

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE VALDECOXIBE.
AVALIAÇÃO DE EFEITOS SOBRE PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcio Fronza

Santa Maria, RS, Brasil

2006

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE VALDECOXIBE. AVALIAÇÃO DE EFEITOS SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

por

Marcio Fronza

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

Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil

2006

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

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
ANÁLISE DE VALDECOXIBE. AVALIAÇÃO DE EFEITOS SOBRE
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS**

elaborada por
Marcio Fronza

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Maria Virgínia Scarpa Gomes de Oliveira, Dr^a (UNESP)

José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 01 de junho de 2006.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, confiança, orientação e revisão crítica;
aos colegas e bolsistas do Laboratório de Controle da Qualidade de Produtos Biológicos e Bioequivalência, pelo auxílio e amizade;
aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial;
aos meus pais, Domingos e Carmelina, pelo amor, educação e incentivo na passagem de mais uma etapa;
à minha irmã e meu cunhado, pelo carinho, incentivo e compreensão;
à Angelita, pelo apoio, carinho e compreensão;
à UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho;
à CAPES, pelo apoio financeiro;
A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE VALDECOXIBE. AVALIAÇÃO DE EFEITOS SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

AUTOR: MARCIO FRONZA

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 01 de junho de 2006.

O valdecoxibe é um medicamento antiinflamatório não esteroide, que representa a segunda geração dos inibidores seletivos da enzima cicloxigenase-2 e apresenta atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética. No presente trabalho desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação quantitativa de valdecoxibe em produtos farmacêuticos e estudos de dissolução, bem como se avaliaram efeitos sub-agudos sobre parâmetros hematológicos em modelo animal. Submeteram-se os produtos aos testes físico-químicos, mostrando que cumprem as especificações. Realizaram-se análises de identificação e quantificação, por cromatografia líquida em coluna Synergi fusion[®] C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 µm) mantida à temperatura de 30 °C. A fase móvel constituída de água pH 7,0:acetonitrila na proporção de 52:48 (V/V) foi eluída à vazão de 1,0 mL/min, com detecção no ultravioleta a 210 nm. O método foi validado demonstrando especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Desenvolveu-se método de dissolução do fármaco, utilizando como meio 900 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio 0,5% mantido a 37 ± 0,5 °C, aparato 2, rotação de 75 rpm e quantificação por cromatografia líquida. Avaliaram-se também os efeitos sobre parâmetros hematológicos, usando os métodos laboratoriais baseados no tempo de protrombina (TP), tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), dosagem de fibrinogênio, contagem de plaquetas, atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa. Os dados fornecidos pelo TTPA, TP e atividade anti-fator Xa mostraram preliminarmente, que o valdecoxibe poderia causar aumento da incidência de eventos trombóticos. Desse modo, estabeleceram-se procedimentos e avaliações que contribuem para aprimorar as áreas de tecnologia farmacêutica e controle da qualidade, bem como garantir a segurança e eficácia no uso terapêutico.

Palavras-chave: valdecoxibe, cromatografia líquida, validação, dissolução, parâmetros hematológicos.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION METHODOLOGY FOR ANALYSIS OF VALDECOXIB. EVALUATION OF THE EFFECTS ON HEMATOLOGICAL PARAMETERS

AUTHOR: MARCIO FRONZA

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, June 1st 2006.

Valdecoxib is a non-steroidal anti-inflammatory drug that represents a second-generation of cyclooxygenase-2 enzyme inhibitor and possesses anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities. In this work a reversed-phase liquid chromatography procedure was developed and validated for the quantitative determination of valdecoxib in solid dosage forms and dissolution studies, and the evaluation of the sub-acute effects on the hematological parameters of animal model as well. Valdecoxib samples were also submitted to the physicochemical tests, meeting the specifications. The identification and quantitation analyses were performed by liquid chromatography on a Synergi fusion C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm i.d.; 4 µm particle size), held at 30° C. The mobile phase consisted of water, pH 7.0/acetone nitrile (52:48, v/v), with run at a flow rate of 1.0 mL/ min, with UV detection at 210 nm. The method was validated evaluating parameters such as the specificity, sensitivity, linearity ($r^2=0.9999$), range, precision, accuracy, and robustness. The dissolution test was developed with 0.5% of sodium lauryl sulfate in water as dissolution medium using an apparatus paddle at a stirring rate of 75 rpm and quantitation by liquid chromatography. The effects of valdecoxib on the hematological parameters were evaluated by the prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), levels of fibrinogen, platelet count, anti-factor Xa and anti-factor IIa activity. The results of the APTT, PT and anti-factor Xa activity showed, preliminary, that valdecoxib could increase the risk of thromboembolic complications, thus the procedures and evaluations carried out can be helpful to understand the side effects and safe use of the drug improving the quality control of the pharmaceutical product.

Keywords: valdecoxib, liquid chromatography, validation, dissolution, hematological parameters.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Estrutura química do valdecoxibe..... 19
- FIGURA 2 – Produção de eicosanóides a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela via da cicloxigenase - Adaptada de Fitzgerald & Patrono, 2001 21
- FIGURA 3 – Cromatogramas do valdecoxibe: (A) solução da SQR na concentração de 100 µg/mL: pico 1 – valdecoxibe. (B) Após exposição à luz UV: picos 1, 2, 3, 4 e 6 produtos fotodegradados, pico 5 – valdecoxibe. (C) Após oxidação: pico 1 – peróxido de hidrogênio, pico 2 - valdecoxibe. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion[®] C₁₈ (15 cm x 4,6 mm d.i., 4 µm); fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (52:48, V/V); vazão: 1 mL/min.; detecção: 210 nm 57
- FIGURA 4 – Representação gráfica da curva de calibração da SQR do valdecoxibe obtida por cromatografia líquida na faixa de 0,05 a 150 µg/ml (n=3).. 58
- FIGURA 5 – Perfil de dissolução dos comprimidos de valdecoxibe com diferentes meios, a 37 ± 0,5 °C, utilizando aparato 2 e rotação de 50 rpm 65
- FIGURA 6 – Perfil de dissolução dos comprimidos de valdecoxibe com diferentes meios, a 37 ± 0,5 °C, utilizando aparato 2 e rotação de 75 rpm 65
- FIGURA 7 – Representação gráfica das percentagens dissolvidas dos comprimidos de valdecoxibe com concentrações de 10, 20 e 40 mg em meio LSS 0,5% a 37 ± 0,5 °C e 75 rpm, aparato 2..... 66
- FIGURA 8 – Resultados da atividade anti-fator Xa (A) e anti-fator IIa (B) determinada em amostras de plasma após administração diária de 10 e 23 mg/Kg de valdecoxibe durante 1, 2, 3 e 4 semanas, 6 ratos/grupo. Dados expressos como média ± EPM 71
- FIGURA 9 – Resultados da atividade anti-fator Xa (A) e anti-fator IIa (B) determinada em amostras de plasma após administração diária de 100 e 420 mg/Kg de ácido acetilsalisílico (AAS) durante 1, 2, 3 e 4 semanas, 6 ratos/grupo. Dados expressos como média ± EPM .. 72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros do método otimizado por cromatografia líquida em fase reversa.	38
TABELA 2 – Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos de valdecoxibe.	46
TABELA 3 – Determinação de peso dos comprimidos de valdecoxibe	54
TABELA 4 – Tempo de desintegração encontrado para os comprimidos de valdecoxibe	55
TABELA 5 – Porcentagem de umidade determinada nos produtos analisados pelo método de Karl-Fischer	55
TABELA 6 – Determinação de friabilidade e dureza dos comprimidos de valdecoxibe	55
TABELA 7 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração de valdecoxibe por cromatografia líquida em fase reversa	58
TABELA 8 – Resultados da curva de calibração calculados pelo método dos mínimos quadrados	59
TABELA 9 – Análise de variância das áreas dos cromatogramas obtidos na determinação da curva de calibração	59
TABELA 10 – Determinação da precisão intradia do método para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida	60
TABELA 11 – Determinação da precisão entre-analistas do método analítico para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida	60
TABELA 12 – Determinação da precisão interdias do método analítico para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida	61
TABELA 13 – Determinação da exatidão do método analítico para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida	61

TABELA 14 – Avaliação da robustez do método analítico através do doseamento de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida	63
TABELA 15 – Resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico	64
TABELA 16 – Determinação do teor de valdecoxibe em comprimidos por cromatografia líquida	64
TABELA 17 – Resultados da avaliação da estabilidade da SQR e da amostra de valdecoxibe no meio de dissolução por cromatografia líquida	67
TABELA 18 – Determinação por cromatografia líquida da concentração plasmática de valdecoxibe em ratos administrados durante quatro semanas	67
TABELA 19 – Resultados da contagem de plaquetas após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) durante quatro semanas em ratos Wistar	68
TABELA 20 – Resultados da dosagem de fibrinogênio após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) durante quatro semanas em ratos Wistar	69
TABELA 21 – Resultados da determinação do tempo de protrombina (TP) após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) durante quatro semanas em ratos Wistar	69
TABELA 22 – Resultados experimentais da determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) durante quatro semanas em ratos Wistar	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalisílico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AINES	Antiinflamatórios não esteróides
AT III	Antitrombina III
AVC	Acidente vascular cerebral
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
cm	Centímetro
COX	Cicloxigenase
CV%	Coefficiente de variação percentual
Da	Dalton
DP	Desvio padrão
DAD	Detector de arranjo de díodos
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
IAM	Infarto agudo do miocárdio
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LSS	Lauril sulfato de sódio
mA	Miliamperes
Min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Militro
mm	Milímetro
N	Normalidade
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PG	Prostaglandinas
PM	Peso médio
r^2	Coefficiente de determinação

rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SQR	Substância química de referência
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TP	Tempo de protrombina
TX	Tromboxanos
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopéia Americana
°C	Grau centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Materiais	32
3.1.1 Substância química de referência (SQR)	32
3.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais	32
3.1.3 Solventes e reagentes	32
3.1.4 Soluções reagentes	33
3.1.5 Equipamentos e acessórios	34
3.1.6 Animais de laboratório	36
3.2 Métodos	36
3.2.1 Testes físico-químicos da forma farmacêutica	36
3.2.1.1 Determinação do peso médio	36
3.2.1.2 Determinação do tempo de desintegração	36
3.2.1.3 Determinação da umidade por Karl-Fischer	36
3.2.1.4 Determinação da resistência mecânica dos comprimidos	37
• Friabilidade	37
• Dureza	37
3.2.2 Cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)	37
3.2.2.1 Preparação da fase móvel	38
3.2.2.2 Preparação da SQR de valdecoxibe	38
3.2.2.3 Preparação das amostras	38
3.2.2.4 Validação do método analítico por CL-FR	39
3.2.2.4.1 Especificidade	39
• Fotólise	39
• Oxidação química	39

• Hidrólise ácida	40
• Hidrólise básica	40
3.2.2.4.2 Linearidade	40
3.2.2.4.3 Precisão	41
3.2.3.4.3.1 Repetibilidade.....	41
3.2.3.4.3.2 Precisão intermediária	41
• Entre-analistas	41
• Interdias	41
3.2.3.4.3.3 Cálculos	42
3.2.2.4.4 Exatidão	42
3.2.2.4.4.1 Cálculos	42
3.2.2.4.5 Limite de detecção (LD)	43
3.2.2.4.6 Limite de quantificação (LQ).....	44
3.2.2.4.7 Robustez	44
3.2.2.4.8 Teste de performance do sistema cromatográfico	45
3.2.3 Doseamento do valdecoxibe por CL-FR	45
3.2.3.1 Cálculos	45
3.2.4 Estudos de dissolução	46
3.2.4.1 Avaliação da estabilidade da SQR e amostra no meio de dissolução	47
3.2.4.1.1 Preparação da SQR de valdecoxibe	47
3.2.4.1.2 Preparação da amostra	47
3.2.5 Bioensaio para avaliação de parâmetros hematológicos	48
3.2.5.1 Cálculos	48
3.2.5.2 Preparação da suspensão de carboximetilcelulose (CMC)	48
3.2.5.3 Preparação da suspensão de valdecoxibe	48
3.2.5.4 Preparação da suspensão de ácido acetilsalisílico (AAS).....	49
3.2.5.5 Seleção dos animais e planejamento do ensaio	49
3.2.5.6 Procedimento	49
3.2.5.6.1 Contagem de plaquetas	50
3.2.5.6.2 Dosagem de fibrinogênio	50
3.2.5.6.3 Determinação do tempo de protrombina (TP)	50

3.2.5.6.4 Determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)	50
3.2.5.6.5 Ensaio do anti-fator Xa.....	50
3.2.5.6.6 Ensaio do anti-fator IIa.....	51
3.2.5.5.7 Determinação da concentração plasmática	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Testes físico-químicos da forma farmacêutica	53
4.2 Cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)	56
4.3 Doseamento de valdecoxibe por CL-FR	64
4.4 Estudos de dissolução	64
4.5 Avaliação de parâmetros hematológicos pelo bioensaio	67
5 DISCUSSÃO	73
6 CONCLUSÕES	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8 ANEXOS	91
8.1 Artigos científicos publicados	92

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os antiinflamatórios não esteróides (AINES) constituem um grupo heterogêneo de substâncias, com estruturas químicas diversas. Apresentam efeitos antitérmico, analgésico e antiinflamatório, sendo amplamente usados em Medicina para o tratamento de diferentes enfermidades.

Os primeiros compostos antiinflamatórios não esteróides desenvolvidos foram os clássicos AINES não-específicos que, apesar da eficácia comprovada, têm apresentado efeitos adversos, especialmente gastrointestinais. A ação dos AINES baseia-se na inibição da enzima cicloxigenase (COX), que converte o ácido araquidônico, liberado das membranas fosfolípídicas, em prostaglandinas (PG). Entretanto, no início dos anos 90 foi demonstrada a existência de duas isoformas dessa enzima. A COX-1 expressa constitutivamente é a única presente nas plaquetas, em que induz à formação de tromboxano A₂ (TXA₂). É encontrada também em outros tecidos, como endotélio vascular, tecido renal e mucosa gástrica, nos quais catalisa a biossíntese de prostaglandinas citoprotetoras. Por sua vez, a expressão da enzima COX-2 é maior durante os processos inflamatórios e de transformação celular, tendo sido observada também em tecidos do sistema nervoso central e renal (FRÖLICH, 1997; McMURRAY & HARDY, 2002).

A hipótese de que a inibição seletiva da COX-2 poderia acrescentar vantagens terapêuticas com menos efeitos colaterais fundamentou o desenvolvimento de inibidores específicos, também conhecidos como coxibes, como nova classe de antiinflamatórios e agentes analgésicos. Nesse contexto, surgiram na década de 80, medicamentos como meloxicam, nimesulida e etodolac. Em seguida, foram desenvolvidos os superseletivos, destacando-se o celecoxibe, rofecoxibe, etoricoxibe, lumiracoxibe, parecoxibe e valdecoxibe (CARVALHO et al., 2004; BOTTING, 2006).

O valdecoxibe oral e sua forma injetável, o parecoxibe, apresentam atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética e foram aprovados para comercialização em 2002, representando importante avanço farmacológico, sendo indicados para o tratamento dos sinais e sintomas da artrite, alívio de dores agudas e dismenorréia. Entretanto, durante o desenvolvimento do presente trabalho, o FDA determinou sua retirada do mercado (04/2005). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) suspendeu sua comercialização, baseada na ausência de dados sobre segurança cardiovascular após uso prolongado, relatos de ocorrências de reações alérgicas e falta de comprovação de vantagens

em comparação com os demais antiinflamatórios. No mesmo ano, a ANVISA autorizou novamente a utilização do parecoxibe, com base na sua forma farmacêutica injetável e indicações. Desse modo, o possível uso terapêutico do valdecoxibe está sendo revisto pela Pfizer, observando estudos de segurança e eficácia para estabelecer a relação risco/benefício. (JENKINS & SELIGMAN, 2005; ANVISA, 2005).

Desde a introdução dos inibidores específicos da COX-2 no mercado, foram realizados diversos estudos relacionando seu efeito antiinflamatório à segurança gastrointestinal, surgindo então dados que evidenciaram a possibilidade de ocorrência de eventos cardiovasculares, como infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão e insuficiência cardíaca. Além disso, os estudos em modelos animais e experimentos por cultura de células demonstram que as prostaglandinas derivadas da COX-2 aumentam o processo neurodegenerativo na inflamação, sugerindo novas perspectivas para esses inibidores específicos, como possível alternativa na prevenção e tratamento de câncer. A base molecular da atividade quimioprotetora está relacionada principalmente à elevada expressão e produção da COX-2 pelo tecido tumoral, conforme observado no adenocarcinoma de esôfago e em neoplasias colorretais. Assim, apesar das descobertas que levaram à interrupção da sua comercialização, optou-se por continuar na investigação e avaliação do perfil de segurança clínico do fármaco, essencial para a compreensão de seu mecanismo e dosagem segura, não somente pela sua comprovada atividade antiinflamatória e analgésica, mas também pela perspectiva de novas indicações (GASPARINI et al., 2003; DRAZEN, 2005; NIELSEN et al., 2006).

Selecionou-se a cromatografia líquida que atualmente se destaca entre os métodos usados para a análise qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados e amostras biológicas. É amplamente utilizada, pois, através da escolha adequada de colunas, fase móvel e método de detecção, possibilita a separação e quantificação dos diferentes componentes da formulação. Por sua vez, a validação é importante para demonstrar, através de estudos experimentais, que a metodologia proposta é adequada para as aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 1996; SWARTZ & KRULL, 1998).

