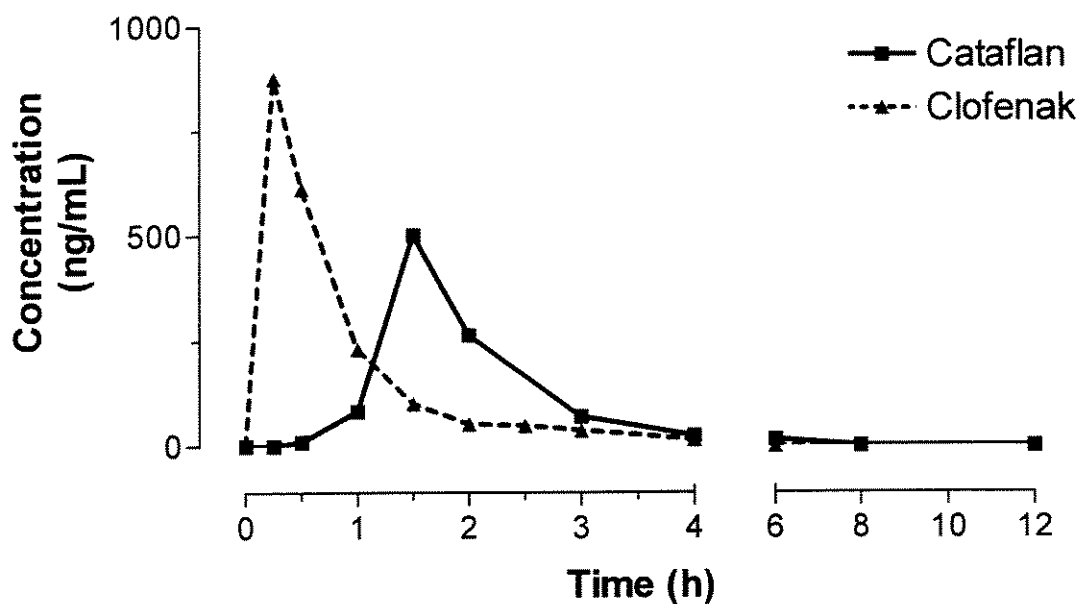
	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	568	342
AUC Inf ([ng * h]/ml)	581	355
AUC last / Inf (%)	97.7	96.3
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	577	349
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.4	98.3
Cmax (ng/ml)	725	468
Tmax (h)	0.50	0.25
T _{1/2} (h)	0.5	0.7
Ke (1/h)	1.49	1.07



	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	4	4
AUC last ([ng * h]/ml)	491	401
AUC Inf ([ng * h]/ml)	528	436
AUC last / Inf (%)	93.0	92.0
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	503	424
AUC all (0-12h) / Inf (%)	95.1	97.3
Cmax (ng/ml)	292	222
Tmax (h)	0.50	1.00
T _{1/2} (h)	1.1	1.0
Ke (1/h)	0.61	0.73



	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	3	3
AUC last ([ng * h]/ml)	366	580
AUC Inf ([ng * h]/ml)	393	617
AUC last / Inf (%)	93.0	94.0
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	379	609
AUC all (0-12h) / Inf (%)	96.5	98.7
Cmax (ng/ml)	388	546
Tmax (h)	1.00	0.50
T _{1/2} (h)	0.7	0.7
Ke (1/h)	0.98	1.06



	Diclofenac	
	Cataflan	Clofenak
T last (h)	5	5
AUC last ([ng * h]/ml)	604	714
AUC Inf ([ng * h]/ml)	647	730
AUC last / Inf (%)	93.4	97.8
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	642	719
AUC all (0-12h) / Inf (%)	99.2	98.5
Cmax (ng/ml)	503	877
Tmax (h)	1.50	0.25
T _{1/2} (h)	0.9	1.1
Ke (1/h)	0.76	0.64

Concentrações plasmáticas individuais (tabela)

