

TAÍZIA DUTRA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E DE FORMULAÇÕES
PARA ESTATINAS**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre 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 Duarte Vianna Soares - UFMG
Co-orientadora Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira

Belo Horizonte

2009

S586d Silva, Taízia Dutra
Desenvolvimento de métodos analíticos e de formulações para
estatinas / Taízia Dutra Silva. - 2009.
144 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Duarte Vianna Soares
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Barbosa de Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. Estatinas - Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência -
Teses. 3. Espectrofotometria - Teses. 4. Colesterol - Tese. I.
Soares, Cristina Duarte Vianna. II. Oliveira, Renata Barbosa de III.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VI.

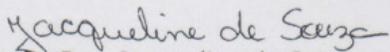
CDD 544.92

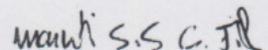
FOLHA DE APROVAÇÃO

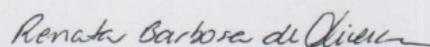
“Desenvolvimento de métodos analíticos e de formulações para estatinas”.

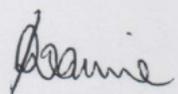
Taízia Dutra Silva

Dissertação aprovada em 03/08/2009 pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes membros:


Profª. Dra. Jacqueline de Souza
Laboratório de Controle de Qualidade da Escola de Farmácia da UFOP


Prof. Dr. Marcilio Sérgio Soares da Cunha Filho
Departamento de Farmácia da Escola de Farmácia da UFOP


Profª. Dra. Renata Barbosa Oliveira (co-orientadora)
Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG


Profª. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares (orientadora)
Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser tão presente em minha vida e conceder a mim e a minha família inúmeras bênçãos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Cristina, pelos ensinamentos passados, conselhos valiosos e pela confiança depositada em mim.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Renata, pela orientação e por ter me passado sempre força e entusiasmo na execução do nosso trabalho.

Ao meu amor Christophe que me incentivou a fazer mestrado e sempre me deu força e carinho, sempre acreditando em meu potencial mais do que eu mesma. Pela compreensão e pela ajuda nos momentos difíceis.

À minha tia Nizinha por ter me acolhido em sua casa por tantos anos, pelo tratamento carinhoso e por ter me ajudado diversas vezes.

Aos meus pais, Altair e Marízia e à minha irmã, Lorena, pelo amor incondicional, pela força, apoio e pela compreensão da nossa distância. Tudo o que eu conquisto é pensando em vocês.

À minha avó e às minhas tias, Cláudia, Maria Nilse e Raquel, por sempre torcerem por mim, acreditar em meu potencial e por tantas vezes ter me ajudado imensamente.

Ao Antônio, Geralda e Emmanuelle pela força e por terem me acolhido com tanto carinho na família.

Aos colegas de laboratório Aline, Amanda, Ana Gabriela, André Lima, André Nascimento, Écio, Diego, Fernando, Flávia, Gustavo, Isabela, Leonardo, Lúcia, Luciano, Márcia, Paula e Tiago pelas contribuições e convívio agradável.

Ao Leonardo, funcionário do CEDAFAR, pelas análises importantes e pela disponibilidade em ajudar.

Às graduandas de farmácia, Alessandra e Valquíria, pela colaboração valiosa na execução desse trabalho.

Ao Jackson pela importante colaboração e ensinamentos valiosos sobre difração de raios X.

À Flávia Dias M. Marinho por ter me ajudado na execução de inúmeras análises no final desse trabalho.

À Adriana Martins Godin por ter me auxiliado, com sua experiência, na execução do experimento em camundongos e pelas dicas valiosas. Muito obrigada!

À professora Dra. Leida Botion pela instrução e colaboração com o experimento em camundongos.

À Farmácia Universitária, à Indústria Farmacêutica Cifarma, à Medley e ao Laboratório Globo pelo fornecimento de matéria-prima e comprimidos de sinvastatina, materiais essenciais para a execução desse trabalho. Muito obrigada pela colaboração.

RESUMO

As estatinas são fármacos utilizados no tratamento da hiperlipidemia. As mais utilizadas na terapêutica são a sinvastatina e a lovastatina, que tem baixa solubilidade. A pravastatina sódica é um sal solúvel e, também usada na terapêutica para redução do colesterol. Neste estudo desenvolveram-se e validaram-se dois métodos analíticos para determinação dessas estatinas. O método por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa foi desenvolvido utilizando coluna C-8, fase móvel acetonitrila:ácido fosfórico 0,1% (65:35), fluxo 1,0 ou 1,5 mL/min, temperatura 30 °C com detecção em λ 238 nm. No método por espectrofotometria derivada no ultravioleta utilizou-se a segunda ordem de diferenciação em λ 247 nm em metanol. Ambos os métodos demonstraram seletividade, precisão e exatidão para determinação das estatinas. Uma formulação de sinvastatina comprimidos foi preparada por meio de dispersão sólida utilizando os polímeros PEG ou PVP. Os comprimidos de dispersões sólidas de sinvastatina e PVP apresentaram heterogeneidade nos ensaios de rotina para o controle de qualidade. Os comprimidos de dispersões sólidas de sinvastatina e PEG cumpriram com os testes de determinação de peso, uniformidade de conteúdo, doseamento e dissolução de acordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira e USP32. Teste *in vivo* em camundongos com dieta hiperlipidêmica foi realizados utilizando sinvastatina sob diferentes formas: (a) sinvastatina, (b) dispersão sólida com PEG, (c) comprimidos de dispersão sólida com PEG e (d) comprimidos Zocor[®]. Os resultados do teste *in vivo* apresentaram elevada variabilidade quanto a redução do colesterol para todos os grupos utilizados e não podem ser conclusivos.

Palavras-chave: estatinas hipolipêmicas, colesterol, desenvolvimento analítico, dispersões sólidas, caracterização, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria derivada no ultravioleta, controle de qualidade, dissolução, Zocor[®].

ABSTRACT

The statins are hypolipemic drugs used in the control of hypercholesterolemia. Simvastatin and lovastatin, low water soluble drugs and soluble sodium pravastatin are among the most prescribed statins for the reduction of cholesterol. In this study two methods were developed and validated for the determination of these statins. A reverse phase high performance liquid chromatographic method was developed using a C-8 column, mobile phase composed of acetonitrile: 0.1% phosphoric acid (65:35), 1.0 or 1.5 mL/min flow rate, column oven 30 °C and UV detection 238 nm. A second order ultraviolet derivative spectrophotometric method was developed at λ 247 nm using methanol. Both methods demonstrated to be selective, precise and accurate for the statins determination. A tablet simvastatin formulation was developed by means of a solid dispersion using the polymers PEG or PVP. Simvastatin tablets dispersions using PVP showed to be heterogeneous regarding the quality control routine tests. Simvastatin tablets dispersions using PEG showed good results for the weight determination, content uniformity and dissolution and met the requirements according to the Brazilian Pharmacopeia and USP32 specifications. *In vivo* tests using mice submitted to a hyperlipemic diet were performed using simvastatin in different forms: (a) simvastatin, (b) powder solid dispersions with PEG, (c) tablets solid dispersions with PEG, and (d) Zocor® tablets. The *in vivo* results showed a great variability in the experiment regarding the cholesterol reduction for all groups tested, hence, were not conclusive.

Keywords: hypolipemic statins, cholesterol, analytical development, solid dispersions, characterization, high performance liquid chromatography, ultraviolet derivative spectrophotometry, quality control, dissolution, Zocor®.

LISTA DE FIGURAS

1 - Estruturas químicas da lovastatina, sinvastatina, pravastatina sódica, fluvastatina sódica e atorvastatina cálcica.	20
2 - Representação simplificada da biossíntese de colesterol a partir de ácido mevalônico.	22
3 - Espectro de absorção na região do IV de lovastatina matéria-prima por reflectância atenuada.....	45
4 - Espectro de absorção na região do IV de pravastatina sódica matéria-prima por reflectância atenuada.....	45
5 - Espectro de absorção na região do IV de sinvastatina padrão de trabalho por reflectância atenuada.....	46
6 - Espectro de absorção na região do UV de lovastatina matéria-prima (8 µg/mL, ACN).	47
7 - Espectro de absorção na região do UV de pravastatina sódica matéria-prima (10 µg/mL, metanol).....	47
8 - Espectro de absorção na região do UV de sinvastatina matéria-prima (8 µg/mL, ACN).	47
9 - Cromatograma de lovastatina (fator de cauda 0,981) e sinvastatina (fator de cauda 0,967) (40 µg/mL, em ACN).....	48
10 - Cromatograma de pravastatina sódica (fator de cauda 1,184) (40 µg/mL, em ACN). ..	49
11 - Cromatograma obtido após hidrólise ácida de lovastatina (5,203 min, R= 8,50). Picos correspondentes a produtos de degradação (PD) em tr=1,182 min e tr=6,623 min. Condições: HCl 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.	50
12 - Cromatograma obtido após hidrólise ácida de sinvastatina (tr=6,611 min, R= 13,55). Pico principal correspondente a produto de degradação (PD) em tr=1,185 min Condições: HCl 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.....	50
13 - Cromatograma obtido após hidrólise básica de lovastatina. Possível hidroxiácido em tr=3,494 min (Lov-HA) e outro produto de degradação (PD) em 1,610 min. Condições: NaOH 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.....	50
14 - Cromatograma obtido após hidrólise básica de sinvastatina. Possível hidroxiácido em tr=4,235 min (Sinv-HA) e outro produto de degradação (PD) em tr=1,571 min. Condições: NaOH 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.....	51
15 - Cromatograma obtido após hidrólise neutra de lovastatina (tr=5,184 min, R= 10,00). Possível hidroxiácido em tr=3,438 min (Lov-HA). Condições: banho-maria a 100 °C por 4 h.	51
16 - Cromatograma obtido após hidrólise neutra de sinvastatina (tr=6,551 min, R= 6,53). Possível hidroxiácido em tr=4,230 min (Sinv-HA). Condições: banho-maria a 100 °C por 4 h.	51
17 - Cromatograma obtido após aquecimento de lovastatina (tr=5,183 min, R= 3,29). Condições: calor seco a 105 °C, por 4 h.	53
18 - Cromatograma obtido após aquecimento de sinvastatina (tr=6,544 min, R= 12,80). Condições: calor seco a 105 °C, por 4 h.	53
19 - Cromatograma obtido após exposição à radiação UV de lovastatina (tr=5,158 min). Condições: exposição à radiação de luz ultravioleta em λ 254 nm por 4 h.....	54
20 - Cromatograma obtido após exposição à radiação UV de sinvastatina (6,546 min). Condições: exposição à radiação de luz ultravioleta em λ 254 nm por 4 h.....	54
21 - Cromatograma obtido após oxidação de lovastatina (5,189 min). Condições: H ₂ O ₂ 30% V/V, em banho-maria a 100° C por 4 h. O pico em 1,350 min corresponde ao branco (H ₂ O ₂).	54
22 - Cromatograma obtido após oxidação de sinvastatina (6,566 min). Condições: H ₂ O ₂ 30% V/V, em banho-maria a 100° C por 4 h. O pico em 1,350 min corresponde ao branco (H ₂ O ₂).	55
23 - Cromatogramas de soluções de placebos A, B C e D (concentração equivalente a 40 µg/mL, em ACN).	56

/continua.