Por sua vez, o teste de dissolução constitui-se em procedimento importante na área farmacêutica, pois, para que o fármaco seja absorvido atingindo a circulação sistêmica, deve estar solubilizado. Nesse sentido, os estudos de dissolução são empregados não somente para garantir a qualidade lote-a-lote da forma farmacêutica sólida, mas também para avaliar etapas

de produção e de desenvolvimento de novas formulações (FDA, 1997; DRESSMAN et al., 1998).

Paralelamente a investigação de fatores de risco de eventos cardiovasculares através de análises laboratoriais dos parâmetros hematológicos em matriz biológica animal, pode contribuir para compreender e prever possíveis distúrbios ou anormalidades hemostáticas que se manifestam clinicamente através de hemorragias ou trombozes (GENTRY, 2004).

O presente trabalho teve por objetivos: a) realizar testes físico-químicos de qualidade, b) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa para determinação quantitativa de valdecoxibe em produtos farmacêuticos e estudos de dissolução, c) desenvolver método para avaliar o perfil de dissolução de comprimidos de valdecoxibe, e d) avaliar efeitos sub-agudos sobre parâmetros hematológicos em modelos animais. Desse modo, estudar procedimentos que possam contribuir para o domínio científico e tecnológico, bem como para a avaliação da segurança, garantindo a eficácia inclusive para novas indicações terapêuticas dos produtos farmacêuticos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

O valdecoxibe é um fármaco produzido por síntese química que se apresenta na forma de pó cristalino branco, denominado quimicamente 4-(5-metil-3-fenil-4-isoxazolil) benzenosulfonamida. Possui peso molecular de 314,36 Daltons, fórmula molecular $C_{16}H_{14}N_2O_3S$ e a estrutura representada na Figura 1 (TALLEY et al., 2000).

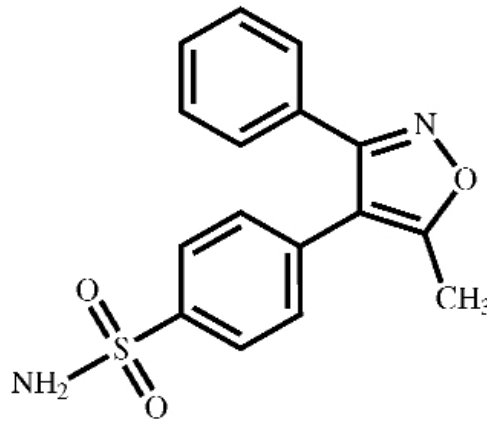


Figura 1- Estrutura química do valdecoxibe.

O valdecoxibe, classificado como um AINES inibidor seletivo da COX-2, apresenta atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética. Foi indicado para o tratamento dos sinais e sintomas da artrite, osteoartrite, alívio de dores agudas, dor pós-operatória e dismenorréia, apresentando eficácia comparável aos outros AINES, em doses elevadas, e menor ocorrência de eventos adversos no trato gastrointestinal (KIVITZ et al., 2002; BENSEN et al., 2002; CHAVEZ & DEKORTE, 2003).

Os antiinflamatórios não-esteróides foram utilizados por suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias, porém seu mecanismo de ação não era bem conhecido. Entretanto, as complicações gastrointestinais desse grupo de fármacos, por exemplo, a aspirina, limitaram seu uso, especialmente continuado. Apenas na década de 60 foi demonstrado que a aspirina atuava inibindo a formação de prostaglandinas originárias do processo inflamatório. Estudos posteriores identificaram a enzima denominada cicloxigenase como responsável por esse mecanismo (VANE, 1971; DUBOIS et al., 1998).

Ao longo dos anos foram desenvolvidos diversos AINES pertencentes a diferentes classes químicas, com a finalidade de eliminar ou atenuar a toxicidade no trato

gastrointestinal. Entretanto, geralmente os efeitos estão relacionados com a ação primária de inibição da cicloxigenase e, portanto, da produção de prostaglandinas e tromboxanos (TX). A maioria dos AINES tem efeito inibidor nos locais de inflamação, mas também podem inibir a produção de prostaglandinas que exercem funções importantes no organismo, sendo essa ação responsável pela toxicidade desses medicamentos (MITCHELL & WARNER, 1999; HERSCHMAN et al., 2003; MAHAJAN & SHARMA, 2005).

As PG e outros eicosanóides não são encontradas pré-formadas nos tecidos. A principal fonte é o ácido araquidônico, um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, contendo quatro ligações duplas. Em condições normais, o ácido araquidônico não está livre para o metabolismo, pois se encontra esterificado nos fosfolípidios da membrana citoplasmática. Os principais eicosanóides são as PG, os TX e os leucotrienos que são responsáveis pelo controle de processos fisiológicos, e são importantes mediadores e moduladores da reação inflamatória (FITZGERALD & PATRONO, 2001; TILLEY et al., 2001; CARVALHO et al., 2004).

O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas diferentes: (1) a via da cicloxigenase, na qual produz as PG e os TX e (2) a via da lipoxigenase, que dá início à síntese de leucotrienos e outros compostos. A cicloxigenase é uma enzima bifuncional, com atividades distintas: a ação principal catalisa a ciclização oxidativa do ácido araquidônico, produzindo a PGG_2 , e a ação de peroxidase converte PGG_2 em PGH_2 . A PGH_2 é então metabolizada por isomerases específicas, originando PGE_2 , prostaciclina (PGI_2), TXA_2 , PGD_2 e PGF_2 . Porém, essas etapas subsequentes do metabolismo do ácido araquidônico diferem entre as células. Nas plaquetas, induzem à síntese do TXA_2 , no endotélio vascular, à síntese da PGI_2 , nos macrófagos, principalmente à síntese da PGE_2 e nos mastócitos à síntese de PGD_2 (SIQUEIRA & DANTAS, 2000; MARNETT, 2000; CHENG et al., 2002; MARNETT, 2002).

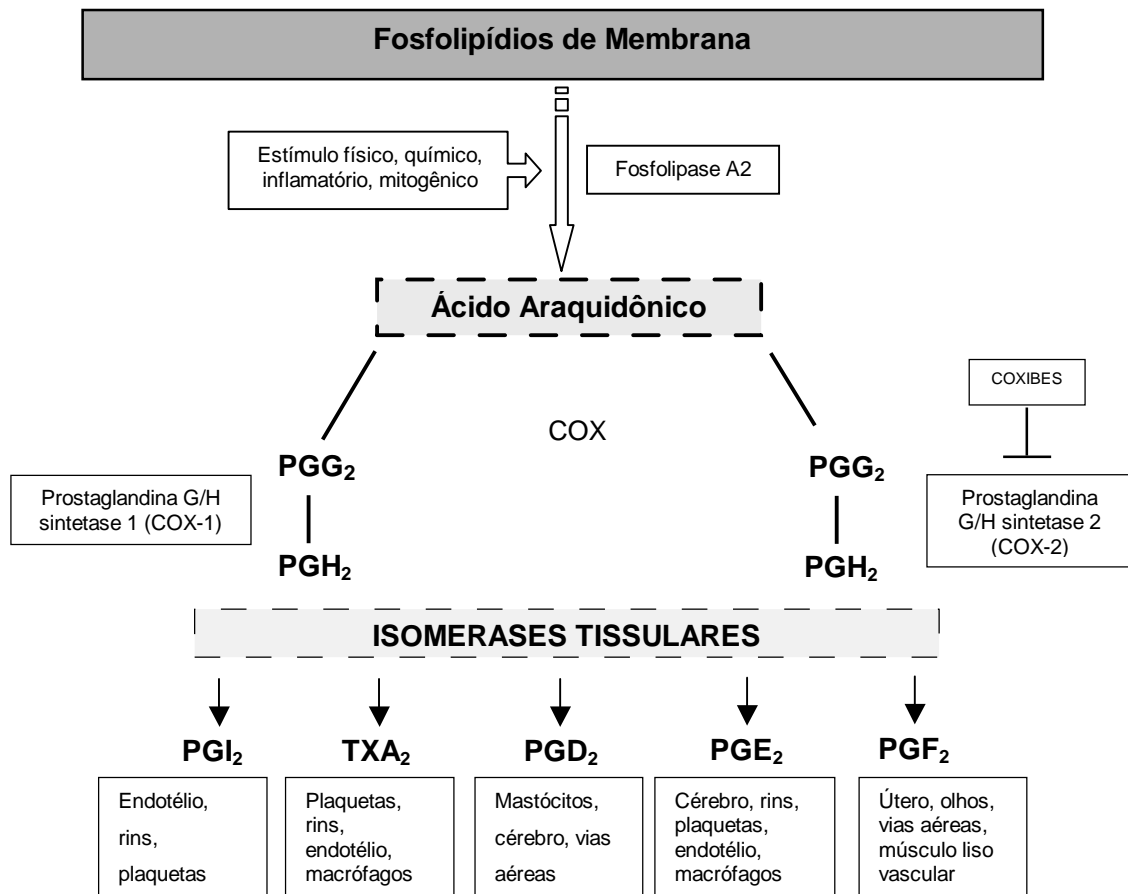


Figura 2 - Produção de eicosanóides a partir do metabolismo do ácido araquidônico pela via da cicloxigenase - Adaptada de Fitzgerald & Patrono, 2001.

A resposta inflamatória é acompanhada da liberação de eicosanóides que estão presentes nesses locais, destacando-se a PGE₂ e PGI₂. Em áreas de inflamação aguda, a PGE₂ e PGI₂ são geradas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais, e a PGD₂ pelos mastócitos. Em inflamações crônicas, as células da série monócito-macrófago também liberam PGE₂ (TILLEY et al., 2001; SIMMONS et al., 2004; BOTTING, 2006).

Os eicosanóides estimulam algumas respostas da seguinte maneira: as PGE₂, PGI₂ e PDG₂ são potentes vasodilatadores, e agem sinergicamente com outras substâncias vasoativas como a bradicinina e a histamina. Essa ação contribui para a formação do eritema e aumento do fluxo sanguíneo em áreas de inflamação aguda. As prostaglandinas da série E também são responsáveis pela indução de febre, sendo encontradas concentrações elevadas em infecções, com evidências de que o aumento na temperatura induzido por agentes endógenos seja mediado pela PGE₂ (SILVEIRA, 2000; SIMMONS et al., 2004).

Apesar da COX ter sido identificada há mais de 30 anos, o maior progresso no entendimento de suas funções ocorreu nos últimos anos. Descobriu-se que existem duas isoformas homólogas, referidas como COX-1 e COX-2, que estão envolvidas em mecanismos regulatórios diferentes (KUMMER & COELHO, 2002; HERSCHMAN et al., 2003). Em quase todos os tecidos normais foi detectada a presença estrutural da COX-1, e baixos ou indetectáveis níveis da COX-2, que pode ser expressa em maior quantidade na presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais, sugerindo sua relevância no câncer e em processos inflamatórios. Expressão aumentada de COX-2 também tem sido relacionada com a Doença de Alzheimer, além de outras condições neurológicas. Dessa forma, a COX-1 foi denominada enzima constitutiva, e a COX-2 indutiva (BROOKS et al., 1999; FITZGERALD & PATRONO, 2001; PATRONO et al., 2001).

Recentemente foi proposta existência de uma terceira isoforma dessa família enzimática, denominada COX-3, a qual, ao contrário da COX-1 e da COX-2, não produziria eicosanóides pró-inflamatórios, mas substâncias antiinflamatórias. Se a hipótese estiver correta, sua expressão pode resultar em períodos típicos de remissão do processo inflamatório, como tem sido constatado em doenças crônicas, como a artrite reumatóide. A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1 (pois é derivada do mesmo gene), encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração (WILLOUGHBY et al., 2000; CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Os AINES que inibem seletivamente a COX-2 devem promover a redução do processo inflamatório, mas ao mesmo tempo, manter os níveis fisiológicos normais dos eicosanóides no estômago e rins, principalmente. Por conseguinte, o AINES ideal deveria inibir seletivamente a enzima COX-2, bloqueando assim a produção de PG pró-inflamatórias, sem inibir, porém, a produção das PG envolvidas na manutenção da homeostase mediada pela COX-1 (SCHNITZER, 2001; JONES, 2001, HERSCHMAN et al., 2003; WALLACE & DEVCHAND, 2005).

Entre os medicamentos inibidores seletivos da COX-2 que surgiram na década de 80, pode-se citar o meloxicam, nimesulida e o etodolac. Em seguida, surgiram os superseletivos, entre os quais, destacam-se o celecoxibe (Celebra[®]), etoricoxibe (Arcoxia[®]), lumiracoxibe (Prexige[®]), parecoxibe (Bextra IM/EV[®]), rofecoxibe (Vioxx[®]) e o valdecoxibe (Bextra[®]). Esses dois últimos foram retirados do mercado e seu uso clínico momentaneamente suspenso, devido, principalmente, à falta de dados adequados da segurança cardiovascular durante uso prolongado (KONSTANTINOPOULOS & LEHMANN, 2005, JONES, 2005; JENKINS & SELIGMAN, 2005; ANVISA, 2005).

Gierse et al. (2005) avaliaram a seletividade do valdecoxibe *in vitro*, através do teste enzimático e do ensaio do sangue total. A eficiência na inibição da COX-2, determinada pelas concentrações inibitórias 50% (CI₅₀), foi de 0,005 µM para o valdecoxibe, podendo ser comparada, com os valores de 0,05, 0,5 e 2,1 µM obtidos para o celecoxibe, rofecoxibe e etoricoxibe, respectivamente. A velocidade de ligação e inativação da enzima COX-2 foi de 110.000 M/s para o valdecoxibe, 7.000 M/s para o rofecoxibe e 80 M/s para o etoricoxibe.

Daniels et al. (2002) avaliaram a eficácia e segurança clínica no tratamento de pacientes com dismenorréia primária através de duas administrações diárias, por via oral, de 20 e 40 mg de valdecoxibe, comparando com 550 mg de naproxeno sódico. Demonstraram atividade analgésica e tempo de ação equivalente ao naproxeno com perfil de segurança clínica superior.

Estudo clínico realizado com 467 pacientes, durante 12 semanas, comparou a eficácia analgésica de 5 e 10 mg de valdecoxibe com 500 mg de naproxeno no tratamento de osteoartrite. A eficácia do valdecoxibe 10 mg foi similar à do naproxeno, porém apresentou menor incidência de efeitos irritantes sobre a mucosa gastrointestinal (MAKAROWSKI et al., 2002).

Fricke et al. (2002) compararam a atividade analgésica de 40 mg de valdecoxibe com 50 mg de rofecoxibe no alívio da dor pós-operatória em cirurgia dentária. Os pacientes tratados com valdecoxibe demonstraram menor sensação de dor, comprovando eficácia superior.

Em dois estudos realizados com voluntários humanos, foram avaliadas a eficácia analgésica, dose e duração do efeito proporcionado pelo valdecoxibe antes de procedimentos cirúrgicos odontológicos. Observou-se efeito analgésico com duração e eficiência significativa para as doses testadas entre 10 a 80 mg, sem registros de efeitos clínicos indesejáveis (DESJARDINS et al., 2002).

Segundo Edwards et al. (2004), estudos realizados comparando a atividade do valdecoxibe com outros AINES clássicos, observaram maior eficácia com menor incidência de efeitos adversos no tratamento crônico da artrite e osteoartrite.

Williams et al. (2006) compararam a eficácia analgésica de 10, 20 e 40 mg de valdecoxibe com 500 mg de naproxeno no tratamento de artrite reumatóide. O valdecoxibe apresentou maior eficácia e menor incidência de efeitos adversos.

Estudos epidemiológicos, pesquisas em modelos animais e por cultura de células *in vitro*, evidenciam a participação da COX-2 no desenvolvimento de processos neoplásicos, gerando a perspectiva de uso dos inibidores específicos, como possível alternativa na

prevenção e tratamento dessas doenças. A base molecular da atividade quimioprotetora dos AINES está relacionada principalmente à elevada expressão e produção de COX-2 pelo tecido tumoral, conforme observado no adenocarcinoma de esôfago e em neoplasias colorretais. Nesse sentido é descrita a avaliação do efeito do celecoxibe em pacientes com pólipos adenomatosos, monitorado por endoscopia computadorizada. Após tratamento por seis meses, observou-se redução significativa de 28% no número e de 30,7% no tamanho dos pólipos (STEINBACH et al., 2000; KISMET et al., 2004; HULL, 2005; PEREG & LISHNER, 2005).

Nos sucessivos estudos clínicos realizados, o valdecoxibe apresentou perfil de segurança similar ao dos AINES não-seletivos, com menor incidência de efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal. Entretanto, pesquisas recentes sugeriram possíveis efeitos cardiovasculares dessa classe de fármacos, que se encontra sob investigação (SILVERSTEIN et al., 2000; FARKOUH et al., 2004; FITZGERALD, 2004; SCHEIMAN, 2005; GROSSER et al., 2006).

Os efeitos sobre a agregação plaquetária, tempo de sangramento e concentrações plasmáticas de tromboxano B₂ (TXB₂) foram avaliados em voluntários adultos saudáveis. Administraram-se altas doses de valdecoxibe (40 mg duas vezes ao dia), que foram comparadas com naproxeno (500 mg duas vezes ao dia), diclofenaco (75 mg duas vezes ao dia) e ibuprofeno (800 mg) em doses terapêuticas. Os resultados demonstraram que não houve efeitos significativos do valdecoxibe sobre esses parâmetros (LEESE et al., 2002; LEESE et al., 2003).

White et al. (2004) avaliaram o risco cardiovascular provocado pelo valdecoxibe em comparação ao diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e placebo em 8000 pacientes com osteoartrite e artrite reumatóide. O tratamento variou de 6 a 52 semanas, não sendo registrada incidência de efeitos colaterais associados ao uso dos medicamentos em estudo.

