

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

FLÁVIA DIAS MARQUES MARINHO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SINVASTATINA 20 mg COMPRIMIDOS E
CÁPSULAS EM RELAÇÃO AOS COMPRIMIDOS REFERÊNCIA**

Belo Horizonte - MG

2012

FLÁVIA DIAS MARQUES MARINHO

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SINVASTATINA 20 mg COMPRIMIDOS E
CÁPSULAS EM RELAÇÃO AOS COMPRIMIDOS REFERÊNCIA**

Tese, como requisito parcial, para obter o título de doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Profa. Dra. Cristina D. Vianna Soares – UFMG

Co-Orientadoras

Profa. Dra. Angélica Alves Lima – UFOP

Profa. Dra. Ilka Afonso Reis – UFMG

Colaborador Dr. José Carlos da Costa Zanon – Ouro Cordis, Hospital Santa Casa

Belo Horizonte - MG

2012

Ficha Catalográfica

M357a Marques-Marinho, Flávia Dias.
Avaliação da eficácia de sinvastatina 20 mg comprimidos e cápsulas em relação aos comprimidos referência / Flávia Dias Marques Marinho. – 2012.
151 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Duarte Vianna Soares.

Coorientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Angélica Alves Lima, Prof^ª. Dr^ª. Ilka Afonso Reis.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Hipercolesterolemia – Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Medicamentos – Controle de qualidade - Teses. 4. Medicamentos – Formas farmacêuticas - Teses. I. Vianna-Soares, Cristina Duarte. II. Lima, Angélica Alves. III. Reis, Ilka Afonso. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.19

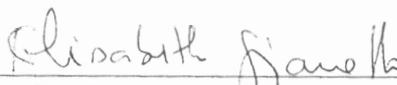
FOLHA DE APROVAÇÃO

FLÁVIA DIAS MARQUES MARINHO

**"AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE SINVASTATINA 20MG COMPRIMIDOS E
 CÁPSULAS EM RELAÇÃO AOS COMPRIMIDOS REFERÊNCIA"**

Tese, como requisito parcial para obter o grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em cinco de novembro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Elisabeth Aparecida dos Santos Gianotto - UEL



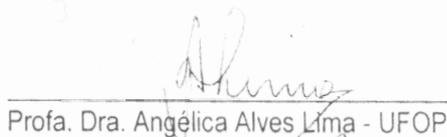
Profa. Dra. Magali Benjamin de Araújo - UNIFAL



Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa - UFMG



Profa. Dra. Scheilla Vitorino C. de Souza Ferreira - UFMG



Profa. Dra. Angélica Alves Lima - UFOP



Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares - UFMG

Dedico o grau de Doutor

Ao bom Deus que por meio de meus amados pais concedeu-me a vida, e posteriormente o desejo e saúde necessários para realização deste trabalho.

Ao precioso Euler por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais e irmã por contribuírem efetivamente em toda minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna-Soares, pela orientação, estímulo, confiança e amizade.

Às Profas. Dras. Angélica Alves Lima e Ilka Afonso Reis pela co-orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Dr. José Carlos da Costa Zanon pela importante colaboração, confiança e disponibilização do seu consultório na Clínica Ouro Cordis no Hospital Santa Casa de Ouro Preto para atendimento aos voluntários.

À Profa. Dra. Emília Sakurai pela co-orientação inicial, ensinamentos, compreensão, carinho e amizade.

À Profa. Dra. Maria Ruth Gonçalves Gaede Carrillo representando o Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia/UFOP pela disponibilização dos equipamentos e infraestrutura do Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) em 21 de janeiro de 2008. Ao Prof. Roney Nicolato pela coordenação das atividades LAPAC/EF/UFOP. Aos funcionários Farm. Cássio Zumerle Masioli, Farm. Ana Cláudia Faria Lopes e Adão pela execução das análises. À Farm. Ana Cláudia Faria Lopes e ao bolsista Pedro Moregola pela participação nas coletas de sangue e avaliação antropométrica dos voluntários. Aos demais funcionários e estagiários do LAPAC que contribuíram nas atividades relacionadas ao projeto.

Ao Dr Ariosvaldo Figueiredo Santos Filho, secretário municipal de saúde de Ouro Preto pela parceria estabelecida em 21 de janeiro de 2011. Aos enfermeiros (Elissama, Gircilene, Glauciane, Isadora, Leandro, Michelle, Miguel, Leandro, Luiza, Patrícia, Ricardo), médicos (Dr. Alexandre Rotondo, Dr. André Nicolato) e assistentes das unidades do Programa Saúde da Família do município de Ouro Preto por auxiliarem no acesso aos usuários do Sistema Único de Saúde e à Farm. Paula Alves de Medeiros pela doação dos comprimidos de sinvastatina 20 mg.

Aos voluntários pela participação e enriquecimento mútuo.

Às minhas tias Maria das Graças Dias Gomes e Maria Geralda Dias Marques pela participação voluntária neste projeto.

À Radio Itatiaia Ouro Preto pela divulgação do projeto à comunidade Ouropretana.

Ao Farm. Sílvio Arndt pela doação de parte dos conjuntos diagnósticos utilizados nesta pesquisa e aos farmacêuticos magistras pela doação de sinvastatina 20 mg cápsulas.

Aos professores Dra. Ilka Afonso Reis, Dra. Marinez de Oliveira Sousa, Dr. Francisco de Assis Acúrcio, Dr. Edson Perini, Dr. Márcio de Matos Coelho, Dr.

Fernão Castro Braga, Dr. Ricardo José Alves, Dr. Christian Fernandes, Dra. Isabela Costa César, Dra. Suzana dos Santos Gomes e Dra. Lucíola Licínio de Castro Paixão Santos e Dr. Robert Cowen pelos ensinamentos nas disciplinas lecionadas na pós-graduação.

Aos professores Dr. Gerson Antônio Pianetti, Dr. Márcio de Matos Coelho e Dr. André Augusto Gomes Faraco pelas sugestões durante o processo de seleção; às professoras Dra. Marinez de Oliveira Sousa, Dra. Jacqueline de Souza e Dra. Gisele Rodrigues da Silva pelas contribuições durante o exame de qualificação e às professoras participantes da comissão examinadora.

Aos professores Dr. Edson Perini e Dr. Francisco de Assis Acúrcio pelas valiosas sugestões durante a concepção deste projeto.

Aos professores Dr. Gilson Andrade Ramaldes, Dr. Nivaldo Lúcio Speziali, Dra. Maria Irene Yoshida pela colaboração em estudos relacionados a esta tese.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Controle de Qualidade (LCQ) da Faculdade de Farmácia da UFMG, Ana Gabriela Reis Solano, André Lima de Oliveira Costa, André Márcio do Nascimento, Fernando Henrique Andrade Nogueira, Iara Maíra de Oliveira Viana, Isabela Costa César, Giovanni Margotto Bertollo, José Antônio de Aquino, Juliana Almeida Baratta, Juliana Machado Brêtas, Laura Maria Fontes Prado, Marcelo Antônio Oliveira, Maria Betânia Freitas Marques, Maria Olívia Nogueira Teixeira, Mariana de Oliveira Almeida, Paula Cristina Rezende Enéas, Paula Rocha Chellini, Rachel Lima Marcelino Freire, Ricardo Martins Duarte Byrro, Taízia Dutra Silva, Tiago Assis Miranda, Vinícius Freire Fagundes e demais amigos do LCQ pelo convívio agradável e enriquecedor.

Aos amigos do CEDAFAR, Eld, Edna, Leonardo, Luciano, Márcia, Miriam, Nilton (*in memoriam*), Sônia e Tânia pelo auxílio prestado e pela disponibilidade.

Às bolsistas de iniciação científica Amanda Leão dos Santos, Bruna Diniz Freitas e as voluntárias Thaís de Melo Guedes e Mirella Monique Lana Diniz, pela colaboração neste projeto.

À Farm. Josiane Monteiro Bastos de Oliveira pela amizade e disponibilização da infraestrutura da Acuracia Pharmaceutica para manipulação de sinvastatina 20 mg cápsulas.

Aos meus amados pais, Maria Joaquina Dias e Flávio Margarida Marques pelos esforços, atenção, compreensão, sobretudo nos últimos quatro anos.

À minha querida irmã Fúlvia Dias Marques Quintão, pelo carinho e amizade.

Ao Euler Horta Marinho, pelo amor verdadeiro e eterno, pelas renúncias, auxílio constante (espiritual e material) sem os quais não seria possível concluir este trabalho.

Aos meus parentes e amigos pelo estímulo e orações.

“Resplandecente é a Sabedoria, e sua beleza é inalterável:

Os que a amam descobrem-na facilmente.

Os que a procuram encontram-na.

Ela antecipa-se aos que a desejam.

*Quem para possuí-la, levanta-se de madrugada, não terá trabalho,
porque a encontrará sentada à sua porta.”*

Sb 6, 12-14.

RESUMO

A sinvastatina (SV), hipolipemiante mundialmente empregado no tratamento da hipercolesterolemia (lipoproteína de baixa densidade, LDLc ≥ 160 mg/dL) ou da hiperlipidemia mista (LDLc ≥ 160 mg/dL e triglicérides, TG ≥ 150 mg/dL), está disponível no Brasil como comprimidos (genérico, similar, referência) no Sistema Único de Saúde/SUS e drogarias, e como cápsulas (farmácias magistrais). A eficácia terapêutica de medicamento similar (comprimidos revestidos), bem como de cápsulas manipuladas em relação ao medicamento referência é avaliada em 96 voluntários após verificação de sua qualidade por meio de testes físicos (desintegração, determinação de peso) e da cromatografia a líquido de alta eficiência para quantificação do fármaco nos demais testes (doseamento, uniformidade de conteúdo, teste de dissolução). Os resultados são avaliados de acordo com as especificações adotadas para comprimidos ou propostas para cápsulas (ausência de monografia). O método constituído por fase móvel metanólica (80%) alternativa a acetonitrila, é seletivo (ausência de interferências), preciso (DPR $\leq 2,0\%$), exato ($\geq 98,0\%$ e $\leq 101,1\%$), robusto ($p \geq 0,10$) e de menor custo. Além disso, mostra-se adequado para aplicação em estudos de dissolução de SV 20 mg comprimidos (amostras similar e referência, sob temperatura controlada) e para cápsulas. Todos os medicamentos administrados aos voluntários (32 por grupo de tratamento) durante 8 semanas apresentam qualidade acima da mínima satisfatória. Apenas os comprimidos similares (SUS) mostram porcentagem média de eficiência de dissolução estatisticamente não homogênea em relação aos comprimidos referência. A redução dos níveis de LDLc ($p > 0,76$) e colesterol total ($p > 0,35$) nos voluntários (no mínimo 93,7% em cada grupo apresenta adesão $\geq 80\%$ ao tratamento) não difere para cápsulas ou comprimidos similar em relação aos comprimidos referência. Não há elevação significativa dos níveis de colesterol na lipoproteína de alta densidade (HDLc) nos grupos de tratamento ($p > 0,05$). As alterações nos níveis das enzimas hepáticas e de creatina quinase também não diferem entre os grupos de tratamento, de modo que quaisquer dos medicamentos podem ser sugeridos na clínica e a sua escolha está facultada aos médicos e pacientes.

Palavras-chave: Sinvastatina, hipercolesterolemia, eficácia terapêutica, farmácia, cápsulas, comprimidos, SUS.

ABSTRACT

Simvastatin (SIM), hypolipidemic worldwide used in the treatment of hypercholesterolemia (low density lipoprotein, LDLc ≥ 160 mg/dL) or mixed hyperlipidemia (LDLc ≥ 160 mg/dL and triglycerides, TG ≥ 150 mg/dL) is available as tablets (generic, similar, reference) at SUS, a Brazilian public health system and drugstores, and as capsules (compounding pharmacies). The therapeutic efficacy of the similar medicine (coated tablets) and of the compounded capsule compared to the reference medicine is assessed in 96 volunteers after checking their quality by means of physical tests (disintegration, weight determination) and of the high performance liquid chromatography for the quantification of the drug in other tests (assay, content uniformity, dissolution test). Furthermore, it is appropriate for use in dissolution studies of SV 20 mg tablets (similar and reference medicines, under controlled temperature) and capsules. All medications administered to volunteers (32 per treatment group) for 8 weeks present satisfactory quality above the minimum requirement. Only the similar tablets (SUS) show percent average dissolution efficiency statistically not homogeneous compared to the reference tablets. The reduction of LDLc levels ($p > 0.76$) and total cholesterol ($p > 0.35$) in volunteers (at least 93.7% in each group presents adherence $\geq 80\%$ to treatment) does not differ for similar tablets or capsules relative to the reference tablets. There is no significant elevation in high density lipoprotein cholesterol (HDLc) levels in the groups of treatment ($p > 0.05$). Changes in levels of hepatic enzymes and creatine kinase did not differ between groups of treatment, so that any of the medicines may be suggested in the clinic and the choice is left to the doctor and patient.

Keywords: Simvastatin, hypercholesterolemia, therapeutic efficacy, pharmacy, capsules, tablets, SUS.

LISTA DE FIGURAS

1 Estrutura química representativa de (a) colesterol, (b) triglicérides constituídos por glicerol e diferentes ácidos graxos (R ₁ , R ₂ , R ₃) e (c) fosfolípides constituídos por glicerol, ácidos graxos (R ₁ , R ₂) e colina, lecitina, etc. (X).	24
2 Estruturas químicas dos principais fármacos empregados no tratamento da hipertrigliceridemia.	29
3 Estruturas químicas das estatinas (ou sal correspondente) empregadas para o tratamento de hipercolesterolemia. Grupo farmacofórico evidente.	30
4 Formação do ácido mevalônico a partir de acetil CoA, etapa envolvida na biossíntese do colesterol.	31
5 Estrutura química de ezetimiba, inibidor da proteína transportadora do colesterol nos enterócitos.	32
6 Metabólitos da sinvastatina via citocromo P450 isoenzima 3A4.	37
1.1 Chemical structure of (a, SIM) simvastatin, (b, LOV) lovastatin and (c) SIM β -hydroxy acid.	47
1.2 Chromatograms of SIM and LOV methanolic solution five days in room temperature after preparation, using methanol:0.1% phosphoric acid (a) 85:15 v/v and (b) 80:20 v/v as mobile phase, 1.5 mL/min, C _{8e} 250×4 mm, 5 μ m, 30 °C, 10 μ L, λ 238 nm.	53
1.3 Chromatograms of SIM and LOV solution prepared in dissolution medium (0.5% SDS in monobasic sodium phosphate, pH 7, 0.01 M) after five days in room temperature; using methanol:0.1% phosphoric acid (a) 85:15 v/v and (b) 80:20 v/v as mobile phase, 1.5 mL/min, C _{8e} 250×4 mm, 5 μ m, 30 °C, 10 μ L, λ 238 nm.	53
1.4 UV/DAD spectrum related to statin products chromatographic peaks in Figure 1.2 and Figure 1.3.	54
1.5 Chromatograms of (a) simvastatin reference standard, (b) tablets placebo and (c) tablets placebo added of SIM RS in methanol. Chromatographic conditions: C ₈ (250×4 mm, 5 μ m) 30 °C, methanol: 0.1% phosphoric acid (80:20 v/v), 1.5 mL/min, λ 238 nm, 10 μ L.	56
1.6 Chromatograms of (a) simvastatin reference standard and (b) tablets placebo in dissolution medium. Chromatographic conditions: as in Figure 5. Dissolution conditions: 0.5% SDS in monobasic sodium phosphate (pH 7, 0.01 M), 900 mL, 37 °C, paddles, 150 rpm, 30 min.	56
1.7 SIM 20 mg tablets (n=6) release profiles in different days (n=2). Conditions: 0.5% SDS in monobasic sodium phosphate (pH 7, 0.01 M), 900 mL, 37 °C, paddles, 50 rpm for 45 min, 150 rpm for 15 min. Chromatographic conditions: as in Figure 1.2b.	59
1.8 Simvastatin and lovastatin chemical structures.	62
1.9 Preliminary chromatograms of SIM and LOV solutions prepared in methanol and in dissolution medium (0.5% SDS in monobasic sodium phosphate, pH 7, 0.01 M) after being stored for 5 days at room temperature; the elutions were performed using methanol:0.1% phosphoric acid (a, b) 85:15 v/v and (c, d) 80:20 v/v, respectively, as the mobile phase (1.5 mL/min, C _{8e} column (250×4 mm, 5 μ m), 30 °C, λ 238 nm, 10 μ L).	69
1.10 Chromatograms for SIM RS methanolic solutions at LOQ=1.0 μ g/mL and at LOD=0.4 μ g/mL using a C ₈ (250×4 mm, 5 μ m) column (30 °C, methanol:0.1% phosphoric acid (80:20 v/v), 1.5 mL/min, λ 238 nm, 10 μ L).	70
1.11 Chromatograms for (a) the SIM reference standard and (b) the placebo capsules. The conditions were the same as those described in Figure 1.10.	70

1.12 Chromatograms for SIM RS in dissolution medium (0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7) at 0.6 µg/mL (LOQ) and at 0.4 µg/mL (LOD). Conditions as described in Figure 1.10.	72
1.13 Chromatograms after dissolution tests for (a) a SIM reference standard and (b) a placebo capsule. Dissolution conditions: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7, 900 mL, 37 °C, paddles, 150 rpm for 45 min. The HPLC conditions were the same as those described in Figure 1.10.	72
1.14 Release profiles of 20 mg compounded simvastatin capsules (n=6) for samples B, C1 and C2. Dissolution conditions: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7, 900 mL, 37 °C, paddles, 75 rpm for 45 min, 150 rpm for 15 min. The HPLC conditions were the same as those described in Figure 1.10.	73
1.15 Conversão da lactona sinvastatina (CAS-79902-63-9) ao β-hidroxiácido correspondente, principalmente no fígado.	79
1.16 Cromatograma de (a) sinvastatina SQT 22,2 µg/mL em meio de dissolução (LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7) após 24 h a 22-24 °C, representativo daqueles obtidos para as amostras (A, B1, B2, C); detalhe: (b) respectivo espectro UV/DAD, (c) curva de pureza. Condições cromatográficas: metanol:ácido fosfórico 0,1% 80:20 v/v, 1,5 mL/min, C_{8e} 250×4 mm, 5 µm, 30 °C, 10 µL, λ 238 nm.	83
1.17 Variação porcentual média das respostas de soluções SV 22,2 µg/mL (SQT, A, B1, B2, C) em tampão fosfato de sódio 0,01 M contendo LSS 0,5%, pH 7, mantidas a 22-24 °C e injetadas (n=3) por 24 h para avaliação de estabilidade a curto prazo. Condições cromatográficas: Figura 1.16.	83
1.18 Variação porcentual média das respostas de soluções SV 22,2 µg/mL, a partir de SQT e cápsulas (amostras A, B2) submetidas ao teste de dissolução. Aliquotas mantidas a (a) 2-8 °C ou (b) 22-24 °C foram injetadas (n=2) por 8 h para avaliação de estabilidade a curto prazo. Condições do teste de dissolução: LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7, 900 mL, 37 °C, pás, 75 rpm, 45 min. Condições cromatográficas: Figura 1.16.	84
1.19 Variação porcentual média das respostas de soluções SV 22,2 µg/mL de amostras submetidas ao teste de dissolução. Aliquotas mantidas a 2-8 °C e 22-24 °C (SQT, C); a 27-28 °C (C) foram injetadas (n=2) por 8 h para avaliação de estabilidade a curto prazo. Condições do teste de dissolução: LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7, 900 mL, 37 °C, pás, 50 rpm, 30 min. Condições cromatográficas: Figura 1.16.	85
1.20 Simvastatin chemical structure.	88
1.21 SIM representative chromatograms for (a) assay/content uniformity, detail: SIM UV/DAD spectrum and (b) dissolution test, detail peak: purity curves. Chromatographic conditions: C₈ endcapped column (250×4 mm, 5 µm) 30°C, λ 238 nm, methanol:0.1% phosphoric acid (80:20 v/v), 1.5 mL/min, injection volume 10 µL. Dissolution conditions: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate pH 7 (900 mL, 37±0.5°C), paddles, 75 rpm, 45 min.	94
2.1 Perfis de dissolução de SV 20 mg (n=6) cápsulas manipuladas (lotes GK1981/1A, SI9225/1, AT3519/1), comprimidos disponíveis no SUS (AQ122) e referência (LLD034) empregados no ensaio clínico. Os perfis obtidos para os lotes GK1981/1A, AT3519/1 e SI9225/1 são representativos daquele(s) obtido(s) para GK1981/2, AT3526/1 e demais, respectivamente. Condições perfil dissolução: LSS 0,5% em fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7, 900 mL, 37 °C, pás, 50 rpm (comprimidos) ou 75 rpm (cápsulas), 45 min e 150 rpm, 60 min. Condições cromatográficas: C_{8e}, 30 °C, MeOH/ácido fosfórico 0,1% 80:20 v/v, 1,5 mL/min, UV λ 238 nm, 10 µL.	108
2.2 Resultados de comparação dos perfis de dissolução por meio das médias de %eficiência de dissolução (ED) para SV 20 mg cápsulas e comprimidos dos lotes (n=10) empregados no ensaio clínico, usando o teste Tukey.	110
2.3 Adesão dos 96 voluntários dos três grupos (n=32) durante o 1º mês, 2º mês e após tratamento completo (1º + 2º mês) com SV 20 mg (a) cápsulas, (b) comprimidos teste e (c) comprimidos referência.	117

LISTA DE TABELAS

1 Constituição das lipoproteínas plasmáticas.....	25
2 Propriedades farmacocinéticas das estatinas.....	34
3 Fármacos potenciais interferentes na metabolização das estatinas pelo CYP450^a.....	35
4 Alteração dos valores basais dos lípides plasmáticos com diferentes doses de sinvastatina.....	38
5 Alterações na bula de medicamentos contendo sinvastatina.....	38
6 Métodos analíticos referenciados para determinação de sinvastatina isoladamente ou associada.....	40
7 Condições experimentais obtidas por CLAE-UV para análise de SV isoladamente ou associada, de acordo com a literatura.....	41
1.1 Results of adjusted regression model ($R^2 > 0.9999$)^a for SIM determination in methanolic solutions (0.04-0.80 μg, n=3) by HPLC^b.....	55
1.2 Results of adjusted regression model ($R^2 > 0.999$)^a for SIM determination (2-34 $\mu\text{g/mL}$, n=3) in dissolution medium^b by HPLC^c.....	55
1.3 HPLC results^a of precision and recovery (%R) for SIM tablets in methanol.....	57
1.4 HPLC results^a of precision and recovery (%R) for SIM tablets in dissolution medium (900 mL, 37 °C, paddles, 50 rpm, 30 min).....	57
1.5 HPLC results of robustness for SIM tablets in methanol.....	58
1.6 HPLC results of robustness for SIM tablets in methanol and in dissolution medium.....	58
1.7 Short-term time stability (% response variation, by HPLC^a) results for SIM standard and capsule sample solutions prepared in methanol or in dissolution medium and maintained at different temperatures.....	69
1.8 Chromatographic system suitability for SIM standard in different diluents.....	69
1.9 Results of the adjusted regression model for SIM determination (n=3) in methanol by HPLC^a using C₈ and C₈ endcapped (250×4 mm, 5 μm) columns.....	70
1.10 HPLC^a validation results of precision, accuracy (unbiasedness) and robustness for 20 mg SIM capsules.....	71
1.11 Results of the adjusted regression model for the determination of SIM (n=3) in dissolution medium by HPLC using a C₈ column (see Table 1.7 for conditions).....	71
1.12 Dissolution test^a validation results of unbiased accuracy (recovery, R), precision and robustness for 20 mg SIM capsules by HPLC^b.....	72
1.13 Quality control tests results for three 20 mg compounded SIM capsules by HPLC-UV.....	73
1.14 Description of simvastatin 20 mg capsule batches acquired from thirty compounding pharmacies.....	90
1.15 HPLC precision and accuracy results for SIM 20 mg compounded capsules provided by the university pharmacy (chromatographic conditions, Figure 1.21).....	94
1.16 Statistical regression results by ANOVA for SIM assay/content uniformity and dissolution test by HPLC (chromatographic conditions, Figure 1.21).....	95
1.17 Quality control test results for thirty batches of simvastatin 20 mg compounded capsules (conditions, Figure 1.21).....	96
2.1 Materiais utilizados pelos voluntários, e necessários para a coleta de sangue.....	100

2.2	Relação dos reagentes e equipamentos utilizados no laboratório de análises clínicas para as dosagens bioquímicas.....	101
2.3	Critérios de inclusão e exclusão para seleção de voluntários em estudo de avaliação terapêutica de sinvastatina.	104
2.4	Resultados dos testes farmacopeicos para os medicamentos contendo sinvastatina 20 mg empregados no ensaio clínico.....	107
2.5	Resultados intercorrida (2 dias) de liberação média^a de SV 20 mg a partir de cápsulas manipuladas (lote GK2701/1), comprimidos similar (AQ122) e referência (LLD034) em estudos de dissolução^a, por CLAE^b.....	109
2.6	Resultados de eficiência de dissolução (%) obtidos a partir dos perfis de dissolução construídos de 0-45 min para SV 20 mg cápsulas e comprimidos (n=6) dos lotes (n=10) empregados no ensaio clínico.....	110
2.7	Características sócio-econômicas dos voluntários selecionados.	112
2.8	Resultados das dosagens bioquímicas de 32 voluntários em cada um dos tratamentos teste (a), (b) e referência (c) com SV 20 mg nos períodos t_0, t_4 e t_8 semanas.....	113
2.9	Dados da avaliação antropométrica dos 32 voluntários em cada grupo de tratamento com SV 20 mg (a) cápsulas, (b) comprimidos teste e (c) comprimidos referência realizada em t_0... 	116
2.10	Efeitos adversos relatados pelos voluntários após 8 semanas de tratamento com SV 20 mg cápsulas (teste) e comprimidos (teste e referência).....	117
2.11	Resultados das variações dos parâmetros bioquímicos dos voluntários nos grupos de tratamento teste (a), (b) e referência (c) com SV 20 mg nos intervalos t_{0-4} e t_{0-8}.	119

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABCA-1	<i>ATP binding cassette A1</i>
ACN	<i>Acetonitrile</i> ou acetonitrila
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> ou análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APO	Apolipoproteína
AST	Aspartato aminotransferase
AV	Atorvastatina
AW	<i>Average weight</i>
BHT	<i>Butylhydroxytoluene</i> ou butilhidroxitolueno
BP	<i>Bristish Pharmacopoeia</i> ou Farmacopeia Britânica
CC	Circunferência da cintura
CETP	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
CMC	<i>Carboxymethylcellulose</i>
CLAE	Cromatografia a Líquido de alta eficiência
CK	<i>Creatina kinase</i> ou creatina quinase
CT	Colesterol total
DAD	<i>Diode array detector</i> ou detector de arranjo de diodos
DPR	Desvio padrão relativo
ED	Eficiência de dissolução
EP	<i>European Pharmacopoeia</i> ou Farmacopeia Europeia
FP	Farmacopeia Portuguesa
FV	Fluvastatina
HDL	<i>High density lipoprotein</i> ou lipoproteína de alta densidade
HDLc	Colesterol presente em HDL
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A</i> ou 3-hidroxi-3-metilglutarilcoenzima A
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IDL	<i>Intermediary density lipoprotein</i> ou lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corporal

LA	<i>Labeled amount</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> ou lipoproteína de baixa densidade
LDLc	Colesterol presente em LDL
LDLcalc	LDL calculado
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOQ	<i>Limit of quantitation</i>
LOV/LV	<i>Lovastatin/lovastatina</i>
LSR	Limite superior de referência
LSS	Laurilsulfato de sódio
MS	<i>Mass spectrometry</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
PT	Pitavastatina
PV	Pravastatina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
REBLAS	Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RP	<i>Reversed-phase</i>
RS	<i>Reference standard</i>
RSD	<i>Relative standard deviation</i>
RV	Rosuvastatina
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
SIM/SV	<i>Simvastatin/sinvastatina</i>
SQT	Substância química de trabalho
SR-B1	Receptores classe B tipo 1
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicérides
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i> ou hormônio estimulante da tireóide
USP	<i>United States Pharmacopeia</i> ou Farmacopeia dos Estados Unidos
UV	<i>Ultraviolet</i> ou ultravioleta
VA	Valor de aceitação
var.	Varição
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> ou lipoproteína de muito baixa densidade

VLDLc	Colesterol presente em VLDL
A_s	<i>Peak asymmetry factor</i>
C_{18}	Coluna octadecilsilano não capeada
C_{18e}	Coluna octadecilsilano capeada
C_8	Coluna octilsilano não capeada ou <i>non-encapped octylsilane column</i>
C_{8e}	Coluna octilsilano capeada ou <i>encapped octylsilane column</i>
k	<i>Retention factor</i>
N	<i>Theoretical plates</i>
Q	<i>Percentage of the labeled content</i>
r	<i>Correlation coefficient</i>
R^2	<i>Determination coefficient</i>
T_f	<i>Tailing factor</i>
t_R	<i>Retention time</i>
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Metabolismo lipídico	24
2.2 Dislipidemias	26
2.2.1 Diagnóstico	27
2.2.2 Tratamento	28
2.3 Estatinas	32
2.3.1 Sinvastatina	36
2.4 Métodos analíticos para quantificação de sinvastatina em formas farmacêuticas	38
3 OBJETIVOS	44
3.1 Geral	44
3.2 Específicos	44
4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS	45
CAPÍTULO 1 Controle de qualidade de sinvastatina 20 mg comprimidos e cápsulas	
PARTE 1 SIMVASTATIN ASSAY AND DISSOLUTION STUDIES BY FEASIBLE RP-HPLC IN TABLETS	46
1 Introduction	46
2 Experimental	48
2.1 Chemicals and reagents	48
2.2 Instrumentation	48
2.3 Standard solution preparation	49
2.4 Sample solution preparation	49
2.5 Method validation	50
3 Results and discussion	52
4 Conclusion	60
PARTE 2 DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A RP-HPLC METHOD FOR SIMVASTATIN CAPSULES	61
1 Introduction	61
2 Material and methods	63
2.1 Chemical and reagents	64
2.2 Instrumentation	64

2.3 <u>Standard solution preparation</u>	65
2.4 <u>Sample solution preparation</u>	65
2.5 <u>Short-term stability study</u>	66
2.6 <u>System suitability</u>	66
2.7 <u>HPLC validation</u>	66
2.8 <u>Dissolution method validation</u>	67
3 Results	68
4 Discussion	73
5 Conclusion	77
PARTE 3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA EM ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS CONTENDO SINVASTATINA	78
1 Introdução	78
2 Material e métodos	80
2.1 <u>Material</u>	80
2.2 <u>Métodos</u>	80
3 Resultados e discussão	82
4 Conclusão	86
PARTE 4 QUALITY EVALUATION OF SIMVASTATIN COMPOUNDED CAPSULES	87
1 Introduction	87
2 Material and methods	89
2.1 <u>Material</u>	89
2.2 <u>Methods</u>	91
3 Results and discussion	93
3.1 <u>HPLC method validation</u>	93
3.2 <u>Pharmacopeial tests</u>	95
4 Final discussion	97
CAPÍTULO 2 Avaliação da eficácia de sinvastatina 20 mg comprimidos e cápsulas em relação aos comprimidos referência	
1 Material	100
2 Métodos	102
2.1 <u>Avaliação da qualidade dos medicamentos empregados no ensaio clínico</u>	102
2.2 <u>Seleção dos pacientes</u>	103
2.3 <u>Avaliação bioquímica</u>	104
2.4 <u>Acompanhamento do tratamento</u>	105

2.5 <u>Análise estatística</u>	106
3 Resultados e discussão	106
3.1 <u>Avaliação da qualidade dos medicamentos empregados no ensaio clínico</u>	106
3.2 <u>Perfil da amostra selecionada</u>	110
3.3 <u>Avaliação bioquímica</u>	111
3.4 <u>Acompanhamento do tratamento</u>	115
3.5 <u>Análise estatística</u>	118
5 CONCLUSÃO GERAL	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
APÊNDICE	
A Monografias	138
B Termo de consentimento livre e esclarecido	145
C Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	147
D Questionário-orientado	148
E Guia de agendamento e orientações	150

1 INTRODUÇÃO

A hiperlipidemia, elevação da concentração de lípides no plasma, é a manifestação de um distúrbio na síntese e/ou degradação de lipoproteínas plasmáticas. Os lípides relevantes na hiperlipidemia são o colesterol total (CT) e frações e os triglicérides (TG) (HARDMAN & LIMBIRD, 2006). Níveis de colesterol acima do ideal caracterizam a hipercolesterolemia e estão associados a condições patológicas como aterosclerose e suas complicações como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. A hipertrigliceridemia, caracterizada por níveis elevados de TG, têm sido associada independentemente a risco aumentado para doença cardiovascular (YUAN *et al.*, 2007). A hiperlipidemia e os níveis reduzidos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) ocorrem em consequência de vários fatores que afetam as concentrações das lipoproteínas plasmáticas, como, genético (mutação em genes relacionados a lipoproteínas ou a seus receptores), metabólico (diabetes mellitus) ou estilo de vida (dieta, atividade física) (HARDMAN & LIMBIRD, 2006).

No terceiro relatório do *National Cholesterol Education Program* (NCEP, 2002), o programa nacional de educação em colesterol dos Estados Unidos, estabeleceu-se com base em numerosos estudos experimentais, epidemiológicos e ensaios clínicos, que a elevação dos níveis plasmáticos de lipoproteína de baixa densidade (LDLc), a redução dos níveis de HDLc e o aumento de TG são fatores de risco para eventos cardiovasculares, os quais têm sido a principal causa de morte no Brasil (33%) (SCHMIDT *et al.*, 2011) e no mundo (WORLD, 2011). Vários ensaios clínicos, tanto de prevenção primária quanto secundária, demonstraram que a redução do LDLc diminui o risco de eventos cardiovasculares, como por exemplo, doença isquêmica do coração, em 27-59% e o risco de morte, em média 30% (JELLINGER *et al.*, 2012).

A redução do risco pode ser atingida pela mudança no estilo de vida que requer associação de procedimentos dietéticos a prática de atividade física e eliminação do tabagismo. Quando a mudança do estilo de vida não é suficiente para um controle desejável dos níveis de colesterol, adicionam-se à terapia fármacos hipolipemiantes, como as estatinas que constituem a melhor estratégia para reduzir o colesterol LDL (HOU & GOLDBERG, 2009; KAPUR & MUSUNURU, 2008).

As estatinas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima essencial na biossíntese do colesterol. Atualmente, estão disponíveis sete fármacos desta classe: lovastatina (LV), sinvastatina (SV), pravastatina (PV), fluvastatina (FV), atorvastatina (AV), rosuvastatina (RV) e pitavastatina (PT), esta última ainda não é mundialmente comercializada. Os fármacos AV, FV, RV e PT são totalmente sintéticos (CAMPO & CARVALHO, 2007; SAITO, 2011). LV e PV são estatinas naturais obtidas por fermentação a partir de *Aspergillus terreus* e da biotransformação da mevastatina (obtida por fermentação a partir de *Penicillium citrinum*) por *Streptomyces carbophilus*, respectivamente. A SV, por sua vez, é um análogo da LV obtida por processo semissintético (BARRIOS-GONZÁLEZ & MIRANDA, 2010; CAMPO & CARVALHO, 2007). Diferente das demais estatinas, SV e LV são pró-fármacos administrados sob a forma lactona que se converte *in vivo* ao correspondente β -hidroxiácido por ação de esterases (CAMPO & CARVALHO, 2007). As doses recomendadas para as estatinas são 1-4 mg de PT, 5-40 mg de RV, 5-80 mg de SV, 10-80 mg de AV, LV e PV; 20-80 mg de FV. A dose SV 80 mg tem sido recomendada apenas para pacientes em uso desta terapia por mais de 1 ano, sem manifestação de miopatia (FOOD, 2011; JELLINGER *et al.*, 2012; SEARCH, 2010).

As estatinas constituem uma terapia de primeira linha para controle dos níveis de colesterol plasmáticos por proporcionar redução de 21-55% em LDLc, acrescida em média de 6% com a duplicação das doses; redução de 6-30% em TG e elevação de 2-10% em HDLc. Desta forma, estes fármacos reduzem a mortalidade por eventos cardiovasculares e a incidência de eventos isquêmicos coronários agudos, além de diminuir a necessidade de revascularização do miocárdio e, o acidente vascular cerebral (JELLINGER *et al.*, 2012; SOCIEDADE, 2007).

Devido à sua grande importância na redução da mortalidade e da morbidade por doenças cardiovasculares no sistema público de saúde, as estatinas SV (20 mg) e AV (10 mg) foram integradas a terceira edição da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) definida pela Política Nacional de Medicamentos no Brasil, e seus comprimidos eram disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2002). Porém, pelo fato da melhor relação custo-efetividade em relação à AV, e da ausência de formas farmacêuticas genéricas de AV no mercado nacional, apenas as apresentações de comprimidos SV 10 mg e 40 mg foram mantidas em sua edição subsequente (BRASIL, 2007b). Nas sexta e

sétima edições da RENAME, a SV foi padronizada nas apresentações contendo 10 e 40 mg (BRASIL, 2009b), mas só na sétima edição foi incluída a apresentação 20 mg por comprimido (BRASIL, 2010c). Atualmente, a última edição da RENAME é composta por três anexos referentes a lista de medicamentos dos componentes básico, estratégico e especializado da assistência farmacêutica (BRASIL, 2012). Das estatinas, apenas a SV integra a lista do componente básico justificado por sua melhor relação custo-efetividade na prevenção secundária de eventos cardiovasculares no SUS comparativamente à AV (ARAÚJO *et al.*, 2011). As demais estatinas AV (10, 20, 40 e 80 mg), FV (20 e 40 mg), LV e PV (10, 20 e 40 mg) integram a lista de medicamentos do componente especializado.

Além disso, as estatinas SV, LV, PV e, recentemente a AV após expiração da sua patente (JELLINGER *et al.*, 2012), também estão disponíveis no comércio nacional na forma de cápsulas, comumente obtidas em farmácias magistrais, onde aviam-se prescrições com doses diferentes, individualizadas, ou iguais às das especialidades farmacêuticas a menor custo, conforme a orientação do médico prescritor (BRASIL, 2007a).

Independente da forma farmacêutica, a produção dos comprimidos e a manipulação das cápsulas com qualidade, segurança e eficácia comprovadas, requerem o cumprimento de resoluções regulamentadoras. Desta forma, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 17/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe do guia de boas práticas de fabricação de medicamentos (BRASIL, 2010a) deve ser cumprida nas indústrias, e, a RDC 67/2007 e sua atualização (RDC 87/2008) vigoram para as farmácias magistrais (BRASIL, 2007a, 2008).

A SV, estatina consumida por grande parcela da população brasileira usuária da rede de saúde pública SUS, tem como referência disponível no comércio o medicamento sob a denominação Zocor[®] (apresentações de SV 10, 20, 40 ou 80 mg por comprimido) que é fabricado e registrado por Merck Sharp & Dohme. Em sua formulação qualitativa constam os seguintes excipientes: ácido ascórbico, ácido cítrico, amido, butilhidroxianisol, celulose microcristalina, dióxido de titânio, estearato de magnésio, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, lactose, óxidos férricos amarelo e vermelho, talco (THE PHYSICIANS, 2000). Os medicamentos genéricos e similares, bem como as cápsulas, podem apresentar formulações com diferentes

composições (qualitativa/quantitativa) de excipientes, principalmente no caso de cápsulas quando preparadas em uma ou outra farmácia.

Os medicamentos (referência, similar ou genérico) disponibilizados no SUS são adquiridos pelos órgãos públicos de saúde vinculados ao Ministério da Saúde, mediante processo licitatório em que cada proposta deve ser acompanhada dentre outros documentos, do respectivo certificado de análise emitido pelo fabricante/detentor do registro e/ou laboratório credenciado pela Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)/ANVISA (BRASIL, 1999b), que ateste a sua qualidade físico-química (BRASIL, 2006c) de acordo com referências oficialmente reconhecidas, como as Farmacopeias Brasileira, da Alemanha, Argentina, Britânica (BP), dos Estados Unidos (USP), dos Estados Unidos Mexicanos, Européia (EP), Francesa, Internacional, Japonesa e Portuguesa (FP) (BRASIL, 2009a).

Os ensaios atualmente exigidos pela ANVISA (BRASIL, 2006a) para medicamentos similares e genéricos são: análises de equivalência farmacêutica, que consistem de métodos farmacopeicos físico-químicos ou microbiológicos, aplicados a medicamentos e o perfil de comparação de dissolução (BRASIL, 2010b) além de biodisponibilidade relativa (similares) ou de bioequivalência (genéricos). Estes últimos consistem de métodos físico-químicos aplicáveis a matrizes biológicas provenientes de pacientes após ingestão do medicamento. Tais análises são de alto custo e exigem equipamentos sofisticados e pessoal qualificado, acessíveis somente a empresas de grande porte como indústrias e laboratórios.

Devido à sua característica de fabricação individualizada sob demanda, na rotina, nem todos os lotes de cápsulas manipuladas são submetidos a todas as análises para avaliação da qualidade. Os testes físico-químicos como doseamento, uniformidade de conteúdo e dissolução requerem maior investimento em equipamentos e pessoal capacitado, e, quando executados, são realizados por laboratórios analíticos terceirizados (BRASIL, 2007a), preferencialmente integrantes da REBLAS (BRASIL, 2008).

Como não existem ainda especificações farmacopeicas ou método oficial para avaliar a qualidade da forma farmacêutica SV cápsula, a sua análise requer o estabelecimento de métodos e especificações tendo em vista os diferentes excipientes empregados nas formulações de cápsulas. Por causa da conhecida interferência dos excipientes nas medidas espectrofotométricas, métodos por

cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) são mais adequados devido à separação prévia do fármaco que possibilita uma quantificação seletiva. O método a ser utilizado para quantificação de SV em cápsulas deve ser validado de modo a garantir a confiabilidade e reprodutividade dos resultados (BRITISH, 2011a,b; THE UNITED, 2012a).

Na literatura científica não foram encontrados trabalhos referentes à eficácia terapêutica de SV cápsulas manipuladas ou comprimidos (similares ou genéricos) ofertados aos usuários do SUS, em relação aos comprimidos referência Zocor®. Portanto, faz-se necessário avaliar não somente a qualidade físico-química de SV cápsulas manipuladas e comprimidos disponíveis no SUS, mediante a otimização de método analítico e o estabelecimento de especificações, mas também, analisar a eficácia terapêutica destes tratamentos por comparação com os comprimidos referência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

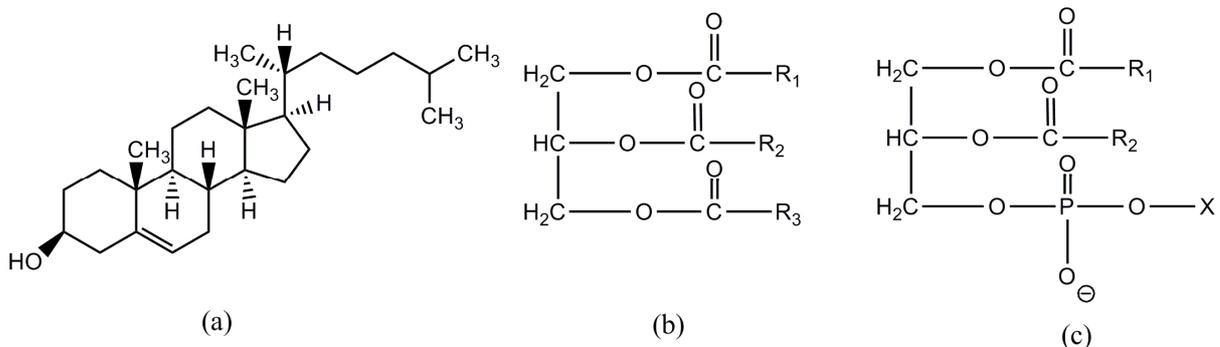
2.1 Metabolismo lipídico

Os principais lípides plasmáticos são colesterol, TGs, ácidos graxos (saturados, mono ou poli-insaturados) e os fosfolípides (**Figura 1**).

O colesterol é precursor dos hormônios esteróides, ácidos biliares e vitamina D e, como os fosfolípidos, são importantes constituintes das membranas celulares. Os TGs, juntamente com os ácidos graxos, desempenham papel importante no fornecimento de energia e em seu armazenamento tecidual.

Devido a sua natureza hidrofóbica, colesterol e TGs requerem transportadores, denominados lipoproteínas, para que se tornem solúveis e sejam conduzidos no sangue.

Figura 1 - Estrutura química representativa de (a) colesterol, (b) triglicérides constituídos por glicerol e diferentes ácidos graxos (R_1 , R_2 , R_3) e (c) fosfolípidos constituídos por glicerol, ácidos graxos (R_1 , R_2) e colina, lecitina, etc. (X).