Plasma Concentration ng/mL

Subject	1		2		3		4	
Hour	Cataflan	Clofenak	Cataflan	Clofenak	Cataflan	Clofenak	Cataflan	Clofenak
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.0	945.8	0.0	25.2	0.0	157.3	91.9	290.3
0.5	0.0	441.4	0.0	68.5	0.0	184.1	1855.8	706.7
1.0	25.3	180.4	1159.9	926.7	386.0	427.1	400.3	768.8
1.5	28.2	80.4	605.0	718.0	420.2	541.9	295.9	405.6
2.0	17.9	62.1	291.4	385.5	376.1	312.4	168.6	187.7
2.5	460.7	49.6	220.4	302.3	232.9	181.6	79.1	212.8
3.0	385.2	28.8	120.5	190.3	131.9	76.0	56.1	123.4
4.0	82.6	13.4	64.1	118.4	46.3	64.4	42.6	73.1
5.0	27.0	0.0	Not Included	46.0	32.3	33.9	28.1	32.4
6.0	11.2	0.0	36.2	31.9	17.1	20.3	14.9	21.4
8.0	0.0	0.0	11.9	18.5	11.4	0.0	0.0	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	5		6		7		8	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.0	409.5	0.0	0.0	0.0	288.9	848.9	874.7
0.5	0.0	516.6	0.0	1120.8	0.0	711.1	1551.9	888.0
1.0	1190.5	1126.0	908.1	437.7	588.3	165.1	465.0	294.9
1.5	400.3	757.4	336.9	288.0	204.1	79.4	195.1	172.1
2.0	221.8	395.4	234.2	159.5	52.2	40.9	156.8	176.9
2.5	128.1	207.0	95.8	202.3	11.0	0.0	69.1	110.8
3.0	61.8	136.6	73.5	150.9	0.0	0.0	45.7	54.4
4.0	Not Included	45.9	38.4	66.5	0.0	0.0	27.9	19.0
5.0	16.5	20.3	10.9	34.6	0.0	0.0	24.8	0.0
6.0	0.0	16.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	9		10		11		12	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	601.1	1942.8	1611.4	1920.6	0.0	26.3	0.0	339.9
0.5	1796.8	993.4	1863.7	1613.3	190.0	187.3	472.2	325.5
1.0	669.4	417.4	656.6	479.2	376.6	936.9	767.8	233.9
1.5	365.5	188.8	175.5	180.8	220.3	596.8	243.0	205.5
2.0	146.2	101.4	82.8	78.3	1067.2	237.1	136.3	275.3
2.5	104.5	101.5	0.0	105.3	735.2	99.5	47.7	122.5
3.0	48.1	58.3	11.7	35.1	311.5	46.1	24.9	0.0
4.0	21.5	24.0	0.0	21.7	96.5	0.0	0.0	0.0
5.0	10.2	0.0	0.0	0.0	15.4	0.0	0.0	0.0
6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.1	0.0	0.0	0.0
8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