As publicações relativas ao estudo dos efeitos colaterais dos AINES destacam o desequilíbrio dos eicosanóides, decorrente da inibição seletiva da COX-2. A manutenção da hemostasia necessita de equilíbrio adequado entre a atividade do TXA₂, produzido pelas plaquetas, e a ação da PGI₂, derivada da célula endotelial. O TXA₂ é o principal eicosanóide originado pela COX-1 e atua como agregador plaquetário e vasoconstritor, além de estimular a proliferação das células da musculatura lisa. Por outro lado, a formação de eicosanóides pelas células endoteliais resulta na produção de PGI₂ que possui ação vasodilatadora, antiagregante e inibidora da proliferação das células da musculatura vascular. Os inibidores específicos COX-2 suprimem a produção de PGI₂ pelas células endoteliais, sem efeitos sobre

a produção de TXA₂ plaquetário. Esse desequilíbrio pode levar à agregação plaquetária e vasoconstrição, com maior tendência à oclusão vascular (CASTELLA-LAWSON & CROFFORD, 2001; CHENG et al., 2002; SEGEV & KATZ, 2004; KRÖTZ et al., 2005; JONES, 2005).

O primeiro estudo a destacar os possíveis efeitos cardiovasculares dos AINES foi realizado, porém, com o objetivo de comparar a toxicidade gastrointestinal do rofecoxibe e naproxeno. Ambos apresentaram eficácia equivalente, porém foi detectada a incidência de infarto agudo do miocárdio significativamente menor no grupo que recebeu naproxeno (0,1%) em relação ao rofecoxibe (0,4%) (BOMBARDIER et al., 2000). Em seguida novos resultados demonstraram aumento significativo de complicações cardiovasculares para o grupo tratado com rofecoxibe, sendo retirado do mercado em 2004 (BRESALIER et al., 2005; KONSTANTINOPOULOS & LEHMANN, 2005).

A segurança cardiovascular do valdecoxibe e sua pró-droga endovenosa parecoxibe foi avaliada por Nussmeier et al. (2005). No tratamento da dor pós-operatória, foram administrados durante 10 dias da seguinte forma: parecoxibe endovenoso por três dias, seguido de valdecoxibe oral até completar o décimo dia, placebo por 10 dias e placebo endovenoso seguido de valdecoxibe oral. Verificou-se maior frequência de eventos cardiovasculares entre os pacientes recebendo parecoxibe e valdecoxibe em relação ao grupo placebo, alertando para a segurança desses medicamentos e confirmando resultados publicados no mesmo sentido, anteriormente (OTT et al., 2003).

Jaeger & Jappe (2005) descreveram relato de caso com paciente de 67 anos, que ao fazer uso de 20 mg de valdecoxibe para tratamento de artrite, apresentou graves reações alérgicas cutâneas, com eritema em cerca de 60% de seu corpo. Em seguida, outros casos de reações alérgicas foram registrados na literatura (BYERLY et al., 2005).

O FDA em 07/04/2005 determinou a retirada do mercado do valdecoxibe oral, devido à relação risco/benefício. No Brasil, a ANVISA suspendeu sua comercialização baseada na ausência de dados sobre segurança cardiovascular após uso prolongado, ocorrência de reações alérgicas e falta de comprovação de vantagens em relação aos antiinflamatórios disponíveis para uso terapêutico (JENKINS & SELIGMAN, 2005; ANVISA, 2005).

A farmacocinética do valdecoxibe foi avaliada em estudos clínicos envolvendo pacientes portadores de dor aguda, osteoartrite, artrite reumatóide, doença hepática e doença renal. O fármaco foi rapidamente absorvido após administração oral, com biodisponibilidade de 83%. Atingiu concentração plasmática máxima de 161,1 ng/mL cerca de 2 a 3 horas após a

administração oral da dose única de 10 mg. O tempo de meia-vida de eliminação foi de, aproximadamente, 8-11 horas, sendo amplamente distribuído pelos tecidos, com volume de distribuição de aproximadamente 86 L e ligação às proteínas plasmáticas em torno de 98%, com metabolização hepática. Identificou-se um metabólito ativo no plasma humano na concentração de, aproximadamente, 10%. É eliminado na forma inativa pela urina (76%) e pelas fezes (18%), sendo menos de 5% excretado na forma inalterada. (FIDLER, 2002; ALSALAMEH et al., 2003; SARAPA et al., 2005).

Yuan et al. (2002) avaliaram a farmacocinética em oito indivíduos adultos saudáveis do sexo masculino através da administração única de 50 mg de [¹⁴C] valdecoxibe radioativo. Amostras de urina, fezes e sangue foram coletadas e analisadas. A meia-vida plasmática foi de, aproximadamente, 7 horas, sendo extensamente metabolizado, identificando-se nove metabólitos, e eliminação pela urina (76,1%) e fezes (18%).

Zhang et al. (2003a) investigaram a farmacocinética e metabolismo em camundongos de ambos os sexos após administração única de 5 mg/kg por via oral de [¹⁴C] valdecoxibe radioativo. Dezesesseis metabólitos foram identificados no plasma, fezes e urina.

Roston et al. (2001) estudaram diferentes sistemas cromatográficos, materiais de empacotamento de colunas e uso de colunas em série para aumentar a eficiência de detecção e resolução de possíveis impurezas na matéria prima de valdecoxibe, através da análise com fluido supercrítico. Observaram que as técnicas empregadas, apesar do custo e tempo de análise, forneceram resultados satisfatórios com detecção de picos adicionais, não observados em outros sistemas de análise.

Zhang et al. (2003b) desenvolveram e validaram método para quantificação de valdecoxibe e seu metabólito hidroxilado em plasma humano. Os analitos e o padrão interno foram extraídos da matriz biológica em sistema automatizado por fase sólida, empregando cartuchos C₁₈. A separação foi realizada em sistema cromatográfico por fase reversa, utilizando coluna C₈ (50 x 2,1 mm, 5 µm), com fase móvel composta pela mistura de acetonitrila:água (50:50, V/V) contendo 10 mM de acetato de amônio. A análise foi conduzida por espectrometria de massas, usando ionização no modo *electrospray* negativo. Os valores médios de recuperação para o valdecoxibe e seu metabólito foram de 91 e 86%, respectivamente. Os parâmetros avaliados na validação demonstraram que a metodologia atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos, sugerindo seu uso para análise de valdecoxibe em plasma humano.

Zhang et al. (2003c) desenvolveram e validaram técnica simples, sensível e específica por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas para determinação do valdecoxibe e seus metabólitos na urina humana. A extração e separação dos fármacos foi conduzida em sistema automatizado em fase sólida (cartuchos C₁₈) e cromatográfica líquida com fase móvel composta de acetonitrila e água (50:50, V/V), contendo 4-metilmorfolino 10 mM, pH 6.

Ramakrishna et al. (2004) descreveram metodologia por cromatografia líquida em fase reversa, com detecção no ultravioleta a 210 nm para determinação de valdecoxibe em plasma humano, empregando rofecoxibe como padrão interno. A extração pelo sistema líquido-líquido foi realizada com dietil éter/diclorometano (70/30 V/V) como solvente. A separação cromatográfica foi efetuada por fase reversa em coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) a temperatura ambiente, utilizando água e metanol (47:53 V/V) como fase móvel. No estudo de estabilidade, não foi detectada degradação do valdecoxibe durante o processamento da amostra, bem como armazenado a -70 °C pelo período de 30 dias.

Srinivas et al. (2004) adotaram cromatografia líquida com detecção no ultravioleta a 234 nm, coluna C₁₈ equilibrada a 40 °C, com fase móvel constituída de acetonitrila:acetato de amônio 0,01 M (50:50, V/V) eluída a uma vazão de 1,5 mL/min para quantificação de valdecoxibe em matéria prima e produto acabado. Os autores avaliaram parâmetros de linearidade, precisão e exatidão do método.

Sane et al. (2005) descreveram método por CL, utilizando o rofecoxibe com padrão interno para determinação de valdecoxibe em plasma humano com detecção no UV a 239 nm. O procedimento de extração foi executado com dietil éter após precipitação das proteínas com ácido perclórico. A separação foi realizada em coluna C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), e fase móvel composta pela mistura na proporção de 60:40, V/V, de tampão acetato de amônia e acetonitrila contendo 0,1% de trietilamina, pH 6,5.

Rao et al. (2005) desenvolveram método por CL para separação e quantificação simultânea do valdecoxibe, celecoxibe, rofecoxibe, nimesulida e nabumetona, em produtos farmacêuticos e plasma humano, usando 2-cloro-nitroanilina como padrão interno. A separação cromatográfica foi realizada por fase reversa com coluna C₁₈, fase móvel constituída de metanol:água (adicionada de ácido acético glacial 0,05%) (68:32, V/V) e detecção no ultravioleta em 230 nm.

A determinação simultânea do valdecoxibe e etoricoxibe em plasma humano foi proposta por Werner et al. (2005) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A extração com mistura de 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M e 4 mL

diclorometano:hexano (50:50, V/V) foi conduzida, após precipitação das proteínas com acetonitrila:água (50:50, V/V). A separação dos fármacos foi realizada em coluna C₈ por cromatográfica líquida com fase móvel composta de metanol e água (50:50, V/V) contendo 1% de ácido acético. A análise quantitativa foi efetuada por espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica no modo positivo. A metodologia foi validada e aplicada para avaliação da farmacocinética do valdecoxibe e etoricoxibe em humanos.

A determinação de valdecoxibe, etoricoxibe, ácido salicílico, cetoprofeno, nimesulida e celecoxibe em plasma humano através de cromatografia líquida, foi estudada por Kumar et al. (2006). Os autores utilizaram sistema de extração líquido-líquido, com acetonitrila e análise com gradiente de separação em coluna C₁₈ (150 mm x 4,6 mm), utilizando fase móvel ternária composta de eluente 1: 0,05 M ácido fórmico (pH 3,0), eluente 2: acetonitrila e eluente 3: água:metanol (5:95).

O ensaio de dissolução é importante para avaliar a liberação do fármaco da forma farmacêutica sólida, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. Atualmente, o teste de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais constitui-se em procedimento importante para a pesquisa, desenvolvimento, produção, controle e garantia da qualidade de formulações. Além disso, diferentes dosagens de um mesmo produto que apresentam perfis de dissolução semelhante, se existir estudo de bioequivalência que comprove a relação *in vitro/in vivo* de uma das dosagens, geralmente a mais alta, com produto de referência; as demais podem ser registradas sem a necessidade de novos estudos *in vivo*, apresentando assim, vantagens do ponto de vista ético, econômico e técnico (SHAH et al., 1995; QURESHI & MCGILVERAY, 1999; MARCOLONGO, 2003; FURLANETTO et al., 2003).

Os estudos de dissolução *in vitro* são essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações, considerando também parâmetros importantes como: fármaco e a formulação, equipamento, meio de dissolução, temperatura e o método analítico. Para fármacos que não possuem monografia oficial, há também a necessidade de desenvolver testes de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* (NOORY et al., 2000; ROHRS, 2001; LAGACE et al., 2004).

O valdecoxibe em sua forma cristalina apresenta baixa solubilidade em água. Nesse sentido, estudos foram conduzidos para aumentar sua solubilidade no produto acabado. Foram assim estudadas formulações com inclusão de co-solventes como etanol, metanol e glicerol, surfactantes como lauril sulfato de sódio, diferentes polietilenoglicóis e tweens (AMBIKE et al., 2004; DESAI & PARK, 2004; LIU et al., 2004; LIU et al., 2005a; LIU et al., 2005b; LIU et al., 2005c).

A hemostasia envolve complexo sistema de fatores entre os quais são citadas as plaquetas, que em baixos níveis sanguíneos predisõem ao sangramento, mas o aumento eleva o risco de formação de coágulos. Os níveis de fibrinogênio também estão associados a possíveis complicações cardiovasculares, acidente vascular cerebral e outros eventos tromboembólicos. Além disso, influenciam diretamente na viscosidade e velocidade do fluxo sanguíneo. Estudos e análises de parâmetros hematológicos, incluindo contagem de plaquetas, determinação de hematócrito, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de sangramento e dosagem de fibrinogênio, foram adotados para avaliação de efeitos de fármacos e extratos de vegetais em modelos animais (DOUTREMEPUICH et al., 1998; GARCÍA-MANZANO et al., 2002; AL-JISHI & HOZAIFA, 2003; GENTRY, 2004; LEMINI et al., 2005).

Os procedimentos e especificações para a validação de métodos analíticos estão descritos na literatura (ICH, 1996). Os principais parâmetros a ser avaliados são a especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez. A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como excipientes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa. A linearidade corresponde à capacidade do método analítico para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância sob análise. A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de, no mínimo, seis determinações na concentração estabelecida correspondente a 100%. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devidas a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa através de coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação. O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de

confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas variações nas condições experimentais, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel, temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros. Desse modo, demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (ICH, 1996; SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004).

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Substância química de referência (SQR)

- Substância química de referência de valdecoxibe, Pfizer¹.

3.1.2 Produtos farmacêuticos comerciais

Utilizaram-se amostras de diferentes lotes de comprimidos, contendo 10, 20 e 40 mg de valdecoxibe, em seu prazo de validade. As amostras foram identificadas pelos números arábicos de 1 a 4.

3.1.3 Solventes e reagentes

- Acetonitrila grau HPLC, Tedia[®].
- Acetato de amônia, Merck[®].
- Ácido acético glacial, Tedia[®].
- Ácido acetilsalicílico, Sigma[®].
- Ácido clorídrico fumegante, Merck[®].
- Ácido fosfórico 95%, Sigma[®].
- Ácido fórmico, Merck[®].
- Álcool isopropílico, Tedia[®].
- Amido, Delaware[®].
- Carboximetilcelulose, Vetec[®].
- Caolin, Sigma[®].
- Celulose microcristalina, Delaware[®].
- Citrato de sódio, Merck[®].

¹ Gentilmente cedido pela Pfizer Laboratórios – Estados Unidos.

- Cloreto de sódio, Merck[®].
- Cloreto de cálcio, Merck[®].
- Croscarmelose sódica, Delaware[®].
- Dodecil sulfato de sódio, Gibco BRL[®].
- Diclorometano, Tedia[®].
- EDTA sódico, Merck[®].
- Estearato de magnésio, Delaware[®].
- Etoricoxibe, Merk Sharp & Dome[®].
- Ezetimibe, Merk Sharp & Dome[®].
- Fator Xa bovino, Sigma[®].
- Fator IIa bovino, Sigma[®].
- Fosfato de potássio monobásico, Merck[®].
- Fosfato de sódio dibásico, Merck[®].
- Fosfato de sódio monobásico, Merck[®].
- Fosfolipídio bovino WHO 86/516, NIBSC.
- Hidróxido de sódio, Merck[®].
- Lactose monoidratada, Delaware[®].
- Lauril sulfato de sódio, Merck[®].
- Laurato de sorbitan etoxilado 20, Tween 20, Sigma[®].
- Metanol, Merck[®].
- Pentobarbital sódico, Sigma[®].
- Polietilenoglicol 2000, Merck[®].
- Substrato cromogênico S-2765, Chromogenix[®].
- Substrato cromogênico S-2238, Chromogenix[®].
- Trietilamina, Merck[®].

3.1.4 Soluções reagentes

- ABX diluent – solução de cloreto de sódio 1%, azida sódica 0,1% e tensoativo 0,1%, Horiba ABX Diagnostics Ltda[®].
- ABX alphalyse – Solução de cianeto de potássio 0,03%, Horiba ABX Diagnostics Ltda[®].

- ABX cleaner – Solução de tampão orgânico 0,2% e enzimas proteolíticas 0,2%, Horiba ABX Diagnostics Ltda[®].
- ABX basolyse - Solução de ácido ftálico 0,09%, ácido clorídrico 0,025% e dodecil sulfato de sódio 0,02%, Horiba ABX Diagnostics Ltda[®].
- ABX retix – solução de laranja de tiazol 0,01%, Horiba ABX Diagnostics Ltda[®].
- Solução anticoagulante de EDTA sódico 5%, Bioclin[®].
- Solução fisiológica, Baxter[®].
- Solução de Karl-Fisher, Merck[®].

3.1.5 Equipamentos e acessórios

- Agitador orbital de tubos, Certomat[®].
- Aparelho de desintegração, Nova Ética[®].
- Aparelho de dissolução com amostrador automático equipado com oito cubas, Vankel[®].
- Aparelho de Karl Fisher, Titroline Alpha[®].
- Balança de precisão, modelo AS5500, Marte[®].
- Balança eletrônica digital, modelo CP225D, Saetorius[®].
- Balão volumétrico 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1.000 e 2.000 mL, Pirex[®].
- Banho de água termostaticado, Tecnal[®].
- Banho ultrassônico, CTA[®].
- Bomba de vácuo, Tecnal[®].
- Centrífuga refrigerada, MR 23i, Jouan[®].
- Citômetro de fluxo Pentra 120 Retic, Horiba ABX Diagnostics Ltda[®].
- Coagulômetros, H. Amelung GmbH D-4920 Lemgo[®].
- Coluna synergi[®] fusion C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 μm), Phenomenex[®].
- Cromatógrafo líquido, Shimadzu[®].
 - Ø Controlador SCL-10 AP_{VP}.
 - Ø Bomba LC-10 AD_{VP}.
 - Ø Válvula quaternária FCV-10 AL_{VP}.
 - Ø Forno para colunas CTO-10 AD_{VP}.
 - Ø Degaseificador DGU-14 A.
 - Ø Auto-injetor SIL-10 AD_{VP}.

Ø Detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M10A_{vp}.

Ø Software CLASS-VP 6.14.