As lipoproteínas são constituídas por lípidos (colesterol livre, éster de colesterol, fosfolípidos, TG) e proteínas (apolipoproteínas, APOs), que desempenham funções importantes tais como formação intracelular das lipoproteínas (APOB-48, APOB-100), ligação a receptores de membrana (APOB-100, APOE) e ação como co-fatores enzimáticos (APOA-I, APOA-V, APOC-I, APOC-II, APOC-III). Existem quatro classes principais de lipoproteínas separadas em dois grupos, a saber, as ricas em TGs que são maiores e menos densas, representadas por quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein*, VLDL) e as ricas em colesterol representadas por LDL (*low density*

lipoprotein) e HDL (*high density lipoprotein*). Existe ainda uma subclasse de lipoproteínas de densidade intermediária (*intermediary density lipoprotein*, IDL) e também a lipoproteína(a) que resulta da ligação covalente da APO(a) à LDL (SOCIEDADE, 2007). A constituição e a densidade das lipoproteínas plasmáticas são apresentadas (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Constituição das lipoproteínas plasmáticas.

Lipoproteína (densidade, g/mL)	Composição do núcleo (%)		Composição da superfície (%)		
	TG ^a	EC ^b	FLs ^c	Col ^d	Proteínas (APOs ^e)
Quilomícrons ^f (0,93)	85	3	7	2	2 (B-48, A-I, C-II, E)
VLDL ^g (0,93 a 1,006)	60	10	15	7	8 (B-100, C-II, E)
LDL ^h (1,019 a 1,063)	5	40	20	10	25 (B-100, C-II)
HDL ⁱ (1,063 a 1,21)	5	10	15	20	50 (A-I, A-II, E)

Adaptado de SCHAEFER, 2010 e GRIFFIN, 2009. a: TG, triglicérides, b: EC, éster de colesterol; c: FLs, fosfolípidos, d: Col, colesterol; e: APOs, apolipoproteínas; f: núcleo composto por vitaminas A,D,E e K; g: VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa; h: LDL, lipoproteína de baixa densidade; i: HDL, lipoproteína de alta densidade.

Os quilomícrons, sintetizados no intestino, têm a APOB-48 como principal proteína sendo que posteriormente durante o trânsito linfático são incorporadas a sua superfície APOA-I (ativa a lecitina-colesterol aciltransferase), APOA-IV, APOC-I, APOC-II (ativam a lipoproteína lipase) e APOC-III (inibe a lipólise). Uma vez removida a maioria dos TGs dos quilomícrons por hidrólise pela lipoproteína lipase ativada pela APOC-II, os quilomícrons incorporam éster de colesterol das HDLs mediante troca por TGs, via ação da proteína de transferência de éster de colesterol (*cholesteryl ester transfer protein*, CETP) e também ocorre troca das APOA-I, APOA-IV e APOC por APOE das HDL. Nesta etapa, estas partículas tornam-se então quilomícrons remanescentes, ricos em APOB-48 e APOE; os quais sofrem captura pelo fígado mediante ligação da APOE aos receptores hepáticos (GRIFFIN, 2009; HEGELE & POLLEX, 2009; SCHAEFER, 2010).

A VLDL, sintetizada no fígado e as LDL e IDL, sintetizadas na corrente sanguínea a partir de VLDL, são compostas por APOB-100. O conteúdo de colesterol hepático é regulado principalmente pelos mecanismos de síntese intracelular; armazenamento pós-esterificação e excreção pela bile. As VLDLs apresentam além da APOB-100 as APOC-I, APOC-II, APOC-III. Semelhantemente ao que ocorre aos quilomícrons, as VLDLs perdem TGs via ativação da lipoproteína

lipase pela APOC-II, trocam TGs por éster de colesterol das HDLs via proteína de transferência de éster de colesterol e incorporam APOE, de modo a serem removidas da circulação pelos receptores para LDL no fígado, ou ainda podem se converter em IDLs para logo em seguida se tornarem LDLs. No período pós-prandial a conversão de VLDL a LDL ocorre em 4-5 h. No plasma normal, LDL corresponde a 60-70% do CT e 80-90% da APOB total, sua permanência no plasma é de cerca de 3,5 dias sofrendo captação pelos receptores de LDL teciduais. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da HMG-CoA redutase, enzima chave na síntese intracelular do colesterol hepático. As LDLs podem ser maiores e menos densas (1,019-1,040 g/mL) ou pequenas e densas (1,041-1,063 g/mL), estas últimas são mais aterogênicas (GRIFFIN, 2009; SCHAEFER, 2010).

As HDLs, sintetizadas no fígado e intestino, têm a APOA-I como principal apolipoproteína. A APOA-I desempenha importante função como mediador no transporte do colesterol captado pelas HDLs a partir das membranas celulares dos tecidos periféricos até o fígado (transporte reverso). Este transporte reverso requer a ação de proteínas transmembrana que utilizam a energia de hidrólise do ATP designadas complexo ABCA-1 (*ATP binding cassette A1*) e a ativação da lecitina-colesterol aciltransferase pela APOA-I, para captação e esterificação do colesterol, respectivamente. O processo de esterificação é fundamental para estabilização e transporte plasmático do colesterol no centro das HDLs até o fígado, onde, então o colesterol é captado pelos receptores classe B tipo 1 denominados SR-B1. Ações das HDLs contribuem para proteção do leito vascular tais como remoção de lípidos oxidados das LDLs, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulação da liberação de óxido nítrico (GRIFFIN, 2009; SOCIEDADE, 2007).

2.2 Dislipidemias

O acúmulo de quilomícrons e/ou de VLDL no plasma resulta em hipertrigliceridemia e decorre da diminuição da hidrólise dos TGs destas lipoproteínas pela lipoproteína lipase ou do aumento da síntese de VLDL. Variantes genéticas das enzimas ou APOs relacionadas a estas lipoproteínas podem causar

ambas alterações metabólicas, aumento de síntese ou redução da hidrólise (SOCIEDADE, 2007).

O acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol como a LDL no plasma resulta em hipercolesterolemia. Este acúmulo pode ocorrer por doenças monogênicas, em particular, por defeito no gene do receptor de LDL ou no gene da APOB-100. Centenas de mutações do receptor de LDL foram detectadas em portadores de hipercolesterolemia familiar, algumas causando redução de sua expressão na membrana, outras, deformações na sua estrutura e função. Mutações no gene que codifica a APOB-100 pode também causar hipercolesterolemia através da deficiência no acoplamento da LDL ao receptor celular. Mais comumente, a hipercolesterolemia resulta de mutações em múltiplos genes envolvidos no metabolismo lipídico, as hipercolesterolemias poligênicas. Nestes casos, a interação entre fatores genéticos e ambientais determina o fenótipo do perfil lipídico (SOCIEDADE, 2007).

As dislipidemias primárias ou sem causa aparente podem ser classificadas genotipicamente ou fenotipicamente através de análises bioquímicas. Na classificação genotípica, as dislipidemias se dividem em monogênicas, causadas por mutações em um só gene, e poligênicas, causadas por associações de múltiplas mutações que isoladamente não seriam de grande repercussão. A classificação fenotípica considera os valores do CT, LDLc, TG e HDLc. Compreende quatro tipos principais bem definidos: a) hipercolesterolemia isolada (elevação somente do LDLc ≥ 160 mg/dL), b) hipertrigliceridemia isolada (elevação somente dos TG ≥ 150 mg/dL), que reflete o aumento do volume de partículas ricas em TG como VLDL, IDL e quilomícrons, c) hiperlipidemia mista (valores aumentados de ambos LDLc ≥ 160 mg/dL e TG ≥ 150 mg/dL), d) HDL baixo (homens < 40 mg/dL e mulheres < 50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDLc ou de TG (JELLINGER *et al.*, 2012; SOCIEDADE, 2007).

2.2.1 Diagnóstico

O perfil lipídico se constitui por determinações bioquímicas dos TG, CT e frações (HDLc, LDLc e VLDLc) após jejum (12 a 14 h) em indivíduos com dieta habitual, abstinência de álcool (72 h) e de atividade física vigorosa (24 h). LDLc pode ser calculado (LDLcalc) pela equação $LDLc = CT - HDLc - VLDLc$ (FRIEDEWALD *et al.*,

1972), sendo $VLDLc = TG/5$. Esta equação é adequada à maioria dos pacientes, sendo empregada rotineiramente, contudo não se aplica a pacientes com hipertrigliceridemia ($TG >400$ mg/dL), hiperquilomicronemia, hepatopatia colestática crônica, diabetes mellitus ou síndrome nefrótica, disbetalipoproteinemia, ausência de jejum, circunstâncias em que a equação é imprecisa.

A determinação das APOA-I e APOB com fins diagnósticos ainda é limitada na prática dado o custo elevado e a ausência de informação adicional clinicamente relevante na maioria dos indivíduos. Por sua vez, a determinação da fração não-HDL colesterol cuja finalidade é identificar o conteúdo de lipoproteínas aterogênicas (IDL, VLDL, LDL) circulantes no plasma de indivíduos com hipertrigliceridemia, é indispensável somente nos casos graves ($TG >400$ mg/dL), quando não é possível o cálculo do LDLc pela equação de Friedewald (JELLINGER *et al.*, 2012; SOCIEDADE, 2007).

2.2.2 Tratamento

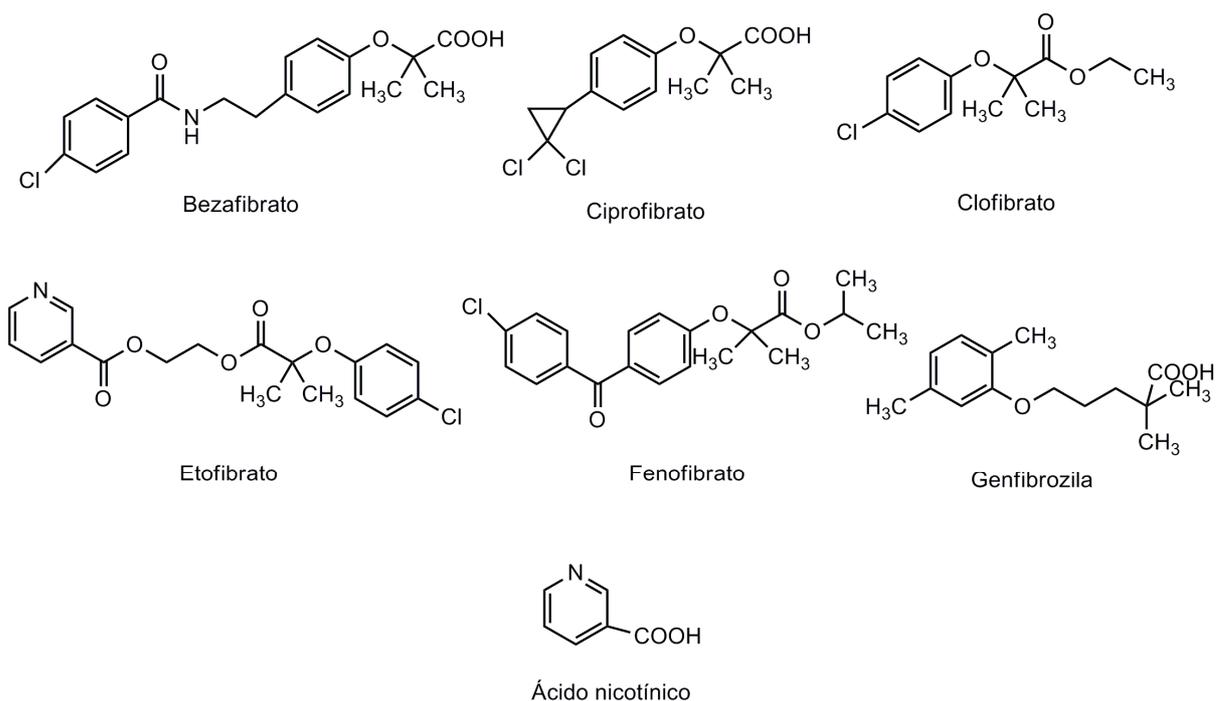
O tratamento das dislipidemias requer desde mudança do estilo de vida (dieta, atividade física, eliminação do tabagismo) até o emprego de fármacos hipolipemiantes. O tipo de tratamento a ser inicialmente instituído depende da classificação do risco cardíaco do paciente considerando idade em anos (homem ≥ 45 , mulher ≥ 55), gênero, hipertensão ($\geq 140/90$ mmHg ou uso de medicação), história familiar de doença coronariana prematura (homem < 55 anos, mulher < 65 anos, em parentesco de 1º grau), baixos níveis de HDL (< 40 mg/dL) e hábito de fumar. Níveis de HDL ≥ 60 mg/dL são considerados fator de proteção. Pacientes considerados de risco baixo e intermediário são submetidos, a princípio, à terapia não farmacológica por 6 e 3 meses, respectivamente, e só então se necessário, à terapia farmacológica; ao contrário, ambas as terapias são indicadas simultaneamente aos pacientes de alto risco (HOU & GOLDBERG, 2009; JELLINGER *et al.*, 2012; SOCIEDADE, 2007).

O tipo de tratamento farmacológico depende da dislipidemia presente, quando há hipertrigliceridemia isolada ($TG > 500$ mg/dL) ou esta é predominante na dislipidemia mista; os fármacos indicados são inicialmente os fibratos, e como segunda escolha o ácido nicotínico ou a associação de ambos. Os fibratos (**Figura 2**) são derivados do ácido fíbrico (ex.: bezafibrato, ciprofibrato, clofibrato,

etofibrato, fenofibrato, genfibrozila) que reduzem os TGs em 30-60% e aumentam o HDL em 5-15% por estímulo dos receptores α ativados de proliferação dos peroxissomas. Este estímulo aumenta a atividade da lipoproteína lipase, diminui a produção hepática de APOC-III e induz a expressão das APOA-I e APOA-II. Efeitos colaterais graves que requeiram a interrupção do tratamento são infreqüentes, podem ocorrer distúrbios gastrintestinais, mialgia, astenia, litíase biliar, diminuição de libido, erupção cutânea, prurido, cefaleia, perturbação do sono. O aumento de enzimas hepáticas e/ou creatina quinase (creatine kinase, CK) é raro e reversível com a interrupção do tratamento.

O ácido nicotínico (**Figura 2**), também denominado niacina ou vitamina B₃, inibe a lipoproteína lipase nos adipócitos, reduz assim a liberação de ácidos graxos livres dos adipócitos para a corrente sanguínea e conseqüentemente diminui a síntese de TG nos hepatócitos em 20-50%; além disso, reduz o LDLc em até 25% por diminuição da produção e liberação hepática de VLDL e aumenta o HDLc em até 35%. Recomenda-se a dose inicial 0,5 g com aumento gradual até 2 g diários. A causa mais comum de inobservância ao tratamento são as manifestações cutâneas rubor facial e prurido (BRAUTBAR & BALLANTYNE, 2011; JELLINGER *et al.*, 2012; MAKI *et al.*, 2012; SOCIEDADE, 2007).

Figura 2 - Estruturas químicas dos principais fármacos empregados no tratamento da hipertrigliceridemia.



Quando há hipercolesterolemia isolada ou dislipidemia mista, as estatinas ou vastatinas são os fármacos de escolha. A forma ativa das estatinas é caracterizada pelo grupo farmacofórico ácido 3,5-dihidroxisalicílico ou seu sal (**Figura 3**), responsável pela ligação reversível a HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a conversão do HMG-CoA a mevalonato (**Figura 4**), em uma etapa inicial e limitante da biossíntese do colesterol (CAMPO & CARVALHO, 2007). Estes fármacos podem ser administrados em associação a ezetimiba, colestiramina, fibratos e ácido nicotínico.

Figura 3 - Estruturas químicas das estatinas (ou sal correspondente) empregadas para o tratamento de hipercolesterolemia. Grupo farmacofórico evidente.

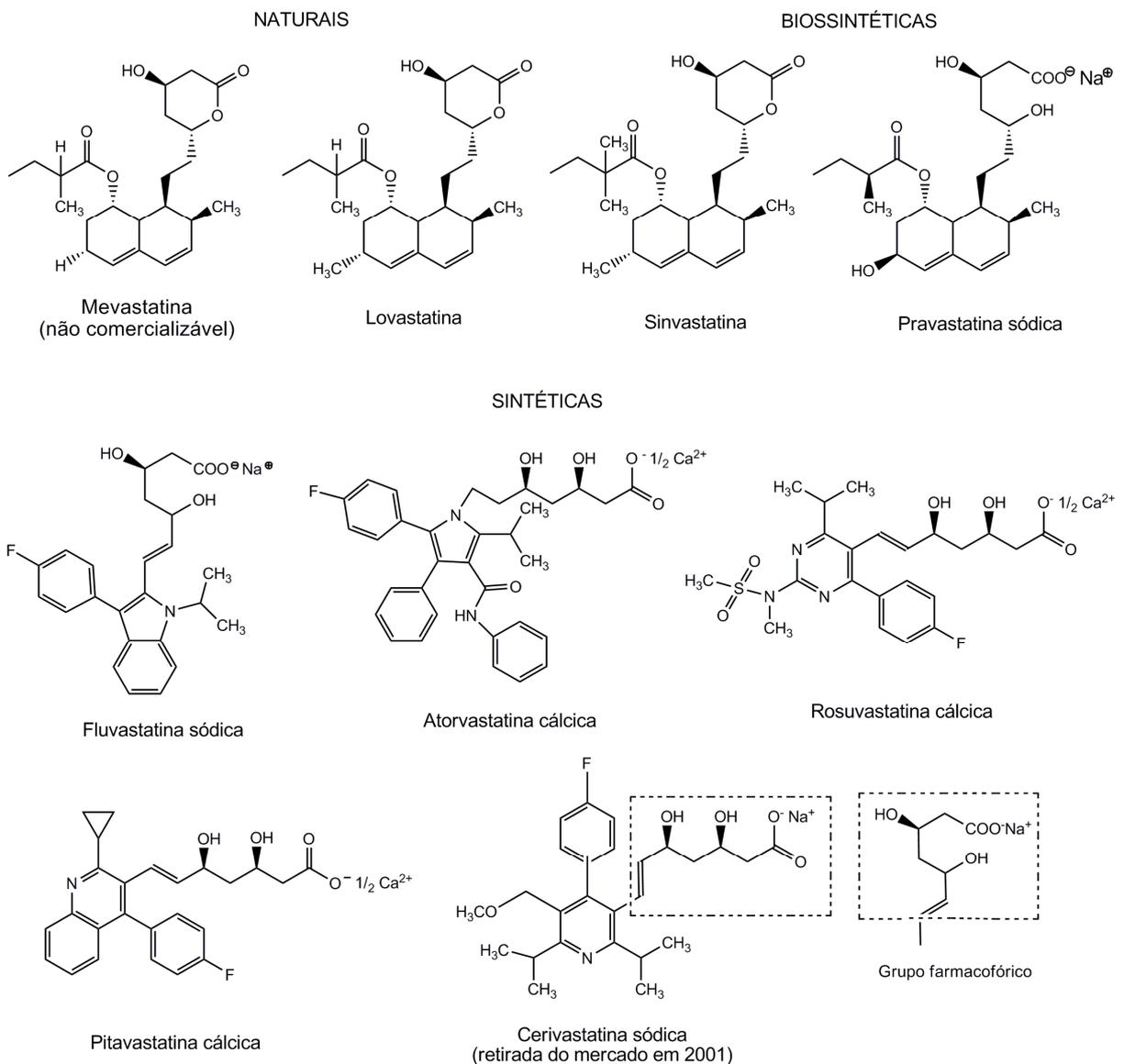
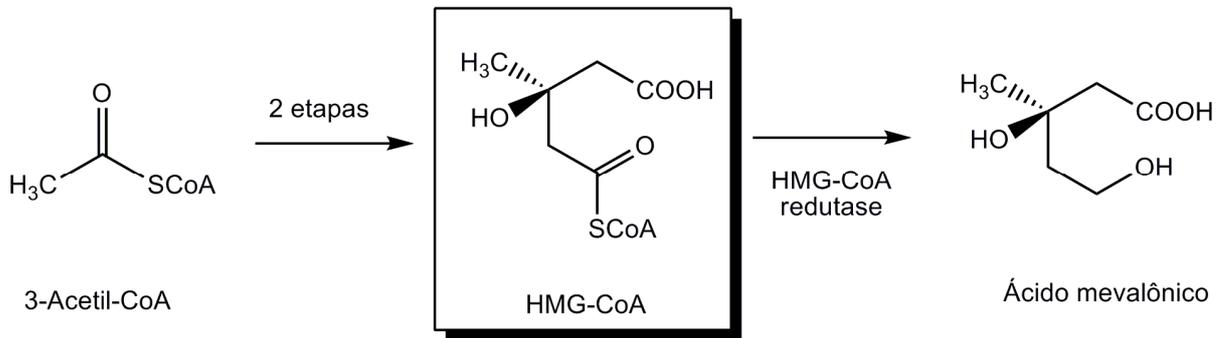


Figura 4 - Formação do ácido mevalônico a partir de acetil CoA, etapa envolvida na biossíntese do colesterol.



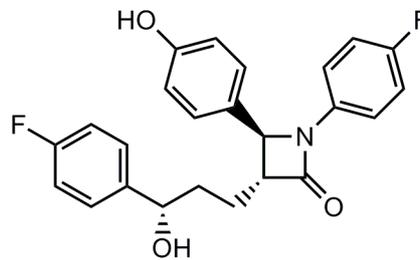
Em geral, as estatinas são bem toleradas e os efeitos adversos estão correlacionados a dose administrada. Os efeitos adversos mais comuns, como dor abdominal, constipação, flatulência, náusea, cefaleia, diarreia e fadiga, são pouco frequentes, ocorrendo em cerca de 5% dos pacientes; exceto a mialgia (dor muscular sem elevação dos níveis séricos de CK) que pode ocorrer em 15,4% dos pacientes. A elevação da CK é relatada em cerca de 1% dos pacientes. A miopatia com rabdomiólise (lise da célula muscular esquelética), caracterizada por dores musculares, fraqueza e elevação de CK igual ou maior a 10 vezes o limite superior de referência (LSR), ocorre em 0,2% dos pacientes, provavelmente com insuficiência renal, idade avançada, doença aguda coexistente ou em uso de muitos fármacos (HOU & GOLDBERG, 2009; JELLINGER *et al.*, 2012).

Aumento de alanina aminotransferase (ALT) e/ou aspartato aminotransferase (AST) superior a três vezes o LSR ocorre em 1,4% dos pacientes e geralmente diminui com a redução da dose ou mesmo quando os pacientes continuam o tratamento. Precaução deve ser tomada quanto ao uso de estatinas por pacientes que apresentem infecção hepática ativa ou doença hepática grave (HOU & GOLDBERG, 2009; JELLINGER *et al.*, 2012). Como a lesão hepática grave decorrente do uso de estatinas é rara e imprevisível em pacientes individuais, a dosagem das enzimas hepáticas é recomendada antes de iniciar a terapia hipolipemiante e, posteriormente, quando clinicamente indicado, sem a necessidade do monitoramento periódico. Recentemente, tem-se advertido sobre o potencial não grave e reversível de declínio cognitivo (confusão, amnésia, esquecimento, deterioração da memória) e diabetes mellitus devido ao aumento da hemoglobina

glicosilada (HbA1c) e dos níveis séricos de glicose em jejum (FOOD, 2012; JUKEMA *et al.*; 2012).

As estatinas podem ser empregadas com 10 mg/dia de ezetimiba (**Figura 5**), fármaco inibidor da ação da proteína transportadora do colesterol presente na borda em escova dos enterócitos que, isoladamente, reduz o LDL em cerca de 10-25%. Efeitos adversos incluem diarreia e, possivelmente, mialgias. Os relatos de angioedema e reações alérgicas são raros.

Figura 5 - Estrutura química de ezetimiba, inibidor da proteína transportadora do colesterol nos enterócitos.



As estatinas também podem ser empregadas associadas a fármacos sequestradores de ácidos biliares (colestiramina, colestipol, colesevelam) que reduzem a absorção intestinal de sais biliares, e conseqüentemente, diminuem o colesterol intracelular nos hepatócitos, disponibilizando maior número de receptores de LDL o que leva a maior remoção de LDL da circulação o qual tem seus valores basais reduzidos em média 20% (5-30%). Desta forma, aumentam a síntese hepática de colesterol, elevando a secreção de VLDL na circulação e limitando o efeito inicial de redução em LDL. Os principais efeitos colaterais são constipação (25% dos pacientes), náusea, flatulência, dor abdominal, plenitude gástrica, exacerbação de hemorróidas pré-existentes. Existe preocupação com relação à absorção de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), mas raros casos de deficiência de vitamina K e hemorragia foram relatados (HOU & GOLDBERG, 2009; JELLINGER *et al.*, 2012; SOCIEDADE, 2007).

2.3 Estatinas

A primeira estatina descoberta foi a mevastatina (ML-236B), em 1976, quando Endo e colaboradores isolaram-na como produto secundário de cepa de *Penicillium*

citrinum e, praticamente ao mesmo tempo, em 1978, Brown e colaboradores isolaram-na de uma cepa de *Penicillium brevicompactum*, no laboratório Beecham durante pesquisa sobre metabólitos antifúngicos e denominaram-na compactina. Posteriormente, a LV (MB-530B, Mevacor®, Merck Sharp & Dohme) foi isolada de culturas de *Aspergillus terreus* por Alberts e colaboradores, em 1980, nos Laboratórios CIBE em Madri (Espanha) e de culturas de *Monascus ruber* M1005 por Endo, em 1979, sob as denominações mevinolina e monacolina K, respectivamente. Em 1981, SV (MK-733, Zocor®, Merck Sharp & Dohme) foi sintetizada a partir da LV e denominada sinvinolina. A produção de PV (CS-514, Pravachol®, Bristol-Myers Squibb), então obtida por Sankyo e Squibb por meio de biotransformação da mevastatina por *Streptomyces carbophilus*, foi aprovada em 1989 (BARRIOS-GONZÁLEZ & MIRANDA, 2010; ENDO, 2004a; TOBERT, 2003).

FV (XU 62-320, Lescol®, Novartis), derivado mevalonolactona de anel indólico fluoro-fenil substituído, foi a primeira estatina inteiramente sintética produzida na forma racêmica. Em seguida, estatinas sintéticas enantiomericamente puras surgiram, AV (CI-981, Lipitor®, Parke-Davis) derivada do pirrol e cerivastatina ou rivastatina (BAY w6228, Baycol® e Lipobay®, Bayer) derivada da piridina. A penúltima estatina sintética, RV (ZD4522, Crestor®) derivado pirimidina altamente purificado foi desenvolvida por Shionogi & Co no Japão e licenciada a AstraZeneca. A última estatina sintética PT (NK-104, LIValo®), inicialmente denominada itavastatina ou nisvastatina, foi desenvolvida por Kowa Company Ltd no Japão (McTAGGART *et al.*, 2001; SASAKI, 2010; TOBERT, 2003).

A mevastatina não se tornou comercializável, pois seu estudo foi abandonado devido a problemas de tumores intestinais em cachorros. As estatinas aprovadas para uso terapêutico foram LV (1987), SV (na Suécia em 1988 e mundialmente nos anos 90), PV (1991), FV (1994), AV (1996), cerivastatina (1997), RV (2003) e PT (2003 no Japão, 2005 na Coreia, 2008 na Tailândia, 2009 na China, 2010 nos Estados Unidos da América, 2011 no Líbano). Contudo, cerivastatina foi retirada do mercado em 8 de agosto de 2001 devido a relatos de rabdomiólise fatal, observada com altas doses especialmente combinada com genfibrozila (ENDO, 2004b; McTAGGART *et al.*, 2001; SAITO, 2011; TOBERT, 2003).

Dados de farmacocinética e de possíveis interações farmacológicas das estatinas são apresentados na **Tabela 2** e **Tabela 3**, respectivamente.

Tabela 2 - Propriedades farmacocinéticas das estatinas.

Estatinas ^a	AV	CV	FL	LV	PT	PV	RV	SV
Massa molecular (g/mol)	1209	482	433,5	405	881	446,5	1001	418,5
Solubilidade	lipofílica	lipofílica	lipofílica	lipofílica	lipofílica	hidrofílica	hidrofílica	lipofílica
Melhor período para administração	qualquer hora	noite	ao deitar	refeições manhã e noite	NI ^b	ao deitar	qualquer hora	noite
Absorção (%)	30	>98	98	31	80	37	50	65-85
Excreção hepática (%)	>70	NA ^c	68	>70	NA ^c	66	90	78-87
Biodisponibilidade (%)	12	60	10-35	<5	>60	17	20	<5
Efeito dos alimentos na biodisponibilidade (%)	-13	+23	-(15-25)	+50	Não	-30	Não	Não
Ligação a proteínas (%)	>98	>99,5	>98	96-98,5	96	43-54	88	>95 ^d
T _{máx} (h)	2-4	2,5-3	0,5-1,5	2,8	0,5-0,8	0,9-1,6	3	1,3-2,4
Meia-vida eliminação (h)	11-30	2,0-3,0	0,5-2,3	2,5-3,0	11	0,8-3,0	20	1,9 ^e -3,0
Excreção renal (%)	2	24	6	30	<2	60	10	13
Concentração inibitória 50% (nmol/l)	15,2	13,1	17,9	2,7-11,1	6,8	55,1	12	18,1
Metabólitos	ativos	ativos	principalmente inativos	ativos	Não	principalmente inativos	não	ativos
Metabolismo CYP450 ^f isoenzima	3A4	3A4 2C8	2C9	3A4	2C9 (mínimo)	3A4 (mínimo)	2C9	3A4

Adaptado de MUKHTAR *et al.*, 2005; a: AV, atorvastatina; CV, cerivastatina (retirada do mercado em agosto de 2001); FL, fluvastatina; LV, lovastatina; PT, pitavastatina; PV, pravastatina; RV, rosuvastatina; SV, sinvastatina; b: NI, não informado; c: NA, não se aplica; d: SV e sua forma hidroxilada; e: meia-vida de eliminação da forma hidróxida da SV; f: CYP450, citocromo P450.

A alta afinidade pelo sítio enzimático, avaliada pela medida da constante de inibição (k_i) para NADPH das estatinas (0,1 a 2,3 nM) e da constante de Michaelis (K_m) para o substrato (4 μ M), mostrou ser cerca de 10.000 vezes superior para as estatinas em relação ao substrato (CAMPO & CARVALHO, 2007). As estatinas mundialmente disponíveis, LV, PV e FV foram classificadas como de 1ª geração ou de menor potência; AV e SV como de 2ª geração ou de maior potência e RV como de 3ª geração ou de alta potência (KAPUR & MASUNURU, 2008).

Tabela 2 - Fármacos potenciais interferentes na metabolização das estatinas pelo CYP450^a.

Isoenzimas CYP450 ^a	Fármacos		
	Indutores ^b	Inibidores ^c	Substratos
3A4	Carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, rifampicina, troglitazona	Amiodarona, amprenavir, atazanavir, atorvastatina , cerivastatina , cimetidina, cetoconazol, claritromicina, eritromicina, fosamprenavir, indinavir, itraconazol, lopinavir, lovastatina , mibefradil, miconazol, nefazodona, nelfinavir, pravastatina^d , quinidina, ritonavir, rosuvastatina^d , saquinavir, sinvastatina , telitromicina, tipranavir, verapamil	Ciclosporina A, clopidrogel, diltiazem, felodipina, lacidipina, lidocaína, losartan, midazolam, nateglidina, nifedipina, pioglitazona, repaglinida, sildenafil, terbinafina, triazolam, warfarina
2C8	Rifampicina	Cerivastatina , genfibrozila, trimetoprima	Pioglitazona, repaglinida, rosiglitazona
2C9	Fenitoína, rifampicina, troglitazona	Amiodarona, cimetidina, diclofenaco, fluconazol, fluvastatina , fluvoxamina, genfibrozila, metronidazol, pitavastatina^d , rosuvastatina^d , sulfafenazol	Alprenolol, clorpropamida, glimepirida, glipizida, gliburida, irbesartan, losartan, nateglidina, N-desmetildiazepam, propranolol, rosiglitazona, tolbutamida, warfarina

MUKHTAR *et al.*, 2005; ARMITAGE, 2007; a: CYP450, citocromo P450; b: etanol; c: suco de uva, consumo ≥ 1 l/dia; d: metabolização mínima pelo CYP450.

AV, FV e PT (**Tabela 2**) apresentam mínima eliminação renal, sendo indicadas para pacientes com insuficiência renal significativa. As estatinas, algumas em extensão mínima (PT, PV, RV), são metabolizadas por uma ou mais isoenzimas (3A4, 2C8, 2C9) do citocromo P450. Desta forma, podem ter sua concentração plasmática, em maior ou menor grau, diminuída por fármacos indutores ou

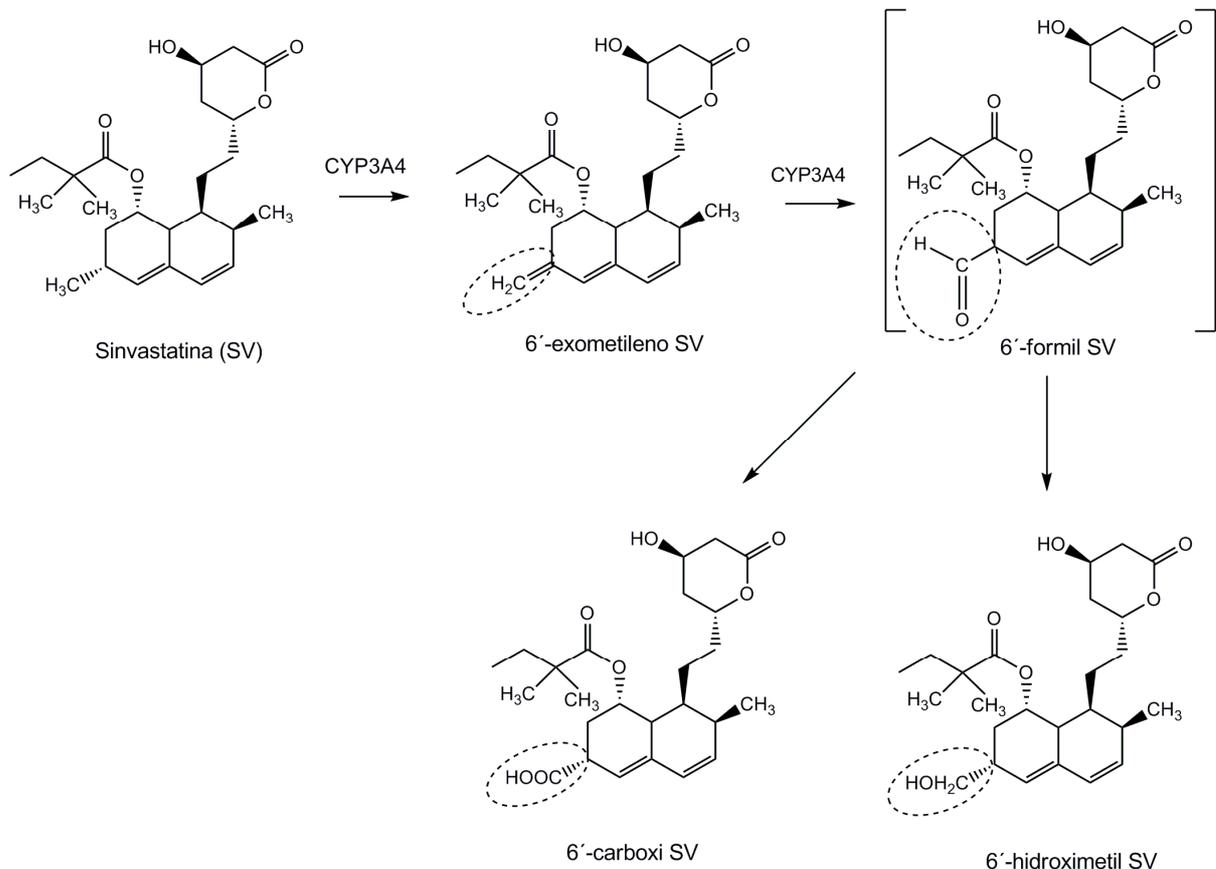
aumentada por fármacos inibidores ou substratos destas isoenzimas (**Tabela 3**). Embora RV e PV não sejam significativamente metabolizadas pelo citocromo P450, podem interagir com warfarina e ciclosporina, respectivamente (HOU & GOLDBERG, 2009).

As estatinas apresentam efeitos pleiotrópicos (não-lipídicos) benéficos sobre a função endotelial e o fluxo sanguíneo, reduzem a oxidação de LDLc, estabilizam as placas de aterosclerose, aumentam a proliferação do músculo liso vascular, inibem a agregação de plaquetas e reduzem a inflamação vascular. Estes efeitos, em sua maior parte são mediados pela ação inibitória das estatinas sobre a síntese de isoprenóides. Estudos têm sido conduzidos para avaliar o papel das estatinas em doenças ósseas, neurológicas, proliferativas e imunológicas. O desafio é determinar quais efeitos pleiotrópicos têm relevância clínica e prática (BARRIOS-GONZÁLEZ & MIRANDA, 2010; LIAO & LAUFS, 2005).

2.3.1 Sinvastatina

Sinvastatina ($C_{25}H_{38}O_5$), ácido 2,2-dimetil-1,2,3,7,8,8a-hexaidro-3,7-dimetil-8-[2-tetraidro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il)etil]-1-naftila[1S-[1 α ,3 α ,7 β ,8 β (2S*,4S*),8a β]] butanóico (**Figura 3**), apresenta-se como pó cristalino branco ou quase branco, não higroscópico, praticamente insolúvel em água (0,03 g/L), *n*-hexano (0,15 g/L) e ácido clorídrico 0,1M (0,06 g/L); e solúvel em clorofórmio (610 g/L), dimetilsulfóxido (540 g/L), etanol (160 g/L), metanol (MeOH, 200 g/L), polietilenoglicol (70 g/L), hidróxido de sódio 0,1M (70 g/L) e propilenoglicol (30 g/L). Possui poder rotatório, $[\alpha]_D^{20}$, entre +285° e +298° (0,5% em acetonitrila, ACN), ponto de fusão de 135 a 138 °C e absorção máxima na região do ultravioleta ($UV_{\text{máx}} \lambda$ 238 nm) em soluções preparadas em ACN, MeOH ou etanol, cujos valores de absortividade molar, ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$) são $>10^4$, 22452, e 14512, para os respectivos solventes (MATEI *et al.*, 2009; MOFFAT *et al.*, 2004; O'NEIL *et al.*, 2006; THE UNITED, 2012a).

Após administração da SV, o início da ação hipolipemiante ocorre a partir de 3 dias e o efeito máximo em 2 semanas. SV sofre extenso metabolismo de primeira passagem em seu sítio de ação primário, o fígado. Seus metabólitos (**Figura 6**) são excretados principalmente nas fezes (60%), a partir da bile, e cerca de 10-15% (predominantemente na forma inativa) na urina (BASNIWAL & JAIN, 2012).

Figura 6 - Metabólitos da sinvastatina via citocromo P450 isoenzima 3A4.

Adaptado de BASNIWAL & JAIN, 2012.

A administração de SV (10-80 mg), a pacientes hipercolesterolêmicos (LDLc >160 mg/dL e ≤250 mg/dL) por 6 semanas, proporciona controle dos níveis séricos de lípidos com reduções de 28-46% em LDLc, 20-33% em CT e 12-18% em TGs, além de elevação de 5,2-6,8% em HDLc (JELLINGER *et al.*, 2012). Contudo, o efeito da SV sobre os níveis séricos de HDLc pode ser insignificante (KOH *et al.*, 2008), modesto (CORTESE & LIBERATOSCIOLI, 2003) ou de elevação em 5,2-6,8% (JONES *et al.*, 2003) a 10-16% (HOU & GOLDBERG, 2009) (**Tabela 4**).

Os distúrbios gastrintestinais são os principais efeitos adversos decorrentes do uso de SV, além de cefaleia, vertigem, erupções cutâneas, visão turva, insônia. Relatos raros de trombocitopenia, proteinúria com SV 40 mg, casos de alopecia e neuropatia (motor e sensorial) na Austrália, risco de catarata em pacientes em uso concomitante com eritromicina, poucos casos de sintomas depressivos, disfunção erétil e impotência (BASNIWAL & JAIN, 2012). Distúrbios musculares, incluindo

miosite, miopatia e rabdomiólise, particularmente com SV 80 mg, motivaram recentemente alterações na bula do medicamento (**Tabela 5**) (FOOD, 2011).

Tabela 3 - Alteração dos valores basais dos lípides plasmáticos com diferentes doses de sinvastatina.

Sinvastatina (mg)	%Alteração do valor basal após tratamento (t=semanas)							
	CT		TG		HDLc		LDLc	
	t ₆ ^a	t ₈ ^b	t ₆ ^a	t ₈ ^b	t ₆ ^a	t ₈ ^b	t ₆ ^a	t ₈ ^b
5	-	-	-	-	-	-	-26	-
10	-20,3	-27	-11,9	-5,3	5,3		-30	-39
20	-25,7	-25	-17,6	-15,6	6,0	NS ^c	-38	-38
40	-27,9	-37	-14,8	-9,4	5,2		-41	-52
80	-32,9	-38	-18,2	-21,1	6,8		-47	-54

a: JONES *et al.*, 2003; b: KOH *et al.*, 2008; c: NS, não significativa.

Tabela 4 – Alterações na bula de medicamentos contendo sinvastatina.

Fármacos	Advertência
Cetoconazol, ciclosporina, claritromicina, danazol, eritromicina, genfibrozila, inibidores de protease, itraconazol, nefazodona, posaconazol, telitromicina	Contra-indicação
Diltiazem e verapamil	Não exceder 10 mg
Amiodarona, anlodipina e ranolazina	Não exceder 20 mg

FOOD, 2011.

Desde a expiração da patente em 2006, além do medicamento referência, genéricos de SV tornaram-se disponíveis no cenário mundial. Igualmente, as cápsulas de SV manipuladas tornaram-se disponíveis em farmácias magistrais no Brasil, porém de forma mais restrita no mundo (BARRIOS-GONZÁLEZ & MIRANDA, 2010; VERONIN & NGUYEN, 2008).

2.4 Métodos analíticos para quantificação de sinvastatina em formas farmacêuticas

A qualidade de um produto farmacêutico ou magistral requer a qualificação dos insumos farmacêuticos empregados (ativo, fármaco e não ativos excipientes) e de todo o processo produtivo ou magistral de acordo com as boas práticas de fabricação ou manipulação (BRASIL, 2010a, 2007a). As matérias-primas e a especialidade farmacêutica devem atender as especificações de qualidade de compêndios oficiais nacionais, como a Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA,

2010) e em sua ausência, de compêndios estrangeiros reconhecidos pela ANVISA (BRASIL, 2009a). Na Farmacopéia Brasileira não constam monografias para SV matéria-prima e para produto acabado, de modo que, apenas os testes abordados em métodos gerais podem ser executados e/ou avaliados de acordo com este compêndio. Assim, para os demais testes, as indústrias e os laboratórios analíticos devem utilizar as monografias disponíveis nas farmacopeias BP, EP, FP ou USP (BRITISH, 2011a,b; EUROPEAN, 2011; FARMACOPEIA, 2005; THE UNITED, 2012a).

No método farmacopéico, a CLAE em fase reversa é descrita para quantificação de SV matéria-prima e em comprimidos. As condições cromatográficas adotadas na USP35, BP2011, EP2011 e FP2005 para quantificação de SV, em matérias-primas são coluna octadecilsilano (33×4,6 mm, 3 µm), eluição por gradiente de concentração com fase móvel constituída por mistura de ACN/ácido fosfórico 0,1% em água (50:50) e ACN/ácido fosfórico (99,9:0,1), fluxo 3 mL/min, detecção UV λ 238 nm, volume de injeção 5 µL, tempo de corrida em cerca de 13 min. Para quantificação de SV em comprimidos, coluna octadecilsilano (250×4,6 mm, 5 µm) a 45 °C, fase móvel solução tampão pH 4,5/ACN, fluxo 1,5 mL/min e detecção UV a 238 nm são adotados pela USP e BP, que diferem quanto a proporção dos componentes na fase móvel (v/v), 65:35 *versus* 7:3, e o volume de injeção (µL), 10 *versus* 20, respectivamente (BRITISH, 2011b; THE UNITED, 2012a). Não foi encontrada monografia para SV cápsulas nas farmacopeias anteriormente citadas e nem em outras referidas na RDC 37 (BRASIL, 2009a), tais como, Farmacopeias Internacional (THE INTERNATIONAL, 2006), Japonesa (THE JAPANESE, 2006), Argentina (FARMACOPEA, 2003) e Mexicana (FARMACOPEA, 2008).

Outros métodos analíticos (**Tabela 6**) têm sido relatados para determinação de SV matéria-prima e/ou comprimidos, isoladamente, associada a outros fármacos ou na presença de impurezas. Contudo, métodos por CLAE (**Tabela 7**) acoplada a diferentes detectores representam mais da metade daqueles descritos na literatura (BASNIWAL & JAIN, 2012).

O método cromatográfico descrito para comprimidos na USP foi adaptado por Veronin & Nguyen (2008) e aplicado a SV na forma de comprimidos e cápsulas, adquiridos pela Internet. Barcat e colaboradores (2009) por sua vez, aplicaram-no a

Tabela 6 - Métodos analíticos referenciados para determinação de sinvastatina isoladamente ou associada.