LISTA DE FIGURAS (continuação)

24 - Curvas analíticas médias para a determinação de (a) lovastatina (b) pravastatina sódica e (c) sinvastatina (28 a 52 µg/mL, ACN, λ 238 nm) por CLAE.....	60
25 - Espectros na região do UV em zero ordem de sinvastatina 10 µg/mL, em metanol e placebos C e D na concentração equivalente a 10 µg/mL de sinvastatina, metanol.	70
26 - Espectro de absorção da sinvastatina em segunda derivada (8 µg/mL, metanol).....	71
27 - Curvas analíticas médias para a determinação de lovastatina (a), sinvastatina (c) (ambas de 4 a 12 µg/mL, metanol) e (b) de pravastatina sódica (6 a 14 µg/mL, metanol) por EDU.....	75
28 - Padrão de difração de raios X de sinvastatina.....	96
29 - Padrão de difração de raios X de PEG6000 (a), PVP (b) e das respectivas MF (1:1, estatina:polímero).....	96
30 - Padrão de difração de raios X de sinvastatina, PEG4000 e das DS de sinvastatina e PEG4000 (1:1, 1:3 e 1:5) preparadas pelo método de fusão.	97
31 - Padrão de difração de raios X das MF de sinvastatina e PEG6000 (a) e das respectivas DS preparadas pelo método de fusão (b).	97
32 - Padrão de difração de raios X da MF de sinvastatina e PEG6000 e das respectivas DS preparadas pelo método de fusão (dispersão) e pelo método de fusão-evaporação de solvente (misto), na proporção 1:5 (estatina:polímero).	98
33 - Padrão de difração de raios X das MF de sinvastatina e PVP (a) e das respectivas DS preparadas pelo método de fusão (b).	99
34 - Curvas DSC de sinvastatina (d) e suas misturas físicas com PEG4000 nas proporções (sinvastatina: PEG4000): 1:1 (a), 1:3 (b) e 1:5 (c).....	100
35 - Curvas DSC de sinvastatina (c) e suas dispersões sólidas com PEG4000 preparadas por meio do método de fusão, nas proporções (sinvastatina: PEG4000): 1:1 (a), 1:3 (b) e 1:5 (d).....	100
36 - Curvas DSC de sinvastatina e suas misturas físicas com PEG6000 nas proporções (sinvastatina:PEG6000): 1:1, 1:3 e 1:5.	101
37 - Curvas DSC de sinvastatina e suas dispersões sólidas com PEG6000 preparadas por meio do método de fusão, nas proporções (sinvastatina:PEG6000): 1:1, 1:3 e 1:5.	101
38 - Curvas DSC das DS de sinvastatina e PEG6000 preparadas por meio do método de fusão (a) e por meio do método de fusão-evaporação de solvente (b), na proporção 1:5 (estatina:polímero).....	102
39 - Curvas DSC das misturas físicas de sinvastatina com PVP nas proporções (sinvastatina:PVP): 1:1, 1:3 e 1:5.....	102
40 - Curvas DSC das dispersões sólidas de sinvastatina com PVP preparadas por meio do método de evaporação de solvente, nas proporções (sinvastatina:PVP): 1:1, 1:3 e 1:5. ...	103
41 - Comparação do aumento de solubilidade da sinvastatina nas DS preparadas com polímeros e proporções diferentes.....	107
42 - Curva analítica para avaliação da solubilidade de sinvastatina por UV, λ 239 nm.	109
43 - Cromatograma da DS de sinvastatina (tr=7,215 min) e PEG4000 (1:5) preparada pelo método de fusão.	110
44 - Cromatograma da DS de sinvastatina (pico principal) e PVP (1:1). A seta indica o pico referente a produto de degradação.....	110
45 - Cromatograma da DS de sinvastatina (pico principal) e PVP (1:3). As setas indicam picos referentes a produtos de degradação.	110
46 - Cromatograma da DS de sinvastatina (pico principal) e PVP (1:5). As setas indicam picos referentes a produtos de degradação.	111
47 - Curva analítica para avaliação do perfil de dissolução da sinvastatina por EDU.....	118
48 - Curva de perfil de dissolução dos comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG e do Zocor® (10 mg), em tampão de NaH ₂ PO ₄ pH 7,40, sem adição de LSS.	119

LISTA DE FIGURAS (conclusão)

49 - Curva de perfil de dissolução de comprimidos preparados com DS de PEG ou PVP e do Zocor® (10 mg), em tampão de NaH_2PO_4 pH 7,40 com 0,3% de LSS.....	120
50 - Comparação dos perfis de dissolução do medicamento referência (a) e dos comprimidos com DS de PEG (b) em tampão NaH_2PO_4 pH 7,40 e 0,3% de LSS com os respectivos perfis de dissolução em tampão NaH_2PO_4 pH 7,40 e 0,5% de LSS.	121
51 - Média de porcentagem de alteração de colesterol plasmático após 7 dias com tratamento hipolipêmico para cada grupo avaliado.	127

LISTA DE TABELAS

1 - Resultados obtidos, em triplicata, para temperaturas de fusão de sinvastatina e lovastatina matérias-primas.	43
2 - Resultados para determinação do poder rotatório de lovastatina, sinvastatina (0,5% p/V em ACN, triplicata) e pravastatina sódica (0,5% p/V em água, triplicata).	44
3 - Atribuições de posições das principais bandas de absorção de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina na região do IV.	46
4 - Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de lovastatina por CLAE, em triplicata.	57
5 - Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de pravastatina sódica por CLAE, em triplicata.	58
6 - Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de sinvastatina por CLAE, em triplicata.	59
7 - Resultados obtidos para análise da regressão linear para determinação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por CLAE.	61
8 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de lovastatina por CLAE, em triplicata.	62
9 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de pravastatina sódica por CLAE, em triplicata.	62
10 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de sinvastatina por CLAE, em triplicata.	64
11 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de lovastatina por CLAE, em triplicata.	65
12 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de pravastatina sódica por CLAE, em triplicata.	66
13 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de sinvastatina por CLAE, em triplicata.	67
14 - Resultados obtidos para robustez do método aplicado à determinação de lovastatina por CLAE.	68
15 - Resultados obtidos para robustez do método aplicado à determinação de pravastatina sódica por CLAE.	68
16 - Resultados obtidos para robustez do método aplicado à determinação de sinvastatina por CLAE.	69
17 - Resultados da avaliação da linearidade do método para a determinação de lovastatina por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata.	72
18 - Resultados da avaliação da linearidade do método para a determinação de pravastatina sódica por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata.	73
19 - Resultados da avaliação da linearidade do método para a determinação de sinvastatina por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata.	74
20 - Resultados obtidos para análise da regressão linear para a determinação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por EDU, segunda ordem.	76
21 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de lovastatina por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata e por analistas diferentes.	77
22 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de pravastatina sódica por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata e por analistas diferentes.	78
23 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de sinvastatina por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata e por analistas diferentes.	79

/continua.

LISTA DE TABELAS (conclusão)

24 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de lovastatina por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata.	80
25 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de pravastatina sódica por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata.	81
26 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de sinvastatina por EDU, segunda ordem, avaliada em triplicata.	82
27 - Resultados obtidos para avaliação de robustez do método aplicado ao doseamento de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por EDU, segunda ordem.....	83
28 - Resultados comparativos para o doseamento de sinvastatina em comprimidos obtidos entre os métodos CLAE e EDU, segunda ordem.	84
29 - Excipientes e proporções utilizadas na fabricação dos comprimidos contendo DS ^a	90
30 - Grupos de animais (n = 6) e tratamentos utilizados na comparação da eficácia terapêutica de sinvastatina sob formas diversas.	94
31 - Resultados obtidos para avaliação das DS e MF de sinvastatina por DSC.....	105
32 - Aumento porcentual da concentração de sinvastatina liberada em solução tampão NaH ₂ PO ₄ pH 7,40, após 1 h de teste de solubilidade parcial.	106
33 - Resultados de peso médio ^a e de variação para os comprimidos com DS de sinvastatina e PEG6000 ou PVP.	114
34 - Resultados obtidos para os testes de dureza e friabilidade para os comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG6000 ou PVP.	115
35 - Resultados obtidos no doseamento por CLAE dos comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG6000 ou PVP, em sextuplicata.	115
36 - Porcentagens de valor rotulado para o teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG6000 ou PVP.	116
37 - Resultados ^a das porcentagens de liberação de sinvastatina, em tampão pH 7,4, sem adição de tensoativo, por EDU, 2 ^a ordem.	119
38 - Resultados ^a das porcentagens de liberação de sinvastatina, em tampão NaH ₂ PO ₄ pH 7,40 com 0,3% de LSS ou com 0,5% de LSS.	120
39 - Resultados de ASC e de porcentagem de ED dos perfis de dissolução calculados de 0 a 60 minutos.	121
40 - Concentração plasmática de colesterol em camundongos em três períodos: colesterol basal (antes de iniciar o estudo), colesterol após 7 dias com dieta hiperlipêmica e após 7 dias com tratamento hipolipêmico e dieta continuada.	125
41 - Porcentagem de alteração de colesterol ^a após 7 dias com tratamento hipolipêmico com sinvastatina sob diferentes formas (n=6).	126
42 - Porcentagem de alteração de colesterol ^a após 7 dias com tratamento hipolipêmico com sinvastatina sob diferentes formas (n=4).	126

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	área sob a curva
C ₈	coluna de sílica quimicamente ligada a grupos octilsilano
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
C _s	concentração de saturação
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CT	colesterol total
DAD	detector de arranjo de diodos
DPR	desvio padrão relativo
DRXP	difração de raios X de pó
DS	dispersão sólida
DSC	calorimetria exploratória diferencial
EDU	espectrofotometria derivada na região ultravioleta
ED	eficiência de dissolução
EP	erro padrão da média
GL	graus de liberdade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
IV	infravermelho
IC	intervalo de confiança
k	fator de retenção
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MF	mistura física
P	coeficiente de partição octanol/água
PEG	polietilenoglicol
PVP	polivinilpirrolidona
R	resolução
RENAME	relação nacional de medicamentos essenciais
rpm	rotações por minuto
s	desvio padrão
SCB	sistema de classificação biofarmacêutica
tr	tempo de retenção
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta-visível
VR	valor rotulado
$ \alpha_D^{25} $	poder rotatório específico
ΔH	variação de entalpia
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Características físico-químicas e propriedades farmacológicas das estatinas	19
2.2 Métodos quantitativos para determinação de estatinas.....	23
2.3 Sistema de classificação biofarmacêutica e dissolução	25
2.4 Dispersões sólidas.....	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Gerais.....	29
3.2 Específicos	29
4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ESTATINAS HIPOLIPÊMICAS	30
4.1 Material.....	30
4.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras	30
4.1.2 Material e Reagentes.....	30
4.1.3 Equipamentos.....	31
4.2 Métodos.....	32
4.2.1 Identificação de matéria-prima	32
4.2.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina.....	33
4.2.3 Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria derivada na região do UV (EDU) para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina ..	38
4.2.4 Comparação dos métodos desenvolvidos: EDU e CLAE	41
4.3 Resultados e discussão	43
4.3.1 Identificação da matéria-prima	43
4.3.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina.....	48
4.3.3 Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria derivada na região do UV para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina	70
4.3.4 Comparação entre os métodos desenvolvidos: EDU e CLAE	83
5 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS E DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE SINVASTATINA	85
5.1 Material.....	85
5.1.1 Substâncias químicas e amostras.....	85
5.1.2 Material e reagentes	85
5.1.3 Equipamentos.....	86
5.2 Métodos.....	87
5.2.1 Desenvolvimento de dispersões sólidas de sinvastatina	87
5.2.2 Caracterização das dispersões sólidas	87
5.2.3 Avaliação da solubilidade parcial das DS.....	88
5.2.4 Avaliação de degradação das DS por CLAE.....	89
5.2.5 Desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos contendo DS de sinvastatina.....	89
5.2.6 Controle de qualidade dos comprimidos contendo DS de sinvastatina	91
5.2.7 Teste <i>in vivo</i>	93
5.3 Resultados e discussão	95
5.3.1 Desenvolvimento de dispersões sólidas de sinvastatina	95
5.3.2 Caracterização das dispersões sólidas	95
5.3.3 Avaliação da solubilidade parcial das DS.....	105
5.3.4 Avaliação de degradação das DS por CLAE.....	109
5.3.5 Desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos contendo DS de sinvastatina.....	112
5.3.6 Controle de qualidade dos comprimidos contendo DS de sinvastatina	113

5.3.7 Teste <i>in vivo</i>	123
6 CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
APÊNDICE A.....	138
APÊNDICE B.....	141
ANEXO A.....	143

1 INTRODUÇÃO

A hiperlipidemia ou hipercolesterolemia, elevação da concentração de lipídios no plasma, é a manifestação de um distúrbio na síntese e na degradação de lipoproteínas plasmáticas. A hiperlipidemia é a principal causa de aterosclerose e patologias a ela associadas, tais como doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular isquêmica e doença vascular periférica (CARVALHO e CAMPO, 2007; ERTÜRK *et al.*, 2003; MOGHADASIAN, 1999). Estas doenças são responsáveis pela maior parte da mortalidade e da morbidade entre adultos. De acordo com estatísticas da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em 2004, as doenças do aparelho circulatório foram a principal causa de óbito no Brasil, correspondendo a 32,5% da mortalidade proporcional por causas definidas (BRASIL, 2006).