- Cronômetro, Technos[®].
- Destilador, Biomatic[®].
- Durômetro, Pharma Test[®].
- Erlenmeyer 250 ml, Pirex[®].
- Estante para tubos, Comlab[®].
- Estufa para secagem e esterilização, Nova Ética[®].
- Filtro estéril e descartável, 0,45 µm, modelo Millex, Millipore[®].
- Friabilômetro, Pharma Test[®].
- Freezer -40 °C, Sanyo[®].
- Freezer -20 °C, Consul[®].
- Gaiolas para ratos, Beiramar[®].
- Leitor de microplacas, Anthos 2001[®].
- Lâmpada ultravioleta TUV 30W/G30 T8, 254nm, Philips[®].
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, Whatman[®].
- Microcomputador, Dell[®].
- Micropipetas de volume ajustável P10, P20, P100, P200, P1000, P5000 e P10000, Gilson[®].
- Microtubos estéreis, Eppendorf[®].
- Papel filtro, Inlab[®].
- pHmetro, Thermo Orion[®].
- Ponteiras descartáveis de 10, 20, 100, 1000, 5000 e 10000 µL, Brand[®].
- Purificador de água, Labconco[®].
- Refrigerador, Brastemp[®].
- Sistema de filtração, Millipore[®].
- Seringas descartáveis de 1 e 5 mL, Becton Dickinson[®].
- Termômetro de imersão, Incoterm[®].
- Tubos de ensaio, Pyrex[®].

3.1.6 Animais de laboratório

Ratos da linhagem wistar, pesando entre 180 – 200 g, provenientes do Biotério Central da UFSM, foram mantidos à temperatura de 22 ± 2 °C com umidade relativa de 65%, iluminação artificial de 12 horas/dia em gaiolas, com livre acesso a água e ração.

Todos os animais permaneceram sob climatização e adaptação às condições do experimento por, no mínimo, quatro semanas.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Testes físico-químicos da forma farmacêutica

Os procedimentos foram executados conforme descrito na Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988).

3.2.1.1 Determinação do peso médio

Para a realização do teste foram escolhidas, aleatoriamente, vinte amostras de cada lote, que foram pesadas individualmente. Calculou-se o peso médio, aceitando-se a variação de 7,5% para os comprimidos na concentração de 10 mg, e de 5% para os de 20 e 40 mg.

3.2.1.2 Determinação do tempo de desintegração

Determinou-se o tempo de desintegração em água, mantida a 37 ± 1 °C, utilizando seis unidades de cada produto. Considerou-se como resultado o tempo em minutos e segundos em que foi observada a desintegração total de todos os comprimidos, ou apenas fragmentos de revestimento.

3.2.1.3 Determinação da umidade por Karl-Fischer

Para determinar a umidade contida nas formulações foi utilizado o método de Karl-Fischer, em titulador automático. Pesaram-se, analiticamente, 200 mg do pó resultante da trituração dos comprimidos. Para determinar a percentagem de umidade contida nos produtos utilizou-se o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de umidade} = \frac{(\text{gasto do reagente de Karl-Fischer} \times \text{FC})}{\text{quantidade de amostra (mg)}} \times 100$$

Em que:

FC = fator de correção do reagente de Karl-Fischer

3.2.1.4 Determinação da resistência mecânica dos comprimidos

· Friabilidade

Para a determinação da friabilidade pesaram-se vinte comprimidos que foram colocados no aparelho e submetidos a cem rotações por cinco minutos. Removeram-se os resíduos de poeira e pesaram-se novamente. A diferença entre o peso inicial e o peso final dos comprimidos representou a friabilidade que foi expressa em percentagem.

· Dureza

Para a determinação da dureza, submeteram-se, individualmente, dez comprimidos à ação do aparelho, medindo em Newton a força necessária para esmagá-los.

3.2.2 Cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)

As condições experimentais estabelecidas para a análise de valdecoxibe, através do método de cromatografia líquida em fase reversa, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros do método otimizado por cromatografia líquida em fase reversa.

Características	Descrição
Fase móvel	água pH 7,0 : acetonitrila (52:48, V,V)
Vazão	1 mL/min
Coluna	Synergi fusion [®] C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm, 4 µm), Phenomenex [®]
Temperatura	30 °C
Comprimento de onda	210 nm
Volume de injeção	10 µL

3.2.2.1 Preparação da fase móvel

Transferiram-se 520 mL de água ultrapura pH 7,0, ajustado com hidróxido de sódio 0,1 N, para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com acetonitrila. Homogeneizou-se e filtrou-se, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro. Preparou-se no momento do uso.

3.2.2.2 Preparação da SQR de valdecoxibe

Pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR de valdecoxibe e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Adicionaram-se, aproximadamente, 8 mL de metanol, e submeteu-se a ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL (solução estoque). A alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com fase móvel, de modo a obter a solução com concentração de 100 µg/mL.

3.2.2.3 Preparação das amostras

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, que foram triturados até a formação de pó homogêneo. Pesaram-se quantidades equivalentes a 50 mg de valdecoxibe e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL. Após adição de aproximadamente 40 mL de metanol, a

solução foi submetida a ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL (solução estoque). A alíquota de 1 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com fase móvel, de modo a obter a solução com concentração de 100 µg/mL.

3.2.2.4 Validação do método analítico por CL-FR

A validação do método foi executada de acordo com procedimento preconizado na literatura (ICH, 1996). Os parâmetros avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

3.2.2.4.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada através do estudo de degradação forçada da SQR. O fármaco foi submetido às condições de fotólise, oxidação química e de hidrólise ácida e básica. Avaliaram-se então, a pureza do pico e percentagem de área referente ao valdecoxibe, utilizando programa CLASS VP 6.14.

· Fotólise

Pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 1 mg/mL. A amostra foi irradiada por luz UV em cubetas de quartzo, à distância de 30 cm por 5 horas. Transferiu-se 1 mL da amostra para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se solução com concentração teórica de 100 µg/mL.

· Oxidação química

Pesaram-se, analiticamente, 5 mg da SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com solução 50% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, obtendo-se concentração de 100 µg/mL. O balão, protegido da luz, foi mantido à temperatura ambiente por 24 horas.

· **Hidrólise ácida**

Pesaram-se, analiticamente, 2 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1N, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL. Deixou-se a solução sob refluxo à temperatura de 80 °C por 4 horas. Retirou-se alíquota de 1 mL e neutralizou-se com 1 mL de hidróxido de sódio 0,1N, obtendo-se solução com concentração teórica de 100 µg/mL.

· **Hidrólise básica**

Pesaram-se, analiticamente, 2 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Solubilizou-se com 1 mL de metanol e completou-se o volume com hidróxido de sódio 0,1N, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL. Deixou-se a solução sob refluxo à temperatura de 80 °C por 4 horas. Retirou-se alíquota de 1 mL e neutralizou-se com 1 mL de ácido clorídrico 0,1N, obtendo-se solução com concentração teórica de 100 µg/mL.

3.2.2.4.2 Linearidade

Para preparação da curva de calibração, pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR e transferiram-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com metanol, obtendo-se solução com concentração de 1000 µg/mL (solução estoque). A partir da solução estoque foram realizadas diluições sucessivas com a fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 0,05, 0,5, 10, 50, 100, 120 e 150 µg/mL, respectivamente. As curvas foram preparadas e analisadas durante três dias. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, e calculada a análise de variância (ANOVA), avaliando-se a validade dos parâmetros estatísticos.

3.2.2.4.3 Precisão

Avaliou-se a precisão do método através do cálculo do coeficiente de variação percentual das amostras, submetidas a ensaios de repetibilidade e precisão intermediária, em relação à solução da SQR na concentração de 100 µg/mL.

3.2.2.4.3.1 Repetibilidade

Preparou-se amostra na concentração de 100 µg/mL e realizaram-se doze determinações sucessivas no mesmo dia. Desse modo, os resultados foram obtidos utilizando as mesmas condições experimentais, método, equipamento e analista.

3.2.2.4.3.2 Precisão intermediária

Avaliou-se a precisão intermediária através da análise entre analistas e em diferentes dias, utilizando o mesmo método e lotes de amostras, na concentração de 100 µg/mL. As análises foram realizadas em cinco replicatas.

- **Entre-analistas**

Preparam-se três amostras, na concentração de 100 µg/mL e submetem-se à análise, por dois analistas, sob as mesmas condições experimentais.

- **Interdias**

Prepararam-se duas amostras, na concentração de 100 µg/mL, e analisaram-se em três dias consecutivos, sob as mesmas condições experimentais.

3.2.2.4.3.3 Cálculos

A concentração de valdecoxibe nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \times C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Em que:

C_A = concentração de valdecoxibe na amostra

A_A = área média absoluta da amostra

C_{SQR} = concentração da SQR

A_{SQR} = área média absoluta da SQR

O valor percentual de valdecoxibe nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \times 100) / C_T$$

Em que:

$C_A\%$ = concentração percentual da amostra

C_A = concentração de valdecoxibe encontrada na amostra

C_T = concentração teórica de valdecoxibe encontrada na amostra

3.2.2.4.4 Exatidão

Determinou-se a exatidão, adicionando-se concentrações de 80, 100 e 120 µg/mL da SQR de valdecoxibe à preparação placebo (mistura dos excipientes da formulação), avaliando-se em paralelo soluções com concentrações correspondentes da SQR. As análises foram realizadas em cinco replicatas.

3.2.2.4.4.1 Cálculos

A concentração da SQR de valdecoxibe nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \times C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Em que:

C_A = concentração da SQR de valdecoxibe na amostra placebo

A_A = área média absoluta da amostra placebo adicionada de SQR

C_{SQR} = concentração da SQR

A_{SQR} = área média absoluta da SQR

O valor percentual da SQR de valdecoxibe nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \times 100) / C_T$$

Em que:

$C_A\%$ = concentração percentual da SQR de valdecoxibe na amostra placebo

C_A = concentração da SQR de valdecoxibe encontrada na amostra placebo

C_T = concentração teórica da SQR de valdecoxibe na amostra placebo

3.2.2.4.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 1996), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em cinco replicatas. A fórmula usada para o cálculo foi a seguinte:

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC}$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

3.2.2.4.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi calculado a partir da fórmula descrita na literatura (ICH, 1996), fundamentada no desvio padrão do intercepto e na inclinação da curva de calibração. Com base no teor calculado, preparou-se experimentalmente a solução e analisou-se em cinco replicatas. O cálculo foi realizado segundo a fórmula:

$$LD = \frac{10 \sigma}{IC}$$

Em que:

σ = desvio padrão do intercepto

IC = inclinação da curva de calibração

3.2.2.4.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada através de modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: vazão de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/min; temperatura da coluna: 25, 30, 35 e 40 °C; variação do pH da fase móvel: 6,7, 7,0 e 7,3; volume de injeção: 5, 10 e 20 μ L; alteração na proporção de acetonitrila: 45, 48, 50 e 55% e modificação no comprimento de onda: 190 a 370 nm. Realizou-se, assim, análise do teor dos comprimidos nas diferentes condições.

3.2.2.4.8 Teste de performance do sistema cromatográfico

Para assegurar a performance do cromatógrafo líquido antes e durante a realização das análises, realizou-se o teste avaliando os seguintes parâmetros: simetria do pico, número de pratos teóricos, tempo de retenção e área do pico do fármaco através do programa CLASS-VP 6.14. A repetibilidade das injeções foi determinada através de cinco replicatas da substância química de referência na concentração 100 µg/mL e do cálculo do coeficiente de variação percentual da área.

3.2.3 Doseamento do valdecoxibe por CL-FR

Para o doseamento dos comprimidos de valdecoxibe, foi empregado o método validado por cromatografia líquida. A preparação da SQR e das amostras foram realizadas conforme descrito nos itens 3.2.2.2 e 3.2.2.3, respectivamente. Realizaram-se três determinações para cada amostra.

3.2.3.1 Cálculos

A concentração de valdecoxibe nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \times C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Em que:

C_A = Concentração de valdecoxibe na amostra

A_A = Área média absoluta da amostra

C_{SQR} = Concentração da SQR

A_{SQR} = Área média absoluta da SQR

O valor percentual de valdecoxibe nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \times 100) / C_T$$

Em que:

$C_A\%$ = Concentração percentual da amostra

C_A = Concentração de valdecoxibe encontrada na amostra

C_T = Concentração teórica de valdecoxibe na amostra

3.2.4 Estudos de dissolução

O teste de dissolução do valdecoxibe em comprimidos foi desenvolvido e otimizado no equipamento VANKEL VK7010, equipado com oito cubas e amostrador automático. O perfil de dissolução foi estudado em doze cubas (dose unidades de cada forma farmacêutica), para cada forma de apresentação. Foram testadas diversas condições de dissolução, de acordo com o método geral da USP 28 (2005), variando-se o meio e a velocidade de agitação. Selecionou-se o aparato especificado para a forma farmacêutica em estudo (comprimidos, aparato 2 - pá). A temperatura foi mantida constante a $37 \pm 0,5$ °C e as condições estudadas estão indicadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições testadas no desenvolvimento do teste de dissolução de comprimidos de valdecoxibe.

Condição	Meio (900 mL)	Velocidade (rpm)
I	Água	50
II	Água	75
III	HCl 0,1N	50
IV	HCl 0,1N	75
V	LSS 0,25%	50
VI	LSS 0,25%	75
VII	LSS 0,5%	50
VIII	LSS 0,5%	75
IX	LSS 0,75%	50
X	LSS 0,75%	75
XI	Tampão fosfato pH 6,8	50
XII	Tampão fosfato pH 6,8	75

Realizaram-se coletas de 3 mL de meio, através de amostrador automático com filtro de 0,45 μm de poro, nos tempos de 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos para o desenvolvimento do método e nos tempos de 0, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos para os estudos do perfil de dissolução. Efetuou-se em cada coleta, a reposição de idêntico volume do meio a $37 \pm 0,5$ °C. Determinou-se a percentagem dissolvida do fármaco nas alíquotas, por cromatografia líquida.

Realizaram-se os cálculos de percentagem dissolvida, observando-se o teor do fármaco e as concentrações nas alíquotas analisadas, com as correções referentes às retiradas e reposições de meio em cada tempo.

3.2.4.1 Avaliação da estabilidade da SQR e amostra no meio de dissolução

Determinou-se a estabilidade das soluções da SQR e amostras no meio de dissolução a temperatura ambiente e a temperatura de $37 \pm 0,5$ °C.

3.2.4.1.1 Preparação da SQR de valdecoxibe

Pesaram-se, analiticamente, 10 mg da SQR de valdecoxibe e transferiram-se para balão volumétrico de 1000 mL. Solubilizaram-se com 5 mL de metanol, acrescentaram-se, aproximadamente, 600 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio (LSS) 0,5% e submeteu-se a ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com LSS 0,5%, obtendo-se solução com concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Alíquota dessa solução foi filtrada em membrana com porosidade 0,45 μm , e analisada por cromatografia líquida. Alíquota de 100 mL dessa solução foi conservada ao abrigo da luz, a temperatura ambiente por 24 horas. Outra alíquota de 500 mL foi transferida para cuba de dissolução e mantida por duas horas a $37 \pm 0,5$ °C. Decorridos os respectivos tempos, foram retiradas as alíquotas, filtradas e analisadas por CL.

3.2.4.1.2 Preparação da amostra

Preparou-se a amostra com os excipientes da formulação (comprimidos) e adicionaram-se 5 mg da SQR. Transferiram-se para balão volumétrico de 500 mL com o

auxílio de 5 mL de metanol, acrescentaram-se, aproximadamente, 300 mL de LSS 0,5% e submeteu-se a ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com LSS 0,5% obtendo-se solução com concentração de 10 µg/mL. Procedeu-se conforme descrito no item 3.2.4.1.1.

3.2.5 Bioensaio para avaliação de parâmetros hematológicos

Todos os procedimentos laboratoriais empregando animais foram conduzidos de acordo com as leis nacionais de proteção e bem estar animal (BRASIL, 1979). Além disso, o projeto e o planejamento dos ensaios foi avaliado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Federal de Santa Maria, recebendo parecer favorável sob registro nº 11/2005.

3.2.5.1 Cálculos

Realizou-se a análise estatística pelo teste t de *Student* ($P < 0,05$), comparando as respostas dos grupos tratados com o controle.

3.2.5.2 Preparação da suspensão de carboximetilcelulose (CMC)

Pesaram-se, analiticamente, 5 g de CMC e transferiram-se para balão volumétrico de 1000 mL. Após adição de aproximadamente 600 mL de água ultrapura, submeteu-se a suspensão a ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com água destilada, obtendo-se suspensão com concentração de 0,5%. Armazenou-se a 4 °C, em geladeira por, no máximo, 7 dias.

3.2.5.3 Preparação da suspensão de valdecoxibe

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, que foram triturados até formação de pó homogêneo. Pesaram-se, analiticamente, quantidades equivalentes a 50 mg e 115 mg de valdecoxibe, e transferiram-se, respectivamente, para balões volumétricos de 25 mL com auxílio de 20 mL da suspensão de CMC 0,5%. Submeteram-se as suspensões a ultra-som por 10 minutos e completaram-se os volumes com suspensão de CMC 0,5%, obtendo-se

concentrações de 2 mg/mL e 4,6 mg/mL, respectivamente. As suspensões foram preparadas diariamente.

3.2.5.4 Preparação da suspensão de ácido acetil salicílico (AAS)

Pesaram-se, analiticamente, 0,5 g e 2,1 g de AAS e transferiram-se para balões volumétricos de 25 mL com auxílio de 20 mL da suspensão de CMC 0,5%. Submeteram-se as suspensões a ultra-som por 10 minutos e completaram-se os volumes com suspensão de CMC 0,5%, obtendo-se concentrações de 20 mg/mL e 84 mg/mL, respectivamente. As suspensões foram preparadas diariamente.

3.2.5.5 Seleção dos animais e planejamento do ensaio

Ratos da linhagem Wistar foram pesados individualmente (peso entre 180 – 200 g), identificados e distribuídos aleatoriamente para as doses respectivas e controle, de acordo com a tabela de números randomizados, e colocados em caixas (MOSES & OAKFORD, 1963).