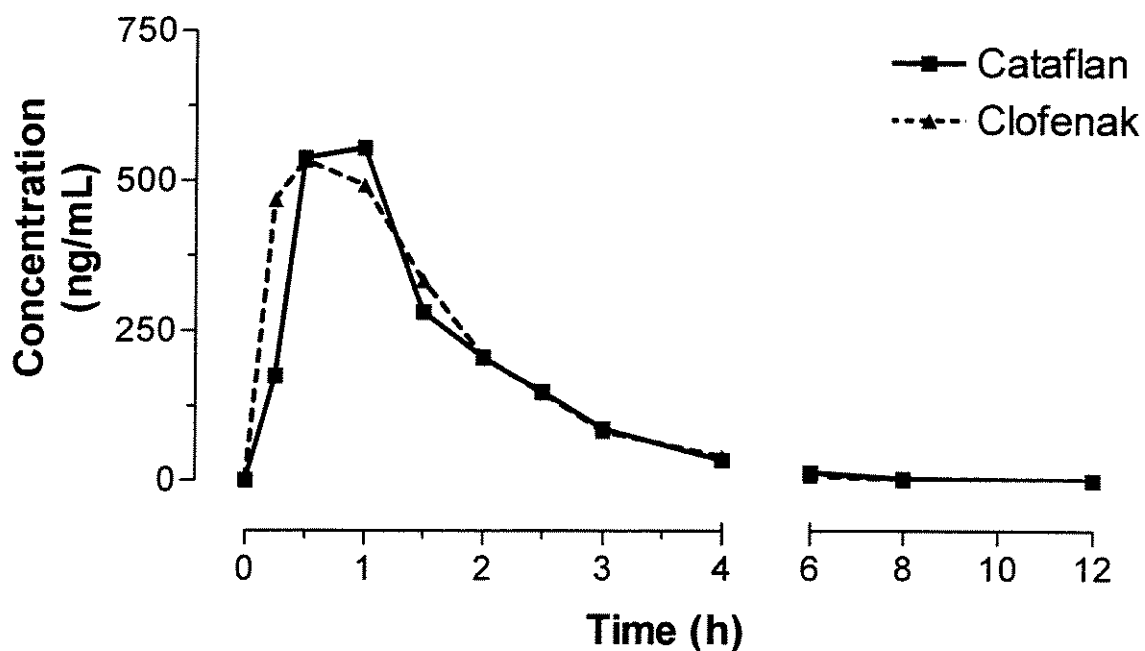
Plasma Concentration ng/mL

Subject	13		14		15		16	
Hour	Cataflan	Clofenak	Cataflan	Clofenak	Cataflan	Clofenak	Cataflan	Clofenak
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.0	0.0	536.9	122.0	0.0	253.0	73.2	309.8
0.5	729.2	99.3	856.5	209.7	347.6	504.0	68.3	217.6
1.0	573.4	499.9	278.8	219.2	316.6	1562.2	90.4	245.0
1.5	188.9	346.9	172.6	317.1	199.4	565.0	330.8	264.6
2.0	119.2	140.3	112.6	242.0	88.9	257.6	232.5	136.1
2.5	57.7	43.6	48.3	63.5	158.9	142.2	99.3	148.4
3.0	19.7	26.9	15.0	35.7	103.3	113.4	76.7	45.9
4.0	12.0	0.0	0.0	14.1	22.1	26.1	16.8	0.0
5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.7	Not Included	105.6	0.0
6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.0	12.8	83.5	0.0
8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	29.2	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	17		18		19		20	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.0	200.1	0.0	1192.4	80.6	248.4	107.3	33.8
0.5	219.0	1093.4	265.9	780.6	702.2	357.3	878.5	261.0
1.0	1832.5	1105.8	286.3	219.2	727.5	210.2	625.3	519.3
1.5	615.4	880.2	195.0	193.2	234.7	136.9	299.9	616.6
2.0	536.5	811.2	103.3	120.2	132.2	64.1	167.5	396.1
2.5	354.5	473.3	192.6	49.2	79.8	556.1	136.3	165.9
3.0	236.7	316.6	93.5	29.4	37.6	254.6	79.9	110.2
4.0	167.1	309.8	32.0	13.8	24.8	41.8	47.9	50.5
5.0	105.0	108.5	0.0	0.0	0.0	26.2	20.1	31.0
6.0	102.5	86.7	0.0	0.0	0.0	0.0	11.6	12.7
8.0	29.8	31.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	21		22		23		24	
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.25	0.0	468.5	234.9	26.3	17.2	278.5	0.0	876.7
0.5	725.3	287.1	291.7	104.9	89.0	545.8	11.0	613.0
1.0	298.2	116.0	222.5	221.6	388.5	288.0	83.1	232.3
1.5	187.4	58.1	194.1	150.7	137.9	170.4	502.5	100.6
2.0	66.1	34.1	86.7	107.3	71.9	Not Included	265.4	52.6
2.5	29.7	19.1	56.4	92.3	44.3	38.1	Not Included	48.2
3.0	19.5	14.1	42.5	78.9	26.9	22.3	69.5	37.2
4.0	0.0	0.0	22.6	19.6	0.0	17.8	24.9	14.9
5.0	0.0	0.0	0.0	13.4	0.0	0.0	27.4	10.3
6.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.0	0.0
8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

* For statistical analysis, all 'not included' points were interpolated. Zeros are true zeros or non-quantifiable quantity.

**Dados da Concentração Média dos Vinte Quatro
Voluntários vs. Tempo (Figura) e
Parâmetros Farmacocinéticos (Tabela)**

Diclofenac Mean



	Diclofenaco			
	Cataflan®		Clofenak	
	Media	SD (variação)	Media	SD (variação)
AUC last ([ng * h]/ml)	943	478	1020	577
AUC INF ([ng * h]/ml)	1000	483	1065	577
AUC last / INF (%)	94.3		95.8	
AUC all (0-12h) ([ng * h]/ml)	992	484	1042	585
AUC all (0-12h)/ INF (%)	99.2		97.9	
Cmax (ng/ml)	897	533	852	469
Tmax (h) (variação)	1.00	(0.50 - 2.50)	0.75	(0.25 - 2.50)
T_{1/2} (h) (variação)	0.8	(0.2 - 1.6)	0.8	(0.4 - 2.3)
Ke (1/h) (variação)	0.84	(0.44 - 2.92)	0.88	(0.30 - 1.77)