O colesterol possui papéis fisiológicos essenciais no nosso organismo como, por exemplo, participar na manutenção da integridade das membranas celulares e constituir um precursor importante na síntese de hormônios esteróides (NELSON e COX, 2005). Existe sob duas formas principais, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade colesterol (HDL). Entretanto, concentrações plasmáticas elevadas de LDL (≥ 160 mg/dL) e/ou triglicérides (≥ 200 mg/dL) e concentrações baixas de HDL (< 40 mg/dL) estão associadas a distúrbios e condições patológicas como a hiperlipidemia e a aterosclerose (GOODMAN e GILMAN, 2003).

De acordo com levantamento realizado em 2006 pela *American Heart Association* (2009), 45,1% da população americana apresentavam valores de colesterol total (CT) iguais ou superiores a 200 mg/dL (limite aceitável) e 15,7% apresentavam valores de CT iguais ou superiores a 240 mg/dL, concentração considerada elevada. Em 2005, nos EUA foram relatados 864.480 óbitos devido às doenças cardiovasculares e 445.687 devido à doença cardíaca coronariana (DCC), representando 35,3% e 18,2% do total de óbitos registrados nesse ano, respectivamente.

Esses dados revelam a importância da identificação e do controle dos fatores de risco para DCC. Os principais fatores de risco são LDL colesterol elevado, HDL colesterol reduzido, fumo, hipertensão, diabetes, obesidade, idade avançada e história familiar de eventos de DCC prematuros (PARODI, 2009; WOOD *et al.*, 1998).

O tratamento de pacientes com distúrbios lipídicos depende do nível de colesterol e triglicérides plasmáticos, da presença ou não de DCC estabelecida, na gravidade dos

fatores de riscos quando presentes e na avaliação baseada nos níveis de risco de Framingham, uma escala quantitativa em que objetiva-se prever a probabilidade de um paciente, sem história prévia de DCC ou outra doença aterosclerótica, desenvolvê-la em 10 anos (NCEP, 2001, WOOD *et al.*, 1998).

Para todos os casos de pacientes hiperlipidêmicos, recomendam-se mudanças no estilo de vida, como dieta hipolipêmica, exercício físico, controle de peso e controle da pressão arterial. Entretanto, quando a mudança no estilo de vida não é suficiente e quando há mais fatores de risco associados torna-se necessária a terapia medicamentosa (NCEP, 2001, WOOD *et al.*, 1998).

O reconhecimento da hipercolesterolemia como um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares levou ao desenvolvimento de fármacos que reduzem os níveis de colesterol. O principal grupo de agentes hipolipidêmicos são os derivados do ácido fíbrico, derivados do ácido nicotínico, resinas biliares, inibidores da absorção do colesterol biliar e dietético (ezetimibe) e as estatinas. As estatinas são os agentes mais bem tolerados e mais efetivos para o tratamento da dislipidemia (GOODMAN e GILMAN, 2003; NCEP, 2001; STUDER *et al.*, 2005).

As estatinas são inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que cataliza uma etapa mais precoce e limitante da biossíntese do colesterol. Os cinco agentes hipolipêmicos mais importantes, clinicamente, dentro desse grupo são a atorvastatina, a fluvastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina (CARVALHO e CAMPO, 2007).

Por serem medicamentos de uso contínuo e de grande importância para a saúde pública, duas estatinas, a sinvastatina e a atorvastatina, estão presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2002) estabelecida pela política nacional de medicamentos do governo brasileiro. A diretriz estabelecida na política nacional de medicamentos relativa à adoção de medicamentos constantes na RENAME se baseia nas prioridades nacionais de saúde, bem como na segurança, na eficácia terapêutica comprovada, na qualidade e na disponibilidade dos produtos considerados essenciais (BRASIL, 2006; RENAME, 2002).

Existem muitas especialidades farmacêuticas à base de estatinas no mercado e, apesar de existirem métodos farmacopéicos em compêndios estrangeiros, não há métodos descritos para tal grupo de fármacos na Farmacopéia Brasileira quarta edição (FARMACOPÉIA,

2005). Os métodos de doseamento descritos nas monografias das estatinas são por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e, diferentes para cada uma delas. Assim, é essencial o desenvolvimento de métodos de doseamento alternativos, acessíveis, econômicos, simples e rápidos para as estatinas a fim de obter uniformidade na avaliação de matérias-primas e produtos acabados desse grupo de fármacos.

Como as estatinas são a classe de fármacos mais usados para o tratamento da hipercolesterolemia, é necessário, além do desenvolvimento de métodos alternativos simples para determinação quantitativa desses fármacos; a contínua pesquisa no desenvolvimento de formulações melhoradas para garantir a disponibilidade e eficácia do fármaco.

A sinvastatina, a segunda estatina mais potente e a mais prescrita no Brasil, é um fármaco de baixa solubilidade aquosa e de alta permeabilidade de acordo com o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB). A sua solubilização *in vivo* é um fator limitante para a sua absorção e para o aparecimento do efeito farmacológico (BUDAVARI, 2006; GRAESER *et al.*, 2008). Dessa forma, é de grande importância o desenvolvimento de formulações que aumentem sua solubilidade e melhorem sua biodisponibilidade.

Existem vários recursos técnicos que podem ser utilizados na tentativa de melhorar a solubilidade e, portanto, aumentar a biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade aquosa como a sinvastatina. Esses recursos incluem a micronização, o preparo de dispersões sólidas, a complexação com ciclodextrinas, a conversão de fármacos do estado cristalino para o estado amorfo, a incorporação de surfactantes, a inclusão em lipossomas, a formação de sais solúveis e a utilização de excipientes que ajudam na solubilização e liberação do fármaco (FORD, 1986; LEUNER e DRESSMAN, 2000, KALÁSZ e ANTAL, 2006; BREWSTER e LOFTSSON, 2007; CARRIER *et al.*, 2007; GRAESER *et al.*, 2008; PATEL e PATEL, 2008; CHEN *et al.*, 2009).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características físico-químicas e propriedades farmacológicas das estatinas

As estatinas foram isoladas a partir de uma cultura da colônia *Penicillium citrinum*. A primeira estatina estudada foi a mevastatina, que demonstrou o potencial terapêutico dessa classe de fármacos (GOODMAN e GILMAN, 2003). Algumas estatinas são produtos naturais, isoladas a partir do metabolismo de fungos, como a mevastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina (derivado semi-sintético), outras são completamente sintéticas como a atorvastatina, a cerivastatina e a fluvastatina (BASTARDA *et al.*, 2005). As estruturas químicas das estatinas são apresentadas na Figura 1.

Dentre os fármacos citados, a sinvastatina e a atorvastatina estão entre as estatinas mais potentes, sendo recomendadas pela *Heart Association and the American College of Cardiology* como a terapia de primeira escolha para reduzir os níveis de colesterol plasmáticos. Em estudos realizados para comparar os efeitos das estatinas na redução do colesterol plasmático demonstrou-se que a dose de 20 mg de sinvastatina equivale à dose de 10 mg de atorvastatina. A atorvastatina é a estatina mais potente, seguindo a sinvastatina, a lovastatina e a pravastatina com potências semelhantes e a fluvastatina com menor potência (JONES *et al.*, 1998; GOODMAN e GILMAN, 2003).

A atorvastatina na forma de sal de sódio tem peso molecular 1192,4 g/mol, pKa 4,46, com solubilidade em água (30 °C) de 20,4 mg/mL em pH 2,1 e, de 1,23 g/L em pH 6,0. Na forma de sal de cálcio apresenta absorção máxima na região do ultravioleta ($UV_{m\acute{a}x}$, acetonitrila ou metanol) em λ 248 nm. A atorvastatina como lactona possui ponto de fusão na faixa de 159,2-160,7 °C, poder rotatório específico, $[\alpha]_D^{25}$, igual a +26,05° (1% em clorofórmio) e solubilidade de $1,34 \pm 0,53$ mg/L em pH 2,3 a 7,7 (30 °C) (AKTAS *et al.*, 2003; BUDAVARI, 2006; MARTINDALE, 1999).

A fluvastatina sódica é um pó amarelo-acastanhado, higroscópico com ponto de fusão na faixa de 194 a 197 °C, solúvel em água, em etanol e em metanol. Possui pKa 4,6 e coeficiente de partição (octanol:água), log P, igual a 4,85. Apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta ($UV_{m\acute{a}x}$, solução aquosa ácida) em λ 235 e 305 nm (BUDAVARI, 2006; MOFFAT *et al.*, 2004).

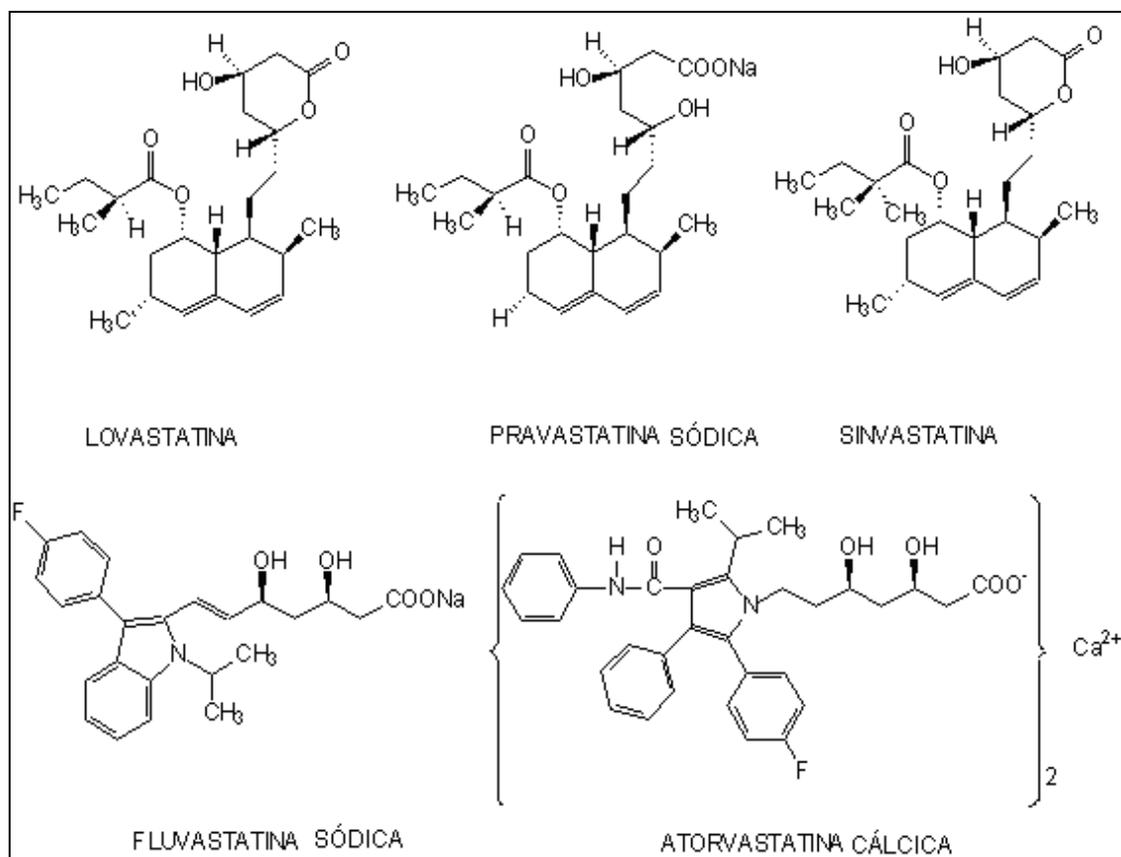


Figura 1 - Estruturas químicas da lovastatina, simvastatina, pravastatina sódica, fluvastatina sódica e atorvastatina cálcica.

A lovastatina é um pó branco cristalino com ponto de fusão de 174,5 °C, insolúvel em água ($0,4 \times 10^{-3}$ g/L), solúvel em acetona, acetonitrila, metanol (28 g/L), etanol (16 g/L) e isopropanol (20 g/L). Essa estatina possui poder rotatório, $[\alpha]_D^{25}$ I, igual a +323° (0,5% em acetonitrila), coeficiente de partição (octanol:água), log P, igual a 4,26 na forma de lactona e máximos de absorção na região do ultravioleta ($UV_{máx}$, acetonitrila) em λ 231, 238 e 247 nm (BUDAVARI, 2006; MOFFAT *et al.*, 2004).