3.2.5.6 Procedimento

Os animais receberam, por via oral, através de sonda gástrica 10 e 23 mg/Kg/dia de valdecoxibe, 100 e 420 mg/Kg/dia de AAS, respectivamente. Para o grupo controle administrou-se veículo.

As coletas sanguíneas foram realizadas ao final da primeira, segunda, terceira e quarta semana. Após anestesia com solução de pentobarbital sódico (40 mg/Kg), coletaram-se aproximadamente 5,5 mL de sangue através da veia cava abdominal com seringas descartáveis. Aliquota de 0,5 mL de sangue foi separada em tubos eppendorf contendo 0,05 mL de EDTA para contagem de plaquetas. Transferiu-se, imediatamente, o restante do sangue para tubos plásticos contendo solução de citrato de sódio a 3,8% na razão anticoagulante:sangue, 1:10. Homogeneizou-se com movimentos suaves e centrifugou-se a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Esse plasma foi empregado para determinação da concentração de valdecoxibe, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, dosagem de fibrinogênio, atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa.

3.2.5.6.1 Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas por método fluorimétrico foi realizada em duplicata em citômetro de fluxo (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France).

3.2.5.6.2 Dosagem de fibrinogênio

A dosagem de fibrinogênio foi realizada em duplicata por método fotométrico, empregando sistema automatizado (Sysmex, Kobe, Japan).

3.2.5.6.3 Determinação do tempo de protrombina (TP)

O teste de coagulação para determinação do tempo de protrombina foi realizado em duplicata por método fotométrico, empregando sistema automatizado (Sysmex, Kobe, Japan).

3.2.5.6.4 Determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)

A determinação do TTPA pelo método coagulométrico foi realizada em triplicata. Adicionaram-se 100 µL de cada amostra de plasma e 100 µL de solução de cloreto de sódio 0,9% em tubos de polietileno e transferiu-se para os coagulômetros a 37 °C, deixando-se estabilizar por 5 minutos. Após, adicionaram-se 100 µL da mistura com volumes iguais (1:1) de caolin (4µg/mL) e fosfolipídio (49,4 µg/mL). Transcorridos 2 minutos, adicionaram-se 100 µL da solução de cloreto de cálcio (25 mmol) e procedeu-se à leitura do tempo de coagulação para cada tubo, registrado no coagulômetro.

3.2.5.6.5 Ensaio do anti-fator Xa

Os ensaios foram realizados em triplicada conforme método descrito na literatura, adaptado (DALMORA et al., 2006). Para o ensaio do anti-fator Xa, transferiram-se 25 µL de plasma para cada poço respectivo da placa de 96 poços, mantendo-se a temperatura de 37 °C

até equilíbrio. Adicionaram-se 50 μL da solução do fator Xa em cada poço. A placa foi incubada por exatamente 2 minutos e então, adicionaram-se 100 μL do substrato cromogênico S-2765. A reação foi interrompida, exatamente, 4 minutos após, adicionando-se 100 μL da solução de ácido acético 20%. A absorbância foi determinada a 405 nm em leitor de microplacas.

3.2.5.6.6 Ensaio do anti-fator IIa

O ensaio do anti-fator IIa foi realizado conforme procedimento descrito para o ensaio do anti-fator Xa, com substituição porém, por solução de fator IIa e pelo substrato cromogênico S-1138.

3.2.5.6.7 Determinação da concentração plasmática

O valdecoxibe e ezetimibe (padrão interno) foram extraídos do plasma, utilizando terc-butil-metil éter como solvente de extração, através de sistema líquido-líquido. Efetuou-se então a análise por cromatografia líquida, por fase reversa. A separação e quantificação foram realizadas, empregando-se coluna Synergi fusion[®] C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 4 μm). Foi utilizada pré-coluna para proteção da coluna analítica. O sistema operacional cromatográfico foi no modo isocrático, a temperatura de 40 °C, com fase móvel composta de água pH 7,0:acetonitrila na proporção de 51:49 (V/V) eluída à vazão de 1,0 mL/min e detecção no ultravioleta a 210 nm. A fase móvel e amostras foram previamente filtradas em membrana de nylon com porosidade 0,45 μm .

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Testes físico-químicos da forma farmacêutica

Inicialmente, realizaram-se os testes físico-químicos de qualidade dos comprimidos de valdecoxibe. As determinações individuais de peso, as médias e os limites calculados de 7,5% para os comprimidos de 10 mg e de 5% para os de 20 e 40 mg, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Determinação de peso dos comprimidos de valdecoxibe.

Comprimidos	1 (40 mg)	2 (40 mg)	3 (20 mg)	4 (10mg)
1	409,2	407,0	420,7	200,0
2	412,1	403,5	414,1	202,6
3	407,2	407,0	417,2	205,5
4	409,3	409,0	413,0	198,9
5	405,8	411,3	415,2	205,6
6	398,6	406,5	413,6	202,3
7	407,0	405,0	411,5	206,0
8	405,2	403,6	408,2	195,8
9	407,2	407,5	410,6	202,2
10	403,5	402,8	413,8	202,9
11	411,2	404,7	418,7	199,1
12	409,6	400,6	411,1	201,4
13	405,3	409,0	410,2	200,6
14	403,2	411,3	407,9	203,6
15	400,5	402,8	406,4	198,9
16	409,0	403,9	409,7	201,1
17	401,9	406,3	416,5	202,4
18	407,6	400,9	410,0	200,8
19	407,0	407,6	415,6	199,6
20	407,4	408,5	416,6	202,3
PM ¹ ± DP ²	406,4 ± 3,49	405,9 ± 3,10	413,0 ± 3,84	201,6 ± 2,54
Limite inferior	426,72	426,19	433,65	216,72
Limite superior	386,08	385,60	392,35	186,48

¹PM = peso médio.²DP = desvio padrão.

As amostras foram submetidas ao teste de desintegração, obtendo-se resultados de, no máximo, 76 segundos, conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Tempo de desintegração encontrado para os comprimidos de valdecoxibe.

Produto	Tempo
1	1 min e 5 seg
2	1 min e 16 seg
3	52 seg
4	49 seg

Os dados obtidos na determinação de umidade dos comprimidos foram inferiores a 4,5%, de acordo com a Tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagem de umidade determinada nos produtos analisados pelo método de Karl-Fischer.

Produto	Umidade (%)
1	4,5
2	3,7
3	3,8
4	4,4

Os resultados dos testes de friabilidade e dureza dos comprimidos encontram-se na Tabela 6, observando-se valores inferiores a 0,21% e superiores a 82,5 N, respectivamente.

Tabela 6 – Determinação de friabilidade e dureza dos comprimidos de valdecoxibe.

Produto	Friabilidade^a (%)	Dureza^b (N)
1	0,16 ± 0,85	123,2 ± 2,35
2	0,21 ± 1,05	125,4 ± 2,64
3	0,13 ± 0,97	107,1 ± 3,02
4	0,17 ± 1,02	82,5 ± 2,54

^a valor médio de 20 comprimidos ± DP.

^b valor médio de 10 comprimidos ± DP.

4.2 Cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR)

Desenvolveu-se método analítico por cromatografia líquida em fase reversa, fundamentado nas características físico-químicas do valdecoxibe. Pesquisaram-se as condições, observando que a fase móvel constituída de água pH 7,0:acetonitrila (52:48, V/V), eluída em coluna C₁₈, proporcionou tempo de retenção reprodutível de, aproximadamente, cinco minutos, simetria e resolução dos picos, sensibilidade e seletividade adequada.

As condições selecionadas foram validadas e a especificidade do método estudada após submeter a SQR à degradação forçada sob condições de hidrólise ácida e básica, fotólise e oxidação química. A Figura 3 (A) apresenta cromatograma da SQR na concentração de 100 µg/mL analisada com pureza superior a 99,99%, antes da degradação. Exposta à luz ultravioleta, a SQR sofreu maior degradação, em comparação com as outras condições testadas, pois, após 5 horas, a diminuição da área do pico foi de 51,6%, com pureza de 99,98%, sem variação significativa do tempo de retenção, como pode ser observado na Figura 3 (B). Foram detectados também cinco picos adicionais relativos aos produtos formados, com espectros diferentes da SQR, que não foram, porém, isolados e identificados. Na oxidação química, efetuada com solução 50% de peróxido de hidrogênio 30 volumes, por 24 horas, a percentagem de degradação foi de 26,4% sem, no entanto, se detectarem picos adicionais referentes aos produtos oriundos desse tratamento. A SQR permaneceu com pureza adequada de 99,98% e sem variação no tempo de retenção (Figura 3 C). Os cromatogramas obtidos após 4 horas de hidrólise ácida e básica demonstraram que não houve decréscimo na percentagem da área do pico do valdecoxibe, deduzindo-se que não sofreu degradação sob essas condições.

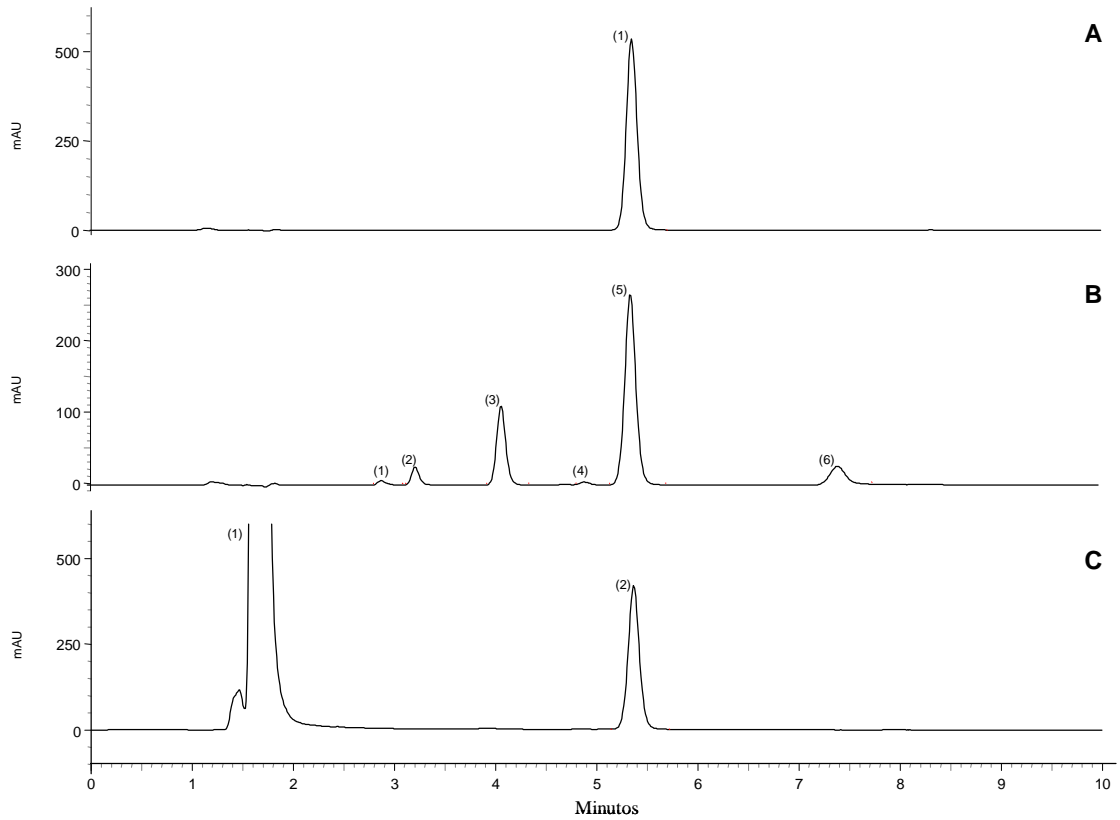


Figura 3 – Cromatogramas do valdecoxibe: (A) solução da SQR na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$: pico 1 – valdecoxibe. (B) Após exposição à luz UV: picos 1, 2, 3, 4 e 6 produtos fotodegradados, pico 5 – valdecoxibe. (C) Após oxidação: pico 1 – peróxido de hidrogênio, pico 2 - valdecoxibe. Condições cromatográficas: Coluna Synergi Fusion[®] C₁₈ (15 cm x 4,6 mm d.i., 4 μm); fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (52:48, V/V); vazão: 1 mL/min.; detecção: 210 nm.

Os valores das áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração, apresentados na Tabela 7, foram plotados em relação a cada concentração respectiva, observando-se linearidade adequada na faixa de 0,05 a 150 $\mu\text{g/mL}$, conforme ilustrado na Figura 4.

Tabela 7 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração de valdecoxibe por cromatografia líquida em fase reversa.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas absolutas			Média	CV% ^a
	1º dia	2º dia	3º dia		
0,05	3379	3370	3402	3384	0,49
0,5	21358	21133	21350	21280	0,60
10	408323	408469	408476	408423	0,02
50	2014232	2023222	2012536	2016663	0,28
100	4082824	4056090	4045403	4061439	0,47
120	4885219	4953865	4844489	4894524	1,13
150	6136445	6135414	6127496	6133118	0,08

^a CV% = coeficiente de variação percentual.

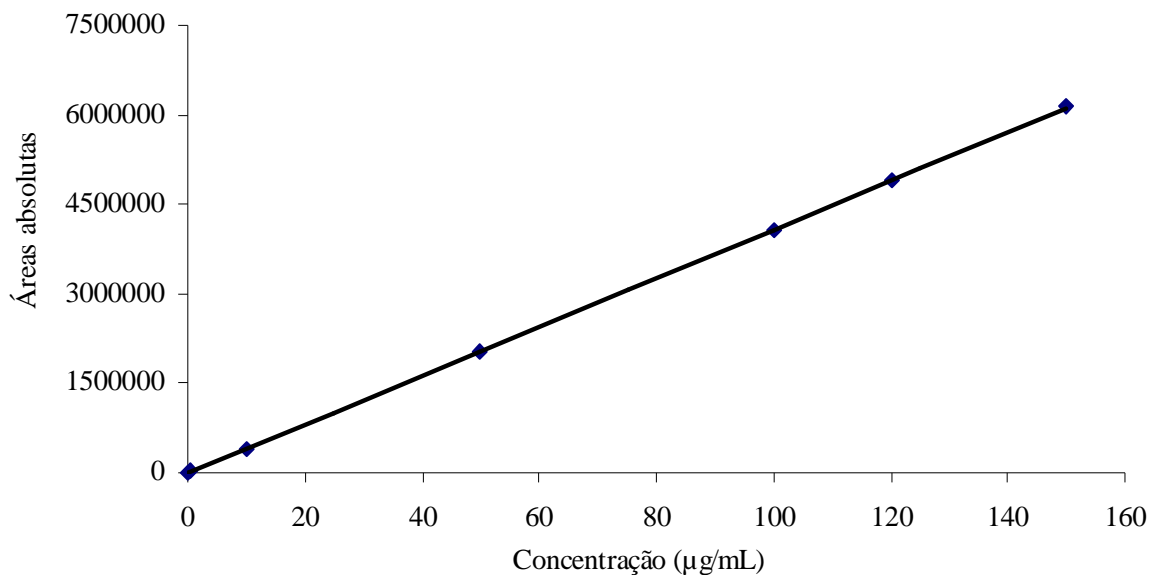


Figura 4 – Representação gráfica da curva de calibração da SQR do valdecoxibe obtida por cromatografia líquida na faixa de 0,05 a 150 $\mu\text{g/mL}$ (n=3).

A equação calculada da reta foi: $y = 40820 \pm 162x - 5201,5 \pm 209$, com coeficiente de determinação $r^2 = 0,9999$, indicando linearidade significativa do método (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados da curva de calibração calculados pelo método dos mínimos quadrados.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	0,05 – 150 µg/mL
Equação: $y = bx + a$	$y = 40820x - 5201,5$
Inclinação (b) ± desvio padrão	40820 ± 162
Intercepto (a) ± desvio padrão	$5201,5 \pm 209$
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9999

Realizou-se também o cálculo da análise de variância (ANOVA), com base nos valores experimentais das áreas, observando-se na Tabela 9 os parâmetros válidos com regressão linear significativa ($P < 0,05$), sem desvio de linearidade ($P > 0,05$).

Tabela 9 – Análise de variância das áreas dos cromatogramas obtidos na determinação da curva de calibração.

Fontes de variação	GL^a	Soma dos Quadrados	Variância	F^b
Entre	6	$1,15 \times 10^{14}$	$1,92 \times 10^{13}$	38.530 (2,85)
- regressão linear	1	$1,15 \times 10^{14}$	$1,50 \times 10^{14}$	231.175 (4,60)
- desvio de linearidade	5	$2,84 \times 10^9$	$5,68 \times 10^8$	1,14 (2,96)
Resíduo	14	$6,97 \times 10^9$	$4,97 \times 10^8$	
Total	20			

^a graus de liberdade.

^b valores entre parênteses correspondem aos valores críticos da tabela F para $P = 0,05$.

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intradia), expressando-se os resultados com base no coeficiente de variação percentual. A amostra preparada na concentração de 100 µg/mL foi submetida a doze análises sucessivas, e os dados obtidos no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, laboratório e analista, forneceram valor médio de 100,01% com CV de 0,06%, conforme a Tabela 10.

Tabela 10 – Determinação da precisão intradia do método para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida.

Análise	Teor ($\mu\text{g/mL}$)		Média ^a (%)	CV ^b %
	Teórico	Encontrado		
1	100	100,08		
2	100	99,97		
3	100	100,08		
4	100	99,91		
5	100	99,95		
6	100	100,01		
7	100	99,98	100,01	0,06
8	100	99,99		
9	100	100,04		
10	100	99,98		
11	100	100,13		
12	100	100,02		

^a média de doze determinações.

^b CV% = coeficiente de variação percentual.

Para a determinação da precisão entre-analistas, três amostras foram avaliadas por dois analistas, obtendo-se valores experimentais médios de 99,92, 100,12 e 99,99%, com CV de 0,21, 0,33 e 0,27%, respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Determinação da precisão entre-analistas do método analítico para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida.