DISCUSSÃO

8

As formulações teste e referência do diclofenaco foram bem toleradas na dose administrada, sem alterações significativas dos sinais vitais. A quantificação dos níveis séricos de diclofenaco foi realizada através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com diferentes métodos de detecção (ultravioleta, fluorescência ou detecção eletroquímica), acoplada ao espectômetro de massa (LC-MS-MS). Uma curva de calibração com 8 pontos de concentrações foi preparada para avaliar a relação entre concentração e resposta. O limite de quantificação foi definido, levando em conta os métodos de sensibilidade, precisão e acurácia, sendo que específico controle de qualidade para as amostras foram incluídos nos procedimentos de validação.

O limite de quantificação para o diclofenaco potássico foi de 9,4 µg/ml. A tabela 02 dos anexos mostra os valores obtidos na curva de calibração.

Os valores obtidos dentro do limite de quantificação foram aceitos dentro das seguintes condições:

- Sem interferência ou uma resposta até 5 vezes maior no tempo de retenção;
- Picos identificáveis, com uma precisão de 20% em relação à concentração nominal do padrão;
- Duplicatas com acurácia entre 80% - 120%.

A análise de bioequivalência proposta pelo FDA baseia-se na comparação da biodisponibilidade das duas formulações, levando-se em conta

dois parâmetros farmacocinéticos: a área sob a curva e a concentração máxima atingida.

A área sob a curva representa a extensão da absorção, refletindo essencialmente a média das concentrações obtidas. A área obtida através das concentrações medidas deve representar 80% da área extrapolada até o infinito.

A razão da média geométrica AUClast da formulação Clofenak 50 mg foi 105,8% (Intervalo de confiança de 90%: 94,2 – 118,7) da formulação Cataflan 50 mg.

A razão da média geométrica AUCinf da formulação Clofenak 50mg foi 104,0% (Intervalo de confiança de 90% : 93,1 – 116,2) da formulação Cataflan 50mg.

A razão da média geométrica AUCtotal da formulação Clofenak 50 mg foi 102,1% (intervalo de confiança de 90% : 90,9 – 114,7) da formulação Cataflan 50mg.

Uma vez que o intervalo de confiança de 90% obtido no estudo para a razão AUClast, AUCtotal e AUCinf encontra-se dentro do limite proposto pelo FDA e EMEA (80%–125%), conclui-se que a formulação Clofenak comprimido revestido 50mg é bioequivalente em relação ao Cataflan drágeas 50 mg para a extensão de absorção.

Outro parâmetro importante para avaliação da bioequivalência é a concentração máxima atingida. Nesse estudo a razão da média geométrica Cmax da formulação Clofenak 50 mg foi 97.4 % (intervalo de confiança de 90%: 77.9 –

121.8) da formulação Cataflan 50 mg. De acordo com o FDA a razão entre as **C_{max}** atingidas (teste/referência) deve estar dentro do intervalo de 80%–125%, o mesmo que aquele exigido para área sob a curva. Entretanto, pela “*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*” (EMA) foi aumentado o intervalo proposto para 70%–143%. A razão para este aumento é que sabidamente a concentração máxima atingida apresenta uma variabilidade muito maior do que a área sob a curva, quer seja pela dificuldade de determinar corretamente a concentração máxima atingida (devido à limitação do número de amostras no período em que a mesma deve ocorrer), quer seja pela característica do fármaco quando apresenta alta eliminação hepática.

Uma vez que o intervalo de confiança de 90% obtido no estudo para a razão **C_{max}** encontra-se dentro do intervalo de 70%-143% proposto pela EMA, a formulação Clofenak comprimido revestido 50 mg é bioequivalente em relação ao Cataflan drágeas 50mg para a taxa de absorção.

Para os critérios do FDA, nos quais a razão **C_{max}** encontra-se dentro do intervalo de 80%-125 %, a formulação Clofenak comprimido revestido 50mg não é bioequivalente em relação ao Cataflan drágeas 50 mg para a taxa de absorção.