A pravastatina, na forma de sal de sódio, é um pó cristalino, higroscópico e apresenta coloração branco-amarelada. É facilmente solúvel em água e em metanol e praticamente insolúvel em acetona, acetonitrila e clorofórmio. Possui coeficiente de partição (octanol:água), log P, igual a -0,23. Na sua forma de lactona possui poder rotatório, $[\alpha]_D^{25}$ I, igual a +194° (0,51% em metanol), ponto de fusão na faixa de 138 a 142 °C e máximos de absorção na região do ultravioleta ($UV_{máx}$, metanol) em λ 230, 237, e 245 nm (EUROPEAN, 2008; MARTINDALE, 1999; MOFFAT *et al.*, 2004).

A sinvastatina é um pó branco com ponto de fusão na faixa de 135 a 138 °C, insolúvel em água (0,03 g/L) e ácido clorídrico 0,1 M (0,06 g/L) e solúvel em clorofórmio (610 g/L), metanol (200 g/L), etanol (160 g/L), polietilenoglicol (70 g/L) e hidróxido de sódio 0,1 M (70 g/L). Possui poder rotatório, $[\alpha]_D^{25}$, igual a + 292 (0,51% em acetonitrila), coeficiente de partição (octanol/água), log P, igual a 4,68 e máximos de absorção na região do ultravioleta ($UV_{m\acute{a}x}$, acetonitrila) em λ 231, 238 e 247 nm (BUDAVARI, 2006; MOFFAT *et al.*, 2004).

As estatinas abaixam o LDL colesterol em 25-45%, dependendo da dose e da estatina empregada. As doses recomendadas de cada estatina são: 10-80 mg/dia de atorvastatina, 20-40 mg/dia de pravastatina e 20-80 mg/dia de fluvastatina, lovastatina e sinvastatina (CARVALHO e CAMPO, 2007; NCEP, 2001). Pacientes hipertrigliceridêmicos que utilizam as doses mais altas (80 mg/dia) de sinvastatina ou atorvastatina apresentam uma redução de 35-45% do LDL colesterol e uma redução semelhante nos níveis de triglicerídios em jejum (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Esse grupo de fármacos são inibidores competitivos muito potentes da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase que sintetiza o ácido mevalônico, um importante precursor na síntese de colesterol, por meio de redução do substrato HMG-CoA. A afinidade das estatinas pela enzima está na faixa nanomolar, enquanto que a afinidade do substrato natural, o HMG-CoA, está na faixa micromolar, ou seja, 3 ordens de magnitude menor. A síntese de colesterol, simplificada, a partir do ácido mevalônico, está representada na Figura 2 (CARVALHO e CAMPO, 2007; MOGHADASIAN, 1999).

Vários estudos relatam benefícios clínicos associados à terapia com as estatinas que são independentes da redução de colesterol, são os chamados efeitos pleiotrópicos. Esses efeitos incluem promoção de síntese de óxido nítrico endotelial, redução na produção de espécies reativas de oxigênio, estabilização das placas ateroscleróticas, redução no crescimento de células musculares lisas que ocorre no processo aterosclerótico, efeitos relacionados com atividade antiinflamatória como redução na liberação de citocinas inflamatórias, redução na adesão leucocitária, e redução na proliferação de macrófagos. Todas essas ações são importantes na atenuação do processo de aterosclerose via limitação da lesão e disfunção endotelial (MARON *et al.*, 2000; TERASAKA *et al.*, 2008; SPARROW *et al.*, 2001; CHOUDHURY *et al.*, 2004; MOLČÁNYIOVÁ *et al.*, 2006, CHOPRA *et al.*, 2007).

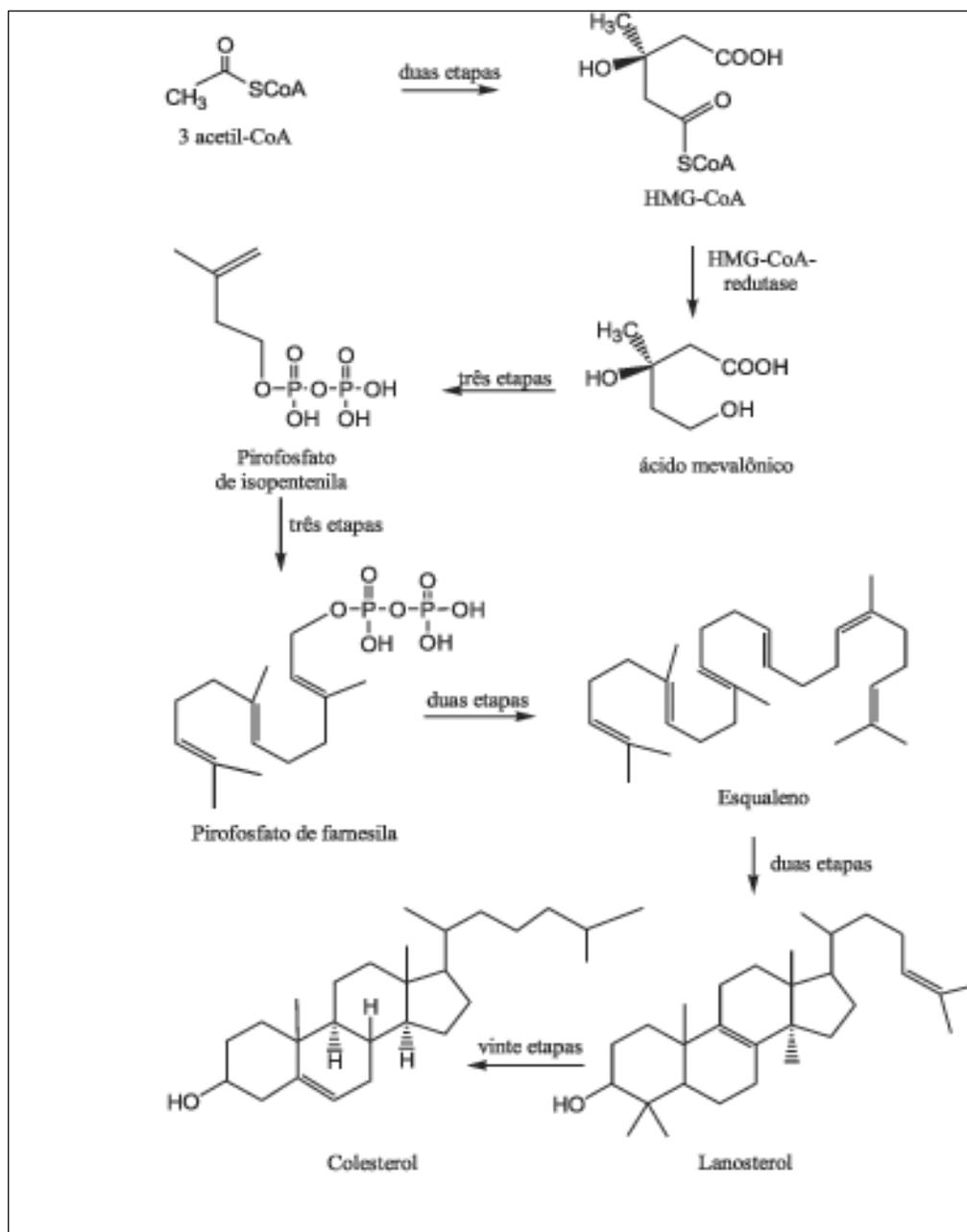


Figura 2 - Representação simplificada da biossíntese de colesterol a partir de ácido mevalônico.

A lovastatina e a sinvastatina são administradas na forma inativa, lactona, e no fígado são hidrolisadas para a forma ativa, o α -hidroxiácido correspondente. As demais estatinas são administradas na forma ativa. A lipofilicidade dos pró-fármacos, lovastatina e sinvastatina, confere aos mesmos maior seletividade pelo fígado, o maior sítio de síntese de colesterol, em comparação com as demais estatinas administradas na forma ativa (MOGHADASIAN, 1999).

Esses fármacos estão sujeitos a extenso metabolismo de primeira passagem pelo fígado. Mais de 95% das estatinas (formas lactonas e ativas) estão ligadas às proteínas plasmáticas, com exceção da pravastatina que apresenta taxa de ligação mais baixa, cerca de 50%. São excretadas nas fezes por meio da bile e uma pequena proporção é excretada na urina (ERTÜRK *et al.*, 2003; GOODMAN e GILMAN, 2003).

Cerca de 30% de lovastatina, 34% de pravastatina sódica e 85% da sinvastatina são absorvidas, sendo que a atorvastatina cálcica e a fluvastatina sódica são quase completamente absorvidas. Devido ao extenso metabolismo de primeira passagem, as estatinas possuem valores baixos de biodisponibilidade sendo 40,7% para a atorvastatina cálcica, 25% para a fluvastatina sódica, até 5% para lovastatina, de 10 a 26% para a pravastatina sódica e até 5% para a sinvastatina (MOFFAT *et al.*, 2004; MOGHADASIAN, 1999).

Os principais efeitos adversos devido ao uso das estatinas são elevação na transaminase hepática, miopatia, catarata, distúrbios gastrintestinais, tonteira e visão embaçada (MARTINDALE, 1999; NCEP, 2001). Dentre eles, o de maior significância, é a miopatia associada com a elevação de creatinocinase sendo caracterizada por mialgia intensa e fadiga. Não há diferenças significativas no potencial de causar efeitos adversos entre as estatinas. São contra-indicadas, principalmente, na presença de doenças hepáticas (MARON *et al.*, 2000; PASTERNAK *et al.*, 2002).

Devido ao aumento do risco de causar miopatia, as estatinas não são usadas em associação com outras estatinas (MARTINDALE, 1999; PASTERNAK *et al.*, 2002), mas são usadas em associação com inibidores da absorção do colesterol (ezetimibe) ou outras classes de fármacos como anti-hipertensivos (valsartana) e antitrombóticos (ácido acetilsalicílico).

2.2 Métodos quantitativos para determinação de estatinas

Apesar da similaridade estrutural das estatinas (**Figura 1**), há diferentes métodos analíticos descritos na literatura para determinação quantitativa desse grupo de fármacos, entretanto são diferentes e desenvolvidos individualmente para cada substância, com base em suas propriedades físico-químicas como solubilidade, pKa e coeficiente de partição octanol/água.

São vários os métodos de doseamento por CLAE descritos para as estatinas e que utilizam detecção por espectrofotometria na região do UV, por fluorescência, por espectrometria de massas e outros recursos (ERTÜRK *et al.*, 2003; ARAYNE *et al.*, 2007; NIROGI *et al.*, 2007; BASAVAIAH e DEVI, 2008). Para a sinvastatina, há descrição de método por meio de espectrofotometria derivada na região do UV (EDU). Esse método mostrou-se mais viável financeiramente e mais rápido em comparação com métodos de quantificação por meio da CLAE (GOMES *et al.*, 2009; WANG e ASGHARNEJAD, 2000).

As estatinas lovastatina, pravastatina e sinvastatina possuem monografias em alguns compêndios estrangeiros, por exemplo as Farmacopéia Americana, Britânica e Européia, com diferentes doseamentos por CLAE utilizando detecção na região do UV em λ 238 nm. As colunas cromatográficas recomendadas são de octilsilano (C_8) ou octadecilsilano (C_{18}) e fase móvel variável. Para a pravastatina sódica também há monografia na Farmacopéia Japonesa (JPXV) (JAPANESE, 2006; BRITISH, 2007; EUROPEAN, 2008; EUROPEAN, 2009; THE UNITED, 2008).

Nos métodos de doseamento descritos para lovastatina matéria-prima nas Farmacopéias Americana (USP31), Britânica (BP2007) e Européia (EP2008) utilizam-se condições semelhantes, como fase móvel constituída por solução de ácido fosfórico 0,1% V/V e acetonitrila (ACN) (35:65) como fase móvel, fluxo 1,5 mL/min, coluna C_8 . A principal diferença é que no método da USP31 utiliza-se eluição isocrática e nos métodos da BP2007 e EP2008 emprega-se eluição em gradiente com tempo de análise de 20 minutos (BRITISH, 2007; EUROPEAN, 2008; THE UNITED, 2008).