Amostra	Analista	Teor ^a (%)	Média ^b (%)	CV ^c %
1	A	100,07	99,92	0,21
	B	99,77		
2	A	99,89	100,12	0,33
	B	100,35		
3	A	99,80	99,99	0,27
	B	100,18		

^a média de cinco determinações.

^b média de dois analistas.

^c CV% = coeficiente de variação percentual.

Para determinação da precisão interdias, realizaram-se análises de duas amostras, em três dias consecutivos, obtendo-se valores experimentais médios de 100,04 e 99,92%, com coeficiente de variação de 0,22 e 0,19%, respectivamente, de acordo com a Tabela 12.

Tabela 12 – Determinação da precisão interdias do método analítico para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida.

Amostra	Dia	Teor^a (%)	Média^b	CV^c %
1	1	100,03	100,04	0,22
	2	100,27		
	3	99,84		
2	1	99,70	99,92	0,19
	2	100,04		
	3	100,03		

^a média de cinco determinações.

^b média de três dias.

^c CV% = coeficiente de variação percentual.

Determinou-se também a exatidão do método, através da análise de três concentrações na faixa pré-estabelecida e os resultados experimentais, que correspondem à percentagem média de 100,02%, encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Determinação da exatidão do método analítico para quantificação de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida.

Concentração de valdecoxibe (µg/mL)	Concentração determinada^a (µg/mL)	Exatidão (%)	CV^b %
80	79,92	99,90	0,09
100	100,02	100,02	0,28
120	120,18	100,15	0,19

^a média de cinco determinações.

^b CV% = coeficiente de variação percentual.

A sensibilidade do método cromatográfico foi determinada através dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O valor calculado para a menor concentração

detectada pelo processo analítico foi de 0,015 µg/mL. Por sua vez, o LQ calculado foi de 0,051 µg/mL, confirmado também, através de análise experimental e adotado com coeficiente de variação de 0,07%.

Avaliou-se também a robustez através de pequenas modificações nos parâmetros do método, tais como: vazão, temperatura da coluna, pH da fase móvel, volume de injeção, alteração na proporção de acetonitrila da fase móvel e mudança no comprimento de onda. Na execução das análises dos produtos farmacêuticos, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 0,56%, comprovando a robustez do método proposto, frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstra a Tabela 14.

Tabela 14 – Avaliação da robustez do método analítico através do doseamento de valdecoxibe em produtos farmacêuticos por cromatografia líquida.

Parâmetro	Valor investigado	Teor^a (%)	CV^b %	Valor otimizado
Vazão (mL/min)	0,8	100,91	0,26	1,0
	1,0	100,07	0,18	
	1,2	100,33	0,24	
Temperatura da coluna (°C)	25	100,44	0,35	30
	30	100,06	0,15	
	35	99,83	0,21	
	40	99,70	0,19	
pH da fase móvel	6,7	101,0	0,29	7,0
	7,0	100,8	0,09	
	7,3	99,89	0,34	
Volume de injeção (µL)	5	99,62	0,42	10
	10	100,04	0,23	
	20	99,45	0,21	
% de acetonitrila	45	99,75	0,27	48
	48	100,19	0,20	
	50	100,89	0,31	
	55	99,35	0,56	
Comprimento de onda (nm)	190 – 370	----	----	210

^a média de três determinações.

^b CV% = coeficiente de variação percentual.

Verificou-se a performance do sistema cromatográfico pela análise quantitativa do valdecoxibe, através da simetria dos picos, número de pratos teóricos da coluna, tempo de retenção e área do fármaco, conforme observado na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico.

Parâmetro	Mínimo	Máximo	CV^a %	Situação
Simetria do pico	1,08	1,23	0,354	Aprovado
Nº de pratos teóricos	9345	9756	1,191	Aprovado
Tempo de retenção	5,320	5,349	0,159	Aprovado
Área	4203816	4332323	0,315	Aprovado

^aCV% = coeficiente de variação percentual.

4.3 Doseamento de valdecoxibe por CL-FR

O método desenvolvido e validado por cromatografia líquida no presente trabalho foi utilizado para análise quantitativa do valdecoxibe nos produtos farmacêuticos e os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 – Determinação do teor de valdecoxibe em comprimidos por cromatografia líquida.

Amostra	Teor declarado		Teor encontrado^a		
	mg por comprimido		mg	%	CV^b %
1	40		40,2	100,5	0,25
2	40		39,4	98,5	0,19
3	20		20,5	102,5	0,24
4	10		9,8	98,0	0,27

^amédia de três determinações.

^bCV% = coeficiente de variação percentual.

4.4 Estudos de dissolução

Adotou-se o método cromatográfico validado, para os estudos de dissolução. As percentagens dissolvidas de valdecoxibe nas doze condições descritas previamente (Tabela 3) para o desenvolvimento do método, encontram-se nas Figuras 5 e 6. Destaca-se, na Figura 6, que a condição que empregou aparato 2, 900 mL de meio aquoso com 0,5% LSS e rotação de 75 rpm, foi a que forneceu melhor perfil de liberação do fármaco em relação ao tempo.

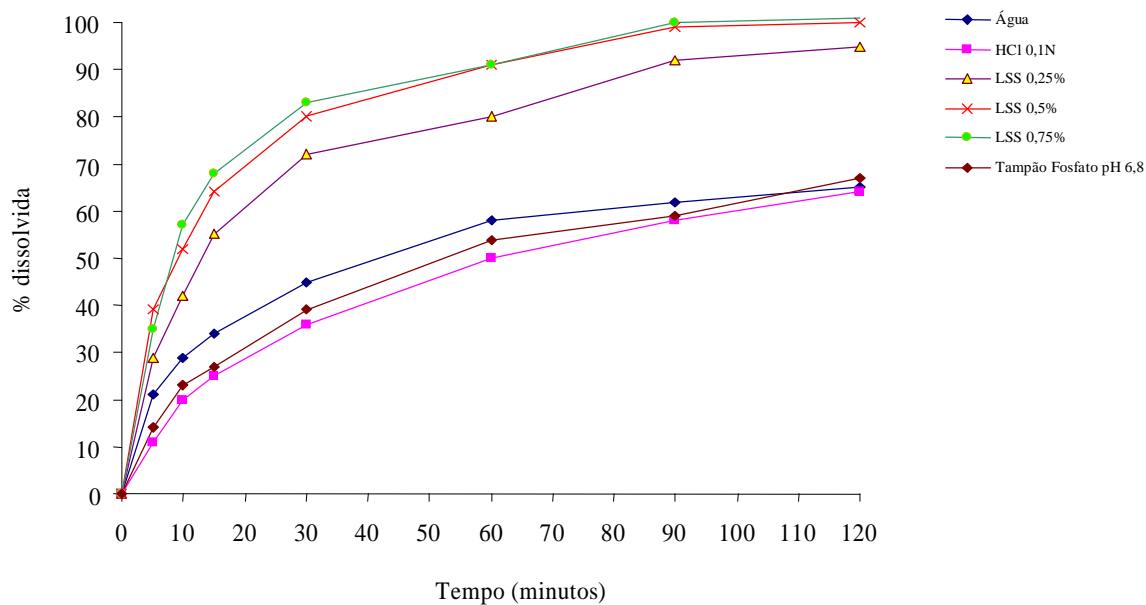


Figura 5 – Perfil de dissolução dos comprimidos de valdecoxibe com diferentes meios, a $37 \pm 0,5$ °C, utilizando aparato 2 e rotação de 50 rpm.

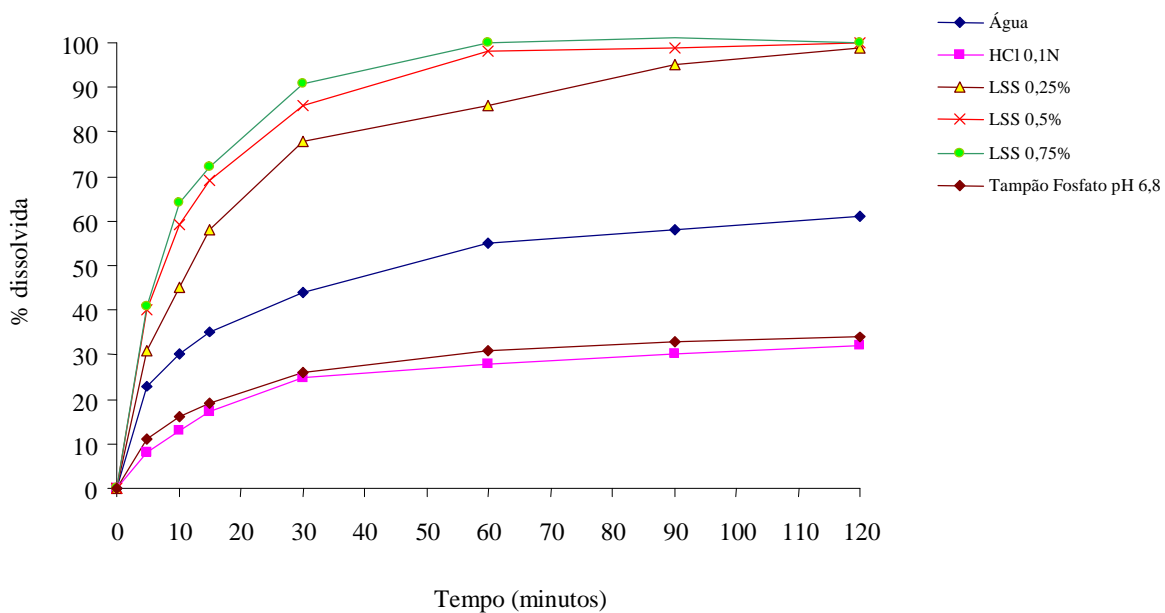


Figura 6 – Perfil de dissolução dos comprimidos de valdecoxibe com diferentes meios, a $37 \pm 0,5$ °C, utilizando aparato 2 e rotação de 75 rpm.

Os resultados dos perfis de dissolução dos comprimidos de valdecoxibe contendo 10, 20 e 40 mg, utilizando a condição selecionada, após 60 minutos, demonstraram valores médios de percentagens dissolvidas de 99,6, 100,2 e 98,5%, respectivamente, conforme a Figura 7.

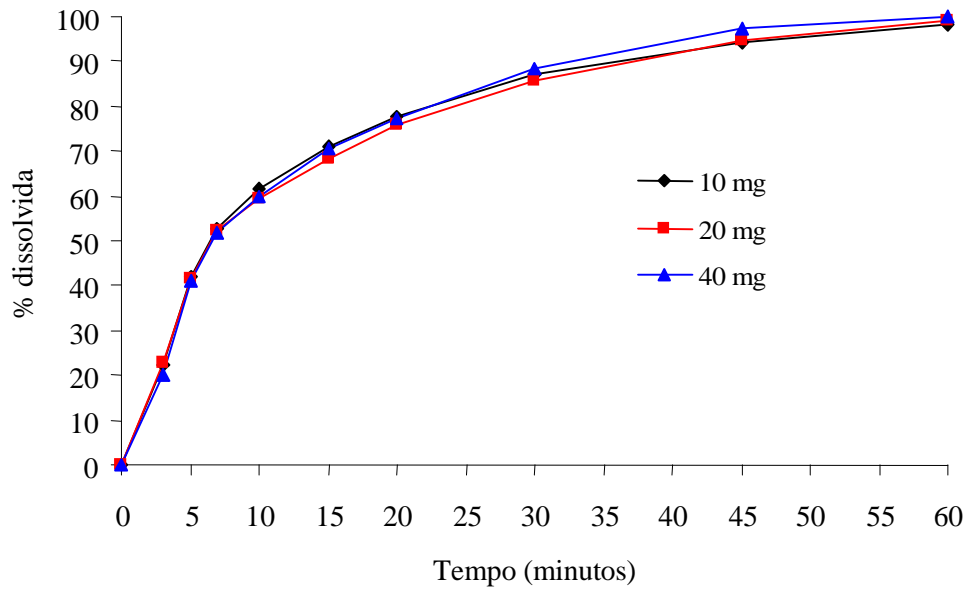


Figura 7 – Representação gráfica das percentagens dissolvidas dos comprimidos de valdecoxibe com concentrações de 10, 20 e 40 mg no meio LSS 0,5% a $37 \pm 0,5$ °C e 75 rpm, aparato 2.

Executou-se também avaliação da estabilidade das soluções da SQR e da amostra de comprimidos no meio de dissolução, demonstrando que o valdecoxibe se mantém praticamente inalterado sob as condições testadas, conforme a Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados da avaliação da estabilidade da SQR e da amostra de valdecoxibe no meio de dissolução por cromatografia líquida.

Amostra	SQR (%)	Comprimido (%)
Recém preparada	-	99,65
2 horas a 37 ± 0,5 °C	100,21	100,2
24 horas a temperatura ambiente	99,75	99,18

4.5 Avaliação de parâmetros hematológicos pelo bioensaio

Sucessivamente, executaram-se estudos para avaliar a influência do valdecoxibe sobre parâmetros hematológicos. O plasma proveniente de cada coleta de sangue dos ratos foi submetido à análise através de método cromatográfico pré-validado, determinando-se as concentrações plasmáticas individuais de valdecoxibe, conforme demonstrado na Tabela 18.

Tabela 18 – Determinação por cromatografia líquida da concentração plasmática de valdecoxibe em ratos administrados durante quatro semanas.

Grupo de animais	Concentração ^a (ng/mL)							
	1^a semana		2^a semana		3^a semana		4^a semana	
	Média	CV%	Média	CV%	Média	CV%	Média	CV%
Controle	nd ^b	-	nd ^b	-	nd ^b	-	nd ^b	-
Valdecoxibe 10 mg/Kg	101,1	8,5	113,5	8,6	164,0	7,3	184,6	9,0
Valdecoxibe 23 mg/Kg	135,2	7,2	154,3	6,3	171,5	5,6	188,6	6,4

^a média de seis animais.

^b nd não detectado.

Os valores experimentais obtidos na contagem de plaquetas, após administração de dose diária de AAS e valdecoxibe durante 1, 2, 3 e 4 semanas, são apresentados na Tabela 19. Para os grupos que receberam AAS nas doses de 100 e 420 mg/Kg, observou-se, redução

média de 1,1 e 0,9%, respectivamente. Por sua vez, os grupos tratados com 10 e 23 mg/Kg de valdecoxibe apresentaram aumento médio de 2,2 e 2,8%. Comparando-se os resultados com os controles, não houve diferença significativa no período do estudo.

Tabela 19 – Resultados da contagem de plaquetas após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) durante quatro semanas em ratos Wistar.

Grupo de animais	Dose (mg/Kg)	Contagem de Plaquetas, em mm ³ (média ^a ± EPM ^b)			
		1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
Controle	-	714,4 ± 8,1	698,3 ± 7,7	725,4 ± 9,0	712,0 ± 6,3
	10	718,2 ± 11,0	721,3 ± 8,4	738,6 ± 7,5	736,1 ± 12,1
Valdecoxibe	23	723,1 ± 10,5	726,7 ± 9,7	742,5 ± 5,3	738,2 ± 6,7
	100	708,4 ± 11,1	695,7 ± 8,6	710,9 ± 12,3	703,2 ± 11,5
AAS	420	706,5 ± 12,4	700,2 ± 9,5	712,6 ± 9,4	706,2 ± 13,2

^a seis ratos/grupo.

^b EPM = erro padrão da média.

Na avaliação de fibrinogênio, ao final das quatro semanas, observou-se aumento médio percentual nos níveis sanguíneos de 1,2 e 3,6% para as doses de 10 e 23 mg/Kg de valdecoxibe, respectivamente. Além disso, diminuição de 0,3% para o grupo tratado com 100 mg/Kg de AAS e aumento de 0,7% para a dose de 420 mg/Kg. Comparando-se os resultados com os controles, não houve diferença significativa (Tabela 20).

Tabela 20 - Resultados da dosagem de fibrinogênio após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) quatro semanas em ratos Wistar.

Grupo de animais	Dose (mg/Kg)	Dosagem de fibrinogênio, em mg/dL (média ^a ± EPM ^b)			
		1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
Controle	-	192,5 ± 12,1	195,3 ± 11,2	200,5 ± 8,5	198,4 ± 13,1
Valdecoxibe	10	190,7 ± 11,2	196,4 ± 8,4	202,4 ± 9,6	206,3 ± 12,5
	23	195,8 ± 10,5	195,7 ± 10,7	209,3 ± 13,4	214,1 ± 12,6
AAS	100	195,4 ± 11,4	192,2 ± 8,7	201,3 ± 10,1	195,1 ± 9,6
	420	195,2 ± 8,3	197,1 ± 9,8	198,6 ± 7,5	201,0 ± 12,5

^a seis ratos/grupo.

^b EPM = erro padrão da média.

Os resultados obtidos na determinação do TP encontram-se na Tabela 21. Observou-se redução significativa no TP de 12,2% para o grupo tratado com 10 mg/Kg de valdecoxibe após 3 semanas e redução de 15,7% para o grupo tratado com 23 mg/Kg após 4 semanas, (P<0,05). Os animais que receberam AAS (100 e 420 mg/Kg) apresentaram aumento médio no tempo de coagulação de 2,8 e 1,8%, respectivamente, comparado aos controles, porém não significativos (P>0,05).

Tabela 21 – Resultados da determinação do tempo de protrombina (TP) após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) durante quatro semanas em ratos Wistar.