Método	Fármaco(s) ^a	Referências
Voltametria	SV ^b	Coruh & Özkan, 2006; Lovric & Nigovi, 2006; Nigovic <i>et al.</i> , 2008
Titulometria	SV ^{b,c}	Tharpa & Basavaiah, 2009
Espectrofotometria		
Visível	SV ^{b,c}	Basavaiah & Devi, 2008; Basavaiah & Tharpa, 2008; Tharpa & Basavaiah, 2009; Tharpa <i>et al.</i> , 2010
	LV ^{b,c} , SV ^{b,c}	El-Din <i>et al.</i> , 2010
	AV ^{b,c} , PV ^{b,c} , SV ^{b,c}	Eman <i>et al.</i> , 2011
	SV ^b	Arayne <i>et al.</i> , 2007
	SV ^d	Polonini <i>et al.</i> , 2011
Ultravioleta convencional	EZ ^{b,c} , SV ^{b,c}	Palabiyik <i>et al.</i> , 2008; Jain <i>et al.</i> , 2009; Rajput & Raj, 2007; Karaigi & Simpi, 2008; Balaji & Sunitha, 2010; Mane <i>et al.</i> , 2011
	Metformina ^{b,c} , SV ^{b,c}	Singla V. <i>et al.</i> , 2010
Ultravioleta derivada	SV ^b	Wang & Asgharnejad, 2000; Gomes <i>et al.</i> , 2009; Millership & Chin, 2010
	EZ ^b , SV ^b	Moussa <i>et al.</i> , 2010; Souri & Amanlou, 2010; Joshi <i>et al.</i> , 2010
	EZ ^c , PV ^c , SV ^c	Farouk <i>et al.</i> , 2010
Cromatografia		
Eletrocínética micelar	LV ^b , SV ^b	Srinivasu <i>et al.</i> , 2002
	EZ ^b , SV ^b	Yardimci & Ozaltin, 2010
Camada delgada de alta eficiência	SV ^b	Kumar D. A. <i>et al.</i> , 2009; Rao & Suneetha, 2010
	PV ^b , RV ^b , SV ^b	Chaudhari <i>et al.</i> ; 2007a
	EZ ^b , SV ^b	Dixit <i>et al.</i> , 2008; Rathinaraj <i>et al.</i> , 2010a; Shrestha <i>et al.</i> , 2010
	Niacina ^b , SV ^b	Tiwari & Sathe, 2010

Adaptado de BASNIWAL & JAIN, 2012. a: AV, atorvastatina; EZ, ezetimiba; LV, lovastatina; PV, pravastatina; RV, rosuvastatina; SV, sinvastatina; b: comprimido; c: matéria-prima; d: cápsula.

Tabela 7 - Condições experimentais obtidas por CLAE-UV para análise de SV isoladamente ou associada, de acordo com a literatura.

Referência	Fármaco(s) ^a	Coluna (mm; µm); °C	Fase móvel (v/v)	Fluxo (mL/min)	Tempo de retenção (min)	Deteção (λ, nm)	Injeção (µL)
Wang & Asgharnejad, 2000	SV ^{b,c}	C ₁₈ (250×4,6); 45	ACN/MeOH/NaH ₂ PO ₄ 0,025 M, pH 4 (55:12:33) ACN/NaH ₂ PO ₄ 0,025 M, pH 4 (65:35)	2,0 1,5	<5 <22	252 238	40 50
Gandhimathi et al., 2003	Niacina ^b , SV ^b	C ₁₈ (150×4,5; 0,5)	MeOH/KH ₂ PO ₄ 0,01 M (90:10)	0,6	4,6	238	NI ^e
Godoy et al., 2004	SV ^b	C _{18e} ^f (100×4,6; 5); 22,3±1	ACN/tampão fosfato 0,03M, pH 4,5 (70:30)	3,0	1,47	238	NI ^e
Alvarez-Lueje et al., 2005	SV ^b	C ₁₈ (150×3,9; 10) C ₁₈ (30×4,6); 25	ACN/tampão fosfato 0,028 M, pH 4 (65:35)	1,0	8,3	238	20
Vuletic et al., 2005	SV ^{b,c}	C ₈ (150×4,6; 3,5); 30	ACN/H ₃ PO _{4(aq)} 0,1% 0,014 M (gradiente linear de eluição)	1,5	9,67	238	50 (5 °C)
Abu-Nameh et al., 2006	SV ^c	C ₁₈ (250×4,6; 5) + pré-coluna	ACN/KH ₂ PO ₄ pH 4,5/MeOH (5:3:1)	2,5	6,47	230	20
Malenovic et al., 2006	3 impurezas ^b , LV ^b , SV ^{b,c} , SVA ^b	XTerra (50×4,6; 3,5); 30	Diisopropil éter/LSS ^g / n-butanol/Na ₂ HPO ₄ 0,025 M, pH 7 (0,9:1,7:7:90,4)	0,3	9,95	238	20
Pasha et al., 2006	AV ^c , LV ^c , PV ^c , SV ^c , RV ^c	C ₁₈ (250×4,6; 5), temp. amb.	ACN/MeOH/CH ₃ COONH ₄ 0,01 M pH 5,0 (gradiente de eluição)	1,0	35,5	237	NI ^e
Ashfaq et al., 2007	EZ ^c , SV ^c	C ₁₈ (250×4,6; 5)	ACN/CH ₃ COONH ₄ 0,1 M, pH 5,0 (70:30)	1,5	9,8	240	20
Chaudhari et al.; 2007b	EZ ^c , SV ^c	C ₁₈ (250×4; 5); temp. amb.	ACN/H ₂ O/MeOH (60:25:15) pH 4,0±0,1	1,5	NI ^e	238	NI ^e
Madan et al., 2007	SV ^b , SVA ^b	C ₈ (250×4; 5); 27±1 C ₁₈ (250×4,6; 5); 27±1	ACN/C ₈ H ₁₇ SO ₃ Na 0,05 M, pH 4 (60:40) (80:20)	1,0	8,9 8,1	240	NI ^e
Ozaltin & Uçakturk, 2007	EZ ^c , SV ^c	CN (250×4; 5); 27±1 C ₈ (200×4,6; 5)	ACN/N(CH ₃) ₄ OH 0,02%, pH 3 (40:60)	1,0	8,2	240	20
Ashfaq et al., 2008	Genfibrozila ^b , SV ^b	C ₁₈ (250×4,6; 5); 25±2	ACN/H ₂ O A (50:50) B (80:20) A-B (60:40 a 0:100) gradiente ACN/CH ₃ COONH ₄ 0,1 M pH 5 (85:15)	1,0	7,68	237	20

Tabela 7 - Continuação

Jain et al., 2008	EZ ^{b,c} , SV ^{b,c}	C ₁₈ (250×4,6; 5); 25±0,5	MeOH/ACN/H ₂ O (75:18,75:6,25)	1,8	13,5	231	NI ^e
Veronin & Nguyen, 2008	SV ^{c,d}	C ₁₈ (150×4,6; 4), 30	ACN/NaH ₂ PO ₄ (65:35)	1,2	8,9	238	20
Gomes et al., 2009	SV ^c	C ₁₈ (125×4,6; 5); 25±1	ACN/MeOH/H ₂ O (20:60:20)	1,0	4,7	239	20
Hefnawy et al., 2009	EZ ^c , SV ^c	C ₁₈ ^f (100×4,6); temp. amb.	ACN/CH ₃ COONH ₄ 0,05 M, pH 5 (65:35)	3,0	1,67	240	1
Kumar D. A. et al., 2009	EZ ^{b,c} , SV ^{b,c}	C ₁₈ (250×4,6; 5)	ACN/CH ₃ COONH ₄ 0,01 M, pH 6,8 (65:35)	1,0	8,5	240	20
Baracat et al., 2009	SV ^{c,d}	C ₁₈ (250×4,6; 5); 45	ACN/NaH ₂ PO ₄ pH 4,5 (65:35)	1,5	NI ^e	238	10
Dixit et al., 2010	EZ ^c , SV ^c	C ₁₈ (250×4,6; 5)	ACN/ tampão fosfato 0,01 M pH 4,5 (65:35)	1,0	15	232 (10') 238	50
Guzik et al., 2010	SV ^c	C ₁₈ (250×4,6; 5), 50 C ₁₈ (250×4,6; 5), 40	ACN/H ₂ O (40:60 a 100:0) MeOH/H ₂ O (70:30 a 97:3)	1,5	9,11 9,35	238	20
Markman et al., 2010	SV ^d	C ₁₈ (100×4,6); 25	ACN/NaH ₂ PO ₄ 0,027 M, pH 3 (65:35)	1,5	3,28	238	20
Nagaraju & Vishnu; 2010	EZ ^c , SV ^c	C ₁₈ (250×4,6; 5)	ACN/H ₃ PO _{4(aq)} 0,1%, pH 3 (75:25)	1,5	7,0	238	20
Oliveira et al., 2010	SV ^b	C ₈ (250×4,6; 5), 30	ACN/H ₃ PO _{4(aq)} 0,1% (65:35)	1,5	6,6	238	10
Piecha et al., 2010	LV ^b , PV ^b , SV ^b	C ₁₈ (250×4,6; 3)	ACN/H ₂ O pH 4,5 (CH ₃ COOH glacial) (gradiente eluição)	1,0	14,2	238	50
Rahman et al., 2010	EZ ^b , SV ^b	C ₁₈ (250×4,6; 5)	ACN/MeOH/H ₃ PO _{4(aq)} 0,1% (75:20:5)	1,0	6,0	238	20
Rathinaraj et al., 2010b	EZ ^c , SV ^c	C ₁₈ (250×4,6; 5)	ACN/CH ₃ COONH ₄ 1 M (55:45)	1,8	20,1	230	20
Sama et al., 2010	EZ ^c , SV ^c	C ₁₈ (50×4,6; 5)	ACN/KH ₂ PO ₄ 0,05 M, pH 3 (55:45)	0,8	3,4	236	NI ^e
Bhatia et al., 2011	SV ^b , SVA ^b , LV ^b , SME ^b	C ₁₈ (150×4,6; 5), temp. amb.	ACN/H ₃ PO _{4(aq)} 0,1% (80:20)	1,0	9,0	237	20
Silva et al., 2012	LV ^b , PV ^b , SV ^b	C _{8e} ^f (250×4,6; 5), 30	ACN/H ₃ PO _{4(aq)} 0,1% (65:35)	1,0 (PV) 1,5	6,5	238	20

Adaptado de BASNIWAL & JAIN, 2012. a: AV, atorvastatina; EZ, ezetimiba; LV, lovastatina; PV, pravastatina; RV, rosuvastatina; SV, sinvastatina; SVA, sinvastatina hidroxídeo; SME, sinvastatina metil éster (impureza); b: matéria-prima; c: comprimido; d: cápsula; e: NI, não informado; f: C_{18e}, C_{8e}, columnas octadecilsilano, octilsilano capeadas; g: LSS, laurilsulfato de sódio.

SV cápsulas manipuladas. Posteriormente, foi descrito na literatura o desenvolvimento de métodos analíticos por CLAE-UV (MARKMAN *et al.*, 2010) e por espectrofotometria UV (POLONINI *et al.*, 2011), ambos aplicável ao doseamento de SV em cápsulas manipuladas.

Com base nas condições cromatográficas descritas na literatura (**Tabela 7**) observa-se o uso da cromatografia em fase reversa empregando mais frequentemente colunas capeadas (C_{18e}) ou não (C_{18}) de octadecilsilano do que de octilsilano (C_{8e} , C_8), com comprimento cada vez menor e temperatura ambiente para análise de SV. As colunas capeadas diferem das não capeadas pelo fato de que os grupos silanóis residuais são tratados com compostos carbônicos de cadeia curta, de modo a reduzir o número de hidroxilas livres disponíveis para ligação com as substâncias presentes na solução em análise. Tal redução favorece menor interação principalmente de substâncias de natureza básica com a sílica, levando a menor efeito de cauda, e conseqüentemente, picos mais simétricos (SNYDER *et al.*, 1997).

Com exceção do sistema emulsionado proposto por Malenovic (2006) e das fases móveis propostas por Gandhimathi (2003) e por Guzik (2010), ACN é o solvente orgânico empregado na fase móvel e normalmente associada a tampão (fosfato ou acetato), constituindo sistema binário ou ternário, com eluição isocrática. Cabe ressaltar que entre 2008 e 2009 houve escassez deste solvente no mercado com elevação substancial de seu custo, o que exigiu a busca por alternativas (LANÇAS, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficácia terapêutica de sinvastatina 20 mg comprimidos e cápsulas em relação aos comprimidos referência.

3.2 Específicos

- Otimizar e desenvolver método analítico para quantificação de SV, respectivamente, em comprimidos e cápsulas por CLAE empregando metanol como solvente orgânico alternativo a ACN.
- Avaliar a qualidade físico-química de SV 20 mg comprimidos (similar e referência) e cápsulas manipuladas por adaptação de testes e/ou proposição de especificações para o controle de qualidade.
- Avaliar estatisticamente os resultados de eficácia terapêutica por comparação entre os grupos de indivíduos que receberam SV comprimidos ou cápsulas manipuladas em relação ao grupo tratado com SV comprimidos referência.
- Contribuir com a Farmacopeia Brasileira e as farmácias magistrais por meio de complementação de monografia para SV matéria-prima, comprimidos, e elaboração de monografia para SV cápsulas.

4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS

CAPÍTULO 1

Controle de qualidade de sinvastatina 20 mg comprimidos e cápsulas

PARTE 1

SIMVASTATIN ASSAY AND DISSOLUTION STUDIES BY FEASIBLE RP-HPLC IN TABLETS

Flávia Dias Marques-Marinho*, Amanda Leão dos Santos, Cristina Duarte Vianna-Soares; Ilka Afonso Reis; José Carlos da Costa Zanon; Angélica Alves Lima

Abstract

Commonly used HPLC acetonitrile solvent has been through a worldwide shortage with a cost increase in 2008 and 2009. In order to get around this situation, a method by RP-HPLC employing methanol and aqueous acid mobile phase was optimized and validated to evaluate simvastatin (SIM). The quality control assay and dissolution studies of this lipid-lowering drug were performed in diluents methanol and 0.01 M phosphate buffer with 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 7, respectively. Dissolution test aliquots did not go through sample treatment, as described in USP SIM tablets monograph by ultraviolet spectrophotometry. The proposed method is fast, simple, feasible and robust.

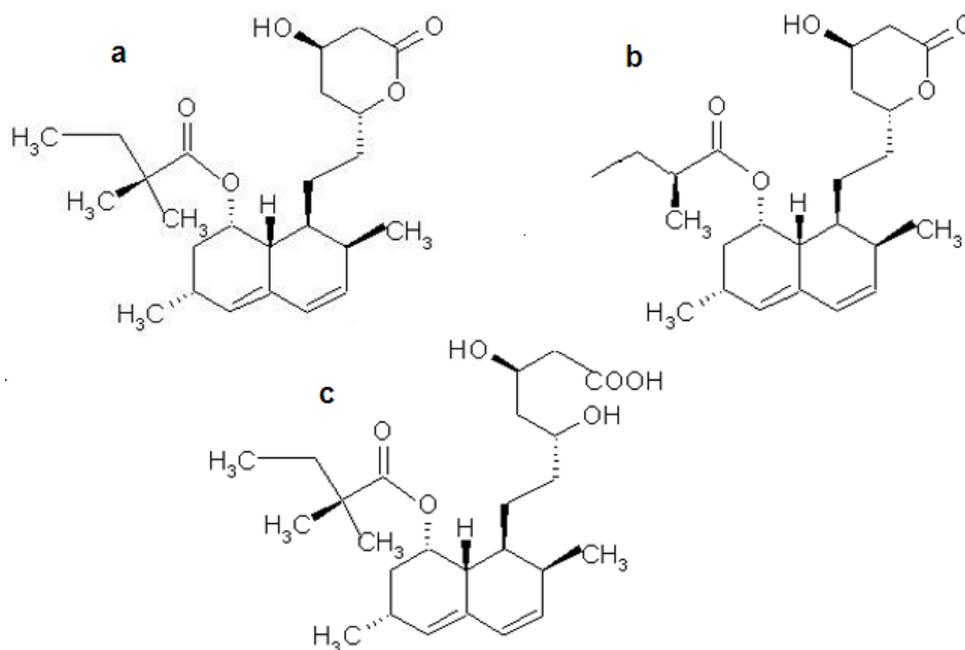
Keywords Simvastatin tablets, Dissolution studies, RP-HPLC.

1 Introduction

Simvastatin (**Figure 1.1a**), 2,2-dimethyl-,1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3,7-dimethyl-8-[2-(tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl)ethyl]-1-naphthalenyl ester [1S-[1a,3a,7b,8b(2S*,4S*),8ab]] butanoic acid is one of the most used statins as lipid-lowering agents, for the treatment of hypercholesterolemia (O'NEIL *et al.*, 2006; THE UNITED, 2011a). It reduces the morbidity and mortality associated with chronic heart disease (THE 4S, 1994). SIM is commercially available as tablets. Similarly to lovastatin (LOV, **Figure 1.1b**), SIM is administered in lactone form as a pro-drug, which is enzymatically hydrolyzed *in vivo* to the active β -hydroxy acid form (**Figure 1.1c**), particularly in liver. The active form competitively inhibits HMG-CoA reductase, which converts HMG-CoA to mevalonate, a rate-limiting step in the cholesterol biosynthesis (ENDO *et al.*, 1976; ENDO *et al.*, 1992; MOGHADASIAN, 1999). SIM is semi-synthetically produced from LOV, which is a natural fermentation product of *Aspergillus terreus*. Hence, LOV can be found in SIM raw material as impurity

(ALBERTS *et al.*, 1980; HIRAMA *et al.*, 1983; HOFFMAN *et al.*, 1986; THE UNITED, 2011a).

Figure 1.1 - Chemical structure of (a, SIM) simvastatin, (b, LOV) lovastatin and (c) SIM β -hydroxy acid.



SIM quantitation in bulk or finished products samples has been reported using UV spectrophotometry and liquid chromatography (LC-UV) (ABU-NAMEH *et al.*, 2006; ALI *et al.*, 2009; ARAYNE *et al.*, 2007; GODOY *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2009; GRAHEK *et al.*, 2001; MARKMAN *et al.*, 2010; POLONINI *et al.*, 2011; PASHA *et al.*, 2006; WANG & ASGHARNEJAD, 2002). LC ion-par coupled to UV detector (MADAN *et al.*, 2007) and visible spectrometric method have also been reported (BASAVIAH & THARPA, 2008). Furthermore, LC-MS/MS was employed to identify SIM impurities (VULETIC *et al.*, 2005) or degradation products in bulk drug or tablets dosage form (OLIVEIRA *et al.*, 2010). UV spectrometry, LC-UV and LC-MS have been reported to quantify SIM associated with other drugs such as ezetimibe (HEFNAWY *et al.*, 2009; PALABIYIK, *et al.*, 2008), gemfibrozile (ASHFAQ *et al.*, 2008) or in multi-drugs (KUMAR V. *et al.*, 2008) formulation. A micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) method has been employed to quantify SIM and LOV in tablets (SRINIVASU *et al.*, 2002). Several other studies, not here considered because of its focus on SIM quantitation in biological samples describe LC coupled

with UV or fluorescence detectors. LC is the most commonly reported method due to its feasibility to couple with several detection techniques. Acetonitrile is widely used in combination with buffer solution in mobile phases, mainly in SIM official monographs of solid dosage forms (ASHFAQ *et al.*, 2008; ABU-NAMEH *et al.*, 2006; BRITISH, 2011b; GOMES *et al.*, 2009; HEFNAWY *et al.*, 2009; KUMAR V. *et al.*, 2008; MADAN *et al.*, 2007; MARKMAN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; PASHA *et al.*, 2006; THE UNITED, 2011a; VULETIC *et al.*, 2005; WANG & ASGHARNEJAD, 2002). Methanol in a binary mobile phase has been reported for SIM determination in nanoparticles (specific pharmaceutical dosage form) in the concentration range 20-80 µg/mL. ACN worldwide shortage has reached a very high cost in the market between years 2008 and 2009 (MAJORS, 2009). In order to get around this situation, an alternative lower cost, as a methanolic mobile phase, not only to assay SIM, but also to determine SIM in dissolution studies was applied for tablets routine analysis.

2 Experimental

2.1 Chemicals and reagents

USP simvastatin reference standard (RS) (lot I0D382, 99.4% purity, Rockville, MD, USA), lovastatin pharmaceutical grade gently donated by Pharma Nostra (lot 07061205A, 99.9% purity, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and locally purchased Zocor® 20 mg tablets samples (Merck Sharp & Dohme, Campinas, SP, Brazil) were used. Methanol HPLC grade (Tedia, Fairfield, OH, USA), phosphoric acid 85% (Merck, Darmstadt, Germany), sodium dodecyl sulfate (Pharmacopéia Ativos Magistrais, Barueri, SP, Brazil), sodium hydroxide (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and monobasic sodium phosphate (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were used as received. Distilled or ultrapurified water (Milli-Q-Plus, Millipore, Bedford, MA, USA) was used when necessary.

2.2 Instrumentation

The dissolution studies were performed in a DT80 (Erweka, Heusenstamm, Germany) dissolution system employing paddles (50 rpm) and 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, final pH 7±0.05 adjusted with 40% w/v sodium

hydroxide (900 mL, 37 ± 0.5 °C) (BRITISH, 2011b; THE UNITED, 2011a). Withdrawn aliquots (with no media replacement) were filtered through a 0.45 μm membrane and directly injected in the chromatograph.

Separations were performed in a HP1200 quaternary LC system (Agilent, Palo Alto, CA, USA) with automatic injector fitted at 10 μL , UV diode array detector (DAD) set at λ 238 nm, octylsilane column (C_8 and $\text{C}_{8\text{e}}$, 250 \times 4 mm, 5 μm) at 30 °C (Merck, Darmstadt, Germany) with data acquisition by internal software (Agilent ChemStation version Rev.B.02.01-SR1). Mobile phase consisted of methanol and 0.1% phosphoric acid (80:20 v/v) at flow rate 1.5 mL/min, with backpressure around 125 bar. All standard and sample solutions were filtered through a 0.45 μm filter membrane (MiniSart RC15 Sartorius, Goettingen, Germany) before injection. Peak area was used for SIM quantitation.

2.3 Standard solution preparation

Stock solutions of SIM RS were accurately prepared in methanol (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and in the dissolution medium (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Diluted SIM standard solutions at 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared in methanol for assay and at 2, 10, 18, 26, 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the dissolution medium. All standard solutions were prepared in triplicate.

2.4 Sample solution preparation

Powdered tablets (20 units) equivalent to 5, 10, 20 mg SIM were accurately weighed in a 50 mL volumetric flask (triplicate), added of 25 mL methanol and sonicated for 10 min. Final volume was completed with the same diluent. The dispersions were filtered and aliquots of 10.0 mL were transferred to 50 mL flask volumetric to yield final concentrations 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

System suitability was verified by injections ($n=6$) of SIM standard solution prepared in methanol (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and in dissolution medium (22.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The relative standard deviation (%RSD) for SIM peak areas and retention times (t_R) were accepted if less than 1.0% or 2.0% for assay or dissolution test, respectively (SNYDER *et al.*, 1997; THE UNITED, 2011b). Chromatographic parameters as

retention factor (k), theoretical plates (N), tailing factor (T_f) and peak asymmetry (A_s) were also evaluated.

2.5 Method validation

Calibration plots were built in two days in the mass range 0.04-0.80 μg by injection of 1, 5, 10, 15, 20 μL of SIM standard solution at 40 $\mu\text{g/mL}$ in methanol and in the concentration range 2-34 $\mu\text{g/mL}$ for SIM solutions in dissolution medium by injection of 10 μL of standard solutions at 2, 10, 18, 26, 34 $\mu\text{g/mL}$. All standard and sample solutions were prepared as well as injected in triplicate. Residues greater or equal than 3.0 were removed by using studentized residuals model. The calibration plots behavior, normality and homoscedasticity (α 0.05) were verified by weighted least squares method using the method using a linear regression model to determine the weights, Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). The lack-of-fit test was used to verify the goodness-of-fit of the models. Determination coefficients, R^2 , were calculated and results were considered significant if correspondent p value were less than 0.05. All statistical analyses were performed using the R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Limits of quantitation (LOQ) and detection (LOD) were determined in triplicate (for methanolic solutions only) by successive dilutions of the lowest calibration curve point. The concentration for which the maximum precision remained below the acceptance limit (RSD 2.0%) was evaluated for LOQ. The minimum detectable area in the greatest dilution was considered for LOD (SHABIR, 2003; SNYDER *et al.*, 1997).

The method selectivity was evaluated by comparison of SIM chromatogram standard solution in methanol (40 $\mu\text{g/mL}$) with that of tablets excipients mixture (ascorbic acid, citric acid, hydroxypropylcellulose, butylated hydroxyanisole, hydroxypropylmethylcellulose, iron oxides, lactose, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, starch, talc, titanium dioxide) in methanol. In dissolution medium, SIM standard solutions (22.2 $\mu\text{g/mL}$) were compared with that obtained by addition of a placebo mass, equivalent to one average weight in three dissolution vessels, agitated at 150 rpm for 30 min (THE UNITED, 2011b).

The repeatability and intermediate precision for SIM tablets sample solutions (20, 40, 80 µg/mL in methanol, triplicate) was performed in three days (ERMER, 2001; SHABIR, 2003). A different analyst performed the procedure at the third day. SIM standard solutions (22.2 µg/mL in dissolution medium, triplicate) were used to evaluate repeatability precision. Tablets dissolution test (30 min) intermediate precision was evaluated by distinct analysts in different days (THE UNITED, 2011b). The results were calculated by the common plot equations.

The standard addition method was employed for recovery studies. Sample tablet solution in methanol was prepared as in sample preparation, except that, it was at 15 µg/mL (37.5% of working concentration). SIM standard solution aliquots were added, so that, 50%, 100% and 200% of working concentration (40 µg/mL) were obtained. The equation $\%R = [(C_T - C_A) / C_S] \times 100$ was employed to determine SIM recovery, in which, C_A is concentration in nonspiked solution, C_T is total concentration in spiked solution and C_S is concentration of standard solution. Recovery in the dissolution medium (900 mL per vessel) was obtained by addition of SIM RS in three different amounts (2, 20, 30 mg) to a tablet placebo mixture, equivalent to one average weight. Each concentration was tested in triplicate (THE UNITED, 2011b).

Robustness was verified for SIM determination (40 µg/mL in methanol, n=6), by varying organic solvent $\pm 2.0\%$, flow rate ± 0.1 mL/min and temperature ± 10 °C. Equivalent SIM standard solutions (n=3) were run in the same conditions. For SIM dissolution medium solutions (n=6), molarity ± 0.005 M, pH ± 0.5 and C_{8e} (endcapped) column were tested. SIM concentrations were calculated by the calibration plot equation. %RSD values for precision and robustness were calculated by analysis of variance (ANOVA one-way), at a significance level α 0.05 using R statistical software.

In a short term stability study SIM RS methanolic solution (40 µg/mL) was kept at room controlled temperature (22-24 °C) and was analyzed after 20 h. Dissolution stability study was evaluated by the addition of 20 mg SIM (one tablet) to dissolution medium (37 °C, 900 mL, 50 rpm, 30 min). This solution (22.2 µg/mL) was transferred to vials (n=2), one kept at room temperature and the other at under refrigeration (2-8 °C). Vials were analyzed every hour during 7 h for comparison. A change less than 2.0% in the response was considered acceptable (SHABIR, 2003).

Dissolution studies for SIM tablets (n=6) release was performed in two days, using the previous described conditions until 45 min and, for additional 15 min at 150 rpm. Aliquots (3 mL) were withdrawn at the time intervals 3, 5, 8, 10, 12, 15, 30, 45, 60 min, without medium replacement. Filtered aliquots were maintained at 2-8 °C previous to injection in the chromatograph. C_{8e} (endcapped) column (250×4 mm, 5 μm) was used.

3 Results and discussion

Very few reports describe the use of C₈ column to determine SIM in pharmaceutical samples (KUMAR V. *et al.*, 2008; MADAN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VULETIC *et al.*, 2005). However, C₈ has been chosen because separation shows a slightly lower peak retention time (t_R) as fair as resolved as in a C₁₈ column under the same conditions. Most reported studies, use isocratic or gradient elution of ternary or binary mobile phases containing ACN as organic solvent, in a variable proportion from 60 to 85% v/v, usually with buffer (GOMES *et al.*, 2009; GRAHEK *et al.*, 2001). Because there is a need to address method validation for SIM determination and dissolution studies, for which linear concentration ranges and diluents are usually different, a single feasible isocratic liquid chromatographic method was proposed. Due to ACN shortage and high cost in the market between years 2008 and 2009, an alternative less expensive solvent was desirable (MAJORS, 2009). Different options to reduce solvent cost are reported in the literature (LANÇAS, 2009; RIBEIRO R. *et al.*, 2004). Ribeiro R. *et al.* (2004) showed that low-cost ethanol can be a choice of mobile phase organic modifier for many RP-HPLC applications. However, its use is not worldwidedly allowed, because of the control regulations in some countries, mainly in USA (RIBEIRO R. *et al.*, 2004). A great effort has been done in order to substitute ACN by methanol, what does not require modifications in equipment nor in the column (LANÇAS, 2009).

A binary phase, methanol and water, has been reported for SIM quantitation in nanoparticles and in human plasma (ALI *et al.*, 2009; OCHIAI *et al.*, 1997). No report has described the use of methanol binary phase in reverse column applied to SIM tablets. Hence, solvent-strength nomograph for reverse-phase HPLC was used to estimate a correspondent methanol percentage necessary to substitute ACN (SNYDER *et al.*, 1997). Considering 72.5% as an average ACN percentage used in

the reported mobile phases, a correspondent methanol percentage should be approximately 80%. In this work, different ratios of methanol and 0.1% phosphoric acid (75:25, 80:20, 85:15, 90:10 v/v) in isocratic elution were evaluated for SIM. The 80:20 and 85:15 mobile phase ratios yielded SIM k values near 2.0 (3.54 and 1.79, respectively) and were used to evaluate the selectivity of SIM and LOV (SIM synthesis route precursor, 40 $\mu\text{g/mL}$ of each, in methanol or 22.2 $\mu\text{g/mL}$ in dissolution medium) at room temperature immediately after preparation and five days later. Superior chromatographic separation and resolution between SIM, LOV and their degradation products were observed for mobile phase 80:20 ratio than 85:15 one.

In the latter, nevertheless, peaks overlapping were observed for SIM and LOV degradation products in methanol (**Figure 1.2**) and for LOV and SIM degradation products in dissolution medium (**Figure 1.3**).

Figure 1.2 – Chromatograms of SIM and LOV methanolic solution five days in room temperature after preparation, using methanol:0.1% phosphoric acid (a) 85:15 v/v and (b) 80:20 v/v as mobile phase, 1.5 mL/min, C_{8e} 250 \times 4 mm, 5 μm , 30 $^{\circ}\text{C}$, 10 μL , λ 238 nm.

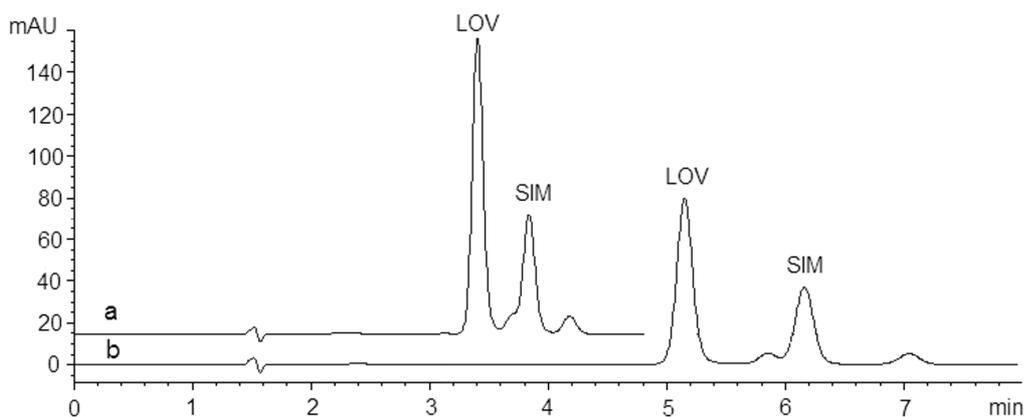
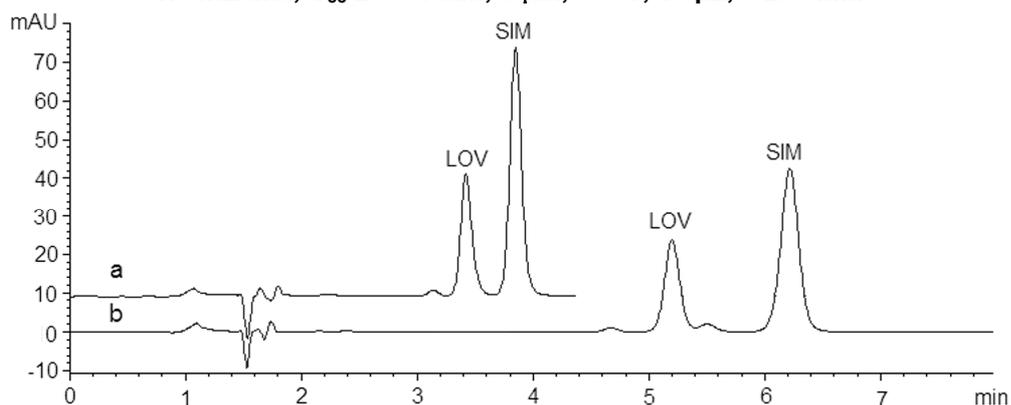
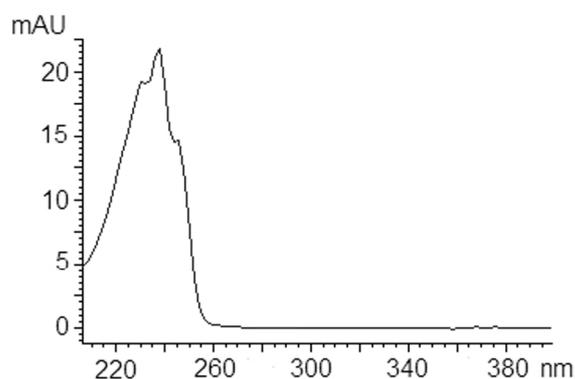


Figure 1.3 – Chromatograms of SIM and LOV solution prepared in dissolution medium (0.5% SDS in monobasic sodium phosphate, pH 7, 0.01 M) after five days in room temperature; using methanol:0.1% phosphoric acid (a) 85:15 v/v and (b) 80:20 v/v as mobile phase, 1.5 mL/min, C_{8e} 250 \times 4 mm, 5 μm , 30 $^{\circ}\text{C}$, 10 μL , λ 238 nm.



Interestingly, it should be noted that the products eluted with greater t_R than SIM and LOV in methanol. The presence of methanol may lead to lactone methanolysis and esterification, what is agreement with previous report (YANG & HWANG, 2006). On the other hand, the more polar products eluted at lower t_R in dissolution medium because of lactone hydrolyses to the corresponding acid form in aqueous solutions (pH 7) (PIECHA *et al.*, 2010). The products UV/DAD spectra (**Figure 1.4**) were identical to SIM and LOV original spectra in both diluents; revealing that the chromophore moiety is not affected by ring opening (ALVAREZ-LUEJE *et al.*, 2005). For all these reasons, the 80:20 v/v ratio mobile phase (1.5 mL/min, 30 °C) was selected. Column temperature, set at 30 °C helped reducing methanol: aqueous acid mobile phase viscosity, decreasing backpressure, therefore avoiding fluctuations. The backpressure was maintained around 125 bar.

Figure 1.4 – UV/DAD spectrum related to statin products chromatographic peaks in Figure 1.2 and Figure 1.3.



System suitability showed %RSD values for peak area (0.47; 0.10) and t_R (0.05; 0.02) less than 1.0% for methanol and dissolution medium solutions, respectively. The results also demonstrate the suitability of the system in terms of column efficiency greater than 2000 (N 5999; 6551), adequate peak shape less than 2.0 (T_f 1.13; 1.15) or asymmetry less than 1.2 (A_s 1.16; 1.19), appropriate SIM peak retention factor greater than 2.0 (k 2.67; 4.43) for solutions in methanol and dissolution medium, respectively (SHABIR, 2003; SNYDER *et al.*, 1997). No fluctuations in the baseline was observed during the runs. Hence, the proposed method showed system suitability for SIM determination in either diluent.

SIM calibration plots were built in both diluents. The simplest model that adequately described the concentration-response relationship was the weighted least

squares method using method using a linear regression model (variances versus mean responses in each concentration) to determine the weights (ROZET *et al.*, 2007). The plots for SIM methanolic (**Table 1.1**) or dissolution medium (**Table 1.2**) solutions showed a linear behavior. No residues were removed for methanolic solutions plots, however, the common plot for dissolution medium solutions had two residues (6.6%) removed, less than 22% of the data (HORWITZ, 1995).

Table 1.1 - Results of adjusted regression model ($R^2 > 0.9999$)^a for SIM determination in methanolic solutions (0.04-0.80 μg , n=3) by HPLC^b.

SIM curve data	Day 1	Day 2	Common curve
Average area \pm SE	916.51 \pm 7.83	922.84 \pm 3.80	921.39 \pm 6.23
Regression equation	y=2253.33x+1.55	y=2257.91x+2.94	y=2257.66x+1.88
%RSD	0.11	0.11	0.12
p value ^c	Intercept	0.02 (0.17) ^d	6.82 \times 10 ⁻⁴ (0.21) ^d
	Shapiro-Wilk	0.40	0.74
	Levene	0.97	0.92
	Lack-of-fit	0.49	0.54

a: p value $< 2.0 \times 10^{-16}$; b: chromatographic conditions C₈ (250 \times 4 mm, 5 μm), 30 °C, methanol: 0.1% phosphoric acid 80:20 v/v, 1.5 mL/min, λ 238 nm; c: statistically significant if less than 0.05; d: intercept percentage relative to 100% analyte level that must be less than 2%.

Table 1.2 - Results of adjusted regression model ($R^2 > 0.999$)^a for SIM determination (2-34 $\mu\text{g/mL}$, n=3) in dissolution medium^b by HPLC^c.

SIM curve data	Day 1	Day 2	Common curve
Average area \pm SE	387.77 \pm 1.35	386.31 \pm 1.41	387.21 \pm 1.66
Regression equation	y=21.559x+0.013	y=21.453x+0.178	y=21.526x+0.107
%RSD	0.30	0.17	0.29
p value ^d	Intercept	0.97	0.68
	Shapiro-Wilk	0.44	0.87
	Levene	0.92	0.86
	Lack-of-fit	0.11	0.36

a: p value $< 2.0 \times 10^{-16}$; b: 0.5% SDS in monobasic sodium phosphate (pH 7, 0.01 M); c: conditions as in **Table 1.1**; d: statistically significant if less than 0.05.

Curves in methanol, as well as in dissolution medium showed no significant parallelism deviation by regression analysis (p value > 0.05). Common regression curves were significant (p value < 0.05), correlation coefficients (r) were above 0.999 and determination coefficients (R^2) were greater or equal 0.98 (JENKE, 1996; THE UNITED, 2011b). The regression RSD values were less than 1.0%. Intercept was not statistically different from zero for dissolution medium medium solutions (p value > 0.05) and percentage of the intercept relative to 100% analyte level was less than

2.0% for methanolic solutions (JENKE, 1996; THE UNITED, 2011b). For both diluents, data analyses followed adequate normality and homoscedasticity (p value >0.05). The hypothesis of the goodness-of-fit of the model was not rejected regardless of the diluent due to p values greater than 0.05 as shown **Tables 1.1** and **1.2**. RSD value found (1.2%) for LOQ was lower than 2.0% for SIM methanolic solutions (SHABIR, 2003).

The method selectivity is demonstrated in **Figures 1.5** and **1.6** for methanolic and dissolution medium solutions, respectively. Tablet (b) placebo constituents did not exhibit interfering peaks over (a) SIM RS retention time. Tablet (c) placebo added of SIM RS methanolic solutions also did not interfere in (a) SIM RS retention time.

Figure 1.5 – Chromatograms of (a) simvastatin reference standard, (b) tablets placebo and (c) tablets placebo added of SIM RS in methanol. Chromatographic conditions: C₈ (250×4 mm, 5 μm) 30 °C, methanol: 0.1% phosphoric acid (80:20 v/v), 1.5 mL/min, λ 238 nm, 10 μL.

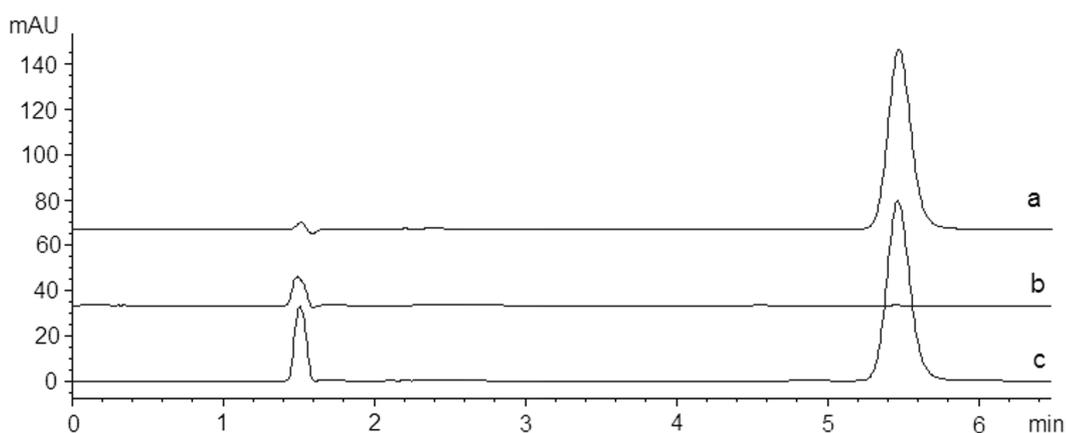
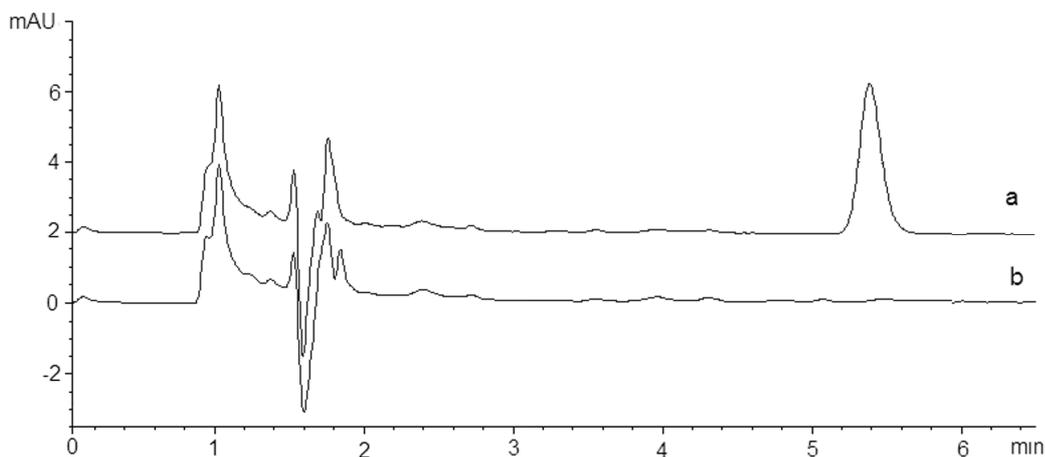


Figure 1.6 – Chromatograms of (a) simvastatin reference standard and (b) tablets placebo in dissolution medium. Chromatographic conditions: as in Figure 5. Dissolution conditions: 0.5% SDS in monobasic sodium phosphate (pH 7, 0.01 M), 900 mL, 37 °C, paddles, 150 rpm, 30 min.



The RSD values for repeatability (1.77%, 1.34%) and intermediate (2.02%, 0.55%) precision were equal or lower than the acceptance limits for methanolic and dissolution medium solutions, as shown in **Table 1.3** and **Table 1.4**, respectively (ERMER, 2001; THE UNITED, 2011b). For methanol as diluent, the effect of days in response was significant only for solutions at 40 µg/mL.

Table 1.3 - HPLC results^a of precision and recovery (%R) for SIM tablets in methanol.

Conc.	SIM, µg/mL mean (%RSD)						Recovery	
	Analyst (n=3)			n=9	Intermediate	Repeatability	(n=3)	%R
	I ^b	II						
20	19.56	19.76	20.25	19.86	(2.02)	(1.41)	20.10 (0.99)	100.5
40 ^c	39.63	38.77	38.55	38.98	(0.78)	(1.77)	39.79 (0.94)	99.5
80	78.01	77.79	77.00	77.60	(0.65)	(1.00)	79.63 (1.30)	99.5

a: conditions as in **Table 1.1**; b: in two days; c: intraday repeatability RSD 1.59% and intermediate precision RSD 1.24% (n=6, average concentration 39.20 µg/mL) for day variation.