Do ponto de vista clínico, embora o pico de absorção (**C_{max}**) tenha tido variação em relação ao intervalo proposto pelo FDA (FDA, 1993; FDA, 1998) e EMA, o mesmo não apresenta risco de toxicidade ao paciente, considerando-se que a extensão de absorção e, por conseguinte a extensão de exposição, é a

mesma para ambas as formulações. O diclofenaco continua apresentando um elevado índice terapêutico.

Sabe-se também que com a administração crônica de um medicamento ocorre a atenuação do **C_{max}**. Sendo assim, a discreta diferença observada com a administração única poderia ser muito menor com o uso clínico do medicamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9

BLUME, H.H.; SCHUG, B.S. Bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products: resolution and issues. In: MIDHA, K.K.; NAGAI, T., (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.85-92.

BRAGA, C.A.P. - Guidance from economic theory. In: SIEBECK, W. (Ed.). Strengthening protection of intellectual property in developing countries. Washington: World Bank Discussion Papers, 1990, n.112, p.17-32.

BRASIL. Lei 9.787, de 10 fevereiro 1999. Altera a Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências, regulamentada pela Resolução 391, 9 ag. 1999. Diário Oficial, Brasília, n.152, 10 ag. 1999.

CALABRO, J. J. Clinical of juvenile and adult ankylosing spondylitis. Br. Jour Rheumatl.[S.I.], v.22, 1983. p.104-109. Suplemento2.

_____ Drug therapy of juvenile rheumatoid arthritis and of the seronegative spondyloarthropathies. In: ROTH, S.H. (Ed.) Handbook of drug therapy in rheumatology. Littleton, Mass: PSG Publishing, 1985, p.115-180.

_____ Efficacy of diclofenac in ankylosing spondylitis. Amer. Jour. of Med. n.80, p.58-63, 1986. (Suplemento 48).

_____; LONDINO, A.V.; EYVAZZADEH, C. Ankylosing spondylitis; management: part II. Clin. Rheumatol. Prac. n.3, p.189-206, 1985. pte. 2.

COLIN DOLLERY. Therapeutic Drugs.[S.l:s.n.],1999. p.D 96.

Food and Drug Administration (US). Bioavailability and bioequivalence requirements; abbreviated applications; proposed revisions – U.S. : FDA, v.63, n.64, p.222-228, 1998. (Proposed rule).

_____and Drug Administration (US). Guidance for Industry: bioanalytical methods validation for human studies. U.S. : DHHS-CDER, 2001.

_____and Drug Administration. In vivo bioequivalence guidance's. Pharmacopoeia Forum. U.S. : FDA, v.19, n.6, p.501-508, 1993.

HANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Pharmacology. 3. Ed., Guanabara: Koogan, 1995. p.194.

HOFFMANN, E.; CHARETTE, J.; STROOBANT, V. (Ed.). Mass spectrometry. New York: John Wiley & Sons, 1996. p.1-142.

HOLFORD, N. H. G. Pharmacodynamics and bioequivalence. In: JACKSON, A. J. (Ed.). Generics and bioequivalence. Salem: CRC Press, 1994. p.87-100.

HU, O.Y.; HSIAÓ, M.; LIU, L. Current practise of bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products in Taiwan-China. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T. (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.73-8.

IGA, T. Current practice of bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products in Japan. In MIDHA, K.K.; NAGAI, T., eds. - Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.39-46.

JACKSON, A. J. Role of single- and multiple- dose studies in the estimation of bioequivalency. In: JACKSON, A. J. (Ed.). Generics and bioequivalence. Salem: CRC Press., 1994. p.29-48.

KIRIM, A. S. Reconsidering patents and economic development: a case study of the turkish pharmaceutical industry. World Development, v.13, n.2, p.219-36, 1985.

LESLIE, J. Analytical aspects of bioequivalency testing. In: JACKSON, A. J. (Ed.) Generics and bioequivalence. Salem: CRC Press, 1994. p.69-86.

LEVY, G. Bioequivalence assessment: irrationality within a rational science. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T. (Ed.). Bio international: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetic Studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.29-34.

LU, W.; WEI, S.; WANG, P. Current practice of bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products in China. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T. (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.57-60.

ORMSBY, E. Statistical methods in bioequivalence. In: JACKSON, A. J. Generics and bioequivalence. Salem, CRC Press. 1994, p.1-28.