Grupo de animais	Dose (mg/Kg)	TP, em seg (média ^a ± EPM ^b)			
		1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
Controle	-	11,1 ± 0,07	10,9 ± 0,13	10,6 ± 0,07	10,8 ± 0,35
Valdecoxibe	10	11,2 ± 0,31	10,8 ± 0,47	9,3 ± 0,33 ^c	11,2 ± 0,15
	23	11,0 ± 0,56	10,7 ± 0,23	9,5 ± 0,64	9,1 ± 0,89 ^c
AAS	100	11,2 ± 0,43	11,1 ± 0,30	11,0 ± 0,45	11,3 ± 0,62
	420	11,3 ± 0,36	11,0 ± 0,24	10,7 ± 0,41	11,2 ± 0,57

^a seis ratos/grupo.

^b EPM = erro padrão da média.

^c teste t de *Student*, diferença significativa em relação ao grupo controle P<0,05.

Conforme demonstrado na Tabela 22, observou-se diminuição significativa no TTPA de, aproximadamente, 18% na segunda semana de tratamento para o grupo que recebeu 10 mg/Kg de valdecoxibe ($P < 0,05$). Os animais que receberam 23 mg/Kg, apresentaram redução significativa de 10,5% na primeira semana, e 13,8% após 3 semanas ($P < 0,05$). Os ratos tratados com AAS, apresentaram prolongamento do tempo de coagulação variável entre 0,5 a 8,6% para dose de 100 mg/Kg e de 0,7 a 4,8% para a dose de 420 mg/Kg, respectivamente. Entretanto, essa diferença não foi significativa ($P > 0,05$) em relação ao grupo controle.

Tabela 22 – Resultados da determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), após administração de valdecoxibe e ácido acetilsalisílico (AAS) durante quatro semanas em ratos Wistar.

Grupo de animais	Dose (mg/Kg)	TTPA, em seg (média ^a ± EPM ^b)			
		1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana
Controle	-	39,2 ± 1,61	41,5 ± 1,30	41,3 ± 1,15	44,3 ± 1,17
Valdecoxibe	10	38,2 ± 0,58	34,0 ± 0,62 ^c	39,9 ± 0,85	48,2 ± 1,18
	23	35,1 ± 1,82 ^c	39,7 ± 0,95	35,6 ± 1,64 ^c	42,5 ± 0,89
AAS	100	39,4 ± 0,90	44,3 ± 1,26	42,3 ± 0,71	48,1 ± 1,51
	420	41,1 ± 0,58	42,3 ± 1,02	41,6 ± 0,92	45,8 ± 0,84

^a seis ratos/grupo.

^b EPM = erro padrão da média.

^c teste t de *Student*, diferença significativa em relação ao grupo controle $P < 0,05$.

Avaliou-se também a influência do valdecoxibe sobre a atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa. Como demonstra a Figura 8, após administração diária, em ratos Wistar, durante quatro semanas, observou-se redução na atividade anti-fator Xa de 3,1, 3,4, 6,2 e 0,5% para o grupo tratado com a dose de 10 mg/Kg. No tratamento estatístico dos dados, apenas a diferença de 6,2%, da terceira semana, foi significativa ($P < 0,05$). Para o grupo que recebeu dose equivalente a 23 mg/Kg, também se observou redução na atividade anti-fator Xa de 6,4, 3,1, 2,8 e 4,9% em relação aos controles, com diferença significativa apenas na primeira semana ($P < 0,05$). Entretanto, a atividade anti-fator IIa do valdecoxibe na dose 10 mg/Kg apresentou redução de 1,1 e 3,1% nas primeiras duas semanas, e aumento de 0,2 e 0,5%, na

terceira e quarta semanas, respectivamente. Na dose de 23 mg/Kg foi observada redução média de 0,7, 2,0, 4,6 e 3,2%. Essas diferenças foram não-significativas ($P>0,05$).

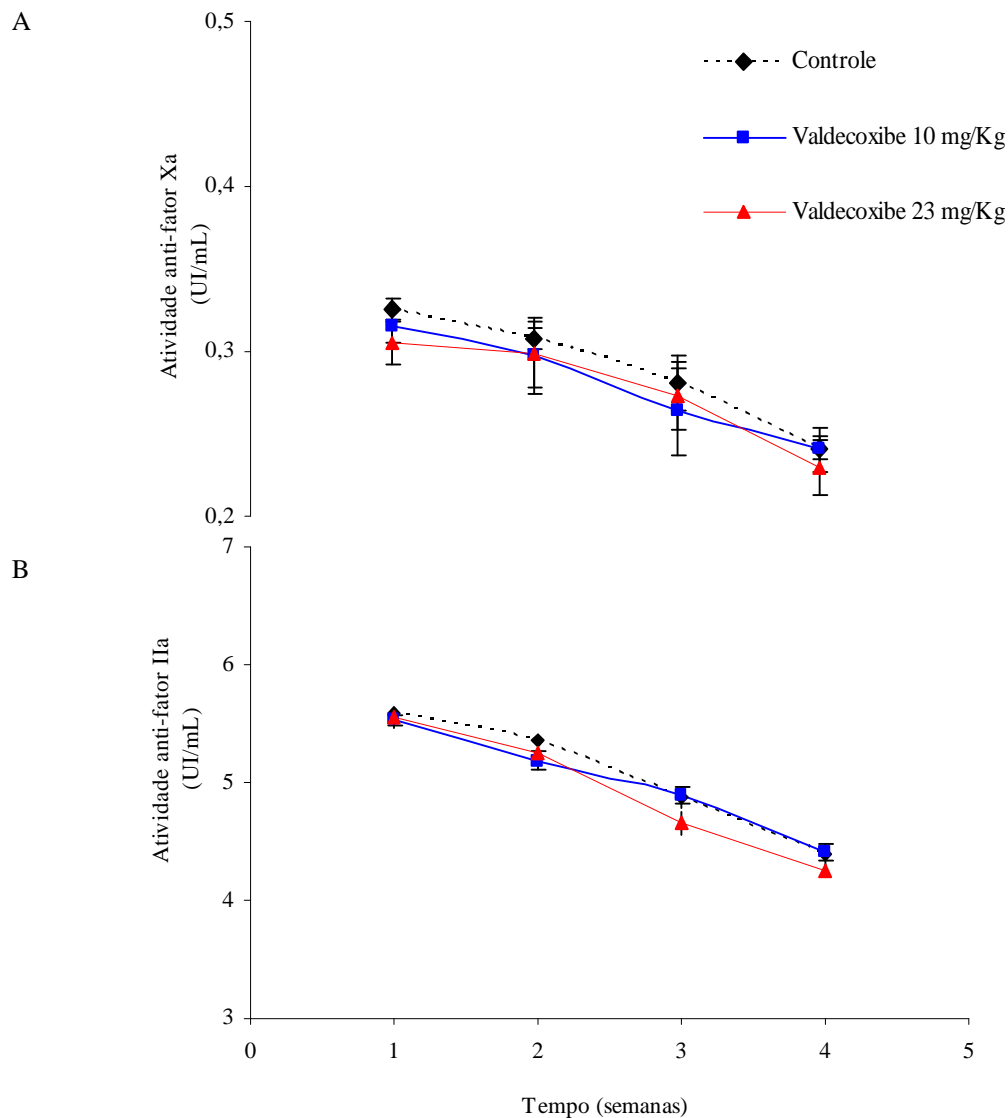


Figura 8 – Resultados da atividade anti-fator Xa (A) e anti-fator IIa (B) determinada em amostras de plasma após administração diária de 10 e 23 mg/Kg de valdecoxibe durante 1, 2, 3 e 4 semanas, 6 ratos/grupo. Dados expressos como média \pm EPM.

Os resultados dos efeitos do AAS sobre a atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa são apresentados na Figura 9. Para dose de 100 mg/Kg de AAS, observou-se aumento de 3,0, 6,5, 6,3 e 5,9% para a atividade anti-fator Xa e de 3,2, 3,5, 1,9 e 4% para a atividade anti-fator IIa. Para dose de 420 mg/Kg de AAS, observou-se aumento de 2,2, 5,6, 6,5 e 5,1% para a

atividade anti-fator Xa, e 2,4, 2,9, 5,8 e 5,0% para a atividade anti-fator IIa. Portanto, ao contrário do encontrado para o valdecoxibe, o AAS originou aumento da atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa durante todo o experimento, porém com diferenças não-significativas em relação ao grupo controle.

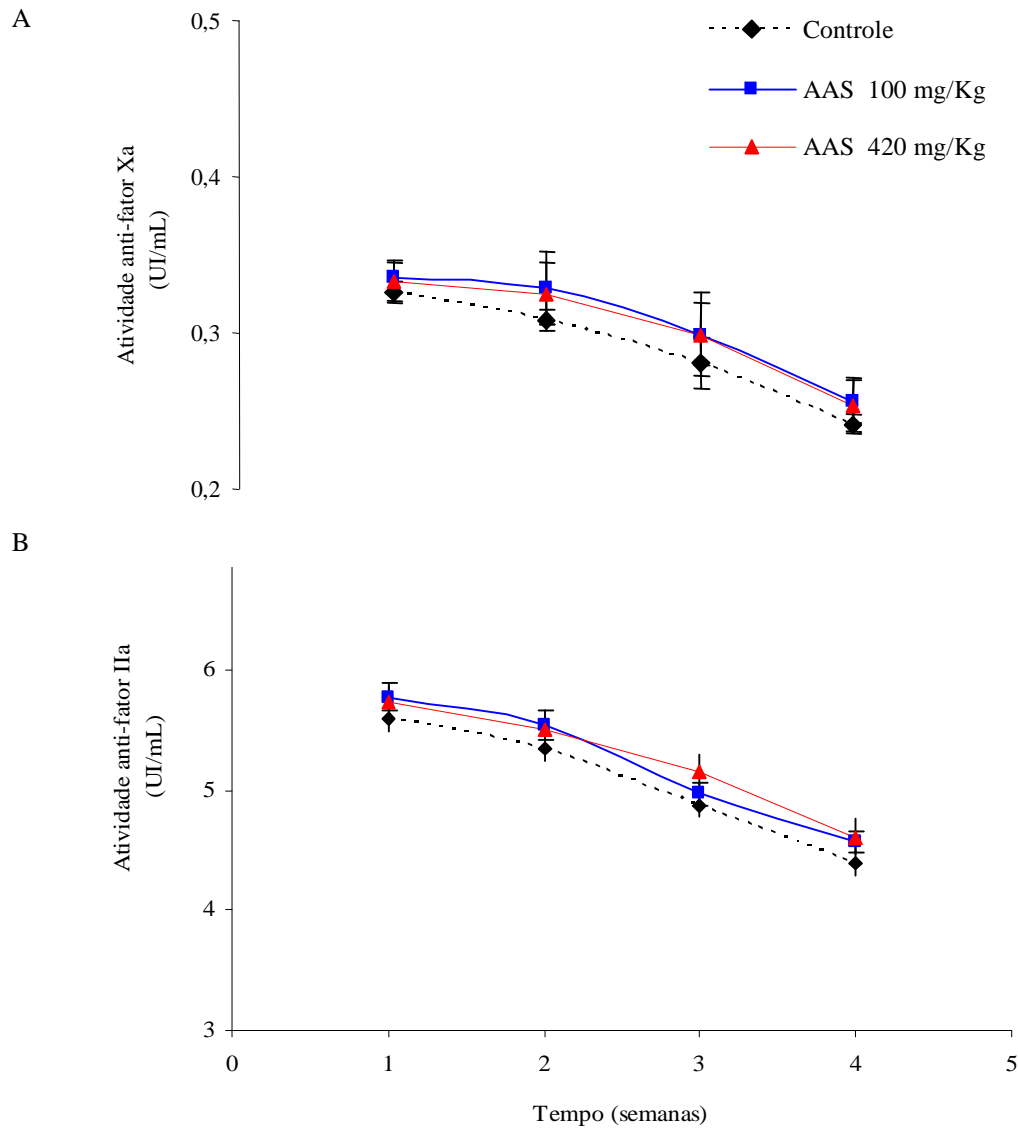


Figura 9 – Resultados da atividade anti-fator Xa (A) e anti-fator IIa (B) determinada em amostras de plasma após administração diária de 100 e 420 mg/Kg de ácido acetilsalisílico (AAS) durante 1, 2, 3 e 4 semanas, 6 ratos/grupo. Dados expressos como média ± EPM.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de amostras biológicas. O desenvolvimento e validação contribuem para garantir a qualidade, segurança e eficácia terapêutica. Nesse contexto, observa-se que o valdecoxibe é um produto farmacêutico de lançamento relativamente recente no mercado mundial, e encontram-se poucas publicações sobre métodos para análise quantitativa do produto acabado.

As formas sólidas administradas por via oral possuem ampla prescrição clínica devido à praticidade e maior segurança proporcionada pela dosagem unitária. Os comprimidos de valdecoxibe foram submetidos aos testes físico-químicos e especificações preconizadas para o controle lote-a-lote (F. Bras., 1988). Os resultados mostram que os produtos analisados cumprem os limites de peso médio especificados com variações inferiores a 7,5% para os comprimidos na concentração de 10 mg, e de 5% para os de 20 e 40 mg (Tabela 3). Do mesmo modo, a desagregação em partículas menores ou grânulos ocorreu em tempo inferior a 30 minutos, sendo adequada para dissolução e absorção do fármaco (Tabela 4). Paralelamente, a percentagem de água encontrada variou entre 3,7% e 4,5% (Tabela 5). O teste de friabilidade forneceu valores de 0,13% a 0,21% (Tabela 6), inferiores ao limite de 1,5%. Por sua vez, submetidos ao teste de dureza, os comprimidos apresentaram valores acima do mínimo estabelecido de 30 N, demonstrando que os produtos acabados cumprem os parâmetros de qualidade.

A cromatografia líquida possibilita a separação e quantificação dos diferentes componentes da formulação, através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Além disso, no desenvolvimento do método analítico foram observadas também as propriedades físico-químicas do valdecoxibe, como a baixa solubilidade em água e elevada em metanol, bem como sua polaridade. O procedimento foi estudado para o doseamento em preparações farmacêuticas e no meio de dissolução. Realizou-se então a validação, para demonstrar que o método analítico seria apropriado para a finalidade pretendida. Na avaliação da especificidade obtiveram-se cromatogramas, nos quais os picos dos produtos formados por oxidação e fotólise encontram-se resolvidos em relação ao íntegro do valdecoxibe (Figura 3). Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos, verificou-se que a SQR permaneceu com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando a especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação

da estabilidade. Destaca-se que não há dados publicados sobre a degradação do valdecoxibe. O método apresentou regressão linear significativa $r^2=0,9999$, sem desvio de linearidade ($P<0,05$), conforme calculado pela ANOVA, comprovando sua validade pelos parâmetros avaliados (Tabela 9). Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 0,33% (Tabelas 10, 11 e 12), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2% (SHABIR, 2003). Conforme pode ser observado na Tabela 13, o valor médio experimental do teste de exatidão foi de 100,02%, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de $100 \pm 2\%$ em relação ao declarado (SHABIR, 2003). Por sua vez, os valores determinados para LD e LQ indicam a capacidade significativa do método para detectar e quantificar com confiabilidade a substância ativa. Na avaliação da robustez, observou-se que as variações na proporção de acetonitrila e na vazão da fase móvel alteraram os tempos de retenção, o que não ocorreu utilizando diferentes valores de pH. Na execução das análises, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa e os coeficientes de variação foram inferiores a 0,56%, comprovando a robustez do método proposto frente aos parâmetros avaliados, conforme demonstrado na Tabela 14. Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico (Tabela 15) mostraram que o equipamento e condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade, exatidão e precisão dos dados analíticos. Portanto, o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura, podendo ser empregado para análise de valdecoxibe e estudos de estabilidade. A determinação quantitativa dos lotes de comprimidos selecionados para esse estudo forneceu resultados médios entre 98,0 e 102,5% (Tabela 16) de acordo com os parâmetros de qualidade entre 95 e 105% (USP, 2005; ICH, 1996; SHABIR, 2003).

O teste de dissolução foi desenvolvido e otimizado para estudar a liberação do valdecoxibe da forma farmacêutica comprimido, observando-se nesse sentido que não foram encontrados métodos na literatura. Assim, desenvolveu-se procedimento com base na baixa solubilidade em água, testando diferentes condições, meios e velocidades de rotação, até atingir a condição selecionada com melhor perfil de liberação do fármaco, conforme observado nas Figuras 5 e 6. Os perfis de dissolução mostraram percentagens de fármaco dissolvidas superiores a 85% em 30 minutos (Figura 7), valores considerados adequados conforme descrito na literatura (SHAH et al., 1995; FDA, 1997). Os dados experimentais obtidos na determinação da estabilidade das soluções da SQR e da amostra de comprimidos no meio de dissolução encontram-se na faixa estabelecida (98 – 102%), demonstrando que o valdecoxibe é estável sob as condições estudadas, conforme a Tabela 17.

Com a finalidade de estabelecer correlação entre os níveis sanguíneos alcançados pela administração sub-aguda das doses do fármaco, e seus efeitos sobre o quadro hematológico, determinaram-se os níveis plasmáticos pelo método cromatográfico pré-validado para essa finalidade através dos parâmetros de precisão e exatidão, obtendo-se valores entre 101,1 e 188,6 ng/mL.

O experimento biológico teve como objetivo principal avaliar fatores relacionados com possíveis distúrbios ou anormalidades hemostáticas, vaso-oclusivas ou trombóticas, observadas no uso clínico do valdecoxibe. Selecionou-se para comparação o ácido acetilsalisílico (AAS), devido a sua ampla utilização e ao seu efeito antiagregante plaquetário (PATRIGNANI, 2003). O planejamento do ensaio baseou-se na seleção de doses de valdecoxibe, aproximadamente, dez e vinte vezes superiores à humana terapêutica, ajustada em função da massa corporal, e de três e dez vezes superiores para o AAS. O modelo de administração nos ratos foi estabelecido visando a observação de possíveis efeitos sub-agudos.