Table 1.4 - HPLC results^a of precision and recovery (%R) for SIM tablets in dissolution medium (900 mL, 37 °C, paddles, 50 rpm, 30 min).

	SIM, µg/mL mean (%RSD)			Recovery	
	Precision		Repeatability ^c	(n=3)	%R
Intermediate (n=6)	Analyst I	Analyst II ^b			
	21.82	21.51; 21.76	(n=3)	2.20 (1.75)	99.1
Inter-day (n=12)	-	21.63 (0.55)	22.14 (1.34)	22.07 (1.12)	99.3
Inter-analyst (n=18)	21.70 (0.30)		-	33.45 (2.13)	100.4

a: HPLC conditions and dissolution medium as in **Table 1.1** and **Table 1.2**, respectively; b: in two days; c: SIM standard solutions in dissolution medium.

Recovery found values ranged from 99.5% to 100.5% for SIM methanolic solutions, attesting the usual range of acceptance for pharmaceutical products (98.0 to 102.0%) (ERMER, 2001; GONZÁLEZ *et al.*, 2010). For solutions in dissolution medium, recovery found values (99.1% to 100.4%) ranged between 95.0% and 105.0% for tablets placebo added of 2.0, 20.0 and 30.0 mg of SIM, in accordance with the USP34 criteria (THE UNITED, 2011b). These results attest the accuracy (unbiasedness) only (THE UNITED, 2011c).

Robustness statistical analysis (**Table 1.5**) showed no significant difference (α 0.05) between standardized (nominal) analytical conditions and deliberate variations. The method using HPLC can be applied in a temperature range of 20 to 40 °C with no strict column oven control and small variations in flow and organic solvent proportion do not strongly affect the results. For dissolution medium solutions

(Table 1.6), changes in the medium molarity showed greater influence (p value closer to 0.05) than variations in medium pH. Furthermore, the solutions can be analyzed regardless of endcapped (C_{8e}) or not (C₈) columns.

Table 1.5 - HPLC results of robustness for SIM tablets in methanol.

SIM Robustness (n=6) Parameters	Mean µg/mL (%)	%RSD	p value^b
Methanol ratio (%)			
78	38.80 (97.00)	0.37	0.47
80 ^a	38.91 (97.28)	0.48	
82	38.82 (97.04)	0.45	
Flow rate (mL/min)			
1.4	38.98 (97.44)	0.42	0.74
1.5 ^a	38.91 (97.28)	0.48	
1.6	38.98 (97.46)	0.45	
Temperature (°C)			
20	38.86 (97.15)	0.56	0.73
30 ^a	38.91 (97.28)	0.48	
40	38.96 (97.39)	0.52	

a: standardized (nominal) HPLC conditions C₈ (250×4 mm, 5 µm), 30 °C, methanol:0.1% phosphoric acid (80:20 v/v), 1.5 mL/min, UV/DAD λ 238 nm, 10 µL; b: statistically significant if less than 0.05.

Table 1.6 - HPLC results of robustness for SIM tablets in dissolution medium.

SIM Robustness (n=6) Parameters	Mean µg/mL (%)	%RSD	p value^c
pH			
6.5 ^a	21.78 (98.00)	1.46	0.86
7.0 ^{a,b}	21.82 (98.20)	0.93	
7.5 ^a	21.85 (98.33)	1.35	
Medium molarity			
0.005 ^a	21.72 (97.75)	1.05	0.14
0.010 ^{a,b}	21.82 (98.20)	0.93	
0.015 ^a	21.51 (96.78)	1.55	
C ₈ column			
endcapped ^b	21.56 (97.04)	1.31	0.10
non-endcapped ^{a,b}	21.82 (98.20)	0.93	

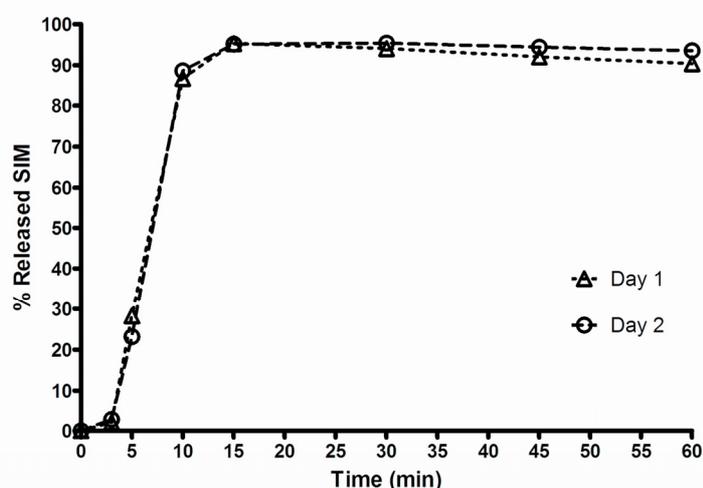
a: standardized (nominal) HPLC conditions as in Table 5; b: dissolution test nominal conditions: 0.5% SDS in monobasic sodium phosphate (pH 7, 0.01 M), 900 mL, 37 °C, paddles, 50 rpm, 30 min; c: statistically significant if less than 0.05.

A short-term stability data for SIM RS methanolic solution evaluated after 20 h at 22-24 °C showed a maximum variation of 0.55%. SIM dissolution medium solution kept at 22-24 °C showed variations equal to or greater than 2.0% after 3 h (2.0%) to 7 h (3.4%) standing in room controlled temperature. On the other hand, the maximum variation was 1.1% after 7 h under refrigeration (2-8 °C) (SHABIR, 2003). This fact

can be explained by SIM temperature sensitiveness (PIECHA *et al.*, 2010). These results indicate that SIM can be assayed under room temperature in methanolic solutions, as well as, for dissolution test. However, it is recommended that SIM solutions to be kept under refrigeration for release profile studies, which are, usually, longer tests.

Because the release profile is an important stage in the development and quality monitoring of the pharmaceutical products, C_{8e} (A_s 1.00, %RSD 0.12) was preferred rather than a C_8 , (A_s 1.20, %RSD 0.32), since more symmetric peaks were obtained (SNYDER *et al.*, 1997). In addition, a HPLC method was chosen for SIM tablets dissolution studies due to improved analytical sensitivity and reduced interference from excipients, without any sample treatment. Contrastingly, a method using UV spectrophotometric is described in international compendia for SIM tablets monograph, in which a sample preparation (centrifugation with pre-washed manganese dioxide) is required after SIM dissolution test, before drug quantitation (BRITISH, 2011b; THE UNITED, 2011a). Zocor® rapidly dissolving tablets release profile (**Figure 1.7**) was greater than 85% in 10 min. The RSD precision values between days for time points above 85% drug release (10, 12, 15, 30, 45 min) and below (8 min) were less than 5% and 10%, respectively (THE UNITED, 2011b). Time points 3 and 5 min were not considered because of high RSD values (>20%) found for six units tested each day. These results attest that proposed method is adequate for SIM tablets in vitro release studies.

Figure 1.7 – SIM 20 mg tablets (n=6) release profiles in different days (n=2). Conditions: 0.5% SDS in monobasic sodium phosphate (pH 7, 0.01 M), 900 mL, 37 °C, paddles, 50 rpm for 45 min, 150 rpm for 15 min. Chromatographic conditions: as in Figure 1.2b.



In summary, the proposed RP-HPLC method advantages are the lower cost (50% less than ACN) and the absence of sample treatment after dissolution test compared to the UV method (BRITISH, 2011b; THE UNITED, 2011a). In addition, it presented a low total run time (7.4 min) in isocratic elution, high selectivity towards SIM and LOV (SIM synthesis route precursor) degradation products in a wide concentration range (0.04-0.80 μg equivalent to 4-80 $\mu\text{g/mL}$), with similar backpressure regarding ACN use (125 *versus* 130 bar). Furthermore, a liquid chromatographic method had not yet been applied to SIM tablets using official dissolution test conditions (BRITISH, 2011b; THE UNITED, 2011a).

4 Conclusion

An alternative validated method using RP-HPLC was successfully applied for SIM assay, as well as, for dissolution test and profile studies in tablets. The method demonstrated to be fast, simple, feasible and affordable when challenged for robustness either in assay conditions, especially for temperature, or in dissolution conditions, after buffer molarity and pH variations.

Acknowledgments

The authors acknowledge Fapemig and CAPES for funding sources.

PARTE 2

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A RP-HPLC METHOD FOR SIMVASTATIN CAPSULES

Flávia Dias Marques-Marinho, Bruna Diniz Freitas, José Carlos da Costa Zanon, Ilka Afonso Reis, Angélica Alves Lima, Cristina Duarte Vianna-Soares

Abstract

Simvastatin, a lipid-lowering agent of the statins class, is widely used in the treatment of hypercholesterolemia and in the prevention of cardiovascular diseases. Currently, simvastatin is available in the global market in both tablet and capsule forms. No official method has been reported for the assaying or dissolution testing of simvastatin capsules. Dissolution specifications were established to evaluate *in vitro* release studies for simvastatin capsules in this work. Adequate dissolution test conditions were obtained with 0.5% sodium dodecyl sulfate in 0.01 M monobasic sodium phosphate buffer at pH 7.0±0.05 (900 mL), and paddle agitation at 75 rpm for 45 min was used to investigate the immediate release of simvastatin capsules. Simvastatin quantified in the dissolution medium for capsules using the developed HPLC method, showed $R^2 > 0.98$, specificity (no placebo interference), precision (%RSD <5), recovery (95.0 to 105.0%) and robustness for deliberate changes in the buffer molarity and pH of the media and for different C_8 columns (p value >0.05) according to the USP (2011) criteria. This work highlights the need to develop suitable dissolution conditions to establish criteria for the analysis of immediate release solid oral dosage form. The developed HPLC simvastatin quantitation method does not require the previous treatment of aliquots with manganese oxide, as described in the US Pharmacopeia and in the British Pharmacopoeia for ultraviolet spectroscopic methods.

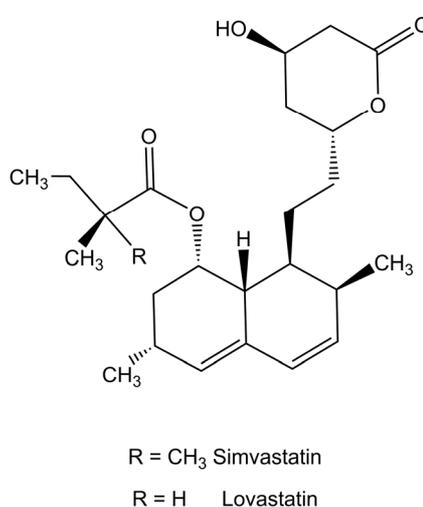
Keywords Capsules, Dissolution validation, Liquid chromatography, Reversed-phase, Simvastatin.

1 Introduction

Simvastatin (2,2-dimethyl-,1,2,3,7,8,8a-hexahydro-3,7-dimethyl-8-[2-tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl)ethyl]-1-naphthalenyl ester [1S-[1a,3a,7b,8b(2S*,

4S^{*}),8ab]] butanoic acid) is a lipid-lowering agent of the statins class. It competitively inhibits HMG-CoA reductase and interferes in the biosynthesis of cholesterol; SIM is therefore used in the treatment of hypercholesterolemia and in cardiovascular diseases prevention (O' NEIL *et al.*, 2006; THE 4S, 1994; THE UNITED, 2011a). It is administered as a pro-drug in lactone form and is semi-synthetically obtained from LOV. Thus, LOV, **Figure 1.8**, can be found as an impurity in SIM (DAVIDSON & TOTH, 2004; ISTVAN, 2003; MANZONI & ROLLINI, 2002; THE UNITED, 2011a).

Figure 1.8 - Simvastatin and lovastatin chemical structures.



SIM, which is a white crystalline powder, melts from 135 °C to 138 °C. It is a lipophilic drug with an octanol/water partition coefficient, log P, of 4.68, which imparts this compound with a high biological membrane permeability. However, it is a drug with low aqueous solubility (0.03 g/l) (MOFFAT *et al.*, 2004; O' NEIL *et al.*, 2006).

Currently, SIM is available in the global market as tablets and capsules (VERONIN & NGUYEN, 2008). The majority of SIM determination reports for immediate-release solid oral dosage forms have been applied in tablets using visible (BASAVIAH & THARPA, 2008; THARPA *et al.*, 2010), UV spectrometry (ARAYNE *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2009; MILLERSHIP & CHIN, 2010; WANG & ASGHARNEJAD, 2000) and/or LC (ABU-NAMEH *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2009; GUZIK *et al.*, 2010; VERONIN & NGUYEN, 2008; WANG & ASGHARNEJAD, 2000). The latter method is the most commonly reported technique (63% of the studies) because of its feasibility of being coupled to several detectors (BASNIWAL & JAIN, 2012). Furthermore, UV spectroscopy (BALAJI & SUNITHA, 2010; JAIN *et al.*, 2009;

MANE *et al.*, 2011; MOUSSA *et al.*, 2010; PALABIYIK *et al.*, 2008; RAJPUT & RAJ, 2007; SOURI & AMANLOU, 2010), LC (ASHFAQ *et al.*, 2007, 2008; CHAUDHARI *et al.*, 2007b; HEFNAWY *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2008; KUMAR D. A. *et al.*, 2009; OZALTIN & UCAKTURK, 2007; PASHA *et al.*, 2006), LC-MS (KUMAR V. *et al.*, 2008), high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) (RATHINARAJ *et al.*, 2010a; TIWARI & SATHE, 2010), MEKC (SRINIVASU *et al.*, 2002; YARDIMCI & OZALTIN, 2010) and other techniques have also been described in an extensive review (BASNIWAL & JAIN, 2012) of the methods for the quantitative determination of SIM in the presence of other drug(s). In addition, the use of LC-UV and LC-MS/MS has also been reported for the quantification of SIM impurities (BHATIA *et al.*, 2011; MALENOVIC *et al.*, 2006) and degradation products (OLIVEIRA *et al.*, 2010). However, few studies on SIM quantitation in capsules have been reported. Methods that involve UV spectroscopy (POLONINI *et al.*, 2011) and high-performance liquid chromatography (HPLC) (MARKMAN *et al.*, 2010; VERONIN & NGUYEN, 2008), as well as SIM tablet pharmacopeial HPLC methods (BARACAT *et al.*, 2009; THE UNITED, 2011a), have been applied toward the assay of SIM in capsules. In the USP tablet dissolution test based on UV spectroscopy, a laborious aliquot treatment is described. This and other UV methods have also been employed for capsules (BARACAT *et al.*, 2009; BRITISH, 2011b; MARKMAN *et al.*, 2010; SINGLA N. *et al.*, 2009; THE UNITED, 2011a; VERONIN & NGUYEN, 2008).

Currently, pharmacopeial methods for SIM assays or dissolution tests for tablets but not for capsules have been reported (BRITISH, 2011b; EUROPEAN, 2011; FARMACOPEIA, 2010; THE INTERNATIONAL, 2006; THE JAPANESE, 2006; THE UNITED, 2011a). Nevertheless, HPLC-UV has been used for both assays and dissolution tests of SIM tablets (GUZIK *et al.*, 2010; WANG & ASGHARNEJAD, 2000). *In vitro* dissolution studies are important for product development and manufacturing process control because they help detecting problems that could affect the drug's *in vivo* performance. Consequently, these studies are frequently required by regulatory authorities (FOOD, 1997; O'HARA *et al.*, 1998). In this work, dissolution studies of SIM capsules were performed using a developed/validated HPLC method. Furthermore, this method can also be applied to assay SIM capsules to determine content uniformity.

2 Material and methods

2.1 Chemical and reagents

USP simvastatin RS (lot I0D382, label claimed 99.4% purity, U.S. Pharmacopeia, Rockville, MD, USA) and lovastatin pharmaceutical grade generously donated by Pharma Nostra (lot 07061205A, 99.9% purity, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were used. Simvastatin 20 mg (A) capsules and its placebo that contained lactose and B₂ vitamin were acquired from a university compounding pharmacy (UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil) and used for validation. Compounded simvastatin 20 mg (B) capsule lots that contained either lactose with β -cyclodextrin (prepared in-house, SIM: β CD 1:1 ratio) or butylhydroxytoluene (BHT) (C1 and C2, prepared by a commercial compounding pharmacy). Methanol was HPLC grade (Tedia, Fairfield, OH, USA). Sodium dodecyl sulfate (Pharmacopeia Ativos Magistrais, Barueri, SP, Brazil), sodium hydroxide (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), monobasic sodium phosphate (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and phosphoric acid (85%, Merck, Darmstadt, Germany), were analytical grade and used as received. Distilled or ultrapurified water (Direct-Q3, Millipore, Bedford, MA, USA) was used when necessary.

2.2 Instrumentation

A DT80 (Erweka, Heusenstamm, Germany) dissolution test system was employed with paddles (USP apparatus 2) and sinkers (Flowscience, Cotia, SP, Brazil) to keep capsules in the vessel bottom. The aqueous dissolution medium consisted of 0.5% SDS (30 g) in 0.01 M monobasic sodium phosphate (8.28 g) diluted to a final volume of 6 L with water. The pH was adjusted to 7 with sodium hydroxide 40% v/v; the pH values were measured using a digital pH meter (827 pH lab, Metrohm, Herisau, Switzerland) (THE UNITED, 2011a). The dissolution medium was degassed for 30 min (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brazil) before being transferred to the vessels (900 mL, 37 \pm 0.5 °C). After the dissolution test (45 min) or the release-profile specific times (3, 5, 8, 10, 12, 15, 30, 45 or 60 min), aliquots of 5.0 mL or 3.0 mL were withdrawn with no media replacement.

A quaternary LC system (HP1200, Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with an automatic injector, a column oven and a DAD module was used. Internal Agilent ChemStation software version Rev.B.02.01-SR1 was used for data acquisition. The

method was performed using a LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100RP-8 non-endcapped column or a 100RP-8e endcapped (5 μm) column (Merck, Darmstadt, Germany) maintained at 30 °C. The UV/DAD was set at λ 238 nm, and the automatic injector was set at 10 μL . A mobile phase that consisted of a mixture of methanol and 0.1% phosphoric acid (80:20 v/v, pH 3.25) was used at a flow rate of 1.5 mL/min, and the backpressure was approximately 120 bar. All solutions were filtered through a 0.45 μm membrane filter (Minisart RC15 Sartorius, Göttingen, Germany) before they were injected into the chromatograph. The statistical R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used to evaluate the plot equation model, normality and homoscedasticity ($\alpha=0.05$) using a weighted least-squares method and the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). The lack-of-fit test was used to check the goodness-of-fit of the models. Previously, the analysis of the studentized residuals (after standardization) was used to remove, if necessary, the outliers (residues equal or greater than 3.0). P values less than 0.05 were considered statistically significant. SIM concentration adjustments were made after aliquot withdrawals for data analysis.

2.3 Standard solution preparation

A 200 $\mu\text{g/mL}$ SIM methanolic stock solution prepared by accurately weighing 20 mg of SIM RS into a 100 mL volumetric flask was used to obtain SIM methanolic standard solutions ($n=3$) at 4, 20, 40, 60 and 80 $\mu\text{g/mL}$.

A 100 $\mu\text{g/mL}$ SIM stock solution in dissolution medium (0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate pH 7) was obtained by accurately weighing 10 mg of SIM RS into a 100 mL volumetric flask, dissolving the solid, and subsequently diluting to concentrations of 2, 10, 18, 26 and 34 $\mu\text{g/mL}$ as SIM standard solutions ($n=3$).

A 22.2 $\mu\text{g/mL}$ SIM standard dissolution medium (100% working concentration) was prepared by dissolving accurately weighed 5.55 mg SIM RS in a 25 mL volumetric flask; the solid was dissolved and subsequently diluted 10-fold in a 10 mL volumetric flask with the same diluent.

All solutions were analyzed within 5 h after they were prepared.

2.4 Sample solution preparation

Placebo and sample (20, 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$) methanolic solutions were prepared in triplicate by accurately weighing placebo or capsule ($n=10$) powder equivalent to one average weight (placebo) or to SIM 10, 20 or 40 mg (sample) in 50 mL volumetric flasks. The samples were sonicated for 10 min after 25 mL of methanol was added, and the samples were diluted to their final volume with the same diluent. Filtered aliquots of 5.0 mL were transferred to 50 mL volumetric flask and diluted with methanol. For content uniformity, dilutions were proceeded accordingly ($n=10$).

Placebo or sample solutions in dissolution medium were obtained by transferring accurately weighed amounts of the placebo mixture (equivalent to one average weight) or one capsule, respectively, placed in vessels that each contained 900 mL dissolution medium at adequate temperature. Aliquots were withdrawn after a specified test time.

2.5 Short-term stability study

SIM methanolic standard and sample solutions (40 $\mu\text{g/mL}$), which were stored at room temperature (22-24 $^{\circ}\text{C}$), were analyzed each hour for 20 h. The dissolution-medium SIM standard and sample solutions (22.2 $\mu\text{g/mL}$), which were stored at room temperature, were analyzed after 8 h and 24 h. In addition, the stability of aliquots post-dissolution (37 $^{\circ}\text{C}$, 900 mL, 75 rpm, 45 min) was checked at room (22-24 $^{\circ}\text{C}$) and refrigerated (2-8 $^{\circ}\text{C}$) temperatures each hour for 8 h for purposes of comparison.

2.6 System suitability

SIM standard solutions in methanol (40 $\mu\text{g/mL}$) and in dissolution medium (22.2 $\mu\text{g/mL}$) were injected ($n=6$) into the chromatograph to determine SIM peak areas, retention times (t_R) and chromatographic relative standard deviation (%RSD). The retention factor (k), theoretical plates (N), tailing (T_f) and peak asymmetry (A_s) chromatographic parameters were also evaluated.

2.7 HPLC validation

A methanolic calibration plot was constructed for the SIM range of 4 to 80 $\mu\text{g/mL}$ to allow an assessment of the assay/content uniformity, and the plot equation was used for SIM quantitation. The regression and intercept p values, the determination coefficient (R^2) and the %RSD were evaluated for C_8 non-encapped and C_{8e} encapped columns. The LOD and LOQ were determined ($n=3$) by successive dilutions of the lowest calibration plot point.

Selectivity was evaluated by comparison of the chromatograms of a SIM methanolic standard solution (40 $\mu\text{g/mL}$) and a placebo capsule (B_2 vitamin and lactose). Repeatability and intermediate precision for SIM capsule methanolic solutions at 20, 40 and 80 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$) were performed in three days and by a single analyst on the third day. Recovery was determined through the addition of SIM RS (40 mg) to a placebo capsule mass (equivalent to two average weights) in a 50 mL volumetric flask using methanol as the diluent. The solution was subsequently diluted to 400 $\mu\text{g/mL}$ in methanol by pipetting 25 mL of the methanolic solution into a 50 mL volumetric flask. Aliquots of this solution were transferred to 25 mL volumetric flasks and were diluted with methanol to obtain concentrations of 50%, 100% and 200% of the working concentration (40 $\mu\text{g/mL}$). SIM recovery was determined according to the equation $\%R=[C_P/C_S]\times 100$, where C_P is the concentration in a spiked solution of placebo, and C_S is the concentration of the standard solution. The robustness was verified through variation of the methanol ratio ($\pm 2\%$), flow rate (± 0.1 mL/min) and temperature (± 10 °C) for SIM standard and capsule methanolic solutions at 40 $\mu\text{g/mL}$ ($n=6$). %RSD values for precision and robustness data were calculated by ANOVA one-way, at a significance level α 0.05.

2.8 Dissolution method validation

Dissolution calibration plots in the SIM range of 2 to 34 $\mu\text{g/mL}$ were constructed on two different days to evaluate parallelism. The intercept, R^2 and %RSD were calculated. The plot equation was used for SIM quantitation after the dissolution validation studies. The LOD and LOQ were determined ($n=3$) by successive dilutions of the lowest calibration plot point.

Selectivity was verified by transferring a placebo mass equivalent to one average weight, an empty capsule and a sinker into vessels ($n=3$) that contained

900 mL of dissolution medium (pH 7.0±0.05, 37±0.5 °C) agitated by paddles at 150 rpm for 45 min. The placebo interference was evaluated by comparison with a chromatogram of SIM RS 2 µg/mL, and the peak purity was confirmed by UV-DAD.

Repeatability and intermediate precision were evaluated, respectively, by preparing 22.2 µg/mL SIM standard solutions in dissolution medium (n=3) and submitting capsules (n=6) to dissolution tests (0.5% SDS in monobasic sodium phosphate, 900 mL, pH 7.0±0.05, 37±0.5 °C, paddle, 75 rpm, 45 min) on two days by each analyst (n=2).

Recovery was evaluated by the addition of SIM RS in three different amounts (2, 20 and 30 mg) to a capsule placebo (amount equivalent to one average weight) in vessels (n=3, each amount) that contained dissolution medium (900 mL, pH 7.0±0.05, 37±0.5 °C) under dissolution test conditions. Robustness was determined by submitting SIM capsules (n=6) dissolved in the dissolution medium (900 mL, paddle, 75 rpm, 45 min) at different molarities (0.005 and 0.015 M, prepared by weighing 4.14 and 12.42 g, respectively) and two different pH levels (6.5 and 7.5). The C₈ endcapped column was also tested. %RSD values for precision and robustness data were calculated by ANOVA one-way at a significance level α 0.05.

3 Results

The 40 µg/mL SIM solution was eluted by HPLC-UV in different methanol:0.1% phosphoric acid ratios (75:25, 80:20, 85:15 and 90:10 v/v). SIM *k* values close 2.0 were obtained using mobile phases with 80:20 (*k* 3.54) and 85:15 (*k* 1.79) ratios (SNYDER *et al.*, 1997). The chromatographic selectivity for SIM and LOV (40 µg/mL and 20 µg/mL, each in methanol and in dissolution medium, respectively) was immediately evaluated and was evaluated again five days later at room temperature, as shown in **Figure 1.9**.

The short-term stability of the percentual SIM variation in methanolic solutions at room temperature and in dissolution medium maintained at room temperature and under refrigeration are shown in **Table 1.7**. The system suitability results are expressed in %RSD for SIM RS solutions in both diluents (**Table 1.8**). The calibration plots were obtained from the weighted least-squares regression method (linear

regression model that considers variances *versus* mean responses in each concentration) using C_8 or C_{8e} columns. The results are shown in **Table 1.9**.

The LOD (0.4 $\mu\text{g/mL}$) and LOQ (1.0 $\mu\text{g/mL}$, %RSD 1.2) of the SIM RS methanolic solution are depicted in the chromatograms in **Figure 1.10**. The method selectivity for the capsule and placebo constituents is demonstrated in **Figure 1.11**.

Figure 1.9 - Preliminary chromatograms of SIM and LOV solutions prepared in methanol and in dissolution medium (0.5% SDS in monobasic sodium phosphate, pH 7, 0.01 M) after being stored for 5 days at room temperature; the elutions were performed using methanol:0.1% phosphoric acid (a, b) 85:15 v/v and (c, d) 80:20 v/v, respectively, as the mobile phase (1.5 mL/min, C_{8e} column (250 \times 4 mm, 5 μm), 30 $^\circ\text{C}$, λ 238 nm, 10 μL).

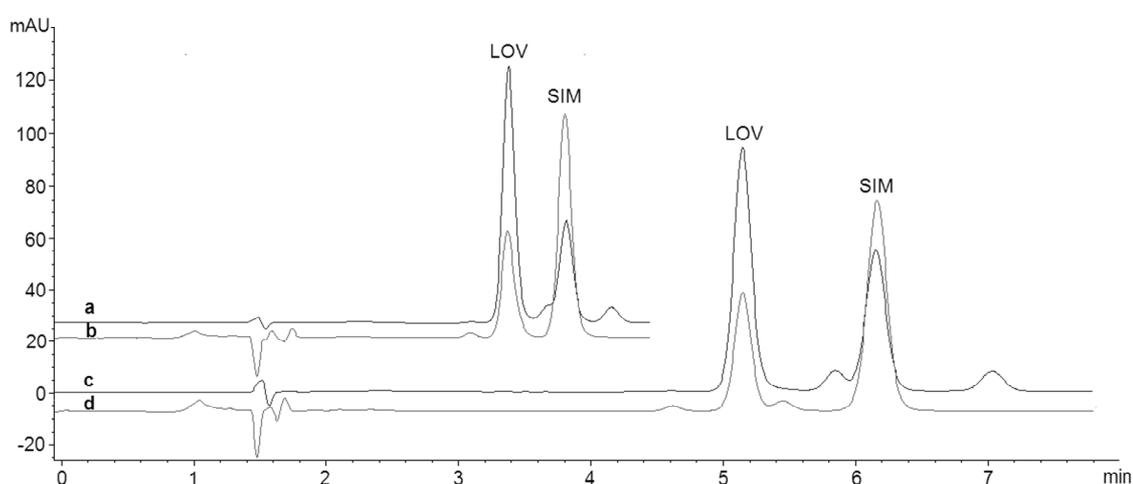


Table 1.7 - Short-term time stability (% response variation, by HPLC^a) results for SIM standard and capsule sample solutions prepared in methanol or in dissolution medium and maintained at different temperatures.

SIM solution	Short-term time stability (HPLC % response variation) in diluents			
	Methanol	Dissolution medium ^b		
		Without test	With test	
	22-24 $^\circ\text{C}$	22-24 $^\circ\text{C}$	22-24 $^\circ\text{C}$	2-8 $^\circ\text{C}$
Standard	20 h (0.5%)	24 h (0.6%)	8 h (0.9%)	8 h (0.5%)
Capsules sample	3 h (1.3%)	24 h (0.9%)	5 h (2.0%)	8 h (0.5%)

a: C_8 (250 \times 4 mm, 5 μm), 30 $^\circ\text{C}$, methanol: 0.1% phosphoric acid 80:20 v/v, 1.5 mL/min, λ 238 nm, 10 μL ; b: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7.

Table 1.8 - Chromatographic system suitability for SIM standard in different diluents.

Diluent	Average values (%RSD, n=6)					
	Area (mAU)	t_R (min)	k	N	T_f	A_s
Methanol	910.0 (0.47%)	5.42 (0.05%)	2.67 (1.36%)	5999 (0.82%)	1.13 (0.25%)	1.16 (0.48%)
Dissolution medium	482.1 (0.10%)	5.29 (0.02%)	4.43 (0.03%)	6551 (1.18%)	1.15 (0.26%)	1.19 (0.46%)

Conditions in **Table 1.7**.

Table 1.9 - Results of the adjusted regression model for SIM determination (n=3) in methanol by HPLC^a using C₈ and C_{8e} endcapped (250×4 mm, 5 μm) columns.

Column	Equation (R ² >0.9999)	RSD (%)	p value ^c		Normality (p value ^c)	Homoscedasticity (p value ^c)
			Regression	Lack-of-fit		
C ₈	0.008x ² +22.374x +0.206 ^b	0.72	7.92×10 ⁻²³	0.24	0.97 (0.85)	0.23 (0.92)
C _{8e}	0.012x ² +22.184x -0.180 ^b	0.47	1.23×10 ⁻²²	0.23	0.97 (0.81)	0.49 (0.74)
Single curve	0.010x ² +22.276x -0.146 ^b	0.63	3.04×10 ⁻⁴⁸	0.05 ^d	0.95 (0.20)	0.55 (0.69)

a: conditions as in **Table 1.7**; b: intercept p value = 0.79; c: statistically significant if less than 0.05; d: statistically inconclusive.

Figure 1.10 - Chromatograms for SIM RS methanolic solutions at LOQ=1.0 μg/mL and at LOD=0.4 μg/mL using a C₈ (250×4 mm, 5 μm) column (30 °C, methanol:0.1% phosphoric acid (80:20 v/v), 1.5 mL/min, λ 238 nm, 10 μL).

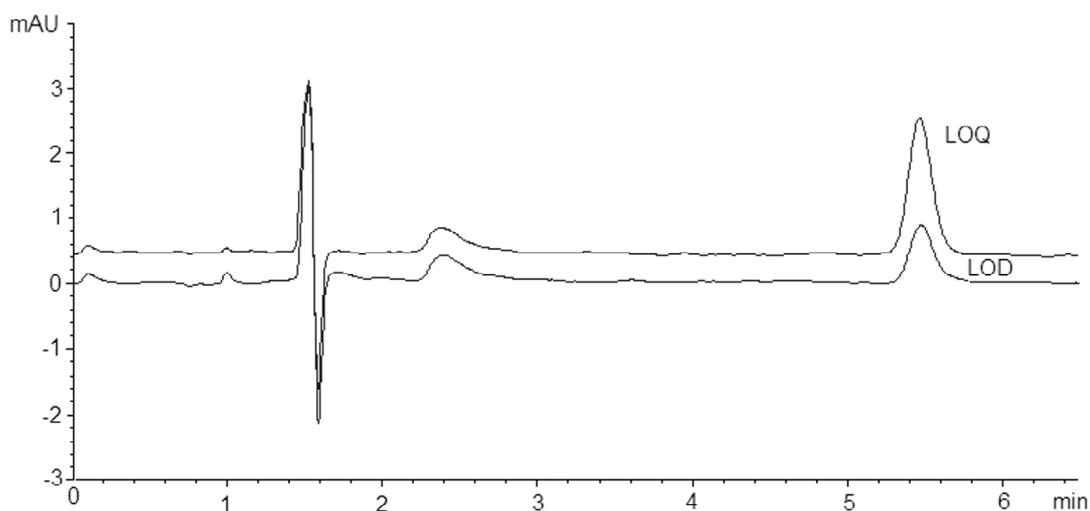
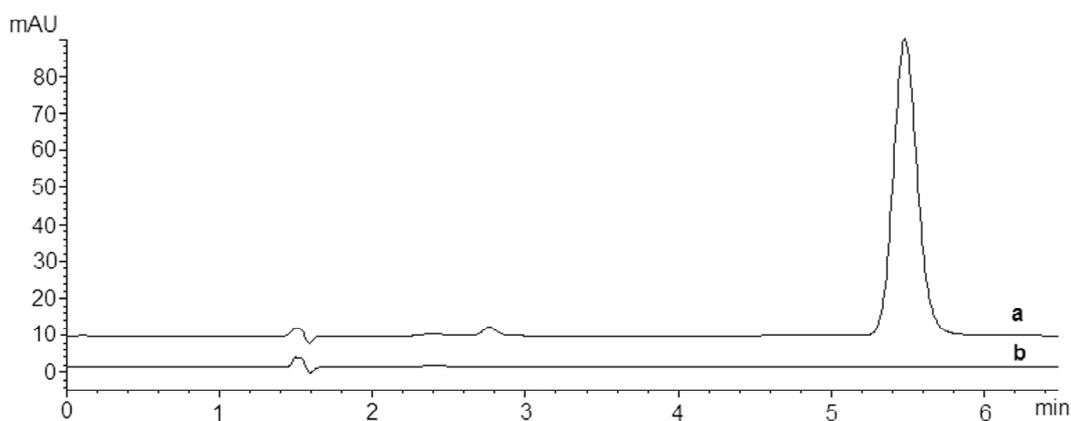


Figure 1.11 - Chromatograms for (a) the SIM reference standard and (b) the placebo capsules. The conditions were the same as those described in Figure 1.10.



The precision, recovery and robustness validation results for the HPLC method are presented in **Table 1.10**.

Table 1.10 - HPLC^a validation results of precision, accuracy (unbiasedness) and robustness for 20 mg SIM capsules.

Analyst (n=3)	Average SIM, µg/mL (%RSD)								
	Precision			Recovery (n=3)		Robustness, SIM 40 µg/mL (n=6)			
	20	40	80	Conc.	%	Variation	MeOH (80±2%)	mL/min (1.5±0.1)	° C (30±10)
I ^b	19.2	38.1	75.3	20.2	100.8	Inferior	37.9	37.6	37.8
I ^c	19.1	38.0	75.0	(0.98)		(1.01)	(0.71)	(0.57)	
II ^b	19.6	37.4	73.6	40.4	101.1	Nominal ^a	37.9	37.7	38.0
(n=9)	19.3	37.8	74.6	(0.30)		(0.61)	(0.72)	(0.84)	
Intermediate	(1.80)	(1.17)	(1.50)	80.1	100.1	Superior	37.9	37.7	37.7
Repeatability	(0.83)	(0.55)	(0.66)	(0.21)		(0.69)	(0.77)	(0.55)	
-	-	-	-	-	-	p value ^d	0.99	0.93	0.19

a: chromatographic conditions C₈ (250×4 mm, 5 µm), 30 °C, methanol: 0.1% phosphoric acid 80:20 v/v, 1.5 mL/min, λ 238 nm, 10 µL; b: day 1; c: day 2; d: statistically significant if less than 0.05.

In the preliminary dissolution study (n=6 vessels) in which two agitation speeds were used, the %RSD for time profile points (10, 12, 15, 30, 45 and 60 min) were ≥5.56 and ≤5.04 at 50 and 75 rpm, respectively. **Table 1.11** presents the linearity results obtained using a weighted least-squares method after two residues (6.6%) were removed, which accounts for less than the maximum allowed value (22%) of the data (HORWITZ, 1995).

The LOD and LOQ for SIM RS in dissolution medium were 0.4 µg/mL and 0.6 µg/mL (%RSD 0.80), respectively, as exhibited in **Figure 1.12**. The method selectivity for SIM in dissolution medium is depicted in **Figure 1.13**. The accuracy (unbiasedness) or recovery, precision and robustness validation results for dissolution tests performed using HPLC are shown in **Table 1.12**.

Table 1.11 - Results of the adjusted regression model (p value 2.2×10^{-16}) for the determination of SIM (n=3) in dissolution medium by HPLC^a using a C₈ column.

Day	Curve equation (R ² >0.999)	RSD (%)	p value		Normality (p value)	Homoscedasticity (p value)
			Intercept	Lack-of-fit		
1	21.549x+0.013	0.30	0.97	0.11	0.94 (0.44)	0.21 (0.92)
2	21.453x+0.178	0.17	0.60	0.36	0.97 (0.87)	0.32 (0.86)
Single curve	21.526x+0.107	0.29	0.68	0.12	0.94 (0.13)	2.10 (0.11)

a: conditions as in **Table 1.7**.

Figure 1.12 - Chromatograms for SIM RS in dissolution medium (0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7) at 0.6 µg/mL (LOQ) and at 0.4 µg/mL (LOD). Conditions as described in Figure 1.10.

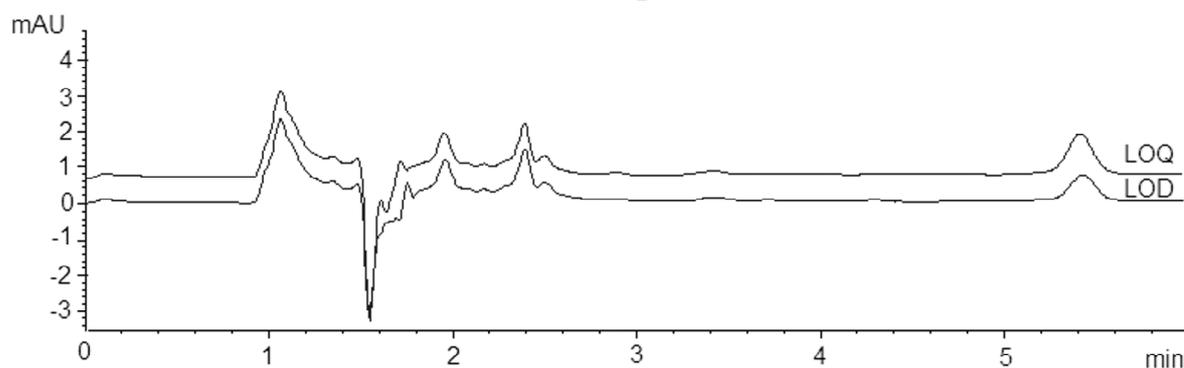


Figure 1.13 - Chromatograms after dissolution tests for (a) a SIM reference standard and (b) a placebo capsule. Dissolution conditions: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7, 900 mL, 37 °C, paddles, 150 rpm for 45 min. The HPLC conditions were the same as those described in Figure 1.10.

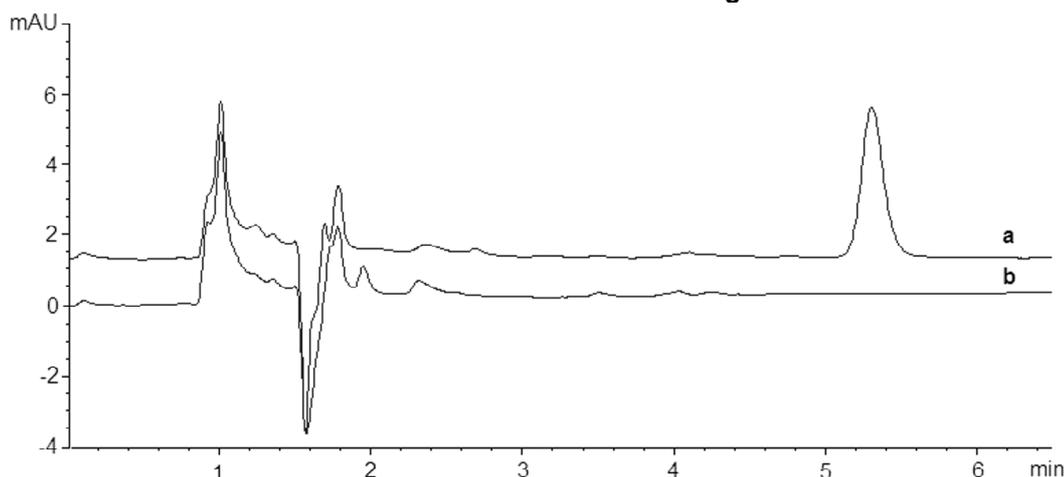


Table 1.12 - Dissolution test^a validation results of unbiased accuracy (recovery, R), precision^c and robustness for 20 mg SIM capsules by HPLC^b.

Accuracy (unbiased, n=3)		Average SIM, mg (%RSD)				Robustness (n=6)				
Mass added	R	%R	Intermediate precision (n=6)		Parameters	Variation			p value ^e	
			Day	Analyst		Inferior	Nominal ^a	Superior		
2	2.0 (0.46)	99.9	1	20.6	20.1	Molarity (0.01±0.005)	19.2	19.5	19.4	0.46
			2	20.2	20.3		(1.76)	(1.16)	(2.42)	
20	20.1 (0.52)	100.7	Inter-day (n=12)	20.4 (0.77)	20.2 (1.22)	pH (7.0±0.5)	19.3	19.5	19.3	0.72
							(2.08)	(1.16)	(2.89)	
30	29.4 (0.38)	98.1	Inter-analyst (n=24)	20.3 (2.08)		C ₈ /C _{8e} ^d column	-	19.3/19.4 ^d (1.78/1.65)	-	0.54

a: dissolution test nominal conditions: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7, 900 mL, 37 °C, paddles, 75 rpm, 45 min; b: conditions in **Table 1.7**; c: repeatability RSD was 1.34% for the SIM standard solutions (n=3, average concentration 22.14 µg/mL); d: endcapped column variation; e: statistically significant if less than 0.05.

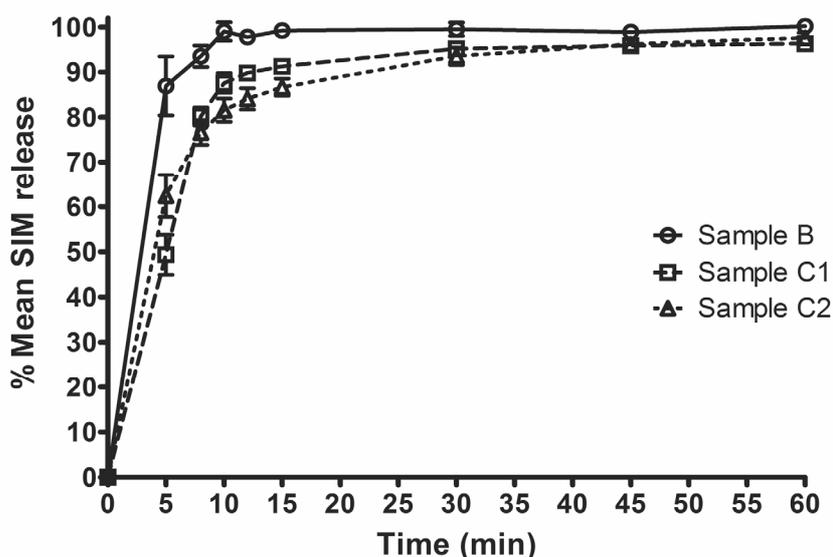
Table 1.13 shows the quality-control results for 20 mg SIM capsule samples (B, C1, C2); their dissolution profiles are shown in **Figure 1.14**.

Table 1.13 - Quality control tests results for three 20 mg compounded SIM capsules by HPLC-UV.

Capsule sample	Assay % average (RSD ^a)	Content uniformity % average±SD ^b (AV ^c)	Dissolution % average (RSD ^a)
B	98.33 (0.53)	100.06±3.18 (7.65)	100.16 (2.75)
C1	94.18 (0.49)	97.12±4.97 (13.32)	91.77 (5.92)
C2	100.06 (0.26)	100.98±4.97 (11.92)	98.96 (6.44)

a: RSD, relative standard deviation; b: SD, standard deviation; c: AV, acceptance value ≤15.0.