POUND, N. J. Bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products: the Canadian perspective. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T. (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.47-50.

PRAKONGPAN, S. Current practice of bioavailability/bioequivalence Requirements for immediate release products in Thailand. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T., (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.79-84.

RAINSFORD, K. D.; VELO, G. P. Side-effects of antiinflammatory/analgesic drugs. Lancaster: Kluwer Academic, 1992.

RA,NG H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.213-256.

SALMONSON,T. Current Practice of bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products in European Union. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T. (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.51-56.

SAPIENZA, A. M. R&D collaboration as a global competitive tactic biotechnology and the ethical pharmaceutical industry. New York: R&D Management, 1989. p.35-50.

SCHARPF, F.; RIEDEL, K. D.; LAUFEN, H.; LEITOLD, M. Enantioselective gas chromatographic assay with electron-capture detection for amlodipine in biological samples. J. Chromatogr. B., n.655, p.225-33, 1994.

_____ Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.39-46.

The United States Pharmacopeia XXIII. Mass Spectrometry. São Paulo: USP Convention ,1995, p.1802-1805.

_____ Chromatography. São Paulo: USP Convention, 1995, p.1768-1779.

TUCKER, D. The world health market: the future of the pharmaceutical industry. London: Euromonitor, 1984. p.25-47.

WALTERS, S. Bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products in Australia. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T. (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.61-64.

WILLIAMS, R.L. Current practice of bioavailability/bioequivalence requirements for immediate release products in USA. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T. (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.35-8.

_____The regulatory perspective in USA. In: MIDHA, K. K.; NAGAI, T., (Ed.). Bio international: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Tokyo: Business Center for Academic Societies Japan, 1996. p.23-28.

ANEXOS



1. Curva de Calibração

Uma curva de calibração contendo um padrão de oito zeros foi feita para definir a relação entre concentração e reação. Os valores específicos foram ajustados em testes subseqüentes incluindo a primeira amostra real levando em conta o método sensível e a série antecipada de valores analíticos.

As seguintes etapas presentes nos processos foram feitas para determinar os parâmetros envolvidos assim como os critérios de validação e resultados.

Determinação do limite de quantificação

O limite de quantificação foi definido levando em conta métodos de sensibilidade, precisão e exatidão. Três valores de concentração baixa, ao redor do LOQ antecipado, o qual foi testado com análises duplas na curva. Para determinar o valor da precisão e exatidão, amostras de controle de qualidade específicas foram também incluídas para validação do processo. Medidas foram tiradas para garantir que o mais baixo valor possível era avaliado, por testes de repetição com o menor valor se inicialmente os valores escolhidos fossem todos aprovados facilmente.

O seguinte passo foi achar critérios para aprovar o valor final:

- Interferências não presentes em brancos do tempo de retenção da análise ou uma resposta cinco vezes melhor do que qualquer tempo de retenção;
- Análise pico Identificável, discreto e com uma precisão de 20% em relação à concentração padrão;

Exatidão calculada entre padrões duplos entre 80-120%;

- LOQ Pares de Controle de Qualidade com a mesma concentração é uma das considerações, cumprindo o critério mencionado sobre precisão e acurácia.

Tabela 1: LOQ validação de dados

Validation List ID		V01
Sample Code		QL1
Sample #	Quantified Concentration	Individual Precision
25	10.7 ng/mL	106.7%
26	10.3 ng/mL	103.4%
27	11.0 ng/mL	110.0%
28	10.7 ng/mL	107.1%
29	11.4 ng/mL	113.6%
30	9.8 ng/mL	98.0%
31	10.0 ng/mL	100.3%
32	10.3 ng/mL	103.0%
Mean (ng/mL)		10.5
Precision (CV%)		4.9%
Accuracy (%)		105.3%

Já que, o LOQ validado sob a condição encontrada durante o pré-estudo de validação era de 10ng/ml. Este valor deveria também ser validado para cada estudo analítico. O valor específico está presente na tabela 1.

Linearidade

A curva de calibração linear foi desenvolvida em ordem para encontrar o seguinte critério:

- Menos de 20% de desvio da concentração normal do LOQ, para pelo menos uma das duplas analisadas;
- Menos de 15% de desvio de outro padrão do que o LOQ da concentração normal para pelo menos uma das duplas analisadas;
- Pelo menos quatro zeros fora do padrão para cada concentração normal cumprindo o critério, incluindo o LOQ e a calibração padrão para a mais alta concentração.
- Zero, 95, ou melhor, coeficiente de correlação (r).