Para a pravastatina sódica matéria-prima, as condições cromatográficas descritas para o doseamento na BP2007, EP2008 e na JPXV são: fase móvel constituída de ácido acético glacial, trietilamina, metanol e água (1:1:450:550 V/V/V/V), eluição isocrática, 1,3 mL/min de fluxo e coluna C_{18} . Entretanto, na USP31 a fase móvel, em gradiente, é constituída por proporções variáveis de solução de ácido fosfórico 0,08 M pH 5,0 e ACN, fluxo 1,0 mL/min e eluição em 20 minutos (JAPANESE, 2006; BRITISH, 2007; EUROPEAN, 2008; THE UNITED, 2008).

Os métodos de doseamento descritos para sinvastatina matéria-prima na USP31, BP2007 e EP2008 utilizam coluna C_{18} , proporções variáveis de uma mistura de solução de ácido fosfórico 0,1% V/V e ACN (50:50) e solução de ácido fosfórico 0,1% V/V em ACN como fase móvel, 1,5 mL/min (USP31), 1,3 mL/min (EP2008) e 3,0 mL/min de fluxo (EP2009) e eluição

em gradiente por 13 minutos (BRITISH, 2007; EUROPEAN, 2008; EUROPEAN, 2009; THE UNITED, 2008).

Percebe-se que há variação nos métodos e na Farmacopéia Brasileira quarta edição, não há métodos descritos para tal grupo de fármacos (FARMACOPÉIA, 2005). Assim, é importante o desenvolvimento de métodos mais uniformes e até alternativos para o doseamento para as estatinas como, por exemplo, a espectrofotometria na região ultravioleta (UV) e suas variações (derivada), de modo a proporcionar procedimentos mais viáveis financeiramente, mais simples e rápidos de serem realizados.

Gomes e colaboradores (2009) desenvolveram método por EDU para determinação de sinvastatina em comprimidos. As medidas foram realizadas em λ 255 nm, em segunda derivada e utilizando-se mistura de metanol e água como solvente. Apesar da menor interferência em comparação com as medidas no modo convencional, zero ordem, a sinvastatina apresenta baixa absorção no comprimento de onda λ 255 nm, originando um pico satélite que pode comprometer a precisão e a reprodutibilidade do método.

Em outro estudo conduzido por Wang e Asgharnejad (2000) foi desenvolvido um método por EDU para a determinação de sinvastatina dissolvida, em tampão fosfato de sódio pH 6,8, a partir de comprimidos. As medidas foram realizadas em λ 243 nm, também em segunda derivada. Wang e Asgharnejad (2000) investigaram apenas a interferência do ácido ascórbico presente nas formulações.

Devido ao grande número de indústrias farmacêuticas que produzem medicamentos à base de estatinas, é necessário desenvolver métodos alternativos padronizados, seletivos, simples e rápidos para uma avaliação mais uniforme dessas substâncias e que sejam compatíveis com a realidade da rotina industrial.

2.3 Sistema de classificação biofarmacêutica e dissolução

No SCB relacionam-se os fármacos em quatro classes, de acordo com a solubilidade aquosa e com a permeabilidade intestinal. Os quatro casos possíveis são: alta solubilidade e alta permeabilidade (classe I), baixa solubilidade e alta permeabilidade (classe II), alta solubilidade e baixa permeabilidade (classe III) e fármacos que apresentam baixa solubilidade e baixa permeabilidade (classe IV) (U.S. FOOD, 1997; KASIM *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2002).

Um fármaco é classificado como altamente solúvel se sua dose mais alta é solúvel em 250 mL, ou menos, de meio aquoso com pH na faixa de 1,0 a 7,5 ou se a razão: dose mais alta/250 mL/solubilidade em água é inferior ou igual a 1. A classificação da permeabilidade é baseada em dados experimentais de absorção intestinal humana, em estudos de transferência de massa através da membrana intestinal ou, ainda, na correlação do coeficiente de partição (P) n-octanol/água do fármaco na forma não ionizada e a medida da sua permeabilidade jejunal (KASIM *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2002).

Uma substância é considerada altamente permeável quando a extensão de absorção intestinal é igual ou maior do que 90%. Entretanto, Yu e colaboradores (2002) sugerem que esse critério é inadequado, pois a fração de dose absorvida determinada experimentalmente para a maioria dos fármacos consideradas completamente ou bem absorvidas não atinge 90%. Assim, os autores sugerem um novo critério, 85%. Outro critério para classificar a permeabilidade é o valor de log P (n-octanol/água), sendo que uma substância é considerada altamente permeável se log P é maior do que 1,72 (KASIM *et al.*, 2003).

A sinvastatina é um pó branco, cristalino, não higroscópico e insolúvel em água (0,03 mg/mL), seu coeficiente de partição entre octanol e tampão acetato pH 7,2 é maior do que 1995 e o seu valor de log P (n-octanol/água) é igual a 4,68 (MOFFAT *et al.*, 2004; AMBIKE *et al.*, 2005; PATEL e PATEL, 2008). Devido a essas propriedades físico-químicas, a sinvastatina faz parte da classe II do SCB, ou seja, é uma substância de baixa solubilidade e alta permeabilidade (GRAESER *et al.*, 2008).

É bem estabelecido que para fármacos com baixa solubilidade e alta permeabilidade a sua liberação e dissolução *in vivo* a partir de uma forma farmacêutica de dosagem oral é uma etapa crítica e limitante para sua absorção, distribuição e, portanto, para o aparecimento do efeito farmacológico. Assim, pelo aumento da velocidade de dissolução desses fármacos é possível aumentar sua biodisponibilidade e eficácia terapêutica (AMBIKE *et al.*, 2005; LEUNER e DRESSMAN, 2000; PATEL e PATEL, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A dissolução é, entre outros fatores, controlada pela área superficial que o fármaco apresenta, pelo grau de cristalização, pelo grau de hidratação e por sua solubilidade em água. Sabe-se que a redução do tamanho de partícula resulta num aumento na velocidade de dissolução, assim como fármacos na forma amorfa apresentam maior energia livre e maior solubilidade do que na sua forma cristalina. Fármacos anidros são, em geral, mais solúveis e, portanto, apresentam maior velocidade de dissolução. Excipientes também podem ser usados para aumentar a dissolução, promovendo a solubilização do fármaco

como no caso de excipientes hidrofílicos ou reduzindo a tensão superficial, no caso de surfactantes. Outra alternativa para o aumento na velocidade de dissolução de um fármaco é o preparo de dispersões sólidas (ANSEL, 2000; FORD, 1986; KALÁSZ E ANTAL, 2006).

2.4 Dispersões sólidas

O desenvolvimento de dispersões sólidas (DS) é uma das estratégias mais promissoras para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água devido à sua fácil produção e alta aplicabilidade. Podem ser definidas como dispersão de um princípio ativo em um carreador inerte ou matriz em estado sólido, formando uma mistura eutética, com pequenos cristais de princípio ativo imersos nesses carreadores e cuja liberação dependerá da solubilização da matriz. Nessas preparações o fármaco pode estar parcialmente disperso a nível molecular. As DS podem ser preparadas por processo de fusão, evaporação de solvente ou processo misto (FORD, 1986; LEUNER e DRESSMAN, 2000; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os carreadores preferencialmente utilizados são polímeros como polivinilpirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG) e derivados da celulose, por possibilitarem a formação de dispersões sólidas amorfas ou reduzirem o tamanho de partícula, em ambos os casos, a energia necessária para dissolução é menor (FORD, 1986; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

DS preparadas com PVP podem alterar ou inibir a cristalização de fármacos nas DS resultando em formas amorfas, as quais são menos estáveis termodinamicamente e liberam o fármaco mais rapidamente. A inibição da cristalização pode ser atribuída às ligações de hidrogênio entre o polímero e o fármaco e à incorporação de moléculas do fármaco dentro da matriz polimérica durante o preparo da DS (FORD, 1986; MATSUMOTO e ZOGRAFI, 1999; MOOTER *et al.*, 2001).

As principais vantagens e possíveis características da dispersão sólida que explicam o aumento da biodisponibilidade são o tamanho de partícula reduzido e aumento da área de superfície, o aumento da umectabilidade devido à presença de carreadores hidrofílicos, a alta porosidade das partículas, às interações carreador-fármaco, à redução ou ausência de aglomeração e agregação e à possível presença do fármaco na forma amorfa (PATEL e PATEL, 2008; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Há relatos, na literatura, de produção de DS de sinvastatina com PVP K30 preparadas pelo método de evaporação de solvente e com PEG4000 preparadas pelo método de evaporação ou fusão. As DS aumentaram a solubilidade da sinvastatina em solução aquosa em até 11,3 vezes em relação ao fármaco apenas. Entretanto, as proporções de polímero utilizadas foram muito altas (90,9%) e dessa forma, o desenvolvimento de comprimidos e cápsulas com essas proporções é dificultado, principalmente no caso de medicamentos com doses mais altas de sinvastatina (40 mg e 80 mg). Nesse estudo, não relata-se a possibilidade de degradação da sinvastatina que venha a ocorrer durante o preparo das DS (AMBIKE *et al.*, 2005; PATEL e PATEL, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

- Propor métodos alternativos para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina em matérias-primas e em produtos acabados;
- propor formulações melhoradas para sinvastatina.

3.2 Específicos

- Desenvolver métodos alternativos por CLAE e EDU para doseamento de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina em matérias-primas e produtos acabados;
- elaborar propostas de monografias de sinvastatina matéria-prima e comprimidos para serem incluídas em edição futura da Farmacopéia Brasileira.
- preparar DS de sinvastatina com diferentes tipos de polímeros e diferentes proporções dos mesmos;
- desenvolver estudos de solubilidade das DS de sinvastatina para a seleção da dispersão mais efetiva;
- desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos com DS para a realização de estudos de perfil de dissolução e comparação com o medicamento referência;
- propor condições para a realização de testes de dissolução para os comprimidos formulados com DS;
- avaliar a eficácia da redução de colesterol da DS selecionada por meio da avaliação em camundongos.

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LOVASTATINA, PRAVASTATINA SÓDICA E SINVASTATINA

4.1 Material

4.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras

- Sinvastatina matéria-prima doada por Laboratório Globo Ltda. (São José da Lapa, MG), lote 2113002/2007, teor 99,2% declarado pelo fabricante Biocon Limited (Bangalore, Índia), sinvastatina matéria-prima doada por Cifarma Científica Farmacêutica Ltda. (Santa Luzia, MG), lote IF 880902, teor 98,9% declarado pelo fabricante Valdequímica Produtos Farmacêuticos Ltda. (São Paulo, SP) e sinvastatina padrão de trabalho doado por Medley S/A Indústria Farmacêutica (Campinas, SP), lote 0080/00348, teor 99,1%, fabricante Biocon Limited (Bangalore, Índia);
- lovastatina matéria-prima, lote 07061205A, teor 99,9% declarado pelo fabricante Pharma Nostra Comercial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ) e lovastatina padrão de trabalho lote 0703064709, teor 100,8 % declarado pelo fabricante Galena Química e Farmacêutica Ltda. (Campinas, SP), doados pela Farmácia Universitária da Faculdade de Farmácia da UFMG (Belo Horizonte, MG);
- pravastatina sódica matéria-prima, lote 06081546A01, teor 99,76% declarado pelo fabricante Pharma Nostra Comercial Ltda. (Rio de Janeiro, RJ) e pravastatina sódica padrão de trabalho, lote IF070102, teor 98,8% declarado pelo fabricante Deg Importação de Produtos Químicos Ltda. (São Paulo, SP), doados pela Farmácia Universitária da Faculdade de Farmácia da UFMG (Belo Horizonte, MG).

4.1.2 Material e Reagentes

- Água destilada e água ultrapurificada (Milli-Q Millipore, Milford, MA, EUA);
- coluna cromatográfica de fase reversa LiChrospher 100 RP-C₈ e de 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (C₈) e tamanho de partícula 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- dispositivos filtrantes de celulose 15 mm, 0,45 µm (Minisart, Sartorius, Goettingen, Alemanha);

- excipientes ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA), ácido cítrico (Henrifarma, São Paulo, SP), celulose microcristalina Microcel[®] MC102 (Blanver, Taboão da Serra, SP), dióxido de silício coloidal Aerosil[®] (Emelfar, São Bernardo do Campo, SP), estearato de magnésio (Ipiranga Química, Santos, SP), glicolato de amido sódico (Henrifarma, São Paulo, SP), hidróxitolueno butil (BHT) (Indukern do Brasil Química Ltda., Osasco, SP), lactose Tabletose 100 (Ipiranga Química, Santos, SP), lauril sulfato de sódio (Pharmacopéia - Attivos Magistrais, Barueri, SP), polietilenoglicol 4000 e 6000 (Labsynth, Diadema, SP), polivinilpirrolidona K15 (Sigma-Aldrich, EUA) e talco (Proquímios, Bangu, RS);
- membrana de celulose com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, Alemanha);
- solventes e reagentes grau analítico ou cromatográfico: acetonitrila (J. T. Baker, Philipsburg, MT, EUA), ácido clorídrico 1 M, ácido fosfórico (Merck, Darmstadt, Alemanha), hidróxido de sódio 1 M, metanol (Tedia Company, Fairfield, Iowa, EUA), peróxido de hidrogênio 30% V/V (Labsynth, Diadema, SP).