Figure 1.14 - Release profiles of 20 mg compounded simvastatin capsules (n=6) for samples B, C1 and C2. Dissolution conditions: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate, pH 7, 900 mL, 37 °C, paddles, 75 rpm for 45 min, 150 rpm for 15 min. The HPLC conditions were the same as those described in Figure 1.10.



4 Discussion

The literature contains numerous reports of SIM quantitation; however, few analytical methods have been developed for SIM capsules (MARKMAN *et al.*, 2010; POLONINI *et al.*, 2011). Most common mobile phases have been composed of an aqueous phase and an acetonitrile organic phase (ABU-NAMEH *et al.*, 2006; ASHFAQ *et al.*, 2007, 2008; BARACAT *et al.*, 2009; BHATIA, *et al.*, 2011; BRITISH, 2011a,b; CHAUDHARI *et al.*, 2007b; EUROPEAN, 2011; GOMES *et al.*, 2009;

HEFNAWY *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2008; KUMAR D. A. *et al.*, 2009; KUMAR V. *et al.*, 2008; MARKMAN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; OZALTIN & UCAKTURK, 2007; PASHA *et al.*, 2006; THE UNITED, 2011a; VERONIN & NGUYEN, 2008; WANG & ASGHARNEJAD, 2000). Because of the worldwide shortage of acetonitrile in 2008-2009, this solvent was substituted with less-expensive methanol in this study. A previous study on the dissolution of SIM tablets described a gradient elution with a methanol:water mobile phase (70:30 to 97:3 v/v, 1.5 mL/min, C₁₈ 250×4.6 mm, 5 μm, 40 °C, λ 238 nm, 20 μL) that showed a delayed SIM peak at approximately 9.0 min (GUZIK *et al.*, 2010). Methanol and potassium phosphate buffer (90:10 v/v) as the mobile phase has been reported to separate SIM and nicotinic acid in tablets (BASNIWAL & JAIN, 2012).

Because of the lack of data specific to SIM capsules, tablet dissolution conditions have been adopted (BARACAT *et al.*, 2009; BRITISH, 2011b; MARKMAN *et al.*, 2010; SINGLA N. *et al.*, 2009; THE UNITED, 2011a; VERONIN & NGUYEN, 2008), for which an HPLC method was developed and validated for assays and dissolution tests of SIM capsules. Although UV spectroscopy is usually the preferred method for dissolution studies, HPLC was chosen because it allows the in-line prior separation of SIM and LOV (SIM synthesis route precursor) (THE UNITED, 2011b). This prior separation would not be possible with UV spectroscopy because the SIM and LOV moieties show the same chromophoric group. Thus, SIM quantitation could be overestimated in a sample that contained a significant amount of LOV (THE UNITED, 2011a). **Figure 1.9** shows the results of this method development for two mobile phases (methanol and aqueous 0.1% acid phosphoric (85:15 and 80:20 v/v ratio)); this figure shows the LOV and SIM profiles in the same chromatogram and the selectivity under the same UV detection parameters. The latter 80:20 v/v ratio (1.5 mL/min, 30 °C, λ 238 nm) was selected for subsequent tests because it provided the best chromatographic resolution (with no overlapping peaks) for SIM, LOV and their respective degradation products in methanol and in dissolution medium as diluents. Under such conditions, the SIM elution profile showed a lower retention time of approximately 5.5 min for SIM capsules.

The SIM standard and the sample methanolic solutions stored at 22-24 °C remained stable for at least 20 h and 3 h, respectively; the short-term stability tests showed a percentual response variation not more than 2% (**Table 1.7**) (SHABIR, 2003). Thus, the methanolic solutions proved to be sufficiently stable to allow assay

or content uniformity tests to be performed. These results suggest that SIM undergoes faster degradation in methanol in the presence of placebo constituents.

The SIM (standard or sample) solutions in dissolution medium were stable for 24 h at 22-24 °C. When SIM RS and SIM capsule solutions were stored at 22-24 °C after the dissolution test, they were stable for 8 h and 5 h, respectively. The same solutions kept at 2-8 °C were stable for at least 8 h. The SIM sample solutions are more sensitive to temperature than are the isolated drug (PIECHA *et al.*, 2010). Satisfactory percentual response variations (<2%) were obtained at the temperatures and times mentioned in **Table 1.7** (SHABIR, 2003). These results suggest that SIM capsule solutions should be stored cold after dissolution studies when chromatographic analyses last longer than 5 h.

System suitability was checked by evaluation of the peak area and the t_R ; the %RSD values were less than 1.0% and 2.0% for SIM in methanol and in dissolution medium, respectively. The column efficiency ($N > 2000$), SIM peak shape ($T_f < 2.0$; $A_s < 1.2$) and elution retention factor ($k > 2$) exhibited acceptable values for SIM in both diluents (**Table 1.8**) (SHABIR, 2003; SNYDER *et al.*, 1997; THE UNITED, 2011b).

The concentration-response relationship of the SIM methanolic solutions was satisfactorily expressed by the weighted (linear regression model that considers variances *versus* mean responses in each concentration) least-squares method (no residue removal), irrespective of the column capping (ROZET *et al.*, 2007). A quadratic behavior with a significant regression ($R^2 > 0.999$, %RSD < 1.0), an intercept not significantly different from zero ($p > 0.05$) and adequate homoscedasticity and normality is evident in **Table 1.9** (GREEN, 1996; JENKE, 1996). The goodness-of-fit of the quadratic model was not rejected by the lack-of-fit test (p value ≥ 0.05).

A single curve was used to express the C_8 and C_{8e} curves because no statistical difference was found between them. The LOD was smaller than the lowest calibration plot point by a factor of 10. An acceptable LOQ was obtained for a 4-fold dilution (RSD < 2.0%) of the lowest calibration plot point, as shown in **Figure 1.10** (SHABIR, 2003). The selectivity was attested because the capsule (b) placebo constituents did not interfere with the (a) SIM RS retention time in **Figure 1.11**. The precision results in **Table 1.10** show a small difference (approximately 1%) with lower figures for the found values compared to the theoretical values, which is most likely associated with the compounding process. Adequate unbiased accuracy only

(%R 98.0-102.0), repeatability and intermediate (interanalyst) precision (%RSD \leq 2.0) and robustness (p value $>$ 0.05) were observed (**Table 1.10**) (ERMER, 2001; SHABIR, 2003; THE UNITED, 2011c; GONZÁLEZ *et al.*, 2010). The day variation did not affect the analyte response.

The HPLC robustness results showed that no strict column temperature control is necessary in the temperature range of 20 to 40 °C. Small variations in the flow rate and in the mobile phase proportion likely did not affect the analyses.

Before the validation of the dissolution method, test conditions were optimized for capsules with respect to the dissolution medium and apparatus 2 (paddle), as described in previous SIM tablet monographs (BRITISH, 2011b; THE UNITED 2011a), at test agitation speeds of 50 and 75 rpm. In a previous study, capsule and tablet dissolution profiles were tested in buffer solutions using 0.1-0.5% SDS. The SIM release was evaluated after 30 min for self-emulsified capsules and Zocor tablets (SINGLA N. *et al.*, 2009).

When the paddle speed was set to 75 rpm, an %RSD of less than 5% for profile points was obtained for times longer than 10 min. The dissolution test time can be established at either 30 min (BRITISH, 2011b) or 45 min (FARMACOPEIA, 2010) depending on the capsule's disintegration requirements.

The weighted least-squares model adequately described the linear concentration-response relationship for SIM in the dissolution medium. The ANOVA showed no significant parallelism deviation (p value $>$ 0.05) between days. A significant regression ($R^2 >$ 0.98, %RSD $<$ 1.0), an intercept statistically equal to zero and appropriate normality and homoscedasticity were observed (p $>$ 0.05, **Table 1.11**) (GREEN, 1996; SHABIR, 2003). The goodness-of-fit hypothesis for the linear model was not rejected by the lack-of-fit test (p value \geq 0.05). The LOD was 5-fold smaller than the lowest calibration plot point. An acceptable LOQ was obtained for a 3.33-fold dilution (RSD $<$ 2.0%) of the lowest calibration plot point, as shown in **Figure 1.12** (SHABIR, 2003). The method was shown to be selective because the capsule placebo constituents did not exhibit peaks that interfered with those of SIM RS, as shown in **Figure 1.13**. The method showed an adequate %RSD average value ($<$ 2.0 and $<$ 5.0) for repeatability and intermediate (inter-day and inter-analyst) precision respectively. Satisfactory unbiased accuracy values ranged between 98.1% and 100.7% within 95.0-105.0% specification (THE UNITED, 2011b,c). The method was shown to be robust for all deliberate variations (α 0.05). However, variation in the

medium molarity showed a greater influence on the results (p value closer to 0.05) than did variation in the pH of the medium. Validation results are shown in **Table 1.12**. The C_8 columns, endcapped or not, can be used indistinctly ($p > 0.05$), despite better peak shapes (A_s , T_f) being obtained with the C_{8e} (0.98, 0.97) than with the C_8 (1.23, 1.19) column.

Therefore, the C_8 endcapped column was used for quality evaluation of simvastatin capsules (samples B, C1 and C2) in assays (10 units), content uniformity (10 units), dissolution tests (6 units) and profile release tests (6 units) by HPLC-UV. All samples showed a SIM content between 90.0 and 100.0%, satisfactory acceptance values ($AV \leq 15$) for content uniformity and adequate SIM release per unit with values greater than 80.0 (Q+5)%, as shown in **Table 1.13**. The samples (B, C1 and C2) were demonstrated to be rapidly dissolving products with drug release greater than or equal to 85% within 15 min (86.8, 87.1 and 85.5% in 5, 10 and 15 min, respectively). Sample B, which contained β -cyclodextrin as an excipient, exhibited faster SIM release than did samples C1 and C2, which contained BHT, probably because β -cyclodextrin is an excipient that promotes SIM solubility.

The samples-release profiles, shown in **Figure 1.14**, were successfully obtained with respect to time points of 5, 8 and 10 min with %RSD <20% and at 12, 15, 30, 45 and 60 min with %RSD values less than 10% (THE UNITED, 2011b). In addition, RP-HPLC-UV can be used for routine tests (assay, content uniformity and dissolution tests) of SIM capsules.

5 Conclusion

The developed HPLC method yielded selectivity, precision, accuracy and robustness for the determination of SIM capsules in quality control tests (assay, content uniformity, dissolution tests and release profiles) in the presence of typical compounding excipients.

Acknowledgments

We thank Fapemig for financial support and CAPES for the fellowship to Marques-Marinho F.D.; we also thank PRPq-UFMG for supporting the editing and revision of this manuscript.

PARTE 3

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA EM ESTUDOS DE DISSOLUÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS CONTENDO SINVASTATINA

Temperature effect on dissolution studies of simvastatin pharmaceutical dosage forms

Flávia Dias Marques-Marinho, Mirella Monique Lana Diniz, José Carlos da Costa Zanon, Ilka Afonso Reis, Angélica Alves Lima, Cristina Duarte Vianna-Soares

Resumo

O antihiperlipêmico sinvastatina está disponível no mercado nacional na forma de comprimidos e cápsulas manipuladas. Método por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção no ultravioleta (λ 238 nm) foi utilizado para quantificar sinvastatina em cápsulas e comprimidos em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M contendo laurilsulfato de sódio 0,5%, pH 7, utilizado como diluente ou meio de dissolução. A estabilidade de curto prazo do fármaco das amostras foi avaliada no diluente, mantido a diferentes temperaturas. A estabilidade de curto prazo (até 24 h) de soluções de sinvastatina, não submetidas ao teste de dissolução, foi satisfatória para o fármaco isolado e para cápsulas, o que não se verificou para comprimidos. A estabilidade da sinvastatina em soluções mantidas a 22-24 °C por 8 h, após o teste de dissolução foi satisfatória para o fármaco isolado e para cápsulas contendo butilhidroxitolueno como excipiente. Os resultados de amostras de sinvastatina cápsulas contendo vitamina B₂ e de comprimidos indicam a necessidade de refrigeração das soluções em estudos de dissolução, caso a análise cromatográfica tenha duração superior a 4 h e 2 h, respectivamente, como descrito.

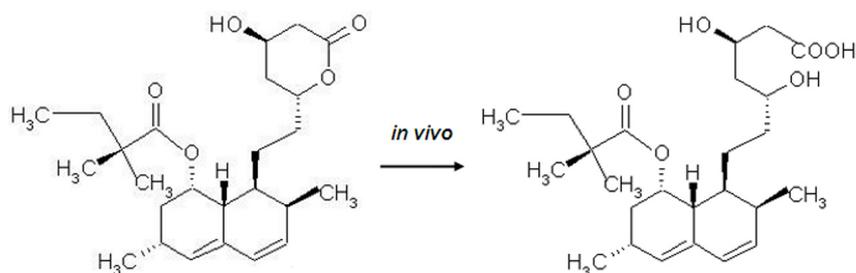
Palavras-chave Estabilidade de medicamentos, Sinvastatina, Cápsulas, Comprimidos, Dissolução/análise.

1 Introdução

O ácido 2,2-dimetil-1,2,3,7,8,8a-hexaidro-3,7-dimetil-8-[2-tetraidro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il)etil]-1-naftila[1S-[1 α ,3 α ,7 β ,8 β (2S*,4S*),8a β]] butanóico, fórmula química C₂₅H₃₈O₅, massa molecular 418,57 g/mol ou sinvastatina é um

antihiperlipêmico inibidor competitivo da HMG-CoA, envolvida em etapa limitante na biossíntese do colesterol (O'NEIL *et al.*, 2006; THE UNITED, 2011a). SV é uma das estatinas mais vendidas em todo o mundo, seja por prevenir ou tratar a morbidade e mortalidade associadas às doenças cardíacas (KAPUR & MUSUNURU, 2008). No Brasil, a SV está disponível comercialmente nas formas de comprimidos industrializados e cápsulas manipuladas. Uma vez administrada, a forma lactona inativa é convertida (principalmente no fígado) à forma β -hidroxiácida ativa (**Figura 1.15**) (ENDO *et al.*, 1976; MOGHADASIAN, 1999).

Figura 1.15- Conversão da lactona sinvastatina (CAS-79902-63-9) ao β -hidroxiácido correspondente, principalmente no fígado.



Monografias deste fármaco e de suas formas farmacêuticas não constam na Farmacopeia Brasileira (FARMACOPEIA, 2010). Entretanto, textos oficiais para o fármaco e/ou comprimidos são encontrados em compêndios internacionais tais como as Farmacopeias dos Estados Unidos da América (THE UNITED, 2011a), Britânica (BRITISH, 2011a,b) e Européia (EUROPEAN, 2011). Por outro lado, nelas não há qualquer relato de monografia para SV cápsulas. A quantificação de SV em cápsulas foi realizada por CLAE-UV (BARACAT *et al.*, 2009), método esse adotado da monografia SV comprimidos da USP (THE UNITED, 2011a). Outros métodos por espectrometria no UV (POLONINI *et al.*, 2011) e por CLAE (MARKMAN *et al.*, 2010; MARQUES-MARINHO *et al.*, 2011) foram desenvolvidos para quantificação de SV em cápsulas.

A determinação de SV em cápsulas submetidas ao teste de dissolução é descrita por espectrometria no UV após tratamento das soluções com óxido de manganês, conforme monografia SV comprimidos da USP (BARACAT *et al.*, 2009; MARKMAN *et al.*, 2010). Alternativamente, SV foi avaliada diretamente por CLAE-UV após o teste de dissolução de cápsulas (MARQUES-MARINHO *et al.*, 2011).

Em todos os trabalhos, empregou-se o meio de dissolução descrito na monografia de SV comprimidos (THE UNITED, 2011a). As soluções de um analito devem permanecer em condições que garantam a sua estabilidade, a qual depende do(s) solvente(s), do(s) excipiente(s), além de fatores externos como luz e temperatura (THE UNITED, 2011b). A estabilidade de sinvastatina em água é relatada sob exposição à luz solar e diversas condições de pH (PIECHA *et al.*, 2010), mas não sob diferentes temperaturas a partir de suas formas farmacêuticas (cápsulas e comprimidos). Portanto, avaliou-se a estabilidade de curto prazo de SV (fármaco, cápsulas e comprimidos) em meio de dissolução, armazenado sob diferentes temperaturas com posterior determinação direta por CLAE-UV (MARQUES-MARINHO *et al.*, 2011).

2 Material e métodos

2.1 Material

Sinvastatina adquirida da Farmacopeia dos Estados Unidos da América (lote I0D382, teor 99,4%, Rockville, MD, EUA) e do fornecedor Pharma Nostra (lote 10010165B, teor 99,2%, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram utilizadas como substância química de referência e de trabalho (SQT), respectivamente. Sinvastatina 20 mg cápsulas manipuladas contendo lactose associada à vitamina B₂ (amostra A, lote 203056); ao butilhidroxitolueno (amostras B1 e B2, lotes 201213 e CF3526/1, respectivamente) doadas pela Farmácia Universitária/UFMG (amostras A e B1) ou adquiridas no comércio local (amostra B2); comprimidos Zocor® sinvastatina 20 mg (amostra C, lote LLD034, Merck Sharp & Dohme, Northumberland, Reino Unido) foram utilizados. Metanol grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA), ácido fosfórico 85% (Merck, Darmstadt, Alemanha), laurilsulfato de sódio (lote 143127, LabSynth, Diadema, SP, Brasil), hidróxido de sódio (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) e fosfato de sódio monobásico (J.T. Baker, Xalostoc, EM, México) foram usados como recebidos. Água destilada foi usada no preparo do meio de dissolução e água ultrapura (Direct-Q3, Millipore, Bedford, MA, EUA) no preparo da fase móvel.

2.2 Métodos

Estudos de dissolução (dissolutor DT80, Erweka, Heusenstamm, Alemanha) foram realizados para comprimidos a 50 rpm por 30 min (THE UNITED, 2011a) e para cápsulas a 75 rpm por 45 min (MARQUES-MARINHO *et al.*, 2011) empregando pás e LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7,0 ajustado com hidróxido de sódio 40% v/v (900 mL, 37±0,5 °C) em potenciômetro (827 pH lab, Metrohm, Herisau, Suíça). Após o tempo de teste, alíquotas (5,0 mL) retiradas das cubas foram filtradas para vials e injetadas (10 µl) diretamente em cromatógrafo a líquido HP1200 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). A separação cromatográfica foi realizada em coluna octilsilano (250×4 mm, 5 µm, Merck, Darmstadt, Alemanha) mantida a 30 °C empregando metanol e ácido fosfórico 0,1% (80:20 v/v) como fase móvel sob fluxo 1,5 mL/min. A detecção no UV com varredura por DAD foi estabelecida em λ 238 nm (MARQUES-MARINHO *et al.*, 2011). Todas as soluções foram filtradas por membranas 0,45 µm (Minisart RC15 Sartorius, Goettingen, Alemanha) antes da injeção. As áreas dos picos e as respectivas purezas, avaliadas por meio dos espectros UV/DAD foram empregadas na quantificação de SV.

2.2.1 Preparo das soluções

Pesou-se quantidade de SQT (triplicata) e de pó proveniente de 10 unidades de cada amostra (cápsulas A, B1, B2; comprimidos C) equivalente a 5,55 mg e a 11,1 mg de SV em balões volumétricos 25 e 50 mL, respectivamente. Adicionaram-se 12 e 25 mL de LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7 e a solução foi submetida a sonicação (MaxiClean 1400, Unique, São Paulo, Brasil) por 5 e 10 min, respectivamente. Completou-se o volume usando o mesmo diluente e homogeneizou-se. Soluções de SV 22,2 µg/mL foram obtidas pela transferência de 1,0 mL da solução da SQT ou 5,0 mL do filtrado (papel filtro, porosidade média 25 µm) no caso das amostras (A, B1, B2, C), para balões volumétricos de 10 e 50 mL, respectivamente. Completou-se o volume com o mesmo diluente.

2.2.2 Avaliação da estabilidade

As soluções SV 22,2 µg/mL em meio de dissolução, oriundas da SQT e das amostras (cápsulas A, B1, B2 ou comprimidos C) mantidas a temperatura ambiente controlada (22-24 °C) foram analisadas por CLAE-UV (MARQUES-MARINHO *et al.*,

2011) após 8 h (com intervalo de 1 h para soluções das cápsulas e comprimidos) e após 24 h do preparo.

Soluções obtidas pela adição de 20 mg de SV SQT e de amostras (cápsulas A, B2; comprimidos C) a 900 mL de meio de dissolução (concentração final 22,2 µg/mL) mantido a 37 °C e sob agitação (pás 50 ou 75 rpm) por tempo adequado (30 ou 45 min para comprimidos e cápsulas, respectivamente) foram retiradas das cubas e filtradas para vials (n=2). As soluções dos vials, um mantido à temperatura ambiente (22-24 °C ou 27-28 °C) e outro sob refrigeração (2-8 °C), foram analisadas por CLAE-UV (injeções em duplicata) em intervalos de 1 h durante 8 h.

As soluções foram consideradas estáveis se a variação da resposta, ao longo do tempo, permanecer inferior a ±2% em relação à resposta inicial, ou seja, entre 98 a 102%, para o período avaliado (THE UNITED, 2011b).

3 Resultados e discussão

Há relatos, na literatura, de que a taxa de conversão da forma lactona de SV a seu β-hidroxiácido é maior em soluções aquosas neutras (pH 7) e que a formação de produtos de degradação é mais rápida em soluções ácidas (PIECHA *et al.*, 2010). Estes pesquisadores verificaram que em soluções aquosas de SV, principalmente ácidas, tão logo ocorre a conversão à forma ácida, inicia-se a degradação, independentemente da incidência ou não da luz solar, sugerindo uma reação térmica. Esse fato exposto caracteriza uma situação semelhante à do teste de dissolução, em que o tempo e a temperatura são fatores que podem influenciar a estabilidade do fármaco (THE UNITED, 2011a).

Observou-se no cromatograma da solução de SV 22,2 µg/mL (SQT), diluída em meio de dissolução e mantida 24 h a 22-24 °C que o pico referente ao fármaco eluiu em 5,22 min (fator de retenção *k* 4,29) e apresentou espectro UV característico com pureza 99,9% (**Figura 1.16**). Cromatogramas com características de separação e perfis espectrais semelhantes foram obtidos para as demais amostras (A, B1, B2, C) nas mesmas condições.

As soluções de sinvastatina SQT e das amostras A, B1, B2 (cápsulas) (**Figura 1.17**) preparadas em meio de dissolução apresentaram-se estáveis durante 24 h a 22-24° C, com variações (var.) percentuais (inferiores a ±2,0%) em relação à resposta inicial de -0,56; -0,91; -1,78 e -0,88%, respectivamente. No entanto, a

solução de SV 22,2 µg/mL da amostra C (comprimidos) foi estável por 3 h apenas com variação de -1,78% a 22-24 °C, mostrando-se instável a partir de 4 h (var. -2,22%) como apresentado na **Figura 1.17**. Após 8 h a 22-24 °C (var. -3,92%), a resposta foi reduzida para 96,1% aproximando-se, de valores descritos previamente, para solução do fármaco (isolado) em água pH 7 (94,3%) considerando o mesmo período de tempo (PIECHA *et al.*, 2010).

Figura 1.16 - Cromatograma de (a) sinvastatina SQT 22,2 µg/mL em meio de dissolução (LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7) após 24 h a 22-24 °C, representativo daqueles obtidos para as amostras (A, B1, B2, C); detalhe: (b) respectivo espectro UV/DAD, (c) curva de pureza. Condições cromatográficas: metanol:ácido fosfórico 0,1% 80:20 v/v, 1,5 mL/min, C_{8e} 250×4 mm, 5 µm, 30 °C, 10 µL, λ 238 nm.

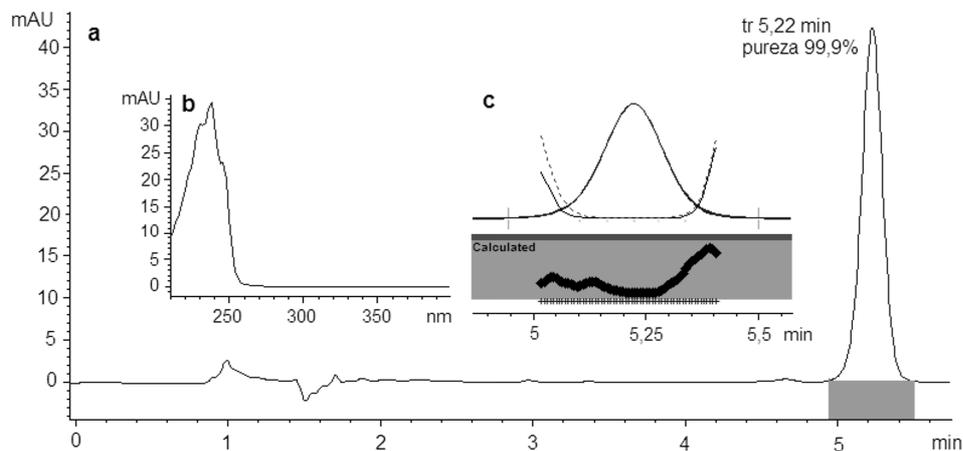
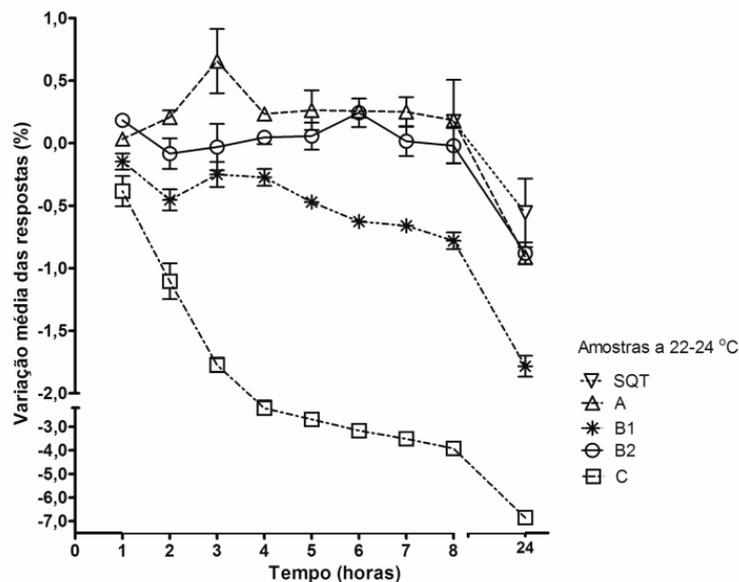
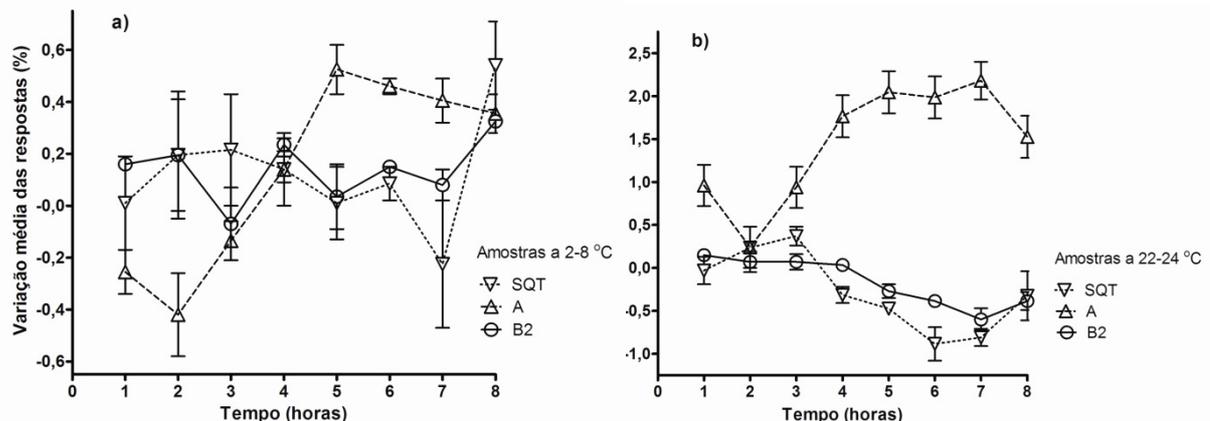


Figura 1.17 - Variação percentual média das respostas de soluções SV 22,2 µg/mL (SQT, A, B1, B2, C) em tampão fosfato de sódio 0,01 M contendo LSS 0,5%, pH 7, mantidas a 22-24 °C e injetadas (n=3) por 24 h para avaliação de estabilidade a curto prazo. Condições cromatográficas: Figura 1.16.



As soluções de SV 20 mg SQT e cápsulas (amostras A e B2) (**Figura 1.18a**), adicionadas ao meio de dissolução a 37 °C sob agitação por pás durante 45 min e mantidas a 2-8 °C foram estáveis por 8 h (período máximo avaliado). As variações máximas foram de 0,54% (8 h); 0,53% (5 h) e 0,33% (8 h) para SQT, A e B2, respectivamente. Considerando os vials mantidos a temperatura ambiente (22-24 °C) por 8 h, as soluções da SQT e da amostra B2 permaneceram estáveis no período avaliado com variações máximas de -0,89% (6 h) e -0,60% (7 h), respectivamente (**Figura 1.18b**). Dentre as cápsulas avaliadas, a solução da amostra A apresentou-se estável por um tempo menor, até 4 h (var. 1,77%), com uma variação máxima de 2,18% após 7 h.

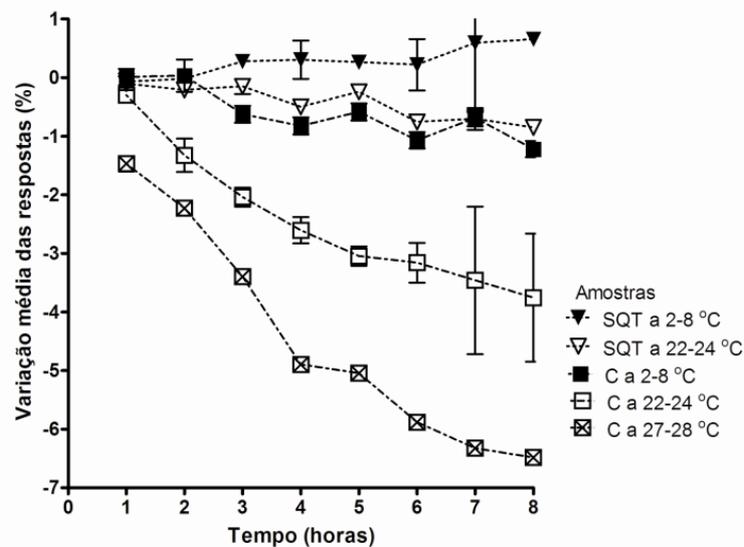
Figura 1.18 - Variação porcentual média das respostas de soluções SV 22,2 µg/mL, a partir de SQT e cápsulas (amostras A, B2) submetidas ao teste de dissolução. Aliquotas mantidas a (a) 2-8 °C ou (b) 22-24 °C foram injetadas (n=2) por 8 h para avaliação de estabilidade a curto prazo. Condições do teste de dissolução: LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7, 900 mL, 37 °C, pás, 75 rpm, 45 min. Condições cromatográficas: Figura 1.16.



De acordo com a **Figura 1.19**, a estabilidade de SV 20 mg SQT submetida ao teste de dissolução (30 min; 37 °C) e mantida a 22-24 °C e a 2-8 °C por 8 h foi adequada para a solução em ambas as condições de temperatura com variações menores que $\pm 2\%$ (-0,85 e 0,66%, respectivamente). Por outro lado, o tempo de estabilidade da solução dos comprimidos (amostra C) reduziu consideravelmente com o aumento da temperatura. Conforme, as variações de resposta observadas, -1,22% (8 h; 2-8 °C), -1,32% (2 h; 22-24 °C) e -1,47% (1 h; 27-28 °C) apresentadas na **Figura 1.19**. Similarmente às soluções dos comprimidos (**Figura 1.17**), houve redução da resposta para 96,24% na temperatura ambiente 22-24 °C e para 93,51%

na temperatura 27-28 °C, após 8 h. Esses valores encontram-se em concordância com a literatura (PIECHA *et al.*, 2010).

Figura 1.19 - Variação porcentual média das respostas de soluções SV 22,2 µg/mL de amostras submetidas ao teste de dissolução. Aliquotas mantidas a 2-8 °C e 22-24 °C (SQT, C); a 27-28 °C (C) foram injetadas (n=2) por 8 h para avaliação de estabilidade a curto prazo. Condições do teste de dissolução: LSS 0,5% em tampão fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7, 900 mL, 37 °C, pás, 50 rpm, 30 min. Condições cromatográficas: Figura 1.16.



Os resultados obtidos sugerem que a estabilidade do fármaco no meio de dissolução descrito depende da composição da amostra (excipientes). A razão para esta afirmativa deve-se ao fato de que as soluções de ambos, fármaco isolado (SQT) e cápsulas contendo BHT (amostras B1, B2, obtidas por diluição e/ou decorrentes do teste de dissolução) não apresentaram problemas quando mantidas nas temperaturas testadas. Comparativamente, as soluções das cápsulas contendo vitamina B₂ (amostra A) e dos comprimidos (amostra C) mostraram-se estáveis por até 4 h e 2 h, respectivamente, quando mantidas a 22-24 °C. Portanto, sugere-se que as soluções devam ser refrigeradas naqueles estudos de dissolução com duração superior a 4 h e 2 h, respectivamente, segundo as análises cromatográficas descritas.

Considerando que cada corrida cromatográfica leva 6 min e que o teste de dissolução (primeira etapa, com 6 unidades) fosse realizado com triplicata de injeções das soluções de cada cuba, o tempo total de análise seria em torno de 120 min. Portanto, pode-se inferir que a manutenção das soluções sob temperatura

ambiente controlada (22-24 °C) é uma condição suficiente para garantir a estabilidade necessária até 2 h após o teste de dissolução, de acordo com as condições de análise cromatográfica descritas.

Por outro lado, para experimentos que requeiram a construção de perfis de dissolução, como em estudos de equivalência farmacêutica, sugere-se, a refrigeração das soluções logo após o estudo, independente da composição da amostra contendo SV, a fim de garantir a estabilidade do fármaco.

4 Conclusão

A avaliação da estabilidade de curto prazo de soluções aquosas de SV (cápsulas e comprimidos) em diferentes temperaturas (refrigerada ou ambiente) é imprescindível para estabelecer as condições experimentais e garantir a adequada execução de estudos de dissolução, tendo em vista a influência dos excipientes.

Agradecimentos

À Fapemig pelo apoio financeiro e à CAPES, pela bolsa de doutoramento à Marques-Marinho, F.D.

PARTE 4

QUALITY EVALUATION OF SIMVASTATIN COMPOUNDED CAPSULES

Flávia Dias Marques-Marinho, José Carlos da Costa Zanon, Emilia Sakurai, Ilka Afonso Reis, Angélica Alves Lima, Cristina Duarte Vianna-Soares

Abstract

Simvastatin is commercially available as tablets and compounded capsules in Brazil. Very few reports regarding these capsules quality, and consequently, efficacy are available. The pharmaceutical quality of 30 lots of 20 mg simvastatin capsules from the market was evaluated through weight determination, content uniformity, disintegration (Brazilian Pharmacopeia), assay and dissolution test (USP32 tablets monograph). HPLC method was developed for assay, content uniformity and dissolution test, furthermore specifications were established. Out of 30 batches evaluated, 29 showed capsule disintegration until 45 min and individual weight variation was within $\pm 10\%$ or $\pm 7.5\%$ relative to average weight, whether \leq or > 300 mg, respectively. Only 27 batches met dissolution test criteria with values $\geq 80\%$ of the labeled amount in 45 min; 21 batches showed simvastatin content between 90.0-110.0% of the labeled amount and 19 batches had at least 9 in 10 capsules with content uniformity values between 85.0-115.0% of the labeled amount with RSD $\leq 6.0\%$. Only 14 of all (30) batches met complete pharmacopeial quality standards. The establishment of test conditions and specification parameters for simvastatin capsules showed that there are relevant pharmacopeial quality differences between batches compounded by distinct pharmacies. For 53.33% of the tested products the hypercholesterolemic treatment efficacy may be compromised.

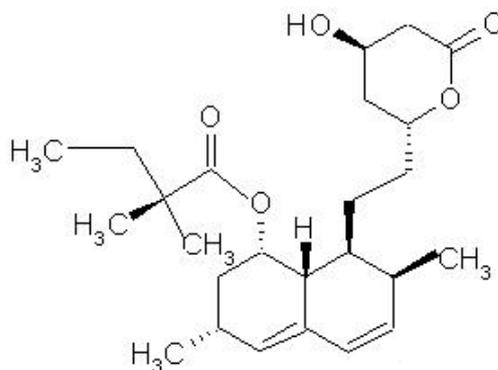
Keywords Compounding simvastatin capsules. Quality control. RP-HPLC.

1 Introduction

Simvastatin (SIM, **Figure 1.20**) is a lipid lowering agent widely used worldwide for the treatment of hypercholesterolemia and for reducing morbidity and mortality associated with chronic heart disease (THE 4S, 1994). It is commercially available in

tablet and capsule dosage forms. SIM capsules are manufactured in Brazil by compounding pharmacies.

Figure 1.20 - Simvastatin chemical structure.



The pharmaceutical sector reached its most dominant in the late 1980s when it became the focus of attention from the regulatory agencies (BERTOLLO, 2008). The creation of the National Sanitary Surveillance Agency, the Brazilian regulatory authority, led to greater concern over health and safety of products, health services, production supervision and drug sales (BRASIL, 1999a). In 2000, ANVISA published its first resolution act, RDC 33, aimed at achieving harmonization in the compounding pharmacies sector (BRASIL, 2000). It became mandatory to evaluate the compounded products by the pharmacies with respect to their physical-chemical quality and different characteristics. The pharmacies had to adjust to this requirement in order to remain in the market, or else shut down. Only six years later, RDC 33 resolution was replaced by the more comprehensive RDC 214 (BRASIL, 2006b). Amid much controversy over the latter, another regulation RDC 67 was subsequently published in 2007 (BRASIL, 2007a) and later updated with the current RDC 87 amendment in 2008 (BRASIL, 2008). In this scenario, ANVISA quality requirements for products and services offered by compounding pharmacies increased upon each new RDC release, leading to the commercial survival only of those businesses who could adapt and comply.

Standardized procedures, process monitoring, quality management, employee training and more rigorous quality control numbered among the requirements. A high investment in equipment, personnel training and hiring of outsourced services was necessary. Not all pharmacies could afford to meet all the demands to incorporate

changes. Nevertheless, the importance of these requirements to share professional responsibility and ensure greater health safety for patients was acknowledged.

For the last ten years compounding pharmacies have been governed by specific legislation, although many doubts about product quality, safety and efficacy still remain. Quality control is hampered by the absence of specific monographs for compounded products, leading to a lack of standardization in quality evaluation by accredited analysis laboratories for health, as well as, by ANVISA (BRASIL, 1999b). Despite the prevailing limitations in the compounding pharmaceutical field, the number of new pharmacies has increased in recent years, according to ANVISA and Compounding Pharmacists National Association/ANFARMAG data (ANVISA, 2005). Today, the importance of compounding pharmacies in the communities is incontestable. Compounded capsules can be dose personalized, less expensive than industrialized tablets, and economically more attractive for the population. In view of the social importance of the sector, the quality of SIM compounded capsules was evaluated in the present study given that it can directly influence the safety and efficacy of products.

2 Material and methods

2.1 Material

Simvastatin USP RS (lot I0D382, 99.4% purity label claim, United States Pharmacopeia, Rockville, MD, USA), methanol HPLC grade (Tedia, Fairfield, OH, USA), phosphoric acid 85% (Merck, Darmstadt, Germany), sodium dodecyl sulfate (Pharmacopéia Ativos Magistrais, Barueri, SP, Brazil), sodium hydroxide (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and monobasic sodium phosphate (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were used as received. Distilled or ultrapurified water (Milli-Q-Plus, Millipore, Bedford, MA, USA) was used when necessary.

Simvastatin 20 mg capsules batches were randomly acquired (April to July, 2009) from thirty compounding pharmacies in regard to site location in different regions of Belo Horizonte, southeast of Brazil. Six batches were donated and twenty four were purchased in the market. During the study the compounded capsules were stored according to labeled instructions and when not specified were stored in a dry

and fresh place at ambient temperature. Batch characteristics (color and size) and capsule unit price are described in **Table 1.14**.

Table 1.14 - Description of simvastatin 20 mg capsule batches^a acquired from thirty compounding pharmacies.

Pharmacy (P)	Capsule price (US\$) ^b	Capsules color; size	Storage conditions
1	D ^c	red/white; 4	NS ^d
2	D ^c	white/white; 1	Also, protect from light and humidity
3	D ^c	green/white; 4	NS ^d
4	D ^c	blue/white; 1	NS ^d
5	D ^c	green/white; 3	Keep refrigerated
6	D ^c	green/white; 4	Keep refrigerated
7	0.63	green/white; 4	NS ^d
8	0.55	transparent; 4	NS ^d
9	0.83	blue/white; 4	Keep in dry place
10	0.87	red/white; 3	NS ^d
11	0.79	orange/yellow; 2	NS ^d
12	0.69	green/white; 3	NS ^d
13	0.69	bordeaux/white; 3	Keep well closed
14	0.74	blue/white; 3	NS ^d
15	0.54	bordeaux/white; 2	NS ^d
16	0.45	bordeaux/white; 3	NS ^d
17	0.60	dark blue/white; 3	NS ^d
18	0.54	blue/white; 2	Protect from heat and humidity
19	0.58	green/white; 4	NS ^d
20	0.56	transparent; 3	NS ^d
21	0.40	white; 3	NS ^d
22	0.43	blue/gray; 4	NS ^d
23	0.74	blue/white; 3	NS ^d
24	0.56	blue/white; 3	Protect from heat and humidity
25	0.74	blue/white; 4	Protect from heat and humidity
26	0.55	blue/white; 4	NS ^d
27	0.73	green/white; 2	NS ^d
28	0.40	green/white; 4	NS ^d
29	0.49	white; 4	NS ^d
30	0.65	transparent; 4	NS ^d

a: Some excipients present in donated samples: B₂ vitamin, butylhydroxyanisole, butylhydroxytoluene, carboxymethylcellulose, cellulose, colloidal silicon dioxide, kaolin, lactose, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, mannitol, sodium dodecylsulfate, starch; b: Zocor® 20 mg tablet unit price US\$2.30, for comparison. Currency conversion BRL to US dollar; c: D, donation; d: NS, not specified.

2.2 Methods

2.2.1 Pharmacopeial tests

All capsules batches were submitted to weight determination, disintegration, content uniformity assessments and evaluated according to Brazilian Pharmacopeia general methods (FARMACOPÉIA, 1988, 1996).

For weight determination, twenty units of each batch were individually weighed on an analytical microbalance (BP210D, Sartorius, Edgewood, NY, USA). The average weight (AW) was calculated along with individual capsule variation relative to AW. Specified individual variation could be less than $\pm 10\%$ or $\pm 7.5\%$ for $AW \leq 300$ mg or $AW > 300$ mg, respectively. If two or more units failed to meet the limits, the capsule ($n=20$) contents were removed and their weight was determined by mass difference. A maximum of two units outside the original range was tolerated, but their variation had to be less than double the specified limits.

Disintegration time was determined using six units from each batch in an Erweka disintegrator (ZT3, Heusenstamm, Germany) equipped with chronometer and thermostatic bath at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. The disintegration time limit for all capsules completely disintegrate was 45 min.

Content uniformity was performed on ten units from each batch. SIM was individually assayed by developed HPLC method after dilution in a 50 mL volumetric flask and successive dilution in methanol until SIM $40 \mu\text{g/mL}$. Acceptance criteria were no more than one unit outside the specified limit of 85.0%-115.0% of the labeled amount (LA). However, the individual value had to fall within 75.0-125.0% LA and the relative standard deviation had to be less than or equal to 6.0%.

For assay, an adequate SIM mass, equivalent to one AW, was accurately weighed (triplicate) and successively diluted with methanol (filtered, if necessary) in order to obtain SIM $40 \mu\text{g/mL}$ for injection into the chromatograph. The criterion was 90.0-110.0% LA. For assay and dissolution test conditions, the USP32 SIM tablet monograph was observed (THE UNITED, 2009a).

The dissolution test (first stage only) was performed for six capsule units from each batch (DT80, Erweka, Heusenstamm, Germany) with USP apparatus 2 (paddle) at 75 rpm for 45 min using stainless steel sinkers (Flowscience, Cotia, SP, Brazil) to

keep the capsules at the vessel bottom. Monobasic sodium phosphate at 0.01M containing 0.50% SDS, pH adjusted to 7 (40% w/v sodium hydroxide), 900 mL, $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ was used as the dissolution medium and selected Q value was 75%. Aliquots of 5.0 mL were withdrawn from the dissolution vessels, filtered and injected into the chromatograph. The requirement for the first stage of the dissolution test was that each unit had to release at least 80% LA (Q+5%).

2.2.2 HPLC method validation

A validated RP-HPLC method developed in-house was used to determine SIM in assay, content uniformity and dissolution test on a HP1200 quaternary pump liquid chromatography (Agilent, Palo Alto, CA, USA) using methanol and 0.1% phosphoric acid (80:20 v/v) as mobile phase, 30°C , 1.5 mL/min, UV/DAD detection λ 238 nm, with automatic injector fitted at 10 μL and a C_8 endcapped column (250 \times 4 mm, 5 μm , Merck, Darmstadt, Germany). All standard and sample solutions were filtered through a 0.45 μm filter membrane (Minisart RC15 Sartorius, Goettingen, Germany) before injection.

Calibration curves were constructed from SIM methanolic solutions (n=3) prepared at 4, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$ for assay/content uniformity and from SIM in dissolution medium solutions (n=3) prepared at 2, 10, 18, 26, 34 $\mu\text{g/mL}$ for dissolution test. The respective curve equations were used to determine SIM in assay/content uniformity and the dissolution test. The R statistical software was used to evaluate the curve equation model, normality and homoscedasticity (α 0.05) by weighted least squares method, Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005). Data were treated by studentized residual model in order to remove outliers (residues equal or greater than 3.0) where necessary. The lack-of-fit test was used to check the goodness-of-fit of the models. Intercept, determination coefficient (R^2) and %RSD were calculated and chromatographic parameters of asymmetry (A_s), retention factor (k) and retention time (t_R) were observed (GREEN, 1996; JENKE, 1996; SNYDER *et al.*, 1997; THE UNITED, 2009b). Results were considered significant when the corresponding p value was less than 0.05.

Selectivity was evaluated through peak purity analysis by UV/DAD spectra of capsule samples. In a representative capsule sample (acquired from the university pharmacy, rather than the 30 pharmacies), SIM 10, 20 and 40 mg correspondent masses were adequately diluted to obtain precision evaluation at three levels of concentrations: 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$), respectively, by 2 analysts in different days. Accuracy (unbiasedness) was assessed by recovery of SIM standard (10, 20, 40 mg, $n=3$) added to SIM capsule sample solution and properly diluted within the linear range (20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$). Robustness was assessed by variations in flow rate (± 0.1 mL/min), methanol ratio ($\pm 2\%$) and temperature (± 5 °C) using SIM 40 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$). RSD values for precision and robustness data were calculated by ANOVA at significance level α 0.05.

3 Results and discussion

The qualitative composition of all donated SIM capsule batches were provided by the respective pharmacies. Compounded capsules unit price (**Table 1.14**) ranged from US\$0.13 to US\$0.27 among the pharmacies, a cost approximately 5.6% to 11.7%, respectively, of Zocor® tablet unit prices (US\$2.30). None of the capsule batches showed any problems regarding physical aspect.

3.1 HPLC method validation

A validated RP-HPLC method for SIM determination showed adequate selectivity (ERMER, 2001; SHABIR, 2003). Chromatographic peak purity ($\geq 99.8\%$) was provided by UV/DAD spectra (**Figure 1.21 a,b**, details).

Satisfactory results were obtained for precision (repeatability and intermediate) and accuracy (unbiasedness) (**Table 1.15**) with RSD values less than 2.0% and recovery levels between 97.0-103.0%, respectively (GONZÁLEZ *et al.*, 2010). The HPLC method was shown to be robust, since there was no statistical difference by ANOVA (p value > 0.05) after variation in flow rate (p 0.71), methanol ratio (p 0.06) and temperature (p 0.11) (THE UNITED, 2011c).

The response-concentration relationship for assay/content uniformity and dissolution test curves obtained by weighted least squares method was expressed by

a quadratic and linear equation, respectively. Both curves demonstrated adequate normality (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity (Levene), for p value >0.05.

Figure 1.21 - SIM representative chromatograms for (a) assay/content uniformity, detail: SIM UV/DAD spectrum and (b) dissolution test, detail peak: purity curves. Chromatographic conditions: C₈ endcapped column (250×4 mm, 5 μm) 30°C, λ 238 nm, methanol:0.1% phosphoric acid (80:20 v/v), 1.5 mL/min, injection volume 10 μL. Dissolution conditions: 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate pH 7 (900 mL, 37±0.5°C), paddles, 75 rpm, 45 min.

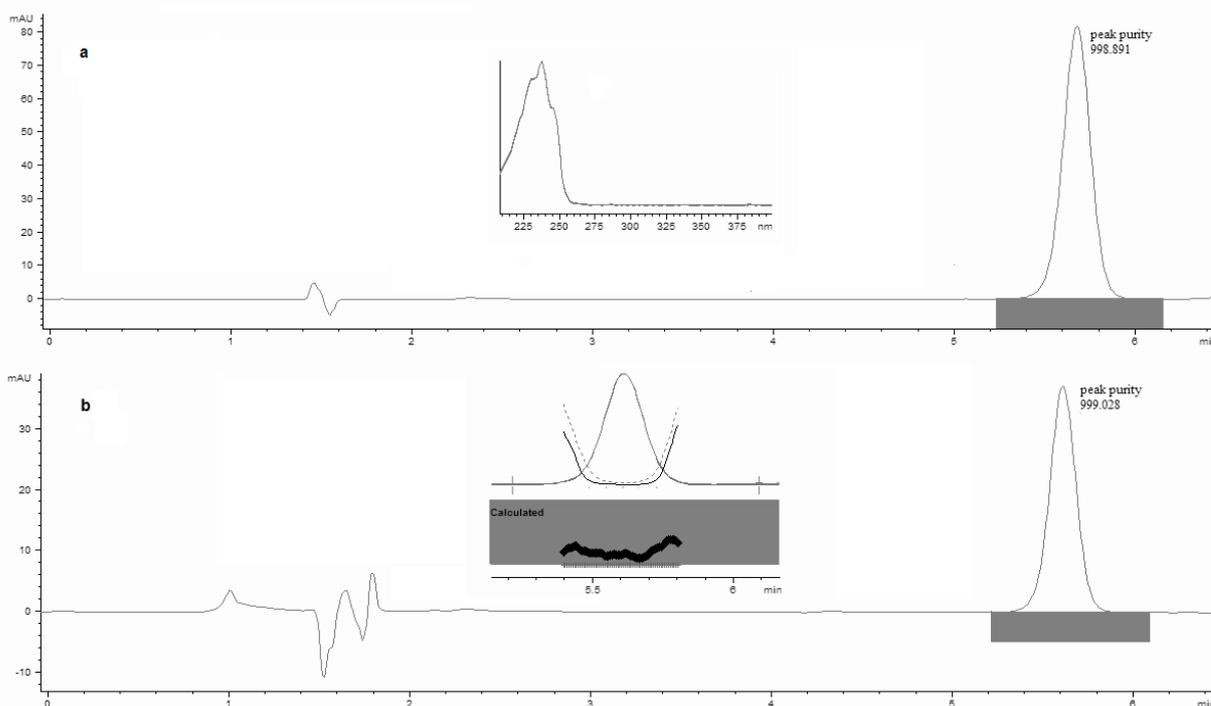


Table 1.15 - HPLC precision and accuracy results for SIM 20 mg compounded capsules provided by the university pharmacy (chromatographic conditions, Figure 1.21).

Validation parameters	SIM mean mg/capsule (%RSD) ^a		
	10	20	40
Precision (n=3)			
Analysts I ^b	8.7; 8.8	17.6; 17.9	34.9; 34.2
II	8.9	17.5	34.0
Intermediate (inter-days, n=6)	8.7 (0.3)	17.7 (1.0)	34.5 (1.4)
(inter-analysts, n=9)	8.8 (1.0)	17.7 (1.0)	34.4 (0.7)
Repeatability (intra-days, n=6)	(1.4)	(1.0)	(0.9)
(intra-analysts, n=9)	(1.6)	(1.2)	(1.6)
Accuracy (unbiased, n=3)			
Standard addition	9.9 (0.8)	19.7 (0.4)	39.4 (0.3)
%Recovery	99.2	98.4	98.6

a: RSD, relative standard deviation; b: in two days.

Intercept was not significantly different from zero (p value >0.05) for the quadratic model for assay/content uniformity. In cases of significant p value less than 0.05, the percentage of the intercept (relative to the 100% analyte level) up to ±2% is

accepted, as observed in the linear model for the dissolution test (GREEN, 1996; JENKE, 1996). Determination coefficients (R^2) were greater than 0.999 for SIM assay/content uniformity curve (JENKE, 1996) or greater than 0.98 for the SIM dissolution curve (THE UNITED, 2009b) and in both cases, RSD values were less than 2.0% (JENKE, 1996). The lack-of-fit was not observed regardless the quadratic or linear model. Results of regression analysis are summarized in **Table 1.16**.

Table 1.16 - Statistical regression results by ANOVA for SIM assay/content uniformity and dissolution test by HPLC (chromatographic conditions, Figure 1.21).

Parameter	Assay/Content uniformity ^a	Dissolution test ^b
Range ($\mu\text{g/mL}$)	4-80	2-34
Regression equation	$y=0.0122x^2+22.1837x-0.1805$	$y=21.5099x+4.2288$
p value regression	1.23×10^{-22}	1.41×10^{-25}
%RSD	0.47	0.23
Determination coefficient, R^2	0.999	0.999
Intercept p value ^c	0.79	0.003 (1.11) ^d
Shapiro-Wilk (p value) ^e	0.97 (0.81)	0.92 (0.26)
Levene (p value) ^e	0.49 (0.74)	0.24 (0.91)
Lack-of-fit p value ^e	0.23	0.32

a: diluent methanol, b: diluent 0.5% SDS in 0.01 M monobasic sodium phosphate (pH 7), c: significant if p value <0.05, d: intercept percentage relative to 100% analyte level that must be less than 2%, e: no statistical evidence of problems if p value >0.05.

SIM peak eluted with retention factors, k , 2.896 (5.622 min) and 4.613 (5.676 min) ($k > 2$), asymmetry factors 0.96 and 1.02 ($A_s < 1.2$) for assay/content uniformity (**Figure 4.2a**) and dissolution test, respectively (**Figure 4.2b**) were appropriate (SNYDER *et al.*, 1997).

3.2 Pharmacopeial tests

The weight determination test results for the thirty batches are shown in **Table 1.17**. Four batches (P12, P17, P19 and P20) had to be retested by the removal of content, whereas one batch (P19) did not meet the weight requirements because it contained more than two units (five) with an individual variation greater than 10%AW. Hence, P19 batch showed problems with homogeneity of powder distribution inside the capsules.

For the disintegration test, only batch (P4) did not meet the criteria, because its capsules did not disintegrate at all within 45 min. The capsules ended swollen and soft suggesting a formulation problem, probably related to a high percentage (30% w/w) of carboxymethylcellulose (CMC), a gel forming agent (ROWE *et al.*, 2009).

Table 1.17 - Quality control test results for thirty batches of simvastatin 20 mg compounded capsules (conditions, Figure 1.21).

Pharmacy (P)	Mean weight ^a (mg)	Disintegration time ^c (min)	Content uniformity ^a (%)	Assay ^a (%)	Dissolution ^a (%)
1	174.4±1.89	26	91.46±1.98	88.22±0.21	93.66±1.02
2	302.6±2.11	14	95.57±2.74	94.10±0.40	96.71±4.49
3	145.5±1.78	16	92.26±5.89	85.58±0.45	98.40±7.00
4	390.5±2.06	>45	92.11±12.89	99.00±1.80	10.11±14.93
5	190.4±2.84	27	96.17±3.18	95.91±0.63	97.13±4.23
6	152.3±2.87	28	96.77±3.65	92.28±0.28	101.59±2.81
7	159.6±3.01	16	93.60±4.61	93.28±1.17	91.99±3.03
8	140.7±2.10	18	95.51±4.57	96.70±0.35	99.95±4.39
9	148.4±1.94	20	90.26±4.77	87.97±0.70	99.30±5.02
10	167.5±2.43	20	103.71±6.36	97.26±0.19	104.83±3.80
11	263.2±2.16	22	87.25±3.66	88.87±1.16	93.60±3.83
12	194.2±4.77 ^b	15	86.93±10.32	89.05±0.58	94.70±16.94
13	220.8±2.47	26	91.84±1.94	91.78±0.27	86.81±2.04
14	234.7±2.46	20	89.19±2.77	90.93±0.26	94.67±3.40
15	306.5±1.90	18	106.27±3.06	105.37±0.65	109.84±2.48
16	205.4±1.28	19	92.62±2.97	93.49±0.33	96.49±6.15
17	128.6±4.55 ^b	14	96.58±6.05	95.96±0.30	97.63±4.99
18	219.5±4.47	20	98.33±19.67	87.46±0.97	101.85±24.63
19	144.2±4.81 ^b	16	90.94±6.24	95.26±0.84	92.92±5.88
20	176.8±4.46 ^b	12	93.14±4.88	93.09±0.27	98.39±4.69
21	166.9±1.50	19	92.89±11.48	90.74±0.75	97.48±10.95
22	157.7±4.75	26	97.18±16.81	94.25±0.63	105.68±15.17
23	192.6±1.45	12	91.63±2.23	90.83±0.80	89.80±5.84
24	194.6±1.43	24	89.72±3.18	88.96±1.00	98.17±5.83
25	132.3±3.05	16	88.50±4.97	88.03±1.09	92.59±2.08
26	117.9±2.13	13	91.78±3.18	92.49±1.25	96.27±1.88
27	273.6±4.33	15	92.10±8.81	101.91±0.64	96.17±10.39
28	172.4±3.75	16	90.52±8.05	88.23±1.19	91.88±11.94
29	134.9±1.95	17	96.90±11.49	92.26±0.10	100.07±6.46
30	234.6±1.98	22	95.92±1.92	96.52±1.14	100.22±4.79

a: mean±RSD [(standard deviation/mean)×100]; b: before removal of content; c: maximum time for complete disintegrated.

For content uniformity (n=30, Table IV), only nineteen (63.3%) batches met the requirements within 85.0-115.0% LA (87.2-106.3%) and RSD values were less than or equal to 6.0 (1.9-6.0%). Ten batches (P4, P10, P12, P18, P19, P21, P22, P27-29) out of eleven, which failed the test, had an RSD greater than 6.0% (6.2-19.7%) and one batch (P25) had three units below 85.0% LA despite having a RSD lower than 5.0%. These problems related to high %LA variability reflected either inadequate powder homogenization or poor capsule powder distribution leading to drug content differences between units within the same batch.

Assay results (**Table 1.17**) show that twenty-one batches (70%) met the criteria 90.0-110.0% (90.7 to 107.4%) and RSD was less than 2.0% (0.2 to 1.8%). All nine batches (P1, P3, P9, P11, P12, P18, P24, P25, P28) that failed the test showed %LA less than 90.0 but greater than or equal to 85.5%. In some cases, problem was due to the fact that a purity correction factor may not have been established for the raw material used.

Dissolution test results (**Table 1.17**) were evaluated according to SIM % average release and RSD values: 27 batches met the acceptance criteria with individual values greater than or equal to 80% LA (20 mg SIM). All three batches (P4, P12, P18) that failed the test showed high RSD values (14.9, 16.9, 24.6%). Batch P4, whose capsules contained a high CMC percentage (30% w/w) showed very low drug release ($\leq 12.7\%$) for all units. This suggests a serious formulation problem, leading to a large quality discrepancy and hence, drug inefficacy.

4 Final discussion

In summary, out of 30, only 14 (46.6%) batches met the requirements for all quality control tests, encoded P2, P5-8, P13-17, P20, P23, P26, P30. The most common problem was related with content uniformity, occurring in 68.7% of non-approved batches. This finding represents a major concern for the regulatory authorities since it is related with low quality of powder homogenization and its distribution in the capsules, in an essential practice in compounding pharmacies. The second most frequent problem was observed for SIM assay, which occurred in 56.2% of non-approved batches. This may possibly be explained by the lack or inappropriate use of a correction factor due to a raw material with lower purity. Low %SIM release after dissolution test occurred in 18.7% of non-approved batches.

These results are closely related to the content uniformity results, since all such batches also showed high RSD values greater than 10.3% for content uniformity test. Weight determination and disintegration problems occurred in isolated batches. Therefore, the conditions and acceptance criteria established for pharmaceutical control tests applicable to SIM compounded capsules are important to evaluate the quality of distinct batches traded not only locally, but also, nationwide. These tests and their specifications have been suggested to devise a SIM capsule monograph (Apêndice A), as guidance for pharmaceutical quality control of these products to be included in the latest edition of the Brazilian Pharmacopeia. Although drug compounding activities in Brazil have been regulated by ANVISA for the last ten years, by means of several acts and their updates content uniformity problems can be easily avoided by rigorous quality requirements and personnel training. In addition, considering that each batch had been acquired by one patient, 53.3% of these individuals would have had their treatment compromised due to lack of quality compliance.

Acknowledgments

The authors acknowledge Fapemig and CAPES for funding support, and the Pharmacy undergraduate Amanda Leão dos Santos for laboratory assistance.

4 ESTUDOS EXPERIMENTAIS

CAPÍTULO 2

**Avaliação da eficácia de
sinvastatina 20 mg comprimidos e
cápsulas em relação aos
comprimidos referência**

1 Material

Os materiais, reagentes e equipamentos utilizados estão listados nas **Tabelas 2.1** e **2.2**, respectivamente.

Tabela 2.1 - Materiais utilizados pelos voluntários, e necessários para a coleta de sangue.

Descrição	Fabricante (localização)	Lote	Validade
Sinvastatina 20 mg cápsulas	Farmácia magistral selecionada	GK1981/1A	06/2011
		GK1981/1B	06/2011
		GK1981/2	06/2011
		GK2699/1	09/2011
		GK2701/1	09/2011
		S19225/1	09/2011
		AT3519/1	12/2011
		AT3526/1	12/2011
Sinvastatina 20 mg comprimidos Sinvaston®	Sanval (São Paulo, SP, Brasil)	AQ122	08/2012
Sinvastatina 20 mg comprimidos Zocor®	Merck Sharp & Dohme (Northumberland, Reino Unido)	LLD034	11/2011
Potes plásticos cor branca 30 g		4799	09/2012
Sílica gel branca cápsula	NI ^a	100745	08/2010
Tampas plásticas cor branca		9689	07/2012
Agulhas 25×8 mm 21G S-Monovette Kanule		0070201	01/2013
Microtubo 2,0 mL com tampa de pressão	Sarstedt	72695500	02/2012
Tubo coleta fluoreto 2,6 mL S-Monovette	(Nümbrecht, OK, Alemanha)	0090801	02/2011
Tubo coleta soro 7,5 mL S-Monovette		0090601	02/2013

a: NI, não informado.

Tabela 2.2 - Relação dos reagentes e equipamentos utilizados no laboratório de análises clínicas para as dosagens bioquímicas.

Tipo	Reagente	Fabricante (localização)	Lote	Validade
Calibradores	Biocal Bioclin	Quibasa (Belo Horizonte, MG, Brasil)	0024	07/2012
Reagentes	Ácido úrico líquido estável Bioclin		0054	06/2012
	Albumina teste colorimétrico Bioclin		0113	03/2012
	ALT transaminase (TGP) Bioclin		0053	12/2011
	AST transaminase (TGO) Bioclin		0057	11/2011
	Colesterol monoreagente Bioclin		0020	08/2012
	Creatina quinase (CK) Bioclin	Quibasa	0118	10/2011
	Creatinina cinética Bioclin	(Belo Horizonte, MG, Brasil)	0049	06/2012
	Glicose monoreagente Bioclin		0026	10/2011
	HDL direto Bioclin		0048	05/2012
	LDL colesterol direto Bioclin		0006	11/2011
	Triglicérides líquido estável Bioclin		0046	10/2011
	Uréia cinética líquido estável Bioclin		0042	09/2012
	TSH (hormônio estimulante da tireóide) Immulite		418, 419	08/2011, 09/2011
	Solução de lavagem sonda Immulite	Siemens	46510007	10/2011
	Substância quimioluminescente Immulite	(Los Angeles, CA, EUA)	807	11/2011
Soro-controle	Biocontrol N Bioclin	Quibasa	0036	10/2011
	Biocontrol P Bioclin	(Belo Horizonte, MG, Brasil)	0027	10/2011
	Multivalent control module RIA	Siemens (Los Angeles, CA, EUA)	0023	04/2013
Equipamentos	Analizador bioquímico Wiener lab CM200	Wiener (Buenos Aires, Argentina)	07081602	NA ^a
	Analizador Immulite 1000	Siemens (Flanders, NJ, EUA)	12249	NA ^a
	Centrifuga, banho-maria, pipetas automáticas	-	-	NA ^a

a: NA, não se aplica.

2 Métodos

2.1 Avaliação da qualidade dos medicamentos empregados no ensaio clínico

Os medicamentos contendo sinvastatina 20 mg (cápsulas manipuladas, comprimidos referência e aqueles disponíveis no SUS no município de Ouro Preto) empregados no tratamento dos indivíduos hipercolesterolêmicos tiveram sua qualidade avaliada com base nos métodos gerais (determinação de peso, desintegração, dissolução, doseamento e uniformidade de conteúdo) da Farmacopeia Brasileira (2010), em monografias para comprimidos (BRITISH, 2011b; THE UNITED, 2012a) e conforme métodos de análise empregando CLAE descritos para SV comprimidos (Capítulo 1, parte 1) e cápsulas manipuladas (Capítulo 1, parte 2). As cápsulas foram adquiridas de farmácia magistral selecionada dentre outras cujas amostras apresentaram qualidade satisfatória (Capítulo 1, parte 4).

Para avaliação do perfil de dissolução, utilizou-se método descrito anteriormente com base nas condições definidas para o teste de dissolução de comprimidos (Capítulo 1, parte 1) e de cápsulas manipuladas (Capítulo 1, parte 2) considerando a influência da temperatura (Capítulo 1, parte 3); na legislação RDC 31/2010 (BRASIL, 2010b) e no capítulo <1092> da USP (THE UNITED, 2012b).

Nos ensaios intracorrída utilizando 6 unidades por lote e coleta de amostras em 3, 5, 8, 10, 12, 15, 30, 45 min, considerou-se aceitável o valor de DPR $\leq 20\%$ para os três primeiros tempos (40% do total, ou ≤ 10 min) e para os demais, DPR $\leq 10\%$ (BRASIL, 2010b; THE UNITED, 2012b). Pontos iniciais com DPR $> 20\%$ foram desconsiderados neste trabalho. Nos ensaios intercorrídas, foram avaliados um dos lotes de cápsulas manipuladas e os lotes de comprimidos similar (disponíveis no SUS) e referência, para os quais a diferença entre valores médios de liberação não deve exceder, em valor absoluto, 5% e 10% nos tempos em que a liberação for maior e menor que 85%, respectivamente (THE UNITED, 2012b). No caso de medicamentos de liberação muito rápida, em que o valor médio é de 85% em até 15 min, considerou-se DPR $\leq 10\%$ para o referido tempo. A eficiência de dissolução (%ED), em porcentagem para as unidades (n=6) dos lotes foi calculada a partir do quociente da integração da área sob a curva no intervalo 0-45 min pela área sob a curva total do retângulo (KHAN & RHODES, 1975). As %ED médias

foram analisadas por ANOVA e em caso de diferença entre as médias, o teste Tukey (IC 95%, $p < 0,05$) foi empregado para comparação das %ED médias dos lotes de medicamentos.

2.2 Seleção dos pacientes

Neste estudo prospectivo, mascarado para o médico, o número amostral estatisticamente definido foi 90 pacientes (3 grupos). Ao considerar que 91,67% dos pacientes tratados com SV respondem com redução do LDLc entre 25-35% e supor a distribuição gaussiana, estimou-se um desvio-padrão de 3% que proporciona um poder de 99% com confiabilidade de 95%. Desta forma consegue-se detectar uma diferença mínima de 4% entre tratamentos e cabe ressaltar que uma diferença de 6% é considerada clinicamente relevante (JONES *et al.*, 2003). Considerando taxas de abandono $\leq 10\%$ foram incluídos mais 3 pacientes em cada grupo do estudo.

Os indivíduos hipercolesterolêmicos (LDLcalc ≥ 160 mg/dL) dos municípios de Ouro Preto e Mariana, em Minas Gerais, triados com base em análises bioquímicas (CT, HDLc, TG, glicose, creatinina, uréia, ácido úrico, albumina, ALT/AST, CK, TSH) foram encaminhados ao cardiologista, que após anamnese, avaliação clínica e dos exames laboratoriais decidiu pela seleção do candidato de acordo com os critérios apresentados na **Tabela 2.3** (FOOD, 2011; SOCIEDADE, 2007).

Os candidatos aptos (n=107) foram convidados pelo médico a participar voluntariamente da pesquisa mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Apêndice B), redigido de acordo com a Resolução Nacional 196/96 CONEP (BRASIL, 1996) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG sob parecer nº ETIC236/08 (Apêndice C).

Estes pacientes (n=96, após reavaliação e abandono) foram aleatoriamente alocados, de forma balanceada por gênero, idade e nível de LDLc (dosado) em três grupos: para uso contínuo de um dos medicamentos teste (a) cápsulas manipuladas, (b) comprimidos disponíveis no SUS do município de Ouro Preto e (c) medicamento referência (Zocor® comprimidos, controle) por 8 semanas.

Tabela 2.1 - Critérios de inclusão e exclusão para seleção de voluntários em estudo de avaliação terapêutica de sinvastatina.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Homens e mulheres	Diabéticos tipos 1 ou 2, ou glicemia jejum >126 mg/dL
Idade entre 30 e 70 anos	Hiper/hipotireoidismo (0,40 µU/mL <TSH >4,00 µU/mL)
LDLc 160-220 (±10%) mg/dL	Doença hepática, ALT/AST >3 vezes LSR ^a
	Hipertrigliceridemia, TG ≥400 mg/dL,
	Creatinina ≥1,5 mg/dL, doença renal crônica
Pressão (normal ou controlada)	Doença cardíaca crônica
Ausculta cardíaca (sem alteração)	Síndrome de má absorção, ressecção gástrica
	CK >10 vezes LSR ^a , fibromialgia, lúpus, artrite
	Hipersensibilidade as estatinas ou seu uso nos últimos 3 meses
Eletrocardiograma (sem alteração)	Uso de fármacos ^b que interagem com SV e/ou CYP450 (3A4) ^c
	Grávidas e lactantes, ou pretensão de engravidar
	Hábito de fumar, ingerir chá ou café (≥1000 mL/dia)

a: LSR, limite superior de referência; b: inibidores, indutores e substratos (exceto losartan e nifedipina) de CYP3A4 constantes na **Tabela 3**; contra-indicados (**Tabela 5**), além de delavirdine, digoxina, efavirenz, esteróides sistêmicos (exceto anticoncepcionais e repositores hormonais), fluconazol, fluoxetina, fluvoxamina, imunossupressores, isotretinoína, nevirapina, niacina, paroxetina, rifabutina, sertralina; c: CYP450(3A4), isoenzima 3A4 do citocromo P450.

2.3 Avaliação bioquímica

As amostras de sangue venoso, cerca de 2,5 mL em ácido etilenodiamino-tetraacético com flúor (EDTA-fluoretado) utilizado para dosagem de glicose e 10 mL sem anticoagulante/aditivo para realização das demais determinações bioquímicas foram coletadas antes de iniciar o tratamento com SV (t_0), e após 4 (t_4) e 8 (t_8) semanas. Estas amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 15 minutos para obtenção de plasma e soro, respectivamente. Os voluntários foram orientados quanto aos procedimentos pré-coleta, jejum (12 a 14h), abstinência alcoólica (72 h) e ausência de atividade física vigorosa (24 h). A coleta de sangue foi realizada por profissional(is) habilitado(s) no Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC/EF/UFOP), empregando materiais descartáveis a vista do paciente, de acordo com as boas práticas de coleta de material biológico. As amostras identificadas pelo código constante no questionário-orientado do respectivo voluntário foram empregadas nas dosagens dos seguintes parâmetros bioquímicos LDLc, CT, HDLc, TG, ALT/AST, CK e glicose (se na triagem a glicemia em jejum >99 mg/dL e <126 mg/dL) antes (t_0) e após o tratamento medicamentoso (t_4 , t_8).

2.4 Acompanhamento do tratamento

Antes de iniciar o tratamento medicamentoso, cada voluntário foi entrevistado e submetido à avaliação antropométrica (peso, altura, %gordura corporal, circunferência da cintura (CC)) para registro em seu questionário-orientado (Apêndice D).

Os dados antropométricos e dos parâmetros bioquímicos no tempo zero foram empregados para identificar os voluntários com síndrome metabólica caracterizada pela presença de CC ≥ 94 cm para homens e ≥ 80 cm para mulheres associada a dois ou mais dos seguintes critérios: TG ≥ 150 mg/dL, HDLc < 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres, glicemia jejum ≥ 100 mg/dL, tratamento para hipertensão arterial (SOCIEDADE, 2007).

Um frasco de medicamento devidamente rotulado e codificado contendo 35 unidades de SV 20 mg (cápsulas ou comprimidos) foi entregue, aleatoriamente, a cada paciente pelo farmacêutico; com a orientação de ingerir uma cápsula ou um comprimido por dia acompanhado de 200 mL de água, após o jantar ou lanche. Os voluntários também receberam calendário para registro da ingestão diária do medicamento e as orientações sobre o tratamento por escrito, além da guia de agendamento (Apêndice E), contendo as orientações pré-coleta, para coleta de sangue 4 semanas após ter iniciado o tratamento medicamentoso. O código do medicamento recebido pelo voluntário, indicando a forma farmacêutica (cápsulas ou comprimidos) e a origem do medicamento (comércio, SUS, farmácia magistral) foi anotado em seu questionário-orientado.

Durante todo o estudo, cada voluntário foi orientado a não alterar seu estilo de vida (dieta, atividade física), a manter o uso de fármacos para doenças crônicas, como os anti-hipertensivos e a relatar qualquer patologia, sinais e sintomas à equipe de pesquisadores.

Após 4 semanas de tratamento, os voluntários foram submetidos à nova avaliação clínica e também pelo farmacêutico que os questionou sobre efeitos adversos e observou a adesão ao tratamento confrontando o número de cápsulas/comprimidos remanescentes no frasco e o registro no calendário. Quando não houve indicação médica contrária, o farmacêutico lhes forneceu um segundo frasco igualmente codificado contendo 25 unidades de SV 20 mg (cápsulas ou comprimidos) para completar o tratamento. Novamente, os voluntários receberam

um calendário com as orientações sobre o tratamento, por escrito, e a guia de agendamento para coleta de sangue 8 semanas após iniciarem o tratamento medicamentoso com as orientações pré-coleta. Decorridas 8 semanas de tratamento, os voluntários foram submetidos à avaliação clínica final e receberam os resultados dos exames laboratoriais. Igualmente, o farmacêutico avaliou a adesão dos voluntários ao tratamento e encaminhou-os à Unidade de Saúde de origem, com os resultados dos exames laboratoriais para atualização do prontuário. Os voluntários foram informados quanto à necessidade de relatar ao cardiologista qualquer alteração relevante no seu estado de saúde, durante (período de uso do medicamento) e após a pesquisa, para avaliação e acompanhamento diferenciado, se necessário. Estas informações foram registradas em seu questionário-orientado.

2.5 Análise estatística

Os resultados dos exames laboratoriais foram agrupados adequadamente e tratados estatisticamente por meio do ajuste de modelos de regressão linear para variáveis respostas do tipo contínuas (como CT, LDLc, HDLc, TG) precedidas de análise descritiva e análise univariada. Na análise univariada foram usados o teste t de Student ou seu correspondente não paramétrico, o teste de Wilcoxon. Para a comparação dos parâmetros de dois ou mais grupos, foi aplicado o modelo de análise de variância (ANOVA) ou o seu correspondente não paramétrico, o teste de Kruskal Wallis. Para testar a homogeneidade de médias, empregou-se o teste Tukey. Quando necessário, as estimativas dos intervalos de confiança foram obtidas para os parâmetros selecionados. O ambiente de programação estatística R (R DEVELOPMENT, 2012) foi a ferramenta utilizada em todas as análises dos dados.

3 Resultados e discussão

3.1 Avaliação da qualidade dos medicamentos empregados no ensaio clínico

A qualidade físico-química das cápsulas manipuladas em farmácia magistral selecionada de Belo Horizonte, MG (8 lotes), dos comprimidos disponíveis no SUS

(1 lote) e dos comprimidos referência (1 lote) empregados no ensaio clínico, expressa pelos resultados obtidos nos testes farmacopéicos descritos na Farmacopeia Brasileira (2010) é apresentada na **Tabela 2.4**.

Tabela 2.2 - Resultados dos testes farmacopéicos para os medicamentos contendo sinvastatina 20 mg empregados no ensaio clínico.

Lote	Determinação de peso $\pm dp^a$, mg	Desintegração, min	Uniformidade de conteúdo %média $\pm dp^a$ (VA ^b)	%Teor médio, (DPR ^c)	%Dissolução média, (DPR ^c)
	n=20	n=6	n=10	n=3	n=6
GK1981/1A ^d	124,84 \pm 8,21	18	96,9 \pm 5,3 (14,3)	97,1 (0,8)	91,1 (6,7)
GK1981/1B ^d	122,66 \pm 5,69	18	97,2 \pm 4,9 (13,0)	94,3 (0,5)	91,7 (5,9)
GK1981/2 ^d	124,97 \pm 8,46	23	98,7 \pm 5,6 (13,4)	96,1 (0,1)	94,6 (8,8)
GK2699/1 ^d	108,42 \pm 5,22	28	101,0 \pm 4,9 (11,7)	100,1 (0,3)	98,9 (6,4)
GK2701/1 ^d	106,13 \pm 7,69	32	99,2 \pm 5,1 (12,2)	97,5 (0,6)	97,5 (3,4)
SI9225/1 ^d	108,08 \pm 6,07	27	99,3 \pm 4,0 (9,7)	100,3 (0,5)	98,4 (4,0)
AT3519/1 ^d	119,48 \pm 5,98	16	104,9 \pm 4,2 (13,6)	102,1 (1,1)	96,1 (5,5)
AT3526/1 ^d	118,94 \pm 6,91	24	100,8 \pm 6,0 (14,5)	100,4 (0,5)	99,8 (4,2)
AQ122 ^e	211,82 \pm 5,76	<1	97,4 \pm 1,7 (5,2)	98,7 (1,3)	88,2 (5,6)
LLD034 ^f	205,88 \pm 3,69	16	96,7 \pm 1,7 (5,8)	99,3 (1,5)	97,9 (1,6)

a: dp, desvio-padrão absoluto; b: VA, valor de aceitação $\leq 15,0$; c: DPR, desvio padrão relativo; d: cápsulas manipuladas; e: comprimidos disponíveis no SUS; f: comprimidos referência.

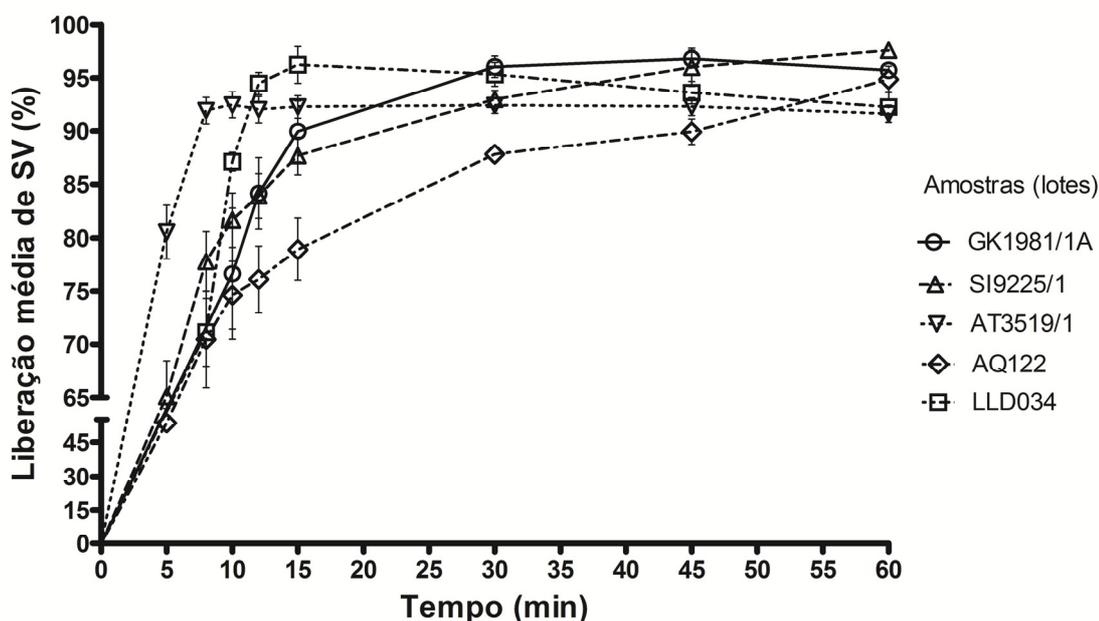
No teste determinação de peso, nenhum dos lotes de amostras apresentou mais que 2 unidades fora do limite especificado ($\pm 10\%$ em relação ao peso médio do conteúdo para cápsulas, $\pm 7,5\%$ em relação ao peso médio para comprimidos), e, nenhuma acima ou abaixo do dobro das porcentagens mencionadas.

A desintegração ocorreu em menos de 45 min (32 min) para as amostras de cápsulas e em menos de 30 min (16 min) para os comprimidos. Todas as amostras apresentaram uniformidade de conteúdo satisfatória com valores de aceitação inferiores a 15,0 (VA 5,2 a 14,5), variando entre 9,7 e 14,5 para cápsulas e entre 5,2 e 5,8 para comprimidos. Embora todas as amostras tenham apresentado homogeneidade adequada entre as unidades do mesmo lote, observou-se ser esta menor para as cápsulas (VA mais próximos do limite 15,0) que para os comprimidos. Estes resultados são condizentes com as características do processo magistral e industrial para obtenção das referidas formas farmacêuticas. O teor observado (94,3-102,1%VD) situou-se entre 90,0 a 110,0% do valor declarado e todos os lotes

apresentaram dissolução adequada com liberação do fármaco por unidade superior a 80% (Q+5%). Pelo exposto, tem-se que os lotes das amostras (cápsulas manipuladas, comprimidos disponíveis no SUS ou referência) utilizadas no ensaio clínico apresentaram qualidade de acordo com as especificações dos testes descritas na Farmacopeia Brasileira (2010) e/ou na literatura (MARQUES-MARINHO *et al.*, 2011).

Na **Figura 2.1** são apresentados os perfis de dissolução para as amostras empregadas no ensaio clínico. Excluíram-se o tempo 3 min e outros (5 e 8 min), para os quais, dependendo do lote, foram observados DPR >20%.

Figura 2.1- Perfis de dissolução de SV 20 mg (n=6) cápsulas manipuladas (lotes GK1981/1A, SI9225/1, AT3519/1), comprimidos disponíveis no SUS (AQ122) e referência (LLD034) empregados no ensaio clínico. Os perfis obtidos para os lotes GK1981/1A, AT3519/1 e SI9225/1 são representativos daquele(s) obtido(s) para GK1981/2, AT3526/1 e demais, respectivamente. Condições perfil dissolução: LSS 0,5% em fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7, 900 mL, 37 °C, pás, 50 rpm (comprimidos) ou 75 rpm (cápsulas), 45 min e 150 rpm, 60 min. Condições cromatográficas: C_{8e} , 30 °C, MeOH/ácido fosfórico 0,1% 80:20 v/v, 1,5 mL/min, UV λ 238 nm, 10 μ L.



Com exceção do lote AQ122 referente à amostra de comprimidos disponíveis no SUS, todos os demais lotes de cápsulas manipuladas e do comprimido referência apresentaram liberação do fármaco $\geq 85\%$ em até 15 min e DPR <10%. Desta forma, considerou-se o medicamento referente ao lote AQ122 como de liberação rápida e os demais, de liberação muito rápida no meio de dissolução contendo LSS 0,5%.

A **Tabela 2.5** apresenta a diferença entre os valores médios de liberação do fármaco em função do tempo nos ensaios intercorridas (2 dias) para um dos lotes de cápsulas manipuladas e para os lotes de comprimidos disponíveis no SUS e referência. A diferença entre os valores médios de liberação de SV observada para as três amostras nos ensaios intercorrida foi inferior a 5% para qualquer tempo.

Tabela 2.3 - Resultados intercorrida (2 dias) de liberação média^a de SV 20 mg a partir de cápsulas manipuladas (lote GK2701/1), comprimidos similar (AQ122) e referência (LLD034) em estudos de dissolução^a, por CLAE^b.

Tempo (min)	%SV dissolvida, média (n=6)								
	Cápsulas manipuladas (GK2701/1)			Comprimidos similar (AQ122)			Comprimidos referência (LLD034)		
	Dia I	Dia II	(I – II)	Dia I	Dia II	(I – II)	Dia I	Dia II	(I – II)
3 ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	68,8	70,0	1,2	50,4	53,4	3,0	- ^c	- ^c	- ^c
8	80,3	80,1	0,1	67,9	70,5	2,6	71,1	70,0	1,1
10	82,5	83,4	0,9	71,3	74,6	3,3	87,1	89,3	2,2
12	88,1	86,9	1,3	75,9	76,1	0,2	94,5	93,1	1,4
15	88,6	88,9	0,3	83,4	78,9	4,5	96,2	96,0	0,2
30	93,7	97,1	3,4	85,1	87,8	2,7	95,3	96,6	1,3
45	96,5	98,1	1,6	86,9	89,9	3,0	93,6	95,9	2,3
60 ^d	97,0	98,5	1,5	96,4	94,9	1,6	92,3	95,4	3,2

a: LSS 0,5% em fosfato de sódio monobásico 0,01 M, pH 7, 900 mL, 37 °C, pás, 50 rpm (comprimidos) ou 75 rpm (cápsulas), 45 min; b: C_{8e} (250×4 mm, 5 µm), 30 °C, MeOH/ácido fosfórico 0,1% 80:20 v/v, 1,5 mL/min, UV λ 238 nm e 10 µL; c: DPR, desvio padrão relativo >20%; d: esgotamento 15 min a 150 rpm.

Os valores de eficiência de dissolução expressos em porcentagem (%ED) calculados no intervalo 0-45 min para os lotes de cápsulas e comprimidos são apresentados na **Tabela 2.6**.

A análise de variância revelou haver diferença entre %ED média dos 10 lotes (p <0,05). As médias de %ED dos lotes foram comparadas pelo teste de Tukey e os resultados apresentados na **Figura 2.2**.

A menor %ED média foi observada para o lote AQ122 (**Tabela 2.6**), esta média foi homogênea às médias dos lotes GK1981/1A e GK1981/2. Por outro lado, o lote AT3526/1 apresentou a maior %ED média, a qual não foi homogênea a dos lotes GK1981/1A, GK1981/2 e AQ122. Médias não homogêneas também foram observadas entre os lotes AT3519/1 e GK1981/2. Todos os lotes, exceto AQ122, apresentaram %ED média homogênea em relação àquela do lote LLD034,

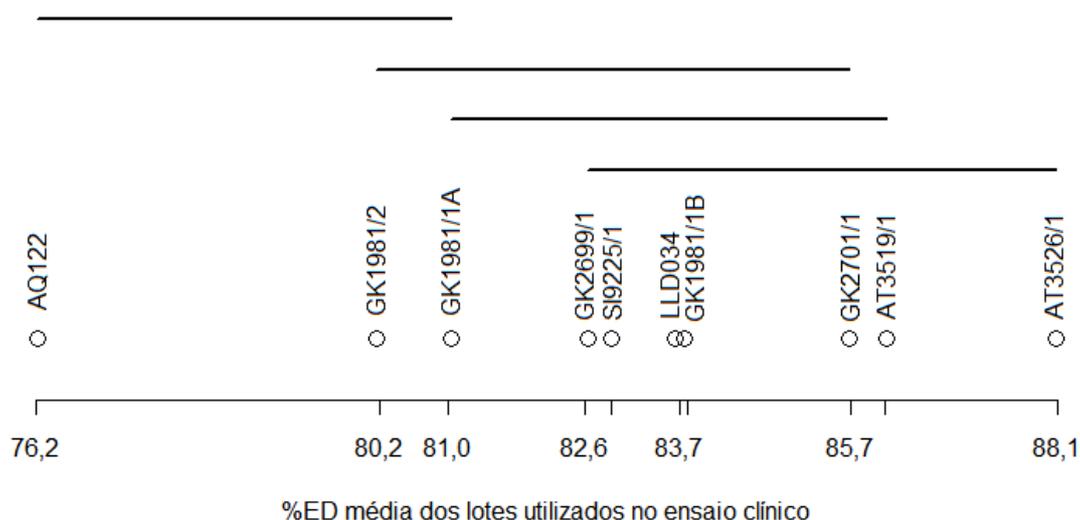
medicamento referência (**Figura 2.2**). Todos os lotes foram considerados com qualidade satisfatória para utilização no ensaio clínico.

Tabela 2.4 - Resultados de eficiência de dissolução (%) obtidos a partir dos perfis de dissolução construídos de 0-45 min para SV 20 mg cápsulas e comprimidos (n=6) dos lotes (n=10) empregados no ensaio clínico.