Valores específicos estão presentes na tabela 2, assim como a curva de regressão na Figura.

1.2. Dados de Validação da Curva de Calibração

Tabela: Dados de Validação x Curva de Calibração

Sample #	Nominal Concentration	Quantified Concentr. (µg/mL)	Deviation %	Analyte Approved?	Concentration Approved?
	10 µg/mL	9.4	93.7	Yes	Yes
		9.5	95.0	Yes	
	20 µg/mL	17.6	88.1	Yes	Yes
		18.5	92.6	Yes	
	50 µg/mL	48.2	96.3	Yes	Yes
		54.8	109.7	Yes	
	100 µg/mL	105.9	105.9	Yes	Yes
		103.2	103.2	Yes	
	200 µg/mL	187.5	93.7	Yes	Yes
		222.6	111.3	Yes	
	500 µg/mL	533.7	106.7	Yes	Yes
		516.4	103.3	Yes	
	1000 µg/mL	1012.8	101.3	Yes	Yes
		1064.1	106.4	Yes	
	2000 µg/mL	1911.9	95.6	Yes	Yes
		1944.0	97.2	Yes	
		Correlation Coefficient:	0.985806		

Compound 1 name: diclofenaco
 Coefficient of Determination: 0.997331
 Calibration curve: $0.000163801 \cdot x + 0.000715878$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

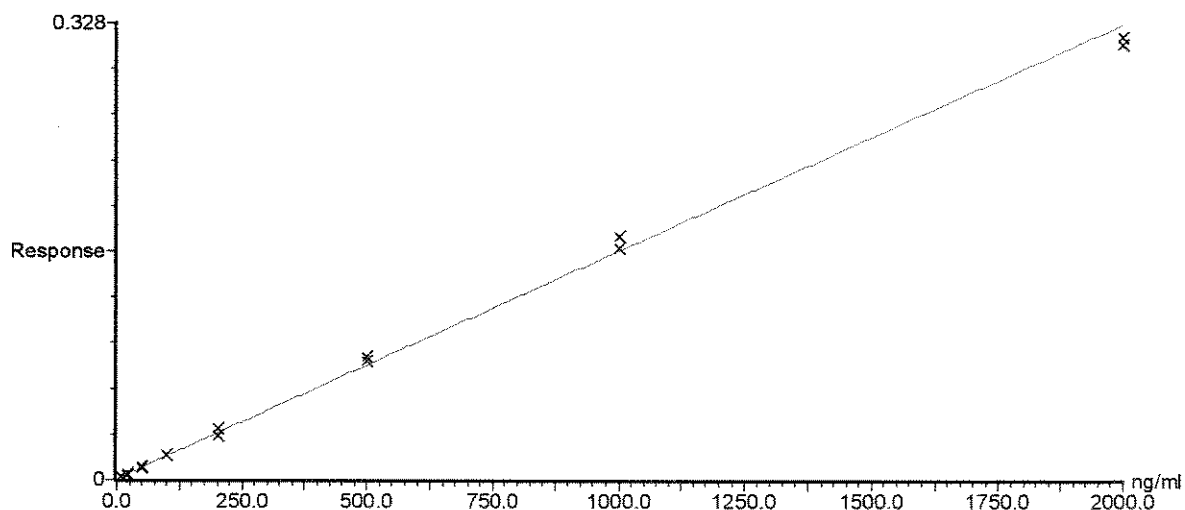


Figure 1: Calibration Curve Linearity

2. Specificity

To test the specificity, blank samples of human plasma were obtained from six individuals under the following conditions:

Table 3 - Matrix

Indiv.	Description	Source	Lot #
1	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-0101243883
2	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-0101409681
3	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-0101357892
4	Normal Human Plasma	Sao Paulo University Hospital	lot-0101243883
5	Hyperlipemic Human Plasma	Cartesius Analytical Unit	lot-gdn
6	Haemolized Human Plasma	Cartesius Analytical Unit	lot-gdn

3. Instrument Settings

Instrument Calibration

Parameters

MS1 Static:

Mass 18 Da to 1976 Da.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 0.1

Reference File: NAICS

Acquisition File: STATMS1

MS1 Scanning:

Mass 20 Da to 2000 Da.