4.1.3 Equipamentos

- Aparelho de ultra-som MaxiClean 1400 (Unique[®], Indaiatuba, SP);
- balança analítica BP210D (Sartorius, Goettingen, Alemanha) com precisão de 0,01 mg;
- banho-maria 120/2 (Fanem[®], São Paulo, SP);
- centrífuga Jouan B4i (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA);
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência HP1100 equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA);
- espectrofotômetro infravermelho Perkin Elmer precisely Spectrum One B (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA);
- espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) HP 8453 com programa automático de derivação interno Agilent (HP, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA);
- espectrofotômetro UV-Vis UV 1800 com programa UV Probe versão 2.33 (Shimadzu, Tokyo, Japão);
- estufa 306/1 (Fanem[®], São Paulo, SP);
- estufa a vácuo 091 (Fanem[®], São Paulo, SP);
- lâmpada UV ENF-240C com cabine CM-10 (Spectroline, Nova York, NY, EUA);
- medidor de ponto de fusão PF62 (Mettler Toledo, Columbus, OH, EUA);
- polarímetro ADP 220 (Bellingham Stanley, Atlanta, GA, EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Identificação de matéria-prima

A identificação das matérias-primas lovastatina, pravastatina sódica e padrão de trabalho de sinvastatina foi realizada por determinação de temperatura de fusão, de poder rotatório específico, $[\alpha_D^{25}]$, por espectrofotometria de absorção nas regiões do infravermelho e do ultravioleta.

4.2.1.1 Temperatura de fusão

A temperatura de fusão das matérias-primas de lovastatina e de sinvastatina foi determinada, em triplicata, pelo método do capilar.

4.2.1.2 Poder rotatório específico

As matérias-primas lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina foram previamente dessecadas a 60 °C em estufa a vácuo por três horas. O poder rotatório específico foi determinado em triplicata, na concentração 5 mg/mL em ACN para lovastatina e sinvastatina e 5 mg/mL em água para pravastatina, conforme descrito nas respectivas monografias das matérias-primas da USP31. Utilizou-se um tubo de 1 dm de comprimento para medida (THE UNITED, 2008).

4.2.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Foram traçados os espectros no infravermelho das matérias-primas lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, na faixa 3600 a 650 cm^{-1} , por meio do modo reflectância atenuada.

4.2.1.4 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Prepararam-se soluções de lovastatina e sinvastatina em ACN na concentração 8 $\mu\text{g/mL}$ e solução de pravastatina sódica em metanol na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$. Os espectros foram traçados na faixa de λ 200 a 400 nm e comparados com os máximos de absorção e espectros registrados na literatura.

4.2.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina

Por meio de adaptação do método descrito na monografia de lovastatina da USP31 (THE UNITED, 2008), desenvolveu-se um método por CLAE para quantificar lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina. Utilizou-se coluna C₈, temperatura do forno controlada em 30 °C, eluição isocrática, fase móvel constituída de ACN e solução de ácido fosfórico 0,1% (65:35), fluxo 1,5 mL/min para lovastatina e sinvastatina e 1,0 mL/min para pravastatina sódica, volume de injeção de 10 µL e detecção UV em λ 238 nm.

O método analítico por CLAE para quantificação de estatinas foi validado com base na Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez.

Para a validação do método foram utilizadas amostras de sinvastatina matéria-prima com teor 99,2% e padrão de trabalho com teor 99,1%, fabricante Biocon Limited, lovastatina matéria-prima e padrão de trabalho com teores 99,9% e 100,8% declarados pelos fornecedores Pharma Nostra e Galena, respectivamente e pravastatina sódica matéria-prima e padrão de trabalho com teores 99,76% e 98,8% declarados pelos fornecedores Pharma Nostra e Deg, respectivamente. Essas matérias-primas e padrões de trabalho foram previamente identificados. A validação do método para os três fármacos foi realizada separadamente.

4.2.2.1 Estudo de estabilidade

A degradação acelerada para lovastatina e sinvastatina foi realizada para avaliar a seletividade do método desenvolvido por CLAE e para conhecer o comportamento químico das duas estatinas sob diferentes condições (BAKSHI e SINGH, 2002).

Todas as amostras submetidas às condições de estresse por hidrólises neutra, ácida e básica, calor seco, exposição à luz UV e por oxidação foram analisadas pelo método desenvolvido por CLAE.

4.2.2.1.1 Hidrólise neutra, ácida e básica

Para avaliação da hidrólise neutra, transferiram-se, exatamente, cerca de 30 mg de lovastatina e sinvastatina para balões volumétricos de 100 mL, separadamente. Adicionaram-se 10 mL de acetonitrila para a solubilização e 50 mL de água destilada. Após aquecimento, em banho-maria a 100 °C, por 4 h e esfriamento a temperatura ambiente, completou-se o volume com ACN. A concentração final obtida foi 300 µg/mL. O mesmo procedimento foi repetido, separadamente, para as hidrólises ácida e básica, porém com adição de 50 mL de ácido clorídrico 1 mol/L e 50 mL de hidróxido de sódio 1 mol/L, respectivamente, em substituição à adição de água destilada para a hidrólise neutra.

4.2.2.1.2 Calor seco

Transferiram-se, exatamente, cerca de 30 mg de lovastatina e de sinvastatina, separadamente, para um pesa-filtro. As amostras foram colocadas em estufa 105 °C por 4 h. Transferiu-se, quantitativamente, cada amostra para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com ACN. A concentração final obtida foi 300 µg/mL para cada estatina.

4.2.2.1.3 Exposição à radiação UV

Pesaram-se, exatamente, cerca de 30 mg de lovastatina e de sinvastatina, separadamente, em vidros-relógios. As amostras foram expostas à radiação de luz ultravioleta em comprimento de onda curto (λ 254 nm) por 4 h, a temperatura ambiente. As amostras foram transferidas, quantitativamente, para balões volumétricos de 100 mL, o volume foi completado com ACN. A concentração final obtida para as estatinas foi 300 µg/mL.

4.2.2.1.4 Oxidação

Transferiram-se, exatamente, cerca de 30 mg de lovastatina e de sinvastatina, separadamente, para balões volumétricos de 100 mL. Adicionaram-se 10 mL de ACN para a solubilização, 50 mL de água destilada e 10 mL de solução de peróxido de hidrogênio 30% V/V. Após aquecimento, em banho-maria a 100 °C, por 4 h, as amostras esfriaram a temperatura ambiente e completou-se o volume com ACN. A concentração final obtida foi 300 µg/mL para cada estatina.

4.2.2.2 Seletividade

Para lovastatina e sinvastatina, a seletividade foi verificada quanto aos seus produtos de degradação por meio da CLAE. Para esta finalidade, foram utilizadas soluções de lovastatina e de sinvastatina submetidas às condições de degradação acelerada citadas no item 4.2.2.1.

A seletividade foi demonstrada pela separação de todos potenciais compostos interferentes frente ao pico de interesse com uma resolução adequada (geralmente, $R \geq 2$) (SNYDER *et al.*, 1997). A pureza dos picos de interesse foi avaliada por meio de detector UV/DAD.

Para pravastatina sódica a seletividade foi verificada em relação a quatro diferentes placebos (A, B, C e D), manipulados com excipientes comumente utilizados na fabricação de comprimidos. Os placebos, fabricados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG (LTF/FAFAR/UFMG), continham as seguintes constituições:

- placebo A: ácido ascórbico (0,1%), aerosil (0,5%), BHT (0,02%), lactose (73,55%), lauril sulfato de sódio (1,5%) e manitol (11%);
- placebo B: ácido ascórbico (0,1%), aerosil (0,5%), amido (32%), celulose microcristalina (43,57%), estearato de magnésio (0,5%), lauril sulfato de sódio (1%) e talco (9%);
- placebo C: ácido ascórbico (0,05%), ácido cítrico (0,85%), aerosil (0,5%), BHT (0,5%), celulose microcristalina (41,35%), estearato de magnésio (0,5%), glicolato de amido sódico (2%), lactose (37,75%), lauril sulfato de sódio (0,5%), PEG (12,5%) e talco (1%);
- placebo D: mesmos constituintes do placebo C, exceto PEG. O PEG foi substituído por PVP (7,5%) e as quantidades de celulose microcristalina e lactose foram ajustadas para 43% e 41%, respectivamente.

Para avaliação da seletividade quanto aos placebos, foram preparadas soluções de placebos correspondentes a 40 µg/mL de estatina (100% da concentração de trabalho), conforme descrito no item 4.2.2.5, com exceção da adição de pravastatina sódica.

4.2.2.3 Linearidade

Foram preparadas três soluções estoques de cada estatina na concentração 400 µg/mL em ACN para lovastatina e sinvastatina e em água ultrapurificada para pravastatina sódica. As diluições foram preparadas, em triplicata, tomando-se alíquotas de 3,5; 4,25; 5,0; 5,75 e 6,5 mL das soluções estoques e transferindo-se para balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram completados com ACN. As concentrações finais obtidas foram 28, 34, 40, 46 e 52 µg/mL.

As soluções foram injetadas em triplicata. As condições cromatográficas estão descritas no item 4.2.2.

As áreas dos picos foram medidas e usadas para a construção da curva analítica. A regressão linear foi verificada por meio do método dos mínimos quadrados utilizando o programa computacional Microsoft Excel® 2003. Foram avaliados os coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r), os fatores de resposta e a distribuição dos resíduos por meio do teste de Ryan-Joiner.

4.2.2.4 Precisão intra-ensaio e inter-ensaio

A avaliação da precisão intra-ensaio do método foi realizada por meio de três determinações de soluções de baixa, média e alta concentração. Foram preparadas três soluções estoques na concentração 400 µg/mL, em ACN para lovastatina e sinvastatina e em água ultrapurificada para pravastatina sódica. Alíquotas de 3,5; 5,0 e 6,5 mL das soluções estoques foram transferidas, em triplicatas, para balões volumétricos de 50 mL e os volumes completados com ACN. As concentrações finais obtidas foram 28, 40 e 52 µg/mL, respectivamente.

Para a determinação da precisão inter-ensaio, o mesmo procedimento descrito para precisão intra-ensaio para lovastatina, pravastatina sódica e para sinvastatina foi repetido, no dia seguinte. A média, o intervalo de confiança (IC) a 95% e o desvio padrão relativo (DPR) foram obtidos como resultado de avaliação da precisão.

4.2.2.5 Exatidão

A determinação da exatidão para as três estatinas foi realizada em três níveis de concentração (70%, 100% e 130% da concentração de trabalho) por meio da adição de placebo, formulado no LTF/FAFAR/UFMG, às matérias-primas. A constituição do placebo A utilizado está descrita no item 4.2.2.2.

Para avaliação da exatidão, foram preparadas três soluções estoques pesando-se, separadamente e exatamente, cerca de 20 mg de lovastatina, de pravastatina sódica e de sinvastatina matérias-primas e mais quantidade de placebo correspondente ao conteúdo de 20 mg de cada estatina. Transferiu-se para balões volumétricos de 50 mL e adicionaram-se cerca de 35 mL de ACN para lovastatina e sinvastatina e 35 mL de água ultrapurificada para pravastatina sódica. As amostras foram submetidas ao ultra-som por 15 minutos e os volumes dos balões completados com os respectivos solventes. Centrifugou-se por quatro minutos a 4000 rotações por minuto (rpm). Alíquotas de 3,5; 5,0 e 6,5 mL das soluções estoques foram transferidas, em triplicata, para balões volumétricos de 50 mL e os volumes foram completados com ACN. As concentrações finais obtidas foram 28 µg/mL, 40 µg/mL e 52 µg/mL. Foi preparada, também, uma solução a 100% da concentração de trabalho de cada estatina padrão de trabalho do mesmo modo que as soluções das matérias-primas, exceto para a adição de placebo e a etapa de centrifugação.