Lote	Eficiência de dissolução (%)			ANOVA ^b
	Unitária	Média± desvio-padrão	DPR (%) ^a	
GK1981/1A ^c	83,1; 73,6; 80,7; 83,4; 80,6; 84,8	81,0±4,0	4,9	p 5,52×10 ⁻⁶ F _{calc} 6,39
GK1981/1B ^c	81,7; 83,1; 86,0; 83,0; 82,9; 85,8	83,7±1,8	2,1	
GK1981/2 ^c	82,1; 86,3; 80,4; 76,2; 77,5; 78,5	80,2±3,6	4,6	
GK2699/1 ^c	75,7; 83,6; 82,1; 87,7; 79,0; 87,7	82,6±4,8	5,8	
GK2701/1 ^c	84,1; 84,0; 86,6; 87,3; 87,7; 84,4	85,7±1,7	2,0	
SI9225/1 ^c	76,9; 81,5; 85,4; 86,0; 83,1; 84,5	82,9±3,4	4,1	
AT3519/1 ^c	86,2; 88,9; 84,1; 86,5; 86,7; 84,3	86,1±1,7	2,0	
AT3526/1 ^c	89,8; 85,2; 86,4; 93,0; 83,6; 90,5	88,1±3,6	4,1	
AQ122 ^d	78,1; 75,7; 74,0; 76,7; 82,0; 70,9	76,2±3,8	4,9	
LLD034 ^e	84,0; 88,3; 82,7; 81,9; 81,1; 83,9	83,6±2,5	3,0	

a: DPR, desvio padrão relativo; b: ANOVA, análise de variância, F_{crit} 2,07, p <0,05 significativo; c: cápsulas manipuladas; d: comprimidos disponíveis no SUS; e: comprimidos referência.

Figura 2.2 – Resultados de comparação dos perfis de dissolução por meio das médias de %eficiência de dissolução (ED) para SV 20 mg cápsulas e comprimidos dos lotes (n=10) empregados no ensaio clínico, usando o teste Tukey.



3.2 Perfil da amostra selecionada

Cerca de 300 indivíduos hipercolesterolêmicos foram triados e cerca de 120 encaminhados ao cardiologista, dos quais 107 assinaram o TCLE. Destes

voluntários, 99 (63 mulheres e 36 homens) apresentaram LDLc dosado 160-220 mg/dL com variação $\pm 10\%$ (SOCIEDADE, 2007) na coleta de tempo zero e foram alocados de forma balanceada por gênero, idade e nível de LDLc nos grupos de tratamento (n=30+3, cada) em uso de um dos medicamentos teste (a) cápsulas manipuladas, (b) comprimidos disponíveis no SUS e do medicamento referência (c) Zocor® comprimidos (controle) por 8 semanas. Durante o estudo, 3 voluntários (1 de cada grupo) abandonaram o tratamento após 4 semanas: dois deles (grupo medicamentos teste) não compareceram às coletas de sangue subsequentes e o outro, devido a efeitos adversos gastrintestinais (grupo medicamento referência). Desta forma, no presente estudo, foram considerados os dados de 96 indivíduos sendo 20 (62,5%) mulheres e 12 (37,5%) homens em cada grupo de tratamento, distribuição de frequências semelhantes àquelas dos usuários dos serviços do SUS relatada em outros estudos (RIBEIRO M. *et al.*, 2006; RIBEIRO E., 2011).

As características sócio-econômicas destes voluntários são apresentadas na **Tabela 2.7**. A amostra em sua maior parte foi constituída por indivíduos casados, com ensino fundamental incompleto e rendimento mensal de 1 a 2 salários mínimos. Como em outros estudos, observou-se predomínio de indivíduos de cor branca em detrimento das demais (LAMARCA & VETTORE, 2012; RIBEIRO M. *et al.*, 2006). Os indivíduos eram principalmente aposentados ou estavam envolvidos com ocupações do lar como verificado em estudo com pacientes hipertensos usuários do SUS na cidade Rio Verde, Goiás (RIBEIRO E., 2011). Quase metade dos voluntários (49%) era sedentária e 51% destes faziam uso frequente de algum medicamento, normalmente anti-hipertensivos.

3.3 Avaliação bioquímica

Na **Tabela 2.8**, estão sumarizados os valores das dosagens bioquímicas de CT, HDLc, LDLc, TG, CK, ALT e AST dos voluntários antes e após 4 e 8 semanas de tratamento com os diferentes medicamentos contendo SV 20 mg.

Os valores de LDLc determinado em t_0 que possibilitou a alocação dos voluntários nos grupos de tratamento foi comparado com os valores de LDLcalc (equação Friedewald, TG <400 mg/dL) por meio de suas médias. A diferença destes valores não foi estatisticamente igual a zero em t_0 ($p 2,4 \times 10^{-16}$), como também em t_4 ($p 2,1 \times 10^{-9}$), t_8 ($p 1,52 \times 10^{-5}$). Desta forma, ambos os valores de LDLc, calculado e

determinado, foram considerados durante este estudo. Houve redução dos valores médios de LDLc e LDLcalc (**Tabela 2.8**) após os tratamentos com diferentes medicamentos contendo SV 20 mg ($p < 2,2 \times 10^{-16}$).

Tabela 2.5 - Características sócio-econômicas dos voluntários selecionados.

Variáveis	Categorias	Voluntários (n=96)	
		n	%
Estado civil	Casado(a)	57	59,4
	Divorciado(a)/separado(a)	11	11,5
	Solteiro(a)	20	20,8
	Viúvo(a)	8	8,3
Cor	Branca	46	47,9
	Parda	37	38,5
	Negra	13	13,6
Escolaridade	Nenhuma	3	3,1
	Fundamental incompleto	51	53,1
	Fundamental completo	12	12,5
	Ensino médio incompleto	9	9,4
	Ensino médio completo	17	17,7
	Ensino superior completo	4	4,2
Rendimento mensal	Nenhum	14	14,6
	< 1 salário mínimo ^a	2	2,1
	1 a 2 salários mínimos ^a	62	64,6
	3 a 4 salários mínimos ^a	12	12,5
	> 4 salários mínimos ^a	4	6,2
Ocupação	Aposentado(a)	25	26,1
	Atividade informal	13	13,5
	Comercial	12	12,5
	Do Lar	14	14,6
	Servidor(a) público(a)	12	12,5
	Outros	20	20,8
Atividade física	Nenhuma	47	49,0
	Esporádica	4	4,2
	1 a 3 vezes por semana	22	22,8
	> 3 vezes por semana	23	24,0
Medicamento(s)	Nenhum	47	49,0
	Ansiolítico (clonazepam, diazepam)	6	6,2
	Antidepressivo (amitriptilina, nortriptilina)	4	4,1
	Anti-hipertensivos (associados ou não) ^b	35	36,5
	Antiulceroso (omeprazol, ranitidina)	10	10,4
	Outros (anti-histamínicos, analgésicos, etc)	8	8,3

a: valor do salário mínimo R\$545,00 ano 2011; b: hidroclorotiazida, captopril, losartan, propranolol, anlodipina, atenolol, enalapril.

Tabela 2.6 - Resultados das dosagens bioquímicas de 32 voluntários em cada um dos tratamentos teste (a), (b) e referência (c) com SV 20 mg nos períodos t_0 , t_4 e t_8 semanas.

Parâmetro (unidade)	t_{sem}	Valor da dosagem (média±desvio-padrão; mediana)			p^a
		(a) Cápsula	(b) Comprimido	(c) Referência	
LDLc (mg/dL)	t_0	172±17; 172	171±19; 169	173±21; 167	0,94 ^b
	t_4	108±16; 107	107±21; 102	106±19; 102	0,81 ^b
	t_8	107±17; 105	106±19; 102	105±17; 106	0,93 ^c
LDLcalc ^d (mg/dL)	t_0	185±18; 181	188±23; 187	190±26; 187	0,79 ^b
	t_4	117±20; 115	113±25; 111	114±23; 109	0,65 ^b
	t_8	109±19; 108	111±20; 111	110±22; 111	0,93 ^c
Colesterol total (mg/dL)	t_0	272±22; 272	273±27; 270	276±24; 272	0,80 ^b
	t_4	198±20; 197	200±26; 197	195±24; 196	0,71 ^c
	t_8	193±26; 197	193±23; 195	192±23; 196	0,96 ^c
HDLc (mg/dL)	t_0	57±10; 56	60±12; 59	61±11; 59	0,39 ^c
	t_4	56±10; 54	61±15; 59	61±12; 58	0,28 ^b
	t_8	58±11; 57	61±14; 61	61±13; 57	0,45 ^c
Triglicérides (mg/dL)	t_0	152±54; 153	130±71; 110	123±56; 111	0,05 ^{b,e}
	t_4	126±51; 114	126±83; 94	102±53; 87	0,07 ^b
	t_8	135±62; 116	102±53; 88	105±45; 98	0,01 ^b
ALT (U/L)	t_0	24±10; 22	25±12; 22	21±11; 19	0,33 ^b
	t_4	27±13; 23	28±13; 24	26±12; 22	0,74 ^b
	t_8	30±15; 26	27±12; 23	23±10; 21	0,09 ^b
AST (U/L)	t_0	29±7; 28	29±8; 29	27±6; 26	0,30 ^c
	t_4	29±9; 27	28±9; 26	29±10; 28	0,75 ^b
	t_8	33±9; 31	33±9; 30	29±6; 29	0,10 ^b
CK (U/L)	t_0	145±87; 125	196±103; 159	196±123; 160	0,07 ^b
	t_4	181±133; 130	204±109; 183	242±198; 174	0,24 ^b
	t_8	166±89; 144	232±168; 183	210±142; 165	1e ⁻¹⁴ ^b
Glicose (mg/dL)	t_0	94±10; 92	93±11; 92	96±9; 95	0,43 ^b

a: significativo se menor 0,05; b: Kruskal-Wallis (mediana), c: Anova (média); d: LDLcalc, valor obtido pela equação de Friedewald se TG ≤400 mg/dL; e: valor inconclusivo.

Os níveis séricos de CT dos voluntários em t_0 variaram entre 229,0 e 355,4 mg/dL, cerca de 95% dos valores foram superiores a 240 mg/dL, nível considerado como de alto risco para doenças cardiovasculares. Os níveis séricos de CT dos voluntários apresentaram valores semelhantes para os grupos durante todo o estudo, com redução para níveis desejados (<200 mg/dL, $p < 2,2 \times 10^{-16}$) a partir de t_4 (Tabela 2.8).

Das 60 mulheres, 5 apresentaram nível sérico de HDLc baixo (<50 mg/dL) em t_0 , sendo o valor médio observado 63 mg/dL. Dos 36 homens, 2 apresentaram nível de HDLc baixo (<40 mg/dL) em t_0 e valor médio 53 mg/dL. Estes valores médios de

HDLc foram estatisticamente iguais àqueles em t_4 ($p > 0,62$) e t_8 ($p > 0,07$) para ambos os gêneros. O valor médio de HDLc mais elevado para mulheres que para os homens explica os níveis séricos médios de HDLc nos grupos aproximar-se de 60 mg/dL, devido a predominância das mulheres (20) em relação aos homens (12).

Dos 96 voluntários, 33 apresentavam TG ≥ 150 mg/dL (SOCIEDADE, 2007) em t_0 , a maioria deles (17) foram alocados no grupo teste (a) representando 53,1% de seus indivíduos. Os demais voluntários com TG ≥ 150 mg/dL (9+7) foram alocados nos grupos teste (b) e referência (c), respectivamente. Isto explica o valor médio dos níveis séricos de TG superior ao desejável (150 mg/dL) no grupo teste (a) diferentemente daqueles dos demais grupos, **Tabela 2.8**. Dos voluntários, 24 (8+9+7, grupos a,b,c, respectivamente) apresentaram TG ≥ 150 mg/dL após t_4 e 22 (9+6+7, grupos a,b,c, respectivamente) após t_8 .

Determinações das atividades de ALT, AST e CK nos períodos t_0 , t_4 e t_8 foram realizadas a fim de monitorar os efeitos adversos decorrentes do tratamento com estatinas. Os valores séricos dos voluntários em t_0 variaram entre 6 a 60 U/L para ALT (6 acima do LSR 40 U/L) e entre 7 a 49 U/L para AST (10 acima do LSR 38 U/L). Observou-se elevação significativa dos níveis de ALT com 4 ($p 5,8 \times 10^{-6}$) e 8 ($p 9,1 \times 10^{-5}$) semanas de tratamento, com leve tendência a declínio em t_8 , porém não significativa ($p 0,42$). Por outro lado, a elevação significativa dos níveis séricos de AST dos 96 voluntários avaliada por meio da mediana só ocorreu após 8 semanas de tratamento ($p 1,4 \times 10^{-5}$). Estes resultados podem ser explicados pela localização diferenciada destas enzimas nas células, a ALT situa-se no citoplasma, enquanto a AST está presente nas mitocôndrias citoplasmáticas. Desta forma, o extravasamento da AST para o sangue requer maior tempo comparado a ALT.

As medianas dos níveis séricos de CK das mulheres (133 U/L) e dos homens (188 U/L) em t_0 foram menores que os respectivos limites superiores de referência (LSR 170 U/L, mulheres e 195 U/L, homens). O valor máximo correspondeu a 2,9 e 2,5 vezes o LSR para mulheres e homens, respectivamente. Tais elevações de CK não constituem contraindicação ao tratamento com sinvastatina. As medianas dos níveis séricos de CK em t_4 ($p 0,11$) e t_8 ($p 0,10$) não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) da mediana basal (t_0) para as mulheres. Por outro lado, para os homens, houve diferença entre as medianas nos períodos t_4-t_0 ($p 8 \times 10^{-3}$) e t_8-t_0 ($p 0,02$). As maiores elevações do nível sérico de CK correspondeu a 3,5 vezes o

LSR para as mulheres e a 4,6 vezes o LSR para os homens e ocorreram após 4 semanas de tratamento.

Dos 23 voluntários que apresentaram glicemia de jejum alterada ($99 < \text{glicose} < 126 \text{ mg/dL}$) em t_0 e tiveram seus níveis monitorados durante o tratamento, 7 pertenciam ao grupo teste (a) cápsulas manipuladas, 10 ao grupo teste (b) comprimido SUS e 6 ao grupo controle (c) comprimido referência. Destes voluntários, 14 (6+3+5, grupos a,b,c, respectivamente) mantiveram níveis alterados em t_4 e 15 (7+4+4, grupos a,b,c, respectivamente) em t_8 .

3.4 Acompanhamento do tratamento

A amostra ($n=96$) foi constituída principalmente por indivíduos adultos de ambos os gêneros, não idosos, com idade média 52 ± 11 anos. Não houve diferença significativa ($p 0,30$) entre a idade média das mulheres (53 ± 11 anos) e dos homens (50 ± 11 anos). Como esperado, a massa corporal em kg das mulheres (65 ± 9 kg) apresentou valor médio inferior àquele dos homens (79 ± 12 kg; $p 1,59 \times 10^{-7}$); como também a média da altura das mulheres ($1,53 \pm 0,05$ m) comparada à dos homens ($1,69 \pm 0,06$ m; $p < 2,2 \times 10^{-16}$). O valor médio do índice de massa corporal ($28 \pm 4 \text{ kg/m}^2$) dos voluntários indicou sobrepeso ($25 \leq \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$, WORLD, 2003) da maioria destes indivíduos, independentemente do gênero ($p 0,88$). Entretanto, o IMC não considera a gordura corporal e a massa magra.

Não houve diferença entre a média da medida (cm) da circunferência da cintura das mulheres (92 ± 9) e dos homens (94 ± 9 ; $p 0,23$). Contudo, como o valor de referência para mulheres (≥ 80 cm) é inferior ao dos homens (≥ 94 cm) observou-se que 90% das voluntárias e 43% dos voluntários apresentaram risco aumentado para doenças cardiovasculares (SOCIEDADE, 2007). A medida da CC associada aos resultados dos parâmetros bioquímicos TG, HDLc, glicose e ao uso de fármacos anti-hipertensivos permitiu a identificação de 27 voluntários (18 mulheres e 9 homens) com síndrome metabólica. Destes voluntários (mulheres+homens) portadores de síndrome metabólica 13 (9+4), 9 (7+2) e 5 (2+3) pertenciam aos grupos de tratamento (a), (b) e (c), respectivamente. O valor médio da gordura corporal (%) observado para as mulheres ($35 \pm 6\%$) foi superior àquele para os homens (25 ± 6 ; $p 1,89 \times 10^{-10}$), resultado esperado considerando a semelhança etária

dos gêneros. Estes valores estão em níveis indicativos de sobrepeso e em concordância com estudo anterior (REZENDE *et al.*, 2006). De forma inversa, a massa magra (%) das mulheres (65±6) apresentou média inferior àquela dos homens (75±6; $p 1,89 \times 10^{-10}$).

Na **Tabela 2.9**, são apresentados os dados de idade e da avaliação antropométrica dos voluntários antes de iniciar o tratamento (t_0) com um dos medicamentos contendo SV 20 mg.

Tabela 2.7 – Dados da avaliação antropométrica dos 32 voluntários em cada grupo de tratamento com SV 20 mg (a) cápsulas, (b) comprimidos teste e (c) comprimidos referência realizada em t_0 .

Parâmetro (unidade)	Tratamento (código)	Valor da medida (média±desvio-padrão; mediana)		
		Mulheres (n=20)	Homens (n=12)	Total (n=32)
Idade (anos)	a	55±8; 53	49±10; 49	52±10; 53
	b	53±11; 54	50±10; 53	52±11; 54
	c	50±12; 52	52±12; 53	51±12; 52
	valor-p	0,50 ^b	0,71 ^b	0,95 ^b
Massa (kg)	a	66±9; 66	77±11; 76	70±11; 68
	b	64±9; 63	80±11; 77	70±12; 71
	c	65±11; 63	80±13; 79	71±14; 73
	valor-p	0,67 ^b	0,87 ^b	0,94 ^b
Altura (m)	a	1,55±0,06; 1,56	1,67±0,07; 1,66	1,60±0,09; 1,59
	b	1,52±0,06; 1,51	1,69±0,04; 1,70	1,58±0,10; 1,58
	c	1,53±0,05; 1,54	1,70±0,06; 1,68	1,60±0,09; 1,59
	valor-p	0,11 ^b	0,41 ^b	0,76 ^b
Índice de massa corporal (kg/m ²)	a	27±3; 27	27±5; 27	27±4; 27
	b	28±4; 26	28±4; 27	28±4; 27
	c	28±5; 27	28±4; 28	28±4; 28
	valor-p	0,97 ^b	0,95 ^b	0,99 ^b
Circunferência cintura (cm)	a	92±7; 91	95±11; 95	93±9; 92
	b ^a	92±9; 90	94±5; 93	92±8; 92
	c	91±12; 90	93±11; 92	92±11; 90
	valor-p	0,92 ^b	0,89 ^b	0,91 ^b
Gordura corporal (%)	a	35±6; 34	25±8; 23	31±8; 32
	b	36±4; 35	25±6; 23	32±7; 32
	c	35±7; 36	25±6; 25	31±8; 31
	valor-p	0,91 ^b	0,97 ^b	0,91 ^b
Massa magra ^c (%)	a	65±6; 66	75±8; 76	69±8; 68
	b	64±4; 65	74±6; 77	68±7; 67
	c	65±7; 64	75±6; 74	69±8; 69
	valor-p	0,91 ^b	0,97 ^b	0,91 ^b

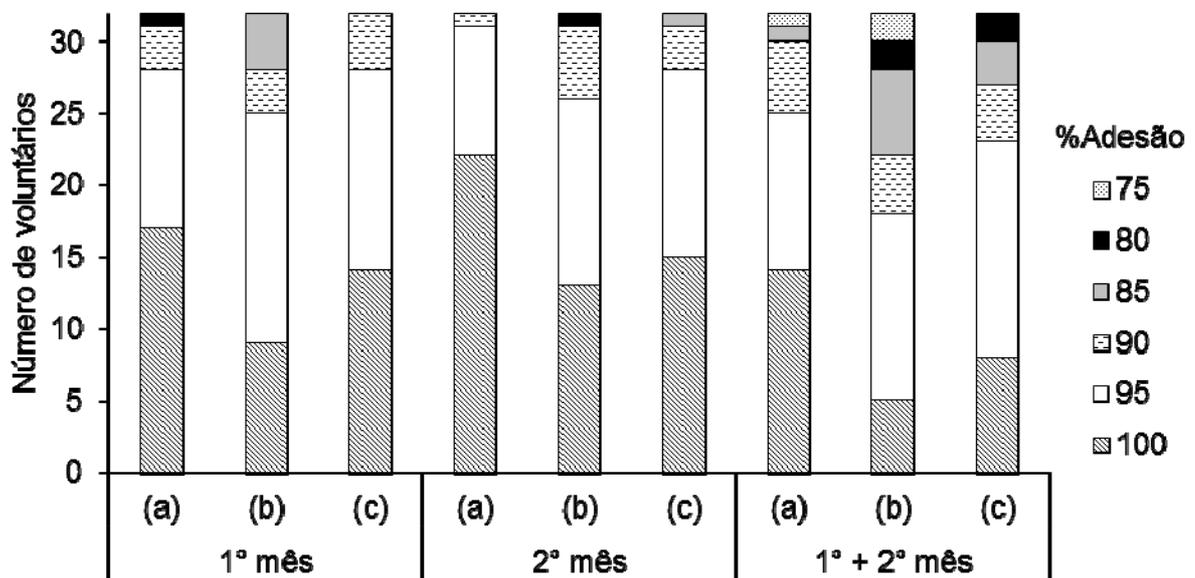
a: um homem não teve esta medida determinada; b: Kruskal-Wallis (mediana); c: Massa magra=(100–gordura corporal)%.

Os valores de mediana, da idade e dos dados antropométricos (massa, altura, IMC, CC, gordura corporal e massa magra) para os gêneros feminino (n=20 por grupo) e masculino (n=12 por grupo) foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis ($n < 30$). Desta forma, também o valor de mediana global dos referidos parâmetros foram avaliados para cada grupo (n=32).

Os valores de mediana observados para os parâmetros (idade, massa, altura, IMC, CC, gordura corporal e massa magra) não diferiram nos grupos mesmo ao considerar os gêneros separadamente ($p > 0,05$). Desta forma, elimina-se a possível influência diferenciada destes parâmetros durante a avaliação das variações dos parâmetros bioquímicos após terapia.

A adesão ao tratamento com SV 20 mg cápsulas e comprimidos (teste e referência) foi avaliada confrontando a contagem das unidades remanescentes no frasco e as datas registradas no calendário (**Figura 2.3**).

Figura 2.3 – Adesão dos 96 voluntários dos três grupos (n=32) durante o 1º mês, 2º mês e após tratamento completo (1º + 2º mês) com SV 20 mg (a) cápsulas, (b) comprimidos teste e (c) comprimidos referência.



A adesão total (100%) foi maior no 2º mês (52,1%) comparado ao 1º mês (41,7%) de tratamento para todos os grupos. Apenas 28,1% dos 96 voluntários apresentaram adesão 100% ao final deste estudo, na ordem decrescente para usuários dos tratamentos (a) cápsulas, (c) comprimido referência e (b) comprimido teste. Independente do grupo de tratamento, a adesão final variou entre 100% e 77%, sendo $\geq 80\%$ para os voluntários do grupo (c) e $> 75\%$ para aqueles dos grupos

(a) e (b). Adesão satisfatória ($\geq 80\%$) foi atingida por todos os voluntários tanto no 1º quanto no 2º mês de tratamento (OIGMAN, 2006). Desta forma, optou-se por não excluir nenhum dos voluntários, embora, nos grupos teste (a) e (b) um (78,3%) e dois (78,3% e 76,7%) deles, respectivamente, tenham apresentado adesão inferior a 80%.

Os efeitos adversos relatados pelos voluntários durante o tratamento com os diferentes medicamentos são apresentados na **Tabela 2.10**.

Tabela 2.8 – Efeitos adversos relatados pelos voluntários após 8 semanas de tratamento com SV 20 mg cápsulas (teste) e comprimidos (teste e referência).

Efeitos adversos	Número relatado de casos por tratamento		
	(a) Cápsulas	(b) Comprimidos	(c) Referência
Nenhum	24	22	17
Ansiedade	-	1	-
Cefaléia	1	3	2
Distúrbios do sono	2 ^a	2 ^b	1 ^b
Dor na deglutição	-	-	1
Gástricos	2	1	2
Hiperidrose	-	-	3
Hipotensão	-	1	-
Inchaço das pernas	1	-	-
Intestinais (flatulência, diarreia, dor)	0	1	3
Muscular (braços ou pernas)	-	-	2
Ressecamento da boca	1	-	-
Vertigem	1	1	1

a: sonolência, b: insônia.

A maioria dos voluntários, 75%, 68,8% e 53,1% não relatou qualquer efeito adverso após o tratamento com SV 20 mg cápsulas, comprimido teste e referência, respectivamente. Cefaleia, vertigem, distúrbios do sono (sonolência ou insônia), sintomas gástricos foram observados em todos os grupos de tratamento (BASNIWAL & JAIN, 2012). Sintomas musculares foram relatados apenas por voluntários (n=2) em uso do medicamento referência e correspondeu a 2% dos voluntários acompanhados durante o estudo.

3.5 Análise estatística

Os dados dos parâmetros bioquímicos LDLc, CT, TG, ALT/AST e CK, para os quais observou-se diferença estatisticamente significativa entre as médias em t_4 e/ou t_8 em relação a t_0 , foram empregados para calcular as respectivas variações, expressas em porcentagem e apresentadas de forma sumarizada na **Tabela 2.11**.

Tabela 2.9 – Resultados das variações dos parâmetros bioquímicos dos voluntários nos grupos de tratamento teste (a), (b) e referência (c) com SV 20 mg nos intervalos t_{0-4} e t_{0-8} .

Parâmetro (unidade)	t_{sem}	%Variação, mediana; 1º e 3º quartis ou média \pm desvio-padrão			p
		(a) Cápsula	(b) Comprimido	(c) Referência	
LDLc (mg/dL)	t_{0-4}	-36,9 \pm 8,7	-37,1 \pm 10,8	-38,6 \pm 9,4	0,76 ^a
	t_{0-8}	-37,9 \pm 8,3	-38,2 \pm 10,2	-39,1 \pm 8,6	0,87 ^a
LDLcalc ^b (mg/dL)	t_{0-4}	-36,9 \pm 9,0	-39,7 \pm 11,3	-40,1 \pm 9,1	0,36 ^a
	t_{0-8}	-41,1 \pm 9,8	-40,8 \pm 9,3	-42,3 \pm 9,2	0,81 ^a
Colesterol total (mg/dL)	t_{0-4}	-27,1 \pm 6,7	-26,7 \pm 8,8	-29,3 \pm 7,1	0,35 ^a
	t_{0-8}	-28,9 \pm 8,5	-29,3 \pm 8,5	-30,4 \pm 6,9	0,73 ^a
Triglicérides (mg/dL)	t_{0-4}	-16,3; -33,0 e -4,0	-7,8; -31,3 e 31,0	-13,6; -36,8 e 3,7	0,26 ^c
	t_{0-8}	-18,1; -30,2 e -3,3	-18,9; -33,7 e -2,2	-14,4; -30,6 e 7,5	0,66 ^c
ALT (U/L)	t_{0-4}	16,7; -8,2 e 37,2	9,5; -8,2 e 37,2	26,6; -3,4 e 52,5	0,40 ^c
	t_{0-8}	22,2; -0,5 e 59,4	13,2; -6,0 e 31,3	10,6; -4,9 e 39,1	0,32 ^c
AST (U/L) ^d	t_{0-8}	12,9; 4,4 e 26,5	7,6; -2,8 e 19,4	11,3; -6,1 e 24,5	0,54 ^c
CK (U/L)	t_{0-4}	10,0; -12,5 e 44,7	5,5; -13,4 e 27,5	10,4; -0,9 e 45,9	0,46 ^c
	t_{0-8}	9,5; -3,6 e 33,1	7,9; -10,2 e 43,8	10,9; -10,6 e 39,1	0,97 ^c

a: Anova (média); b: LDLcalc, valor obtido pela equação de Friedewald se TG \leq 400 mg/dL; c: Kruskal-Wallis (mediana); d: t_{0-4} não avaliado, pois diferença entre as médias iguais a zero.

O decréscimo nos níveis de LDLc basais foram observados em t_{0-4} e t_{0-8} ($p < 2,2 \times 10^{-16}$), mas não houve diferença entre os valores médios de t_{0-4} e t_{0-8} dentro dos grupos ($p > 0,49$). Os valores médios da redução de cada intervalo t_{0-4} e t_{0-8} não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,76$) e se aproximaram do limite superior da faixa 27-42% (SOCIEDADE, 2007) e dentro da faixa 33-38% relatada para dose de 20 mg (FOOD, 2011; HOU & GOLDBERG, 2009; JONES *et al.*, 2003; SOLANGI *et al.*, 2012). Os valores médios de redução de LDLcalc em t_{0-4} e t_{0-8} foram estatisticamente iguais para os grupos ($p > 0,36$) comportando-se conforme descrito para LDLc, exceto para o grupo das cápsulas, cujo valor médio de redução em t_{0-4} diferiu estatisticamente daquele em t_{0-8} ($p 0,03$). A diferença dos valores médios de redução de LDLc e LDLcalc no intervalo t_{0-4} foi significativa apenas para o grupo teste comprimidos ($p 2 \times 10^{-3}$) e para todos os grupos no intervalo t_{0-8} ($p < 5,5 \times 10^{-3}$). Houve redução significativa ($p < 2,2 \times 10^{-16}$) do valor médio de CT dos

voluntários dos três grupos nos intervalos t_{0-4} e t_{0-8} para cada um destes intervalos, não houve diferença entre as médias dos grupos ($p \geq 0,35$). Além disso, os valores médios de redução em t_{0-4} e t_{0-8} foram estatisticamente iguais em qualquer dos grupos ($p > 0,13$). Os valores médios de CT após tratamento se aproximaram daqueles relatados, 25,7% (DAVIDSON & TOTH, 2004; JONES *et al.*, 2003) e 31% (SOLANGI *et al.*, 2012) para a dose de 20 mg do fármaco.

A variação dos níveis de HDLc nos grupos após tratamento não foi comparada uma vez que as diferenças entre as médias ou medianas nos intervalos t_{0-4} e t_{0-8} não foram significativas ($p > 0,05$). Este resultado corrobora com relatos de elevação não significativa ou modesta de HDLc com o uso de estatinas (CORTESE & LIBERATOSCIOLI, 2003; KOH *et al.*, 2008). Em estudos semelhantes com medicamentos genérico(s) e referência contendo SV 20 mg ($n=3$) e 10 mg ($n=2$), houve elevação dos níveis séricos de HDLc (18%) nos três grupos após 12 semanas, e apenas no grupo genérico (2,4%) após 8 semanas de tratamento, respectivamente (SOLANGI *et al.*, 2012; WIWANITKIT, *et al.*, 2002). A elevação de HDLc depende da dose de sinvastatina administrada e da duração do tratamento, esta última explica em parte a divergência com os resultados encontrados. Além disso, nos trabalhos citados a diferença observada pode ser decorrente de fatores étnicos (paquistaneses e tailandeses) e dos valores basais de HDLc (30-31 mg/dL; 45-46 mg/dL) inferiores ao do presente estudo (57-61 mg/dL).

Os demais parâmetros bioquímicos foram comparados por meio das medianas usando o teste Kruskal-Wallis, uma vez que os resíduos do modelo ANOVA não atenderam à suposição de normalidade.

Os níveis de TG reduziram após tratamento para todos os grupos conforme medianas observadas nos intervalos t_{0-4} (7,8-16,3%) e t_{0-8} (14,4-18,9%). Apenas para o grupo (b), o decréscimo em t_{0-8} foi significativo em relação a t_{0-4} ($p 0,02$). Os valores das medianas em t_{0-4} e t_{0-8} foram semelhantes para os grupos ($p > 0,26$) e situaram-se dentro da faixa descrita na literatura 7 a 28% para estatinas (SOCIEDADE, 2007) e para sinvastatina de 12 a 18% (JONES *et al.*, 2003; MAKI *et al.*, 2012). Contudo, foi inferior a observada no estudo paquistanês (27%) e no estudo tailandês (12%) considerando as respectivas doses 20 e 10 mg (SOLANGI *et al.*, 2012; WIWANITKIT, *et al.*, 2002). Excluindo a possível questão étnica, esta diferença pode ser explicada pelos valores médios de TG basais dos indivíduos nos referidos trabalhos (160-168 mg/dL; 243-292 mg/dL) serem superiores ao do

presente estudo; visto que a redução proporcionada pelas estatinas nos níveis TG é tanto maior quanto maior forem os níveis basais dos indivíduos (STEIN *et al.*, 1998). Isto também justifica a maior redução de TG no intervalo t_{0-4} para os voluntários em uso das cápsulas em comparação aos comprimidos.

Houve elevação significativa dos níveis basais de ALT em todos os grupos no intervalo t_{0-4} ($p < 0,04$) e apenas no grupo em uso de cápsulas no intervalo t_{0-8} ($p 2,1 \times 10^{-3}$). Para o grupo referência observou-se uma redução significativa dos níveis de ALT em t_{0-8} comparativamente a t_{0-4} ($p 8 \times 10^{-3}$). A elevação dos níveis basais de AST em t_{0-4} não foi significativa nos grupos ($p > 0,05$). A mediana das elevações de AST em t_{0-8} foi significativa ($p < 0,05$) e estatisticamente igual entre os grupos ($p 0,54$). As medianas das elevações em t_{0-4} e t_{0-8} diferiram apenas no grupo teste comprimido ($p 0,02$).

As medianas das aminotransferases ALT e AST dos três grupos, em nenhum dos períodos, ultrapassaram os respectivos LSRs 40 U/L e 38 U/L (**Tabela 2.8**). Além disso, o maior nível sérico de ALT e AST em t_4 (65 U/L; $1,63 \times \text{LSR}$ e 58 U/L; $1,53 \times \text{LSR}$, respectivamente) e em t_8 (75 U/L; $1,87 \times \text{LSR}$ e 55,8 U/L; $1,47 \times \text{LSR}$, respectivamente) não ultrapassaram em 3 vezes os respectivos LSR (40 U/L e 38 U/L). Contrariamente à elevação de ALT em t_{0-8} que foi inferior (10,6-22,2%) a do estudo com indivíduos tailandeses (45%), a elevação de AST mostrou-se semelhante à relatada (8,3-16,3%) para mesmo período de tratamento, porém com uso de SV 10 mg comprimido (WIWANITKIT, *et al.*, 2002). Estes resultados corroboram com a decisão do Food and Drug Administration que, em 28 de fevereiro de 2012, aboliu o monitoramento dos níveis séricos destas enzimas durante o tratamento com estatinas, visto que o seu uso na rotina parece não ser efetivo na detecção ou prevenção de lesão hepática grave. Além disso, os danos hepáticos são raros e não previsíveis em pacientes individuais (FOOD, 2012).

A elevação significativa dos níveis basais de CK em t_{0-4} ocorreu nos grupos teste cápsulas e referência, e em t_{0-8} apenas no grupo teste cápsulas ($p < 0,05$). Este fato pode decorrer do valor inferior da mediana dos níveis basais de CK no grupo teste cápsulas comparado aos demais grupos (**Tabela 2.8**). No grupo referência, embora não significativa ($p 0,10$), houve redução dos níveis séricos de CK entre t_{0-4} e t_{0-8} . As medianas da variação de CK dos três grupos nos intervalos t_{0-4} e t_{0-8} não diferiram entre si ($p > 0,46$). Os valores extremos de CK observados em

t_{0-4} nos grupos (a), (b) e (c) foram 662 U/L, 557 U/L e 894 U/L correspondentes a 3,4; 2,9 e 4,6 \times LSR, respectivamente (LSR 195 U/L, homens). Em t_8 , os maiores valores de CK nos grupos (a), (b) e (c) foram 475 U/L, 826 U/L e 614 U/L correspondentes a 2,8 (mulher); 4,2 e 3,1 \times LSR, respectivamente. Nenhuma elevação de CK ultrapassou em 10 \times LSR (LSR 170 U/L, mulheres, LSR 195 U/L, homens), fator que, associado a sintomas musculares, caracteriza a forma grave de miopatia. Uma voluntária que relatou sintoma muscular apresentou nível sérico de CK ligeiramente superior ao LSR em t_4 e com a manutenção do tratamento em t_8 houve redução do nível sérico abaixo do LSR. Este resultado não sugere que a administração de SV 20 mg tenha propiciado a elevação de CK, mas sim, outros fatores como a prática de atividade física nas 48 h que antecederam a coleta de sangue após as 4 semanas de tratamento.

As respectivas médias e medianas dos níveis de glicose dos indivíduos com glicemia de jejum alterada em t_0 (108 e 106 mg/dL), t_4 (109 e 107 mg/dL) e t_8 (107 e 106 mg/dL) não foram diferentes. Desta forma, o tratamento com SV 20 mg por 4 e 8 semanas reduziu satisfatoriamente os níveis séricos de LDLc sem elevar os níveis séricos de glicose em indivíduos com maior propensão (glicemia de jejum basal alterada) a diabetes. Contudo, em decorrência da advertência do aumento de níveis da glicose em jejum e risco de diabetes em usuários de estatinas aconselha-se o monitoramento de níveis glicêmicos em indivíduos em uso de SV (FOOD, 2012).

Em resumo, a redução dos níveis de LDLc não foi diferente para os tratamentos com SV 20 mg cápsulas e comprimidos em relação aos comprimidos referência ($p > 0,76$), resultado igualmente observado para a redução do CT ($p > 0,35$). Não houve elevação significativa dos níveis de HDLc após tratamento em nenhum dos grupos ($p > 0,05$). As alterações nos níveis das enzimas hepáticas e de CK também não diferiram entre os grupos de tratamento. Cabe ressaltar, que os resultados de redução de LDLc decorrem de adesão $\geq 80\%$ ao tratamento por no mínimo 93,7% dos voluntários em cada grupo e que todos os medicamentos apresentaram qualidade adequada, embora %ED distintas.

5 CONCLUSÃO GERAL

O emprego do solvente orgânico metanol (80%) em substituição a acetonitrila (65%) na fase móvel no método por CLAE-UV mostrou seletividade, precisão, recuperação e robustez e menor custo para quantificação de sinvastatina comprimidos (Capítulo 1, parte 1) e cápsulas (Capítulo 1, parte 2) em ensaios de qualidade (doseamento, uniformidade de conteúdo, teste de dissolução). Este método, sob condição de temperatura controlada, mostrou-se adequado para aplicação em estudos de dissolução destas formas farmacêuticas (Capítulo 1, parte 3), podendo ser utilizado para inferir sobre a extensão de disponibilidade *in vitro* do fármaco para fins terapêuticos.

Os testes adaptados e as especificações propostas para sinvastatina cápsulas manipuladas permitiram constatar a qualidade adequada de apenas 46% das amostras de 30 farmácias no município de Belo Horizonte e inferir sobre o cenário farmacêutico magistral local (Capítulo 1, parte 4). Com os resultados, informados aos farmacêuticos que forneceram amostras por convite, o intuito foi conscientizar e educar a classe para o alcance de produtos manipulados com qualidade.

Todas as amostras de comprimidos (similar e referência) e cápsulas manipuladas destinadas a ensaio clínico, eticamente correto, em voluntários apresentaram qualidade físico-química adequada às especificações farmacopeicas e/ou propostas. A realização do ensaio clínico com voluntários permitiu avaliar a eficácia terapêutica dos diferentes medicamentos contendo SV 20 mg (cápsulas manipuladas, comprimidos similares disponíveis no SUS, comprimidos referência) e os resultados mostraram que o tratamento hipolipêmico pode ser feito com quaisquer dos medicamentos avaliados, facultando aos médicos e pacientes a sua escolha.

As monografias sinvastatina matéria-prima e comprimidos previamente propostas (SILVA, 2009) foram complementadas e reapresentadas à Farmacopeia Brasileira. A monografia sinvastatina cápsulas elaborada e apresentada à Farmacopeia Brasileira foi uma contribuição adicional para avaliação da qualidade de cápsulas manipuladas em favor de um aprimoramento na prática magistral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-NAMEH, E. S. M.; SHAWABKEH, R. A.; ALI, A. High-performance liquid chromatographic determination of simvastatin in medical drugs. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 63–6, 2006.

ALBERTS, A. W.; CHEN, J.; KURON, G.; HUNT, V.; HUFF, J.; HOFFMAN, C.; ROTHROCK, J.; LOPEZ, M.; JOSHUA, H.; HARRIS, E.; PATCHETT, A.; MONAGHAN, R.; CURRIE, S.; STAPLEY, E.; ALBERS-SCHONBERG, G.; HENSENS, O.; HIRSHFIELD, J.; HOOGSTEEEN, K.; LIESCH, J.; SPRINGER, J. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 7, p. 3957–61, 1980.

ALI, H.; NAZZAL, S. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the simultaneous analysis of simvastatin and tocotrienols in combined dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 4, p. 950–6, 2009.

ALVAREZ-LUEJE, A.; VALENZUELA, C.; SQUELLA, J. A.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J. Stability study of simvastatin under hydrolytic conditions assessed by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 6, p. 1631–6, 2005.

ANVISA. O X da manipulação. **Boletim Informativo**, v. 56, p.6–9, 2005.

ARAÚJO, D. V.; SOUZA, C. P. R.; BAHIA, L. R.; REY, H. C. V.; JUNIOR, B. S.; TURA, B. R.; BERWANGER, O.; BUEHLER, A. M.; SILVA, M. T. Análise de custo-efetividade da simvastatina versus atorvastatina na prevenção secundária de eventos cardiovasculares no sistema único de saúde brasileiro. **Value Health**, v. 14, n. 5, supl. 1, p. S29–32, 2011.

ARAYNE, M. S.; SULTANA, N.; HUSSAIN, F.; ALI, S. A. F. Validated spectrophotometric method for quantitative determination of simvastatin in pharmaceutical formulations and human serum. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 62, n. 6, p. 536–41, 2007.

ARMITAGE, J. The safety of statins in clinical practice. **Lancet**, v. 370, p. 1781–90, 2007.

ASHFAQ, M.; KHAN, I. U.; ASGHAR, M. N. Development and validation of liquid chromatographic method for gemfibrozil and simvastatin in binary combination. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, v. 53, n. 3, p. 1617–9, 2008.

ASHFAQ, M.; KHAN, I. U.; QUTAB, S. S.; RAZZAQ, S. N. HPLC determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Chilean Chemical Society**, Concepción, v. 52, n. 3, p. 1220–3, 2007.

BALAJI, S.; SUNITHA, A. Development and validation of spectrophotometric method for simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe in tablet formulations. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 4, p. 375–8, 2010.

BARACAT, M. M.; MONTANHER, C. L. S.; KUBACKI, A. C.; MARTINEZ, R. M.; ZONTA, G. A. N.; DUARTE, J. C.; NERY, M. M. F.; GIANOTTO E. A. S.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Avaliação da qualidade de formulações manipuladas e industrializadas de simvastatina. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 427–32, 2009.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; MIRANDA, R. Biotechnological production and applications of statins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 869–83, 2010.

BASAVAIHAH, K.; THARPA, K. The development and validation of visible spectrophotometric method for simvastatin determination in pure and the tablet dosage forms. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 14, n. 3, p. 205–10, 2008.

BASNIWAL, P. K.; JAIN, D. Simvastatin: Review of updates on recent trends in pharmacokinetics, pharmacodynamics, drug-drug interaction, impurities and analytical methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 2, p. 135–56, 2012.

BERTOLLO, G. **O processo magistral em farmácias do estado do Espírito Santo**. [dissertação]. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008, p. 18.

BHATIA, M. S.; JADHAV, S. D.; BHATIA, N. M.; CHOUDHARI, P. B.; INGALE, K. B. Synthesis, characterization and quantification of simvastatin metabolites and impurities. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 3, p. 601–14, 2011.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996. Brasília, DF, 10 out 1996.

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o sistema nacional de vigilância sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 27 jan 1999a, seção I, p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 229, de 24 de junho de 1999. Implantação da Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde-REBLAS para prestar serviços laboratoriais relativos a produtos sujeitos ao regime de Vigilância. **Diário Oficial da União**, Brasília, 28 jun 1999b, seção I, p. 17.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 33, de 19 de abril de 2000. Regulamento técnico sobre boas práticas de manipulação de medicamentos em farmácias e seus anexos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 abr 2000, seção I, p. 27.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 1170, de 19 de abril de 2006. Guia para provas de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 abr 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 214, de 12 de dezembro de 2006. Dispõe sobre boas práticas de manipulação de medicamentos para uso humano em farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 dez 2006b, seção I, p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 67, de 08 de outubro de 2007. Dispõe sobre boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 out 2007a, seção I, p. 29–58.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 87, de 21 de novembro de 2008. Altera o regulamento técnico sobre boas práticas de manipulação em farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 nov 2008, seção I, p. 58–59.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 37, de 6 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das farmacopéias estrangeiras. **Diário Oficial da União**, Brasília, 8 de jul 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 abr 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos estudos de equivalência farmacêutica e de perfil de dissolução comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 ago 2010b, seção I, p. 36.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. Série B. Textos básicos de saúde. 3. ed. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2002**. Brasília, DF, 2002, p. 37.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Série A. Normas e manuais técnicos. 1. ed. **Aquisição de medicamentos para assistência farmacêutica no SUS : orientações básicas**. Brasília, DF, 2006c, 56p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Série B. Textos básicos de saúde. 5. ed. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2007**. Brasília, DF, 2007b, p. 59, 61, 171.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos.