Resolution : 15.0/15.0

Ion Energy: 0.1

Reference File: NAICS

Acquisition File: SCNMS1

MS1 Scan Speed:

Scan 99 to 495 amu/sec.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 0.1

Reference File: NAICS

Acquisition File: FASTMS1

MS2 Static:

Mass 18 Da to 1976 Da.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 0.8

Reference File: NAICS

Acquisition File: STATMS2

MS2 Scanning:

Mass 20 Da to 2000 Da.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 0.8

Reference File: NAICS

Acquisition File: SCNMS2

MS2 Scan Speed:

Scan 99 to 495 amu/sec.

Resolution: 15.0/15.0

Ion Energy: 0.8

Reference File: NAICS

Acquisition File: FASTMS2

Calibration Time: 15:10

Calibration Date: 01/15/98

Coefficients

MS1 Static: $-0.000000151515x^2 + 1.001003035443x + -0.361354841764$

MS2 Static: $-0.000000314536x^2 + 1.001356659064x + -0.463133593384$

Function 1: None

Instrument ID: OCP -v3.1_4 -QUAT2 4000

Tuning Parameters: ES+

Source Page (ESI)

Capillary:	3.50 kVolts
HV Lens:	0.60 kVolts
Cone:	30 Volts
Skimmer Offset:	5 Volts
Skimmer:	2.0 Volts
RF Lens:	0.0 Volts
Source Temp:	100°C

MS1

Ion Energy:	0.1 Volts
Ion Energy Ramp:	0.0 Volts
LM Resolution:	10.0
HM Resolution:	10.0
Lens 5:	100 Volts
Lens 6:	0 Volts
Multiplier 1:	880 Volts

MS2

Ion Energy:	0.1 Volts
Ion Energy Ramp:	0.0 Volts
LM Resolution:	12.0
HM Resolution:	12.0
Lens 7:	250 Volts
Lens 8:	0 Volts
Lens 9:	0 Volts
Multiplier:	880 Volts

Pressures

Analyser Vacuum:	3.8e-5 mBar
Gas Cell:	1.8e-3 mBar

Acquisition Threshold

SIR or MRM Data

Baseline level:	1.0
-----------------	-----

General

Ion count threshold:	0
----------------------	---

Prescan Statistics

Zero Level:	29
ADC zero:	70.19
ADC standard deviation:	1.81

Acquisition Threshold MS2

SIR or MRM Data

Baseline level:	1.0
General	
Ion count threshold:	0
Prescan Statistics	
Zero Level:	29
ADC zero:	59.80
ADC standard deviation:	1.22

ACE Experimental Record

HP1100 LC Pump Initial Conditions

Solvents

A%	0.0
B%	100.0
C%	0.0
D%	0.0
Flow (ml/min)	1.000
Stop Time (mins)	4.5
Min Pressure (bar)	0
Max Pressure (bar)	400
Oven Temperature Left (°C)	40.0
Oven Temperature Right (°C)	40.0

HP1100 LC Pump Gradient Timetable

No Entries in the gradient Timetable.

HP1100 LC Pump External Event Timetable

The Timetable contains 4 entries which are:

Time	Column	Switch	Contact 1	Contact 2	Contact 3	Contact 4
Initial	Off	Off	Off	Off	Off	
0.00	Off	Off	On	Off	On	
0.10	On	On	Off	Off	Off	
5.00	On	On	Off	Off	Off	

HP1100 Autosampler Initial Conditions

Injection Volume(μl)	80.0
Draw Speed	200.0
Eject Speed (μl/min)	200
Draw Position (mm)	0.00
Stop Time (mins)	3.50
Vial Number	87
Thermostat On	
Thermostat Temperature(°C)	5.0

End of experimental record.

Solvent Delay
None

Function 1

Scans in function:	255
Cycle time (secs):	0.431
Inter Channel delay (secs):	0.00
Retention window (mins):	0.000 to 3.700
Ionization mode:	ES+
Data type:	SIR or MRM data
Function type:	MRM of 2 channels
Chan Reaction	Dwell (secs) Cone Volt. Col.Energy
1 : 179.00 > 109.00	0.40 30.0 20.0
2 : 296.00 > 215.10	0.40 30.0 20.0