Os resultados da exatidão foram expressos em porcentagem de recuperação do fármaco adicionado ao placebo A.

4.2.2.6 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

A determinação do LD e do LQ foi realizada por meio da equação que utiliza os valores de estimativa do desvio padrão da resposta e a inclinação da curva, como a seguir:

$$LD = 3 \times \frac{s_a}{b}$$

$$LQ = 10 \times \frac{s_a}{b},$$

em que: s_a , desvio padrão do intercepto com o eixo y ; b , inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

4.2.2.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada modificando-se deliberadamente as condições cromatográficas estabelecidas e verificando-se a sua influência nos resultados apresentados. Foram preparadas, separadamente, soluções de 6 amostras e uma solução padrão de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, separadamente, na concentração 40 µg/mL em ACN (100% da concentração de trabalho). Os parâmetros modificados foram porcentagem de modificador orgânico na fase móvel ($\pm 2\%$), fluxo ($\pm 0,1$ unidade) e temperatura (± 5 °C).

A partir dos resultados de teores obtidos, foram realizadas análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de Tukey, a fim de verificar a influência de cada parâmetro na resposta fornecida pelo método analítico.

4.2.3 Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria derivada na região do UV (EDU) para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina

Inicialmente, foram traçados os espectros das soluções de lovastatina, pravastatina sódica e, sinvastatina e dos placebos C e D, fabricados utilizando-se excipientes comumente encontrados nos produtos acabados de estatinas (constituição descrita no item 4.2.2.2). Os espectros foram avaliados na faixa de comprimento de onda λ 200 nm a 400 nm no modo convencional (zero ordem) e primeira, segunda, terceira e quarta ordens. Com base no perfil de espectros obtidos foram selecionados a menor ordem de derivada e o comprimento de onda que resolvessem a interferência devido ao placebo. Desse modo, os parâmetros espectrofotométricos selecionados e utilizados para a determinação de lovastatina, pravastatina sódica e de sinvastatina por EDU foram: velocidade baixa de varredura na faixa de λ 200 nm a 400 nm e absorção máxima no comprimento de onda λ 247 nm, em segunda derivada, método zero pico, com diferenciação automática. Soluções a 100% da concentração de trabalho foram preparadas para cada estatina em metanol.

O método analítico por EDU para quantificação de estatinas foi validado, separadamente para cada uma delas, com base na resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez.

As replicatas das amostras e padrões de trabalho utilizados para a validação do método de doseamento por EDU foram as mesmas utilizadas para validação do método por CLAE, descritos no item 4.2.2 para as três estatinas.

4.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi verificada quanto à interferência de excipientes comumente presentes em comprimidos de estatinas, por meio dos placebos C e D. Foram traçados os espectros das estatinas e dos placebos, separadamente e sobrepostos, em segunda derivada na faixa λ 200 a 400 nm, e avaliou-se a interferência no comprimento de onda estabelecido para o desenvolvimento do método, λ 247 nm.

Os espectros das três estatinas e dos placebos foram traçados utilizando-se metanol como solvente, nas concentrações 4 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ das estatinas e soluções de placebos preparadas de modo a conter o equivalente a 4 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ de lovastatina, pravastatina sódica ou sinvastatina.

4.2.3.2 Linearidade

Preparou-se solução estoque, para cada estatina separadamente, na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$, pesando-se, exatamente, cerca de 10 mg de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina e transferindo-se para balões volumétricos de 100 mL. O volume foi completado com metanol. Para lovastatina e sinvastatina tomaram-se alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL das respectivas soluções estoques e, para pravastatina sódica, tomaram-se alíquotas de 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; e 7,0 mL. Os volumes foram completados com metanol para balão volumétrico de 50 mL. As concentrações finais obtidas foram 4, 6, 8, 10 e 12 $\mu\text{g/mL}$ para lovastatina e sinvastatina e, 6, 8, 10, 12 e 14 $\mu\text{g/mL}$ para pravastatina sódica.

As medidas de absorvância (A/nm^2) das soluções preparadas em triplicatas foram realizadas, também em triplicata, em λ 247 nm, segunda derivada.

A regressão linear foi verificada por meio do método dos mínimos quadrados utilizando o programa computacional Microsoft Excel[®] 2003. Foram avaliados os coeficientes de determinação (r^2) e de correlação (r), os fatores de resposta e a distribuição dos resíduos por meio do teste de Ryan-Joiner.

4.2.3.3 Precisão intra-ensaio e inter-ensaio

A avaliação da precisão intra-ensaio do método foi realizada por meio de determinação de três soluções em baixa, média e alta concentração. Soluções estoques foram preparadas, separadamente, pesando-se, exatamente, cerca de 10 mg de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina e transferindo-se para balões volumétricos de 100 mL. Os volumes foram completados com metanol. Para lovastatina e sinvastatina tomaram-se alíquotas de 2,0; 4,0 e 6,0 mL das respectivas soluções estoques e, para pravastatina sódica, tomaram-se alíquotas de 3,0; 5,0 e 7,0 mL para balões volumétricos de 50 mL. Os volumes foram completados com metanol. As concentrações finais obtidas foram 4, 8 e 12 µg/mL para lovastatina e sinvastatina e 6, 10 e 14 µg/mL para pravastatina sódica.

Para a determinação da precisão inter-ensaio, repetiu-se o mesmo procedimento, descrito para precisão intra-ensaio para lovastatina, pravastatina sódica e para sinvastatina, em dois dias consecutivos por analistas diferentes. A média e o intervalo de confiança (IC) a 95% e o desvio padrão relativo (DPR) foram obtidos como resultado de avaliação da precisão.

As medidas de absorvância (A/nm^2) das soluções preparadas em triplicata foram realizadas, também em triplicata, em λ 247 nm, em segunda derivada.

4.2.3.4 Exatidão

A determinação da exatidão para as três estatinas foi realizada em três níveis de concentração (4, 8 e 12 µg/mL para lovastatina e sinvastatina e 6, 10 e 14 µg/mL para pravastatina sódica) com adição de placebo às matérias-primas. A constituição do placebo utilizado (placebo C) está descrita no item 4.2.2.2.

Foram preparadas três soluções estoques pesando-se, exatamente, cerca de 10 mg de lovastatina, de pravastatina sódica e de sinvastatina matérias-primas e quantidade de placebo equivalente a 10 mg de cada estatina. Transferiu-se para balões volumétricos de 100 mL e adicionaram-se cerca de 70 mL de metanol. As amostras foram submetidas ao ultra-som por 15 minutos e os volumes dos balões foram completados com metanol. Centrifugou-se por quatro minutos a 4000 rpm. Alíquotas de 2,0; 4,0 e 6,0 mL das soluções estoques centrifugadas por 4000 rpm, 4 minutos, de lovastatina e de sinvastatina e, alíquotas de 3,0; 5,0 e 7,0 mL das soluções estoques centrifugadas de pravastatina sódica foram tomadas dos sobrenadantes e transferidas para balões volumétricos de 50 mL. Os

volumes foram completados com metanol. Preparou-se, também, uma solução de cada estatina padrão de trabalho do mesmo modo que as soluções de estatinas matérias-primas, exceto para a adição de placebo e a etapa de centrifugação. Os resultados da exatidão foram expressos em porcentagem de recuperação do fármaco adicionado ao placebo C.

As medidas de absorvância (A/nm^2) das soluções preparadas em triplicatas foram realizadas, também em triplicata, em λ 247 nm da segunda derivada.

4.2.3.5 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os cálculos para determinação do LD e do LQ foram realizados por meio das equações descritas no item 4.2.2.6.

4.2.3.6 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada quantificando-se as amostras a 100% da concentração de trabalho, em dois espectrofotômetros de fabricantes diferentes, HP 8453 Agilent e UV-Vis Shimadzu 1800. Para essa finalidade, foram preparadas, separadamente, soluções de 6 amostras e uma solução padrão, em metanol, na concentração 8 $\mu\text{g/mL}$ para lovastatina e sinvastatina e, na concentração 10 $\mu\text{g/mL}$ para pravastatina sódica.

A partir dos resultados de teores obtidos, foi realizada comparação das médias por meio do teste de hipóteses (teste t), a fim de verificar diferenças estatísticas nas médias dos teores obtidos por meio dos dois espectrofotômetros.

4.2.4 Comparação dos métodos desenvolvidos: EDU e CLAE

Para a comparação entre os dois métodos de quantificação desenvolvidos foram preparadas cinco soluções a 100% da concentração de trabalho, a partir de um mesmo *pool* de 20 comprimidos de sinvastatina e analisadas por CLAE e por EDU, cujos parâmetros estão descritos nos itens 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente.

Para a avaliação por meio do método de quantificação por CLAE, foram pesadas cinco alíquotas de pó de sinvastatina comprimidos contendo o equivalente a 10 mg de sinvastatina

e transferidas para balões volumétricos de 50 mL. Adicionaram-se cerca de 35 mL de ACN e submeteu-se ao ultra-som por 15 minutos. Completaram-se os volumes com ACN e centrifugou-se por quatro minutos a 4000 rpm. Alíquotas de 5,0 mL do sobrenadante foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com o mesmo solvente. A concentração final obtida foi 40 µg/mL. Preparou-se, também, uma solução de padrão sinvastatina na mesma concentração e com o mesmo solvente. As amostras preparadas em quintuplicata e a solução padrão foram injetadas em triplicata.

Para a avaliação por meio do método de quantificação por EDU procedeu-se como descrito para o método por CLAE, exceto para a utilização de um balão volumétrico de 100 mL na primeira diluição e pela transferência de alíquotas de 4,0 mL para balões volumétricos de 50 mL. Utilizou-se metanol como solvente. A concentração final obtida das amostras e da solução padrão foi 8 µg/mL.

A partir dos resultados de teores obtidos, a comparação das médias por meio do teste de hipóteses (teste t) foi realizada, a fim de verificar diferenças estatísticas nas médias dos teores obtidos com os dois métodos de quantificação.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Identificação da matéria-prima

4.3.1.1 Temperatura de fusão

Moffat e colaboradores (2004) descrevem uma faixa de fusão para sinvastatina de 135 a 138 °C, enquanto que para a lovastatina descrevem um valor único de temperatura de fusão, 174,5 °C.

Em um estudo de estabilidade térmica de lovastatina e de sinvastatina conduzido por Souza e colaboradores (2007), o ponto de fusão das duas estatinas foi determinado por meio da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Ambas as estatinas apresentaram duas transições endotérmicas: a primeira transição correspondente à fusão, em 172 °C (lovastatina) e 142 °C (sinvastatina) e a segunda, em 285 °C (lovastatina) e 302 °C (sinvastatina), referente à decomposição térmica (SOUZA *et al.*, 2007).

A temperatura de fusão da sinvastatina foi determinada, também, por DSC no presente trabalho (item 5.3.2.2). A temperatura do evento endotérmico referente à fusão foi 142,5 °C. Este resultado é condizente com o encontrado no estudo conduzido por Souza *et al.* (2007). As temperaturas de fusão da lovastatina e da sinvastatina matérias-primas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos, em triplicata, para temperaturas de fusão de sinvastatina e lovastatina matérias-primas, por meio do método capilar.

Determinação	Temperatura de fusão (° C)	
	Lovastatina	Sinvastatina
1	170,4	137,7
2	170,3	139,5
3	169,5	137,4
Média	170,1	138,2
DPR (%)	0,30	0,82

A temperatura de fusão média para lovastatina e para sinvastatina estão de acordo com os dados descritos na literatura (MOFFAT, *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2007).

4.3.1.2 Poder rotatório específico

O poder rotatório específico, $|\alpha_D^{25^\circ}|$, para as soluções de lovastatina, de pravastatina sódica e de sinvastatina (5 mg/mL em ACN, água e ACN, respectivamente) foi determinado conforme a equação:

$$\alpha_D^{25^\circ} = \frac{100\alpha}{lc},$$

em que: α , ângulo de rotação medido sob comprimento de onda da lâmpada de sódio a 25 °C; l , comprimento em decímetros do tubo do polarímetro; c , concentração da substância expressa em porcentagem peso por volume (%p/V).

Os valores obtidos e calculados de α e $|\alpha_D^{25^\circ}|$ para lovastatina, pravastatina sódica e para sinvastatina estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados para determinação do poder rotatório de lovastatina, sinvastatina (0,5% p/V em ACN, triplicata) e pravastatina sódica (0,5% p/V em água, triplicata).

	Lovastatina			Pravastatina sódica			Sinvastatina		
	Conc. (%p/V)	α	$ \alpha_D^{25^\circ} $	Conc. (%p/V)	α	$ \alpha_D^{25^\circ} $	Conc. (%p/V)	α	$ \alpha_D^{25^\circ} $
Média	0,52	+1,69 ^o	+324,48 ^o	0,52	+0,81 ^o	+155,23 ^o	0,52	+1,52 ^o	+293,95 ^o
DPR (%)	2,5	+4,2	+1,7	1,96	+3,3	+1,34	3,5	+4,6	+2,3

As faixas especificadas para o poder rotatório específico, $|\alpha_D^{25^\circ}|$, descritas nas respectivas monografias contidas na USP31, são +324^o a +338^o para lovastatina, +150^o a +160^o para pravastatina sódica e +285^o a +298^o para sinvastatina (THE UNITED, 2008). As médias obtidas para as três estatinas estão dentro das respectivas faixas especificadas.

4.3.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

As principais bandas na região do infravermelho (IV) descritas para lovastatina estão localizadas nos seguintes números de ondas: 1725, 1460, 1260 e 1072 cm⁻¹, para pravastatina sódica em 1727, 1579, 1187 cm⁻¹ e para sinvastatina em 1718, 1459, 1389 e 1267 cm⁻¹ (MOFFAT *et al.*, 2004). Essas bandas podem ser observadas nos espectros

obtidos (**Figuras 3 a 5**) para as três estatinas, em número de ondas aproximado. As atribuições das principais bandas estão apresentadas na Tabela 3.

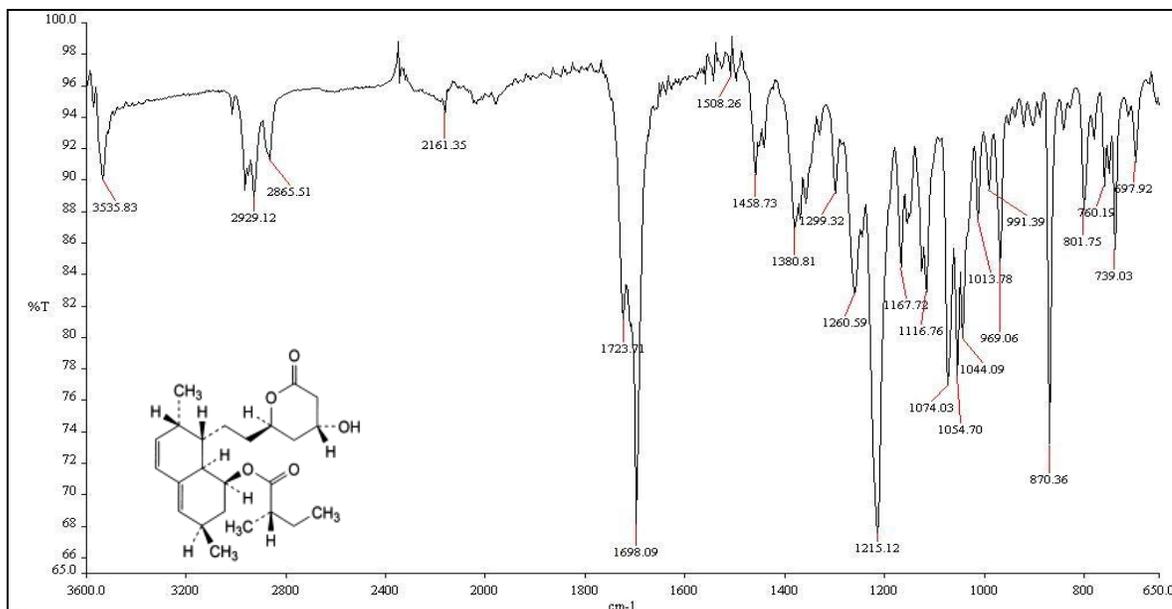


Figura 3 - Espectro de absorção na região do IV de lovastatina matéria-prima por reflectância atenuada.

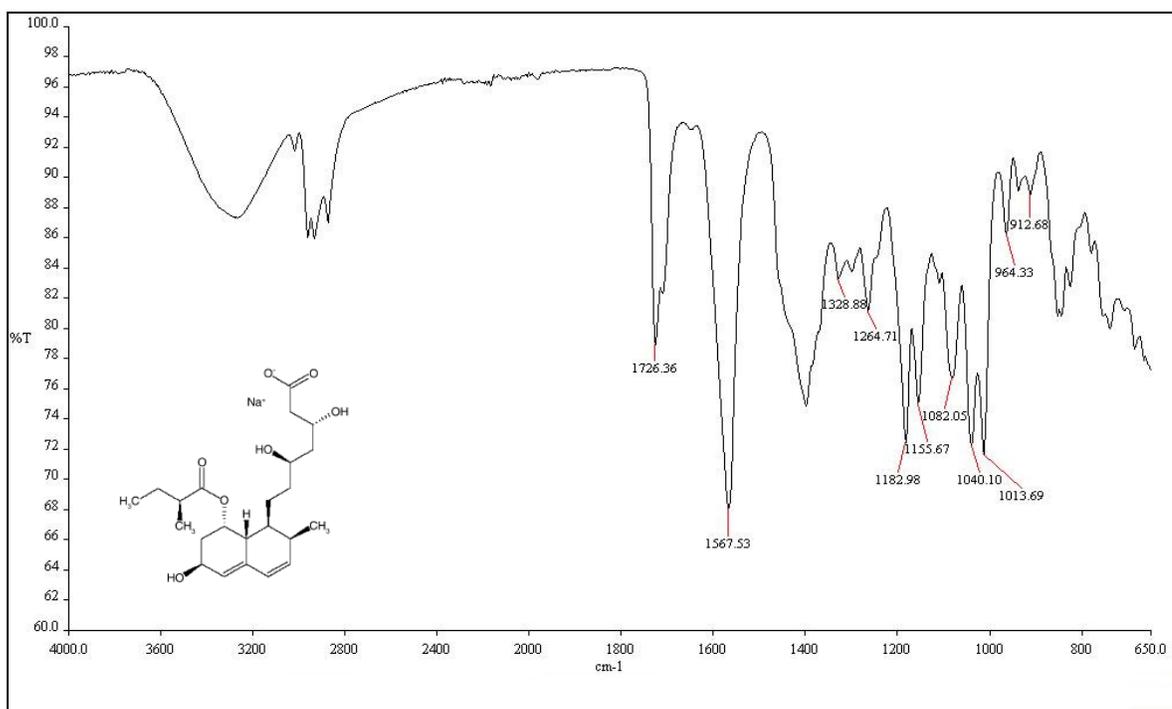


Figura 4 - Espectro de absorção na região do IV de pravastatina sódica matéria-prima por reflectância atenuada.

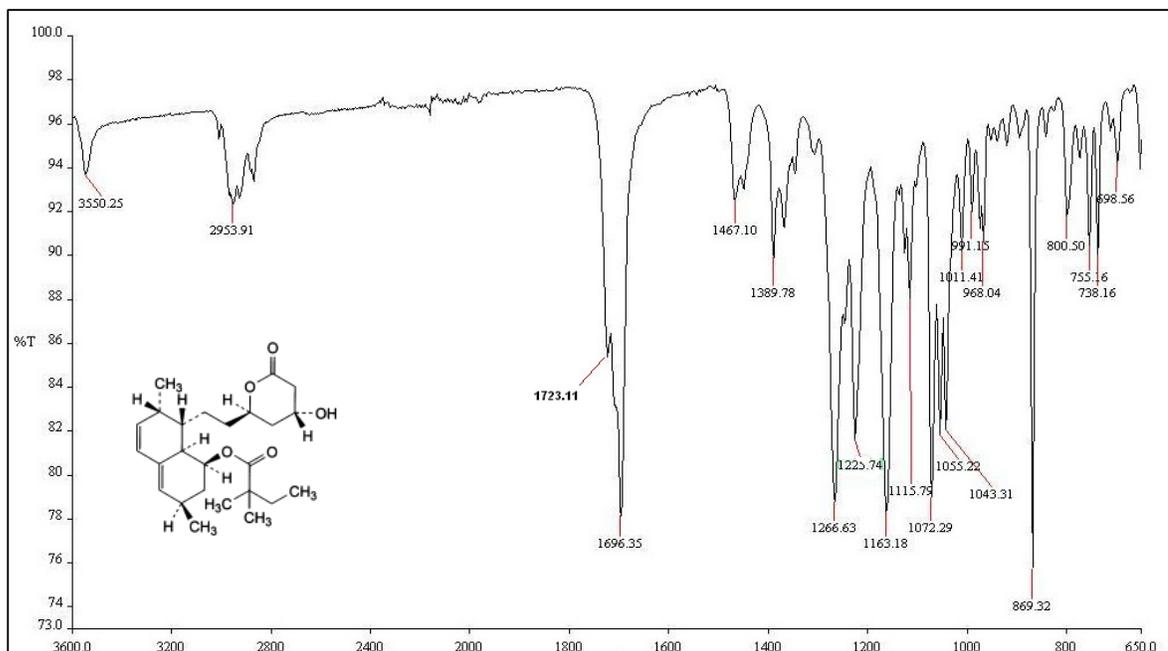


Figura 5 - Espectro de absorção na região do IV de simvastatina padrão de trabalho por reflectância atenuada.

Tabela 3 - Atribuições de posições das principais bandas de absorção de lovastatina, pravastatina sódica e simvastatina na região do IV.

Número de onda aproximado (cm^{-1})	Atribuição
3500	Deformação axial O-H
1720, 1700	Deformação axial C=O de éster e lactona
1567	Deformação axial de C=O de carboxilato
1460, 1389	Deformação angular de metil e metileno
1260, 1070, 1080	Deformação axial de C-O-C de éster e lactona
1160, 1182	Deformação angular de O-H

4.3.1.4 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

Os espectros na região do ultravioleta foram traçados na faixa de comprimento de onda λ 200 a 400 nm, utilizando-se soluções de lovastatina e de simvastatina matérias-primas 8 $\mu\text{g/mL}$ em ACN e, solução de pravastatina 10 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. Os máximos de absorção foram comparados com os descritos na literatura. Os espectros obtidos na região do UV estão representados nas Figuras 6 a 8.

Os espectros são condizentes com os espectros descritos na literatura com máximos de absorção em λ 231 nm, 238 nm e 247 nm, tanto para lovastatina quanto para sinvastatina e λ 230 nm, 237 nm e 245 nm para pravastatina sódica (BUDAVARI, 2006; MOFFAT et al., 2004). Os espectros das três estatinas são muito semelhantes, pois possuem o mesmo grupo cromóforo representado pelas duplas conjugadas heterocíclicas (**Figura 1**).

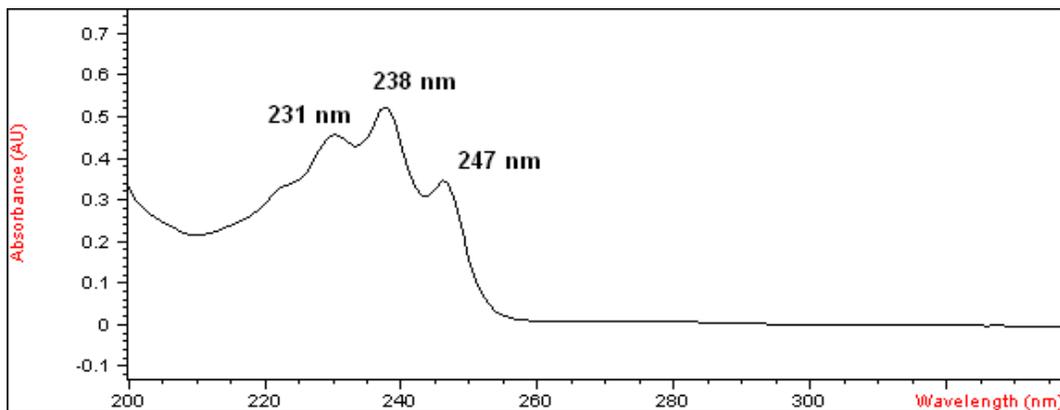


Figura 6 - Espectro de absorção na região do UV de lovastatina matéria-prima (8 $\mu\text{g/mL}$, ACN).