Série B. Textos básicos de saúde. 6.ed. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2008**. Brasília, DF, 2009b, p. 46.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Série B. Textos básicos de saúde. 7.ed. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais 2010**. Brasília, DF, 2010c, p. 50.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 533, de 28 de março de 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME) no âmbito do sistema único de saúde (SUS). **Diário Oficial da União**, n. 62, s. 1, p. 96, Brasília, 29 mar 2012.

BRAUTBAR, A.; BALLANTYNE, C. M. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. **Nature Reviews Cardiology**, v.8, n. 5, p. 253–65, 2011.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery office, v. 2, 2011a. p. 1936–8.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Stationery office, v. 3, 2011b. p. 3204.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425–30, 2007.

CHAUDHARI, B. G.; PATEL, N.; SHAH, P. Determination of simvastatin, pravastatin sodium and rosuvastatin calcium in tablet dosage forms by HPTLC. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 1, p. 130–2, 2007a.

CHAUDHARI, B. G.; PATEL, N. M.; SHAH, P. B. Stability-indicating reversed-phase liquid chromatographic method for simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe from their combination drug products. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 5, p. 1242–9, 2007b.

CORTESE, C.; LIBERATOSCIOLI, L. Effects of statins on lipoprotein fractions. **International Congress Series**, v. 1253, p. 247–52, 2003.

DAVIDSON, M. H.; TOTH P. P. Comparative effects of lipid-lowering therapies. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, n. 2, p. 73–104, 2004.

ENDO, A.; KURODA, M.; TISUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 12, p. 1346–8, 1976.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v. 33, n. 1, p. 1569–82, 1992.

ENDO, A. The discovery and development of HMGCoA reductase inhibitors. **Atherosclerosis Supplements**, v. 5, n. 3, p. 67–80, 2004a.

ENDO, A. The origin of the statins. **Atherosclerosis Supplements**, v. 5, n. 3, p. 125–30, 2004b.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5–6, 755–67, 2001.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 7 ed. Strasbourg: Directorate of Quality of Medicines of the Council of Europe, v. 2, 2011. p. 115, 2906–8.

FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS. 9 ed. México: Secretaría de Salud, v. 1–2, 2008.

FARMACOPEA ARGENTINA. 7. ed. Buenos Aires: Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, v. 1, 2003. 616 p.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p.V.1.6.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FARMACOPEIA PORTUGUESA. 8 ed. Lisboa: Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento, v. 2, 2005. p. 2855.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**; FDA: Rockville, MD, 1997. 24p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, **US Department of Health and Human Services**. FDA drug safety communication: new restrictions, contraindications, and dose limitations for zocor (simvastatin) to reduce the risk of muscle injury, December, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA drug safety communication: important safety label changes to cholesterol-lowering statin drugs, February, 2012.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972.

GANDHIMATHI, M.; RAVI, T. K.; VARGHESE, A.; NINAN, A. RP HPLC determination of simvastatin and nicotinic acid in tablets. **Indian Drugs**, v. 40, n. 12, p. 707-711, 2003.

GODOY, R.; GODOY, C. G.; DIEGO, M.; GOMÉZ, C. Liquid chromatographic assay for fast determination of simvastatin in drug substance. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 49, n. 4, p. 289–90, 2004.

GOMES, F. P.; GARCÍA, P. L.; ALVES, J. M. P.; SINGH, A. K.; KEDOR-HACKMANN E. R. M.; SANTORO M. I. R. M. UV-derivative spectrophotometric and stability-indicating high-performance liquid chromatographic methods for determination of simvastatin in tablets. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 2, p. 261–9, 2009.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1995–8, 2010.

GRAHEK, R.; MILIVOJEVIC, D.; BASTARDA, A.; KRACUN, M. Chromatographic purification of some 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Journal of Chromatography A**, v. 918, n. 2, p. 319–24, 2001.

GREEN, J. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 605A–9A, 1996.

GRIFFIN, B. A. Lipid metabolism. **Surgery**, v. 27, n. 1, p. 1–5, 2009.

GUZIK, L.; MROZIK, W.; KAMYSZ, W. Determination of simvastatin in pharmaceutical dosage forms by optimized and validated method using HPLC/UV. **Croatica Chemica Acta**, v. 83, n. 4, p. 371–7, 2010.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (ED). *Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Mac GrawHill, 2006. p. 837–56.

HEFNAWY, M.; AL-OMAR, M.; JULKHUF, S. Rapid and sensitive simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin from their combination drug products by monolithic silica high-performance liquid chromatographic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p. 527–34, 2009.

HEGELE, R. A.; POLLEX R. L. Hypertriglyceridemia: phenomics and genomics. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 326, n. 1–2, p. 35–43, 2009.

HIRAMA, M.; IWASHITA, M.; Total synthesis of (+)-monacolin K (mevinolin). **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 17, p. 1811–2, 1983.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 331–43, 1995.

HOFFMAN, W. F.; ALBERTS, A. W.; ANDERSON, P. S.; CHEN, J. S.; SMITH, R. L.; WILLARD, A. K. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. 4. Side chain ester derivatives of mevinolin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 849–52, 1986.

HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J.; McTAGGART F. Molecular mechanism for inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase by rosuvastatin. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 3, p. 528–31, 2003.

HOU, R.; GOLDBERG A. C. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North American**, v. 38, n. 1, p. 79–97, 2009.

ISTVAN, E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. **Atherosclerosis Supplements**, v. 4, n. 1, p. 3–8, 2003.

JAIN, N.; JAIN, R.; SWAMI, H.; JAIN, D. K. RP-HPLC method for simultaneous estimation of simvastatin and ezetimibe in bulk drug and its combined dosage form. **Asian Journal Research in Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 29–31, 2008.

JAIN, N.; JAIN, R.; SWAMI, H.; PANDEY, S.; JAIN, D. K. Spectrophotometric method for simultaneous estimation of simvastatin and ezetimibe in bulk drug and its combined dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 170–5, 2009.

JELLINGER, P. S.; SMITH, D. A.; MEHTA, A. E.; GANDA, O.; HANDELSMAN, Y.; RODBARD, H. W.; SHEPHERD, M. D.; SEIBEL, J. A. American Association of Clinical Endocrinologists' guidelines for management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis. **Endocrine Practice**, v. 18, s. 1, p. 1–78.

JENKE, D. R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 5, p. 737–57, 1996.

JONES, P. H.; DAVIDSON, M. H.; STEIN, E. A.; BAYS, H. E.; MCKENNEY, J. M.; MILLER, E.; CAIN, V. A.; BLASETTO, J. W.; for the STELLAR study group. comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR) trial. **The American Journal of Cardiology**, v. 92, n. 2, p. 152–60, 2003.

JUKEMA, J. W.; CANNON, C. P.; CRAEN, A. J. M.; WESTENDORP, R. G. J.; TROMPET, S. The controversies of statin therapy weighing the evidence. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 60, n. 10, p. 875–81, 2012.

KAPUR, N. K.; MUSUNURU, K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. **Vascular Health and Risk Management**, v. 4, n. 2, p. 341–53, 2008.

KHAN, K. A.; RHODES, C. T. The concept of dissolution efficiency. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 48–9, 1975.

KOH, K. K.; QUON, M. J.; HAN, S. H.; LEE, Y.; AHN, J. Y.; KIM, S. J.; KOH, Y.; SHIN, E. K. Simvastatin improves flow-mediated dilation but reduces adiponectin levels and insulin sensitivity in hypercholesterolemic patients. **Diabetes care**, v. 31, n. 4, p. 776–82, 2008.

KUMAR, D. A.; SUJAN, D. P.; VIJAYASREE, V.; RAO J. V. L. N. S. Simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe in tablets by HPLC. **E-Journal of Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 541–4, 2009.

KUMAR, V.; SHAH, R. P.; SINGH, S. LC and LC-MS methods for the investigation of polypills for the treatment of cardiovascular diseases Part 1. Separation of active components and classification of their interaction/degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 3, p. 508–15, 2008.

LAMARCA, G.; VETTORE, M. A nova composição racial brasileira segundo o Censo 2010 [Internet]. Rio de Janeiro: DSS Brasil; 2012 Jan 21. Disponível em: <http://cmdss2011.org/site/?p=8005&preview=true>. Acesso em 25 de setembro de 2012.

LANÇAS, F. M. Como economizar (ou eliminar o uso de) acetonitrila em tempos de "crise"?. **Scientia Chromatographica**, v. 1, p. 51–60, 2009.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 89–118, 2005.

MADAN, J.; THAKKAR, V.; DWIVEDI, A. K.; SINGH, S. Ion pairing RP-HPLC analytical methods for simultaneous estimation of simvastatin and its β -hydroxy acid. **Journal Sciences and Industry Research**, v. 66, n. 5, p. 371–6, 2007.

MAJORS, R. E. The continuing acetonitrile shortage: how to combat it or live with it. **LCGC North America**, Jun, 2009. Available at: <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=605650&sk=&date=&pageID=4>. Accessed February, 2012.

MAKI, K. C.; BAYS, H. E.; DICKLIN, M. R. Treatment options for the management of hypertriglyceridemia: Strategies based on the best-available evidence. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 6, n. 5, p. 413–26, 2012.

MALENOVIC, A.; MEDENICA, M.; IVANOVIC, D.; JANCIC, B. Monitoring of simvastatin impurities by HPLC with microemulsion eluents. **Chromatographia**, v. 63, p. S95–S100, 2006.

MANE, V. B.; BABAR, S.; KULKARNI, N. Development of UV spectrophotometric method for the simultaneous estimation of simvastatin and ezetimibe in tablet dosage form by simultaneous equation and absorbance ratio method. **International Journal of Pharmtech Research**, v. 3, n. 3, p. 1459–66, 2011.

MARKMAN, B. E. O.; ROSA, P. C. P.; KOSCHTSCHAK, M. R. W. Avaliação da qualidade de cápsulas de simvastatina de farmácias magistrais. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p. 1055–62, 2010.

MARQUES-MARINHO, F. D.; ZANON, J. C. C.; SAKURAI, E.; REIS, I. A.; LIMA, A. A.; VIANNA-SOARES, C. D. Quality evaluation of simvastatin compounded capsules. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 495–502, 2011.

MATEI, I.; SOARE, L.; TABLET, C.; HILLEBRAND, M. Characterization of simvastatin and its cyclodextrin inclusion complexes by absorption and circular dichroism spectroscopies and molecular mechanics calculations. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, n. 2, p. 133–41, 2009.

MANZONI, M.; ROLLINI, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 5, p. 555–64, 2002.

McTAGGART, F.; BUCKETT, L.; DAVIDSON, R.; HOLDGATE, G.; McCORMICK, A.; SCHNECK, D.; SMITH, G.; WARWICK, M. Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. **The American Journal of Cardiology**, v. 87, suppl. 5A, p. 28B–32B, 2001.

MILLERSHIP, J. S.; CHIN, J. Determination of simvastatin in tablet formulations by derivative UV spectrophotometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 65, n. 2, p. 164–8, 2010.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (ED). *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 3rd. ed. London: Pharmaceutical Press, 2004. 564 p.

MOGHADASIAN, M. H. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Life Sciences**, v. 65, n. 13, p. 1329–37, 1999.

MOUSSA, B. A.; MOHAMED, M. F.; YOUSSEF, N. F. Derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in combined tablets. **European Journal of Chemistry**, v. 1, n. 4, p. 348–51, 2010.

MUKHTAR, R. Y. A; REID, J.; RECKLESS, J. P. D. Pitavastatin. **International Journal of Clinical Practice**, v. 59, n. 2, p. 239–52, 2005.

NCEP - Third report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report. **Circulation**, v. 106, n. 25, p. 3143–421, 2002.

OCHIAI, H.; UCHIYAMA, N.; IMAGAKI, K.; HATA, S.; KAMEI, T. Determination of simvastatin and its active metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with 1-bromoacetylpyrene. **Journal of Chromatography B**, v. 694, n. 1, p. 211–7, 1997.

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 214–23, 1998.

OIGMAN, W. Métodos de avaliação da adesão ao tratamento anti-hipertensivo. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.13, n. 1, p. 30–4, 2006.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; VIANNA-SOARES, C. D.; PIANETTI, G. A. Análise térmica aplicada à caracterização da simvastatina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 33, n. 8, p. 1653–7, 2010.

O'NEIL, M. J.; HECKELMAN, P. E.; KOCH, C. B.; ROMAN, K. J.; KENNY, C. M.; D'ARECCA, M. R. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological**, 14th ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck Research Laboratories, 2006, p.1471–2.

OZALTIN, N.; UCAKTURK, E. Simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical formulations by dual-mode gradient LC. **Chromatographia**, v. 66, p. S87–91, 2007.

PALABIYIK, I. M.; ONUR, F.; YARDIMCI, C.; ÖZALTIN, N. Simultaneous spectrophotometric determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical preparations using chemometric techniques. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1121–4, 2008.

PASHA, Md. K.; MUZEEB, S.; BASHA, S. J. S.; SHASHIKUMAR, D.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N. R. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors - atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and *in vitro* metabolism studies. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 3, p. 282–93, 2006.

PIECHA, M.; SARAHA, M.; TREBSE, P.; KOCAR, D. Stability studies of cholesterol lowering statin drugs in aqueous samples using HPLC and LC-MS. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 2, p. 185–91, 2010.

POLONINI, H. C.; SANTOS, F. C.; VAZ, U. P.; BRANDÃO, M. A. F. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de simvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 516–9, 2011.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

RAJPUT, S. J.; RAJ, H. A. Simultaneous spectroscopic estimation of ezetimibe and simvastatin in tablet dosage forms. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 6, p. 759–62, 2007.

RATHINARAJ, B. S.; RAJAMANICKAM, V.; RAJVEER, C.; KUMARASWAMY, D.; BANGLAE, G. S.; SHINDE, G. V. Development and validation of HPTLC method for the estimation of simvastatin and ezetimibe. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 8, p. 288–92, 2010a.

RATHINARAJ, B. S.; KUMAR, S. V.; SUDHARSHINI, S.; THIRUPATHY, B.; GURUSHARAN. Quantitative analysis of simvastatin and ezetimibe of drugs in

combined dosage forms by HPLC. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 2, p. 1–7, 2010b.

REZENDE, F. A. C.; ROSADO, L. E. F. P. L.; RIBEIRO, R. C. L.; VIDIGAL, F. C.; VASQUES A. C. J.; BONARD, I. S.; CARVALHO, C. R. Índice de massa corporal e circunferência abdominal: associação com fatores de risco cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 728–34, 2006.

RIBEIRO, E. G. Análises dos indicadores relacionados ao grau de adesão ao tratamento de portadores de hipertensão arterial. **Revista Psicologia & Saúde**, v. 3, n. 1, p. 20–32, 2011.

RIBEIRO, M. C. S. A.; BARATA, R. B.; ALMEIDA, M. F.; SILVA, Z. P. Perfil sociodemográfico e padrão de utilização de serviços de saúde para usuários e não-usuários do SUS – PNAD 2003. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1011–22, 2006.

RIBEIRO, R. L. V.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 300–6, 2004.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 6th ed. London: United Kingdom, 2009. p. 119.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 111–25, 2007.

SAITO, Y. Pitavastatin: an overview. **Atherosclerosis Supplements**, v. 12, n. 3, p. 271–6, 2011.

SASAKI, J. Pitavastatin approved for treatment of primary hypercholesterolemia and combined dyslipidemia. **Vascular Health and Risk Management**, v. 6, p. 997–1005, 2010.

SCHAEFER, E. J. **High density, lipoproteins, dyslipidemia, and coronary heart disease**. 1. ed. New York: Springer, 2010. p. 1-13. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=kl673ibTs1MC&printsec=frontcover&dq=dyslipidemia&hl=en&ei=bZ0LTabkLYKklwfYxsHjCw&sa=X&oi=book_result&ct=book-thumbnail&resnum=5&ved=0CEEQ6wEwBA#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 13 de dezembro de 2010.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; SILVA, G. A.; MENEZES, A. M.; MONTEIRO, C. A.; BARRETO, S. M.; CHOR, D.; MENEZES, P. R. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, v. 377, n. 9781, p. 1949–61, 2011.

SEARCH collaborative group. Intensive lowering of LDL cholesterol with 80 mg versus 20 mg simvastatin daily in 12.064 survivors of myocardial infarction: a double-blind randomised trial. **Lancet**, v. 376, n. 9753, p. 1658–69, 2010.

SHABIR, G. 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, n. 1–2, p. 57–66, 2003.

SHRESTHA, B.; STEPHENRATHINARAJ, B.; PATEL, S. S.; VERMA, N. K.; MAZUMDER, R. Simultaneous HPTLC estimation of simvastatin and ezetimibe in tablet dosage form. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 1206–11, 2010.

SINGLA, N.; GUPTA, G. D.; KOHLI, K.; SINGLA, K. A discriminatory and biorelevant dissolution test method for simvastatin drug products. **Dissolution Technologies**, v. 16, n. 4, p. 11–3, 2009.

SINGLA, V.; BHASKAR, R.; BHASKAR, R. Simultaneous estimation of simvastatin and metformin hydrochloride in bulk and solid dosage forms. **Rasayan Journal Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 507–13, 2010.

SILVA, T. D. **Desenvolvimento de métodos analíticos e de formulações para estatinas** [dissertação]. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009, p. 138–43.

SILVA, T. D.; OLIVEIRA, M. A.; OLIVEIRA, R. B.; VIANNA-SOARES, C. D. Development and validation of a simple and fast HPLC method for determination of lovastatin, pravastatin and simvastatin. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 9, p. 831–8, 2012.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1997. 765 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, supl. 1, p. 1–19, 2007.

SOLANGI, N. A.; AHMED, S. P.; SOOMRO, K. Cholesterol, triglycerides and LDL lowering effects of generic products of simvastatin and HDL effect as compared to original brand of simvastatin in hypercholesterolemic subjects – a randomized study. **Medical Channel**, v. 18, n. 1, p. 41–4, 2012.

SOURI, E.; AMANLOU, M. Development and validation of a derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, p. S197–S202, 2010.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005.

SRINIVASU, M. K.; RAJU, A. N.; REDDY, G. OM. Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 4, p. 715–21, 2002.

STEIN, E. A.; LANE, M.; Laskarzewski, P. Comparison of statins in hypertriglyceridemia. **The American Journal of Cardiology**, v. 81, n. 4A, p. 66B–9B, 1998.

THARPA, K.; BASAVAIHAH, K.; RAJEDRAPRASAD, N.; VINAY K. B.; HIRIYANNA, S. G. Sensitive spectrophotometric assay of simvastatin in pharmaceuticals using permanganate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, p. 91–8, 2010.

THE INTERNATIONAL PHARMACOPOEIA. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 2006. 1499 p.

THE JAPANESE PHARMACOPOEIA. 15th ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2006, 1788 p.

THE PHYSICIANS' DESK REFERENCE. 54. ed. Montvale: Medical economics company, 2000. p. 1916-20.

THE 4S COLLABORATIVE INVESTIGATORS. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **Lancet**, v. 344, n. 8934, p.1383–89, 1994.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 32 ed. **Simvastatin Tablets**. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2009a. p.3558.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 32 ed. **The dissolution procedure: development and validation <1092>**. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention, 2009b. p.599.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 34 ed, **Simvastatin Tablets**. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2011a. p. 4228–30.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 34 ed. **The dissolution procedure: development and validation <1092>**. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention, 2011b. p. 624–30.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 34 ed. **Validation of Compendial Procedures <1225>**. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2011c. p. 778–82.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 35 ed. **Simvastatin Tablets**. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2012a. p. 4639–41.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 35 ed. **The dissolution procedure: development and validation <1092>**. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention, 2012b. p. 675–81.

TIWARI, P. K.; SATHE, P. Development and validation of HPTLC method for niacin and simvastatin in binary combination. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, p. 131–5, 2010.

TOBERT, J. A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 7, p. 517–526, 2003.

VERONIN, M. A.; NGUYEN, N. T. Comparison of simvastatin tablets from the US and international markets obtained via the internet. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 42, n. 5, p. 613–20, 2008.

VULETIC, M.; CINDRIC, M.; KORUZNJAK, J. D. Identification of unknown impurities in simvastatin substance and tablets by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p. 715–21, 2005.

WANG, L.; ASGHARNEJAD, M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 6, p. 1243–8, 2000.

WIWANITKIT V., WANGSATURAKA, D.; T ANGPLHAO, O. LDL-cholesterol lowering effect of a generic product of simvastatin compared to simvastatin (Zocor™) in Thai hypercholesterolemic subjects – a randomized crossover study, the first report from Thailand. **BMC Clinical Pharmacology**, v. 2, n. 1, 2002. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6904/2/1> Acesso em: 20 de setembro de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **World Health Organization technical report series**, Geneva, v. 916, n. 1-8, p. 1–149, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases. Fact Sheet N° 317, September 2011.

YANG, D; HWANG, L. S. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxyl acid forms and their determination in Pu-Erh tea. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 277–84, 2006.

YARDIMCI, C.; ÖZALTIN, N. Simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical preparations by MEKC. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, n. 2, p. 95–9, 2010.

YUAN, G.; AL-SHALI K. Z.; HEGELE R. A. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. **Canadian Medical Association Journal**, v. 176, n. 8, p. 1113–20, 2007.

APÊNDICE A – Monografias

SINVASTATINA CÁPSULAS

Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de $C_{25}H_{38}O_5$.

IDENTIFICAÇÃO

A. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtido no método **B.** ou **C.** de *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

Procedimento para uniformidade de conteúdo. Pesar individualmente cada cápsula, transferir o conteúdo para balão volumétrico de 50 mL e pesar novamente. Adicionar 25 mL de metanol. Prosseguir conforme descrito no método **B.** de *Doseamento*, a partir de “Deixar em ultrassom...”.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: laurilsulfato de sódio a 0,5% (p/v) em solução aquosa de fosfato de sódio monobásico 0,01 M, 900 mL, pH 7.

Aparelhagem: pás, 75 rpm.

Tempo: 45 minutos.

Procedimento: após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar e diluir, se necessário, em meio de dissolução até concentração adequada e proceder conforme descrito em *Doseamento*. Calcular a quantidade de $C_{25}H_{38}O_5$ dissolvida no meio, comparando as áreas obtidas com a da solução de sinvastatina SQR na concentração de 22,2 µg/mL, preparada no mesmo diluente.

Tolerância: não menos que 75% (Q) da quantidade declarada de $C_{25}H_{38}O_5$ se dissolvem em 45 minutos.

DOSEAMENTO

A. Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento* da monografia de *Sinvastatina*. Preparar a *Solução amostra* como descrito a seguir.

Solução amostra: pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. Homogeneizar o conteúdo das cápsulas. Transferir quantidade do pó equivalente a 20 mg de sinvastatina para balão volumétrico de 50 mL e adicionar 25 mL de metanol. Deixar em ultrassom durante 10 minutos e completar o volume com o mesmo solvente. Homogeneizar e filtrar. Transferir 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e completar volume com o mesmo solvente.

APÊNDICE A (continuação)

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular a quantidade de C₂₅H₃₈O₅ nas cápsulas a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

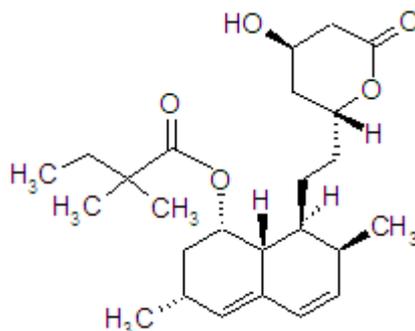
ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

APÊNDICE A (continuação)

SINVASTATINA

Simvastatinum



$C_{25}H_{38}O_5$; 418,57

sinvastatina; 08016

Ácido 2,2-dimetilbutanóico (1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-[(2R, 4R)-tetrahidro-4-hidróxi-6-oxo-2H-piran-2-il]-etil]-1-naftalenil éster
[79902-63-9]

Contém, no mínimo, 98,0% e, no máximo, 102,0% de $C_{25}H_{38}O_5$, em relação à substância dessecada.

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino branco ou quase branco.

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água, muito solúvel em diclorometano, facilmente solúvel em metanol, etanol 96%, clorofórmio, ligeiramente solúvel em propilenoglicol, muito pouco solúvel em n-hexano.

Constantes físico-químicas.

Faixa de fusão (5.2.2): 135 °C a 138 °C.

Poder rotatório específico (5.2.8): +285° a +298°, em relação à substância dessecada
Determinar em solução a 0,5% (p/v) em acetonitrila.

IDENTIFICAÇÃO

A. O espectro de absorção no infravermelho (5.2.14) da amostra, previamente dessecada, dispersa em brometo de potássio, apresenta máximos de absorção somente nos mesmos comprimentos de onda e com as mesmas intensidades relativas daqueles observados no espectro de sinvastatina SQR, preparado de maneira idêntica.

B. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida no método **B** ou **C** de *Doseamento*, corresponde àquele do cromatograma da *Solução padrão*.

APÊNDICE A (continuação)

ENSAIOS DE PUREZA

Aspecto da solução. A solução metanólica a 1% (p/v) é límpida (5.2.25) e não mais corada que a *Solução padrão de cor SC G* (5.2.12) diluída 2,5% (v/v) em ácido clorídrico 0,1 M.

Metais pesados (5.3.2.3). Utilizar o *Método III*. No máximo 0,002% (20 ppm).

Perda por dessecação (5.2.9). Determinar em 1 g da amostra. Dessecar em estufa a 60 °C, sob pressão reduzida, por 3 horas. No máximo 0,5%.

Cinzas sulfatadas (5.2.10). Determinar em 1 g da amostra. No máximo 0,1%.

DOSEAMENTO

Empregar um dos métodos descritos a seguir:

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (5.2.14)*. Pesar, exatamente, cerca, de 40 mg da amostra e solubilizar em metanol. Completar o volume para 100 mL com o mesmo solvente. Diluir, sucessivamente, em metanol, até concentração 0,0008% (p/v). Preparar solução padrão na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. Medir as absorvâncias das soluções resultantes em λ 238 nm, utilizando metanol para ajuste do zero. Calcular o teor de $C_{25}H_{38}O_5$ na amostra a partir das leituras obtidas. Alternativamente, realizar os cálculos considerando $A(1\%, 1\text{ cm}) = 604$, em 238 nm, em metanol.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 238 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,0 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 μ m), mantida a 30 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,5 mL/minuto.

Fase móvel: mistura de ácido fosfórico 0,1% e metanol (20:80).

Solução amostra: solubilizar quantidade exatamente pesada da amostra em metanol de modo a obter solução de $C_{25}H_{38}O_5$ a 0,4 mg/mL. Diluir em metanol até concentração 40 μ g/mL.

Solução padrão: solubilizar quantidade exatamente pesada de sinvastatina SQR em metanol de modo a obter solução de $C_{25}H_{38}O_5$ a 0,4 mg/mL. Diluir em metanol até concentração 40 μ g/mL.

Injetar replicatas de 10 μ L da *Solução padrão*. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não é maior que 2,0%.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 μ L das *Soluções padrão e amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. Calcular o teor de $C_{25}H_{38}O_5$ na amostra a partir das respostas obtidas com as *Soluções padrão e amostra*.

C. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 238 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (5 μ m), mantida a 30 °C; fluxo da *Fase móvel* de 1,5 mL/minuto.

Fase móvel: mistura de ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila (65:35).

APÊNDICE A (continuação)

Solução amostra: dissolver quantidade exatamente pesada da amostra em acetonitrila de modo a obter solução de $C_{25}H_{38}O_5$ a 0,4 mg/mL. Diluir em acetonitrila até concentração de 40 µg/mL.

Solução padrão: dissolver quantidade exatamente pesada de sinvastatina SQR em acetonitrila de modo a obter solução de $C_{25}H_{38}O_5$ a 0,4 mg/mL. Diluir em acetonitrila até concentração de 40 µg/mL.

Injetar replicatas de 10 µL da *Solução padrão*. O desvio padrão relativo das áreas de replicatas dos picos registrados não é maior que 2,0%.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL das *Soluções padrão e amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos principais. Calcular o teor de $C_{25}H_{38}O_5$ na amostra a partir das respostas obtidas com as *Soluções padrão e amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

CLASSE TERAPÊUTICA.

Hipolipemiante.

APÊNDICE A (continuação)**SINVASTATINA COMPRIMIDOS**

Contém, no mínimo, 90,0% e, no máximo, 110,0% da quantidade declarada de $C_{25}H_{38}O_5$. Os comprimidos podem ter revestimento simples.

IDENTIFICAÇÃO

A. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtido no método **B.** ou **C.** de *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de dureza (5.1.3.1). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

Procedimento para uniformidade de conteúdo. Transferir cada comprimido para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 2 mL de água (não mais que 4% da capacidade do balão volumétrico) e aguardar desintegração total do comprimido. Adicionar 30 mL de metanol, deixar em ultrassom por 10 minutos e completar o volume com o mesmo solvente. Prosseguir conforme descrito no método **B.** ou **C.** de *Doseamento*, a partir de “Homogeneizar e filtrar” ou “Centrifugar por 4 minutos a 4000 rpm...”.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: laurilsulfato de sódio a 0,5% (p/v) em solução aquosa de fosfato de sódio monobásico 0,01 M, 900 mL, pH 7.

Aparelhagem: pás, 50 rpm.

Tempo: 30 minutos.

Empregar um dos procedimentos descritos a seguir:

A. após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar (se necessário, diluir em meio de dissolução até concentração 22,2 $\mu\text{g/mL}$) e injetar no cromatógrafo nas condições descritas no método **B.** de doseamento (5.2.17.4), utilizando *Meio de dissolução* como branco. Calcular a quantidade de $C_{25}H_{38}O_5$ dissolvida no meio, comparando as áreas obtidas com aquela da solução de sinvastatina SQR na concentração 22,2 $\mu\text{g/mL}$, preparada no mesmo diluente.

B. após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar e diluir, se necessário, com o meio de dissolução, até concentração adequada. Obter o espectro em segunda derivada, automaticamente, por meio de software de diferenciação interno e medir a amplitude máxima das soluções em 248 nm, utilizando *Meio de dissolução* para ajuste do zero. Alternativamente, obter o espectro na faixa de 200 a 300 nm, registrar as absorvâncias com incrementos de 1 nm. Calcular a derivada em segunda ordem e medir a absorvância da amplitude em 248 nm, utilizando o mesmo solvente para ajuste do zero. Calcular a quantidade de $C_{25}H_{38}O_5$ dissolvida no meio, comparando as leituras obtidas com aquela da solução de sinvastatina SQR na concentração 0,0008% (p/v), preparada no mesmo solvente.

APÊNDICE A (conclusão)

Tolerância: não menos que 75% (Q) da quantidade declarada de $C_{25}H_{38}O_5$ se dissolvem em 30 minutos.

DOSEAMENTO

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta (5.2.14)*. Pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó para balão volumétrico de capacidade adequada, adicionar metanol, até cerca de 70% da capacidade total do balão volumétrico, e deixar em ultrassom por 15 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente. Centrifugar por 4 minutos a 4000 rpm. Diluir volume adequado do sobrenadante até concentração 0,0008% (p/v), utilizando metanol como solvente. Preparar solução padrão na mesma concentração. Obter o espectro em segunda derivada, automaticamente, por meio de software de diferenciação interno e medir a amplitude máxima das soluções em 247 nm, utilizando metanol para ajuste do zero. Alternativamente, obter o espectro na faixa de 200 a 300 nm, registrar as absorvâncias com incrementos de 1 nm. Calcular a derivada em segunda ordem e medir a absorvância da amplitude em 247 nm. Calcular a quantidade de $C_{25}H_{38}O_5$ nos comprimidos, a partir das leituras obtidas.

B. Proceder conforme descrito no método **B.** de *Doseamento* da monografia de *Sinvastatina*. Preparar a *Solução amostra* como descrito a seguir.

Solução amostra: pesar e pulverizar 20 comprimidos. Utilizar quantidade do pó equivalente a 20 mg de sinvastatina e transferir para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 25 mL de metanol. Deixar em ultrassom durante 10 minutos e completar o volume com metanol. Homogeneizar e filtrar por papel adequado. Transferir 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e completar volume com o mesmo solvente.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 μ L da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos correspondentes à sinvastatina. Calcular a quantidade de $C_{25}H_{38}O_5$ nos comprimidos a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e a *Solução amostra*.

C. Proceder conforme descrito no método **C.** de *Doseamento* da monografia de *Sinvastatina*. Preparar a *solução amostra* como descrito a seguir.

Solução amostra: pesar e pulverizar 20 comprimidos. Transferir quantidade do pó para balão volumétrico de capacidade adequada, adicionar acetonitrila, cerca de 70% da capacidade total do balão volumétrico, e deixar em ultrassom por 15 minutos. Completar o volume com o mesmo solvente, homogeneizar e centrifugar por 4 minutos a 4000 rpm. Diluir volume adequado do sobrenadante até concentração 40 μ g/mL, utilizando acetonitrila como solvente.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 μ L da *Solução padrão* e da *Solução amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de $C_{25}H_{38}O_5$ nos comprimidos a partir das respostas obtidas com a *Solução padrão* e *Solução amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prefeitura Municipal de Ouro Preto (PMOP) e Ouro Cordis/Hospital Santa Casa da Misericórdia, Ouro Preto; Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais (FaFar/UFMG), Belo Horizonte
 Laboratório Piloto de Análises Clínicas, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto (LAPAC/EF/UFOP), Ouro Preto

Ouro Preto, ____/____/____

CONVITE

Prezado paciente,

Você está sendo convidado a participar do **Projeto de Pesquisa** intitulado “**Avaliação da eficácia de sinvastatina 20 mg comprimidos e cápsulas em relação aos comprimidos referência**”.

Este projeto será realizado em parceria nos laboratórios da Faculdade de Farmácia da UFMG em Belo Horizonte, da Escola de Farmácia da UFOP e da Prefeitura Municipal de Ouro Preto (PMOP) e Ouro Cordis/Hospital Santa Casa da Misericórdia em Ouro Preto.

Tem como objetivo principal avaliar a eficácia de medicamentos (comprimidos ou cápsulas manipuladas contendo sinvastatina) que abaixam o colesterol (hipolipêmicos).

Você foi escolhido pelo médico cardiologista para participar voluntariamente dessa pesquisa nos próximos dois meses porque apresenta nível de colesterol alterado e estará sob tratamento medicamentoso e acompanhamento médico.

Você tomará os medicamentos prescritos pelo médico, diariamente, por 2 meses. Ao final de cada mês, você doará um pouco de sangue para avaliação de colesterol total e frações e será submetido à avaliação clínica pelo médico.

Informamos que você não terá despesas fora da sua rotina de acompanhamento do tratamento.

 Dr. José Carlos da Costa Zanon
 Médico cardiologista
 Ouro Cordis/Hospital Santa Casa

 Flávia D. Marques / Profa. Dra. Cristina D.V. Soares
 Pesquisador ou coordenador
 Departamento de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos
 da Faculdade de Farmácia da UFMG

DECLARAÇÃO

Eu, _____,
 identidade _____, sexo_M_/F__, nascido(a) em ___/___/___, residente à
 Rua/Av. _____, bairro _____,
 cidade _____, MG, telefone _____,

declaro que fui convidado a participar dessa pesquisa com o objetivo de avaliar a eficácia de sinvastatina 20 mg, comprimidos ou cápsulas manipuladas para a redução do colesterol total (CT) e suas frações, por meio da pesquisadora do Departamento de Produtos Farmacêuticos (FaFar/UFMG) e do médico cardiologista Dr. José Carlos da Costa Zanon (Ouro Cordis/Hospital Santa Casa da Misericórdia).

Afirmo ter sido informado que:

/continua

APÊNDICE B (conclusão)

1. somente serão empregados medicamentos com qualidade físico-química comprovada pelo laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos da UFMG;
2. este estudo deve-se à necessidade de avaliação da eficácia do medicamento sinvastatina 20 mg, sob a forma de comprimidos (disponíveis no SUS/Sistema Único de Saúde) e de cápsulas manipuladas em farmácias em relação à sinvastatina 20 mg, comprimidos referência (Zocor®);
3. serei acompanhado durante toda a pesquisa, e receberei o medicamento (comprimidos referência, disponíveis no SUS ou cápsulas) por dois meses;
4. devo visitar o médico cardiologista pelo menos três vezes (início, meio e fim do tratamento); para acompanhamento e avaliação do quadro clínico;
5. devo fornecer amostras de sangue (de 2,5 e 10 mL) pelo menos três vezes durante a pesquisa, a fim de acompanhar os níveis de colesterol; as amostras serão coletadas (**após jejum de 12 h, abstinência de bebidas alcoólicas nas 72h anteriores e abstinência de atividade física vigorosa nas 24h anteriores à coleta**) no Laboratório Piloto de Análises Clínicas da Universidade Federal de Ouro Preto LAPAC/UFOP, por profissional habilitado utilizando material descartável e procedimentos adequados para a proteção de qualquer risco;
6. a primeira coleta acontecerá após assinatura deste termo e será agendada para uma sexta-feira, tão logo os resultados sejam disponibilizados, receberei o medicamento das mãos do farmacêutico para início do tratamento (desde que não tenha sido excluído). A segunda coleta ocorrerá após 30 dias e a terceira após 60 dias do início do tratamento.
7. apenas os pesquisadores envolvidos terão acesso às informações e à identificação dos medicamentos de modo a salvaguardar a confidencialidade, o sigilo e a privacidade;
8. o médico cardiologista aferirá a pressão arterial, fará a ausculta cardíaca e eletrocardiograma, e solicitará exames laboratoriais além disso realizará anamnese que poderá ser complementada pelo farmacêutico;
9. devo comunicar ao médico qualquer alteração em minha saúde, a fim de ser avaliado e orientado;
10. a sinvastatina pode ocasionar reações adversas em alguns pacientes, como dor abdominal, prisão de ventre, má digestão, gases, enjôo, dor de cabeça, erupções cutâneas, vertigem e em caso de uso prolongado dor e fraqueza muscular;
11. posso ser desligado do estudo caso não adapte ao tratamento proposto, ou solicitar à equipe o meu desligamento do estudo a qualquer momento, sem prejuízo do acompanhamento médico;
12. o tratamento adequado a minha necessidade será garantido mediante acompanhamento por médico cardiologista e demais profissionais de saúde durante a pesquisa;
13. os riscos decorrentes dessa participação são baixos e minimizados pela adoção de medidas preventivas;
14. toda a informação obtida pode ser divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, desde que não revelada minha identidade;
15. minha participação é totalmente voluntária e não deverá me trazer despesas adicionais, além daquelas relacionadas a rotina do meu tratamento na Ouro Cordis e no LAPAC/UFOP;
16. terei direito à indenização devida diante de eventuais danos a saúde decorrentes do estudo; ao acesso as informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, caso queira informações mais detalhadas sobre a pesquisa ou os meus dados agora ou no futuro, poderei entrar em contato com a coordenadora da pesquisa, Profa. Dra. Cristina D. Vianna Soares pelo telefone (31) 3409-6959 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa COEP/UFMG pelo telefone (31) 3409-4592;

Declaro que fui convenientemente esclarecido pelo médico e pelo pesquisador, entendi o que me foi explicado, concordo em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Paciente

APÊNDICE C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 236/08

**Interessado(a): Profa. Cristina Duarte Vianna Soares
Departamento de Produtos Farmacêuticos
Faculdade de Farmácia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 18 de junho de 2008, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da eficácia clínica entre sinvastatina 20 mg comprimidos disponíveis no SUS e cápsulas manipuladas em relação aos comprimidos Zocor®**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. T. Marques Amaral', is positioned above the printed name.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

APÊNDICE D – Questionário-orientado



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
AVENIDA PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS, 6627 - PAMPULHA
CEP 31270-901 – BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS – BRASIL

QUESTIONÁRIO-ORIENTADO No. _____ CÓDIGO MEDICAMENTO _____

1) DADOS PESSOAIS

Nome: _____ Idade: _____
 Estado Civil: _____ Identidade: _____ CPF: _____
 Peso: _____ Altura: _____ Etnia: _____ CC: _____ Gord. Corp.: _____
 Endereço: _____ CEP: _____
 Cidade: _____ Telefone: _____ e-mail: _____

2) DADOS PROFISSIONAIS

Profissão: _____
 Estabelecimento: _____
 Endereço: _____
 Telefone / fax: _____ Início da atividade: _____
 Salário em mínimos: () < 1 () 1 a 2 () 3 a 4 () > 4 () NT

3) DADOS SOCIAIS

GRAU DE ESCOLARIDADE

() FUNDAMENTAL () ENSINO MÉDIO () SUPERIOR () POS-GRADUAÇÃO
 () incompleto () completo

POS-GRADUAÇÃO lato-sensu () stricto sensu (). Qual? _____

MORA EM RESIDÊNCIA () própria () alugada () de parentes () pública () outra, qual?

MORA () sozinho () mulher e/ou filhos () pais () outro. Qual? _____

TEM FILHOS () NÃO () SIM. Quantos? _____ Qual idade dele(s)? _____

São seus dependentes financeiramente? () SIM () NÃO

Tem cônjuge? () NÃO () SIM É seu dependente? () SIM () NÃO

Qual a profissão do seu cônjuge? _____

Qual o rendimento estimado dele(a)? Salário () < 1 () 1 a 2 () 3 a 4 () > 4 () NT

Existem outras pessoas que sejam suas dependentes financeiramente? () NÃO () SIM

Quais? _____

PRÁTICA ESPORTE(S)? () NÃO () SIM Qual(is)? _____

Com que frequência? () 1x/semana () 2x/semana () 3 ou mais x/semana () esporadicamente

4) DADOS ALIMENTARES E HÁBITOS

Quantas refeições faz ao dia? _____

O que costuma comer e tomar no café da manhã?

/continua

APÊNDICE D (conclusão)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
AVENIDA PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS, 6627 - PAMPULHA
CEP 31270-901 – BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS – BRASIL

O que costuma comer e tomar no almoço?

O que costuma comer e tomar no jantar?

Fuma? () NÃO () SIM.

Quantos cigarros fuma ao dia? _____

5) DADOS DE SAÚDE

Apresenta doenças do tipo

Diabetes? () NÃO () SIM Hipo/Hipertireoidismo? () NÃO () SIM

Gota? () NÃO () SIM Problema renal? () NÃO () SIM. Qual? _____

Problema no fígado? () NÃO () SIM Qual? _____

Outras problemas de saúde? () NÃO () SIM

Faz uso contínuo de algum medicamento? () NÃO () SIM

Quais? _____

6) DADOS LABORATORIAIS

Ácido úrico _____ mg/dL

Creatinina _____ mg/dL

Ureia _____ mg/dL

TSH _____ U

Albumina _____ mg/dL

PCRas _____ mg/dL

Coleta	Glicose (mg/dL)	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	ALT (mg/dL)	AST (mg/dL)	CK (mg/dL)
1ª									
2ª									
3ª									

7) EFEITOS ADVERSOS

8) OBSERVAÇÕES

APÊNDICE E – Guia de agendamento e orientações

Secretaria Municipal de Saúde - Prefeitura de Ouro Preto Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC/EF/UFOP), Ouro Preto

Paciente: _____ GUIA _____

Local da coleta: LAPAC Rua Costa Sena, 171, Centro

Data: ___/___/_____ (sexta-feira)

Horário: 7:00 às 8:00 horas

Procedimento pré-coleta:

- 1) Jejum de 12 horas (não alimentar após às 7:00 horas da noite do dia ___/___/_____);
- 2) Não ingerir bebida alcoólica nas 72 horas precedentes a coleta, ou seja, a partir das 7:00 horas do dia ___/___/_____;
- 3) Não realizar atividade física vigorosa nas 24 horas que antecedem a coleta, ou seja, a partir das 7:00 horas da manhã do dia ___/___/_____.

Observação: o cumprimento dos procedimentos acima é obrigatório para coleta.

ORIENTAÇÕES QUANTO AO TRATAMENTO

- Mantenha seu medicamento em local seco, fresco, sem exposição direta a luz e longe do alcance de crianças.
- Tome uma cápsula à noite com um copo de água (200 mL) após o jantar ou lanche, todos os dias.
- Em caso de se esquecer de tomar o medicamento em um dia, tome no dia seguinte da mesma forma.
- **Não tome duas unidades do medicamento no mesmo dia.**
- EVITAR o consumo suco de uva.
- Se precisa tomar qualquer outro medicamento, comunicar à Flávia (9225-2288).
- Caso sinta algum sintoma diferente ou em caso de dúvidas entre em contato com Flávia (9225-2288) ou profa. Angélica (3559-1646). Caso não consiga falar, deixe seu nome e telefone com a secretária do LAPAC que entraremos em contato (3559-1646).

Novembro 2011						
D	S	T	Q	Q	S	S
		1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30			

25/11/2011 - Coleta de sangue no LAPAC/EF/UFOP 7-8 h.

30/11/2011 - Consulta com cardiologista na Clínica Ouro Cordis