A avaliação dos efeitos do valdecoxibe na contagem de plaquetas, níveis de fibrinogênio e atividade anti-fator IIa durante 1, 2, 3 e 4 semanas mostram aumentos, não significativos, sugerindo porém que o fármaco interfere nesses parâmetros, com risco crescente de formação de trombos. Na determinação do tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e atividade anti-fator Xa, observou-se que a administração de valdecoxibe causou redução significativa do tempo e atividade, respectivamente, em alguns períodos do estudo, indicando a influência sobre os fatores de ativação da cascata de coagulação, que poderiam induzir à formação de coágulos. Ao contrário do valdecoxibe, o AAS provocou aumento médio no número de plaquetas, na atividade anti-fator Xa e anti-fator IIa, prolongamento no tempo de protrombina e tempo de tromboplastina, porém não significativos, mas certamente indicativos de sua atividade antiagregante.

Embora as alterações observadas não tenham sido significativas para todas as doses e períodos testados, pode-se observar tendência para a hipercoaguabilidade, justificando possíveis efeitos colaterais decorrentes do seu uso clínico. Sucessivos estudos, inclusive de longa duração, são justificáveis para melhor avaliação da atividade do fármaco sobre os parâmetros hematológicos.

Tendo em vista as controvérsias relativas aos coxibes, certamente os estudos de dosagem, tempo de uso, indicações terapêuticas e relação risco/benefício contribuirão para estabelecer alternativas que justifiquem a utilização desses fármacos devido a sua comprovada atividade antiinflamatória e analgésica, ou em prescrições para outras enfermidades.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Û Os testes físico-químicos demonstraram a qualidade dos lotes de comprimidos adotados para o estudo, de acordo com especificações farmacopéicas;
- Û o método desenvolvido e validado por cromatografia líquida em fase reversa apresentou especificidade, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e robustez, de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e análise quantitativa de valdecoxibe;
- Û o método validado foi adotado para determinação do teor dos lotes de valdecoxibe, fornecendo valores médios entre 98,0 e 102,5%;
- Û o método validado por cromatografia líquida em fase reversa pode ser aplicado em estudos de estabilidade de valdecoxibe, pois possibilita separação com resolução adequada da substância ativa e dos produtos de degradação;
- Û para os estudos de dissolução, selecionou-se o meio de 900 mL contendo 0,5% de lauril sulfato de sódio em água a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, aparato pá e velocidade de rotação de 75 rpm, que forneceram melhores resultados;
- Û o método validado por cromatografia líquida em fase reversa foi adotado para avaliar a percentagem dissolvida dos comprimidos de valdecoxibe, sendo sugerido para estudos de dissolução;
- Û as amostras dos lotes de comprimidos de valdecoxibe nas três concentrações usadas apresentaram perfis de dissolução comparáveis;
- Û os efeitos significativos demonstrados nas avaliações do tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de protrombina e atividade anti-fator Xa poderiam estar relacionados com o aumento da incidência de eventos trombóticos, observados durante o uso terapêutico continuado do valdecoxibe, justificando-se porém, a execução de estudos adicionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSALAMEH, S. et al. Review article: the pharmacological properties and clinical use of valdecoxib, a new cyclo-oxygenase-2-selective inhibitor. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 17, p. 489-501, 2003.

AL-JISHI, S. A.; HOZAIFA, B. A. Effect of *Nigella sativa* on blood hemostatic function in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 7-14, 2003.

AMBIKE, A. A.; MAHADIK, K. R.; PARADKAR, A. Stability study of amorphous valdecoxib. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 151-162, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. In: Posicionamento da Anvisa quanto aos inibidores seletivos de COX-2. Brasília: Câmara Técnica de Medicamentos, 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/cateme/posicionamento_COX2.htm> . Acesso em 8 abril 2005.

BENSEN, W. et al. Efficacy and safety of valdecoxib in treating the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: a randomized, controlled comparison with placebo and naproxen. **Rheumatology**, v. 41, p. 1008-1016, 2002.

BYERLY, F. L. et al. Valdecoxib-associated acute generalized exanthematous pustulosis. **Burns**, v. 31, p. 383-387, 2005.

BOMBARDIER, C. et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 21, p. 1520-1528, 2000.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane. **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208-219, 2006.

BRASIL. Lei nº 6.638, de 10 de outubro de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecação de animais e determina outras providências. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 out. 1979. Disponível em: <<http://www.imepa.org.br/lei6638.html>>. Acesso em: 06 maio 2005.

BRESALIER, R. S. et al. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1092-1102, 2005.

BROOKS, P. et al. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. **Rheumatology**, v. 38, p. 779-788, 1999.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: Avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448-464, 2004.

CASTELLA-LAWSON, F.; CROFFORD, L. J. Cyclooxygenase inhibition and thrombogenicity. **The American Journal of Medicine**, v. 110, n. 3A, p. 28S-32S, 2001.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

CHAVEZ, M. L.; DEKORTE, C. J. Valdecoxib: A review. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 3, p. 817-851, 2003.

CHENG, Y. et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. **Science**, v. 296, p. 539-541, 2002.

DALMORA, S. L. et al. Validation of the anti-factor Xa and anti-factor IIa assays for the potency assessment of nadroparin in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p. 58-64, 2006.

DANIELS, S. E. et al. Valdecoxib, a cyclooxygenase-2 specific inhibitor, is effective in treating primary dysmenorrhea. **Obstetrics & Gynecology**, v. 100, n. 2, p. 350-358, 2002.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Solubility studies on valdecoxib in the presence of carriers, cosolvents, and surfactants. **Drug Development Research**, v. 62, p. 41-48, 2004.

DESJARDINS, P. J. et al. A single preoperative oral dose of valdecoxib, a new cyclooxygenase-2 specific inhibitor, relieves post-oral surgery or bunionectomy pain. **Anesthesiology**, v. 97, p. 565-573, 2002.

DOUTREMEPUICH, F. et al. Fibrinogen as a factor of thrombosis: Experimental study. **Thrombosis Research**, v. 90, p. 57-64, 1998.

DRAZEN, J. M. COX-2 inhibitors : A lesson in unexpected problems. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1131-1132, 2005.

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

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, p. 1063-1073, 1998.

EDWARDS, J. E.; MCQUAY, H. J.; MOORE, R. A. Efficacy and safety of valdecoxib for treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: systematic review of randomised controlled trials. **Pain**, v. 111, p. 286-296, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a ed. São Paulo, Atheneu: 1988.

FARKOUH, M. E. et al. Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), cardiovascular outcomes: randomised controlled trial. **Lancet**, v. 364, p. 675-685, 2004.

FIDLER, B. D. Valdecoxib: A new COX-2 inhibitor. **Drug Forecast**, v. 27, n. 6, p. 282-286, 2002.

FITZGERALD, G. A. Coxibs and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 17, p. 1709-1711, 2004.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 6, p. 433-442, 2001.

FDA - Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms, August 1997.

FRICKE, J. et al. Valdecoxib is more efficacious than rofecoxib in relieving pain associated with oral surgery. **American Journal of Therapeutics**, v. 9, n. 2, p. 89-97, 2002.

FRÖLICH, J. C. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 30-34, 1997.

FURLANETTO, S. et al. Optimization of dissolution test precision for ketoprofen oral extended-release product. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 159-165, 2003.

GARCÍA-MANZANO, A. et al. Changes on hemostatic parameters induced by 17 β -estradiol, ethinylestradiol, and the 17 β -aminoestrogen pentolame in the male Wistar rat. **Steroids**, v. 67, p. 1129-1135, 2002.

GASPARINI, G. et al. Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: A new class of anticancer agents? **The Lancet Oncology**, v. 4, p. 605-615, 2003.

GENTRY, P. A. Comparative aspects of blood coagulation. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 238-251, 2004.

GIERSE, J. K. et al. Valdecoxib: Assessment of cyclooxygenase-2 potency and selectivity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 3, p. 1206-1212, 2005.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 4-15, 2006.

HERSCHMAN, H. R.; TALLEY, J. J.; DUBOIS, R. Cyclooxygenase 2 (COX-2) as a target for therapy and noninvasive imaging. **Molecular Imaging and Biology**, v. 5, n. 5, p. 286-303, 2003.

HULL, M. A. Cyclooxygenase-2: How good is it as a target for cancer chemoprevention? **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1854-1863, 2005.

ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for human Use, “**Guideline on Validation of Analytical Procedure: Methodology**”. 1996.

JAEGER, C.; JAPPE, U. Valdecoxib-induced systemic contact dermatitis confirmed by positive patch test. **Contact Dermatitis**, v. 52, p. 47-48, 2005.

JENKINS, J. K.; SELIGMAN, P. J. Analysis and recommendations for Agency action regarding non-steroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. Food and Drug Administration. Estados Unidos da América: Memorandum, 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/cox2/nsaiddecisionmemo.pdf>>. Acesso em: 10 abril 2005.

JONES, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: Past, present, and future. **The American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1A, p. 4S-7S, 2001.

JONES, S. C. Relative thromboembolic risks associated with COX-2 inhibitors. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 39, p. 1249-1259, 2005.

KISMET, K. et al. Celecoxib: a potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, p. 127-142, 2004.

KIVITZ, A. et al. Randomized placebo-controlled trial comparing efficacy and safety of valdecoxib with naproxen in patients with osteoarthritis. **The Journal of Family Practice**, v. 51, n. 6, p. 530-537, 2002.

KONSTANTINOPOULOS, P. A.; LEHMANN, D. F. The Cardiovascular toxicity of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors: Comparisons, contrasts, and aspirin confounding. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, p. 742-750, 2005.

KRÖTZ, F. et al. Selective COX-2 inhibitors and risk of myocardial infarction. **Journal of Vascular Research**, v. 42, p. 312-324, 2005.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: Current issues. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

KUMAR, V. V. P. et al. Simultaneous quantitation of etoricoxib, salicylic acid, valdecoxib, ketoprofen, nimesulide and celecoxib in plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 125-132, 2006.

LAGACE, M. et al. Developing a discriminating dissolution procedure for a dual active pharmaceutical product with unique solubility characteristics. **Dissolution Technologies**, v. 11. n. 1, p. 13-17, 2004.

LEESE, P. T. et al. Valdecoxib does not impair the platelet function. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 20, n. 4, p. 275-281, 2002.

LEESE, P. T.; RECKER, D. P.; KENT, J. D. The COX-2 selective inhibitor, valdecoxib, does not impair platelet function in the elderly: results of a randomized controlled trial. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, p. 504-513, 2003.

LEMINI, C. et al. Contrasting effects of estradiol and 17 α -minoestrogens on blood clotting time in rats and mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 510, p. 229-233, 2005.

LIU, C.; DESAI, K. G. H.; LIU, C. Solubility of Valdecoxib in the presence of ethanol and sodium lauryl sulfate at (298.15, 303.15, and 308.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 49, p. 1847-1850, 2004.

LIU, C.; DESAI, K. G. H.; LIU, C. Solubility of Valdecoxib in the presence of Poly(ethylene glycol) 4000, Poly(ethylene glycol) 6000, Poly(ethylene glycol) 8000, and Poly(ethylene glycol) 10 000 at (298.15, 303.15, and 308.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 50, p. 278-282, 2005a.

LIU, C. et al. Solubility of Valdecoxib in the presence of Glycerol, Propylene Glycol, and Poly(ethylene glycol) 400 at (298.15, 303.15, and 308.15) K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 50, p. 1736-1739, 2005b.

LIU, C. S.; LIU, C. G.; DESAI, K. G. H. Enhancement of dissolution rate of valdecoxib using solid dispersions with polyethylene glycol 4000. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 1-10, 2005c.

MAHAJAN, A.; SHARMA, R. COX-2 Selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Current status. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 53, p. 200-204, 2005.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MAKAROWSKI, W. et al. Efficacy and safety of the COX-2 specific inhibitor valdecoxib in the management of osteoarthritis of the hip: a randomized, double-blind, placebo-controlled comparison with naproxen. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, p. 290-296, 2002.

MARNETT, L. J. Cyclooxygenase mechanisms. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 545-552, 2000.

MARNETT, L. J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 68-69, p. 153-164, 2002.

McMURRAY, R. W.; HARDY, K. J. Cox-2 inhibitors: Today and tomorrow. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 323, n. 4, p. 181-189, 2002.

MITCHELL, J. A.; WARNER, T. D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1121-1132, 1999.

MOSES, L. E.; OAKFORD, R. V. **Tables of random permutations**. London : George Allen & Unwin, 1963.

NIELSEN, O. H. et al. Systematic review: coxibs, non-steroidal anti-inflammatory drugs or no cyclooxygenase inhibitors in gastroenterological high-risk patients? **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, p. 27-33, 2006.

NOORY, C. et al. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. **Dissolution Technologies**, v. 7, n. 1, p. 16-18, 2000.

NUSSMEIER, N. A.; WHELTON, A. A.; BROWN, M. T. Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 11, p. 1081-1091, 2005.

OTT, E. et al. Efficacy and safety of the cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxib in patients undergoing coronary artery bypass surgery. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 125, n. 6, p. 1481-1492, 2003.

PATRIGNANI, P. Aspirin insensitive eicosanoid biosynthesis in cardiovascular disease. **Thrombosis Research**, v. 110, p. 281-286, 2003.

PATRONO, C.; PATRIGNANI, P.; RODRÍGUEZ, L. A. G. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 1, p. 7-13, 2001.

PEREG, D.; LISHNER, M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer. **Journal of Internal Medicine**, v. 258, p. 115-123, 2005.

QURESHI, S. A.; MCGILVERAY, I. J. Typical variability in drug dissolution testing: study with USP and FDA calibrator tablets and marketed drug (glibenclamide) product. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 249-258, 1999.

RAMAKRISHNA, N. V. S. et al. Quantitation of valdecoxib in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection using liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 802, p. 271-275, 2004.

RAO, R. N. et al. Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for separation and simultaneous determination of COX-2 inhibitors in pharmaceuticals and its application to biological fluids. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 362-368, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROHRS, B. R. Dissolution method development for poorly soluble compounds. **Dissolution Technologies**, v. 8, n. 3, p. 1-5, 2001.

ROSTON, D. A. et al. Comparison of drug substance impurity profiles generated with extended length columns during packed-column SFC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 339-355, 2001.

SANE, R. T. et al. HPLC determination and pharmacokinetic study of valdecoxib in human plasma. **Chromatographia**, v. 61, n. 3/4, p. 137-141, 2005.

SARAPA, N. et al. The effect of mild and moderate hepatic impairment on the pharmacokinetics of valdecoxib, a selective COX-2 inhibitor. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, p. 247-256, 2005.

SCHEIMAN, J. M. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, including COX-2 specific inhibitors, on the GI tract. **American Society for Gastrointestinal Endoscopy**, v. 12, n. 3, p. 1-4, 2005.

SCHNITZER, T. J. Cyclooxygenase-2-specific inhibitors: are they safe? **The American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1A, p. 46S-49S, 2001.

SEGEV, G.; KATZ, R. J. Selective COX-2 inhibitors and risk of cardiovascular events. **Hospital Physican**, v. 40, p. 39-46, 2004.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P. et al. In vitro dissolution of sparingly water-soluble drug dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, p. 99-106, 1995.

SILVERSTEIN, F. E. et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. Celecoxib long-term arthritis safety study. **Journal of the American Medical Association**, v. 284, n. 10, p. 1247-1255, 2000.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.

SIQUEIRA, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda, 2000. 238p.

SRINIVAS, M. S.; SRINIVAS, L. D.; SASTRY, B. S. Estimation of valdecoxib in pharmaceutical dosage forms by reverse phase HPLC. **Asian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 1119-1123, 2004.

STEINBACH, G. et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in Familial Adenomatous Polyposis. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 26, p. 1946-1952, 2000.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TALLEY, J. J. et al. 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-benzenesulfonamide, Valdecoxib: A potent and selective inhibitor of COX-2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 775-777, 2000.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: Modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 1, p. 15-23, 2001.

WALLACE, J. L.; DEVCHAND, P. R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, p. 275-282, 2005.

WERNER, U. et al. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitation of both etoricoxib and valdecoxib in human plasma. **Biomedical Chromatography**, v. 19, p. 113-118, 2005.

WHITE, W. B. et al. Effects of the cyclooxygenase-2 specific inhibitor valdecoxib versus nonsteroidal antiinflammatory agents and placebo on cardiovascular thrombotic events in patients with arthritis. **American Journal of Therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 244-250, 2004.

WILLIAMS, G. W. et al. A comparison of valdecoxib and naproxen in the treatment of rheumatoid arthritis symptoms. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 204-221, 2006.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **Lancet**, v. 355, p. 646-648, 2000.

YUAN, J. J. et al. Disposition of a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, valdecoxib, in human. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 9, p. 1013-1021, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 28th ed. Rokville, United States Convention, 2005.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, v. 231, p. 749-754, 1971.

ZHANG, J. Y. et al. Pharmacokinetics and metabolism of a COX-2 inhibitor, valdecoxib, in mice. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 4, p. 491-501, 2003a.

ZHANG, J. Y.; FAST, D. M.; BREAU, A. P. Development and validation of an automated SPE-LC-MS/MS assay for valdecoxib and its hydroxylated metabolite in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 61-72, 2003b.

ZHANG, J. Y.; FAST, D. M.; BREAU, A. P. Determination of valdecoxib and its metabolites in human urine by automated solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 123-134, 2003c.

ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 Artigos científicos publicados

FRONZA, M.; BRUM JUNIOR, L.; WRASSE, M.; BARTH, T.; DALMORA, S. L. Development and validation of a RP-HPLC method for the quantitation and dissolution studies of valdecoxib. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 1, p. 117-122, 2006.

FRONZA, M.; WRASSE, M.; BRUM JUNIOR, L.; SANGOI, M. S.; DALMORA, S. L. Evaluation of the changes on hemostatic parameters induced by valdecoxib in male wistar rats. **Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy**, v. 28, n. 1, p. 28-32, 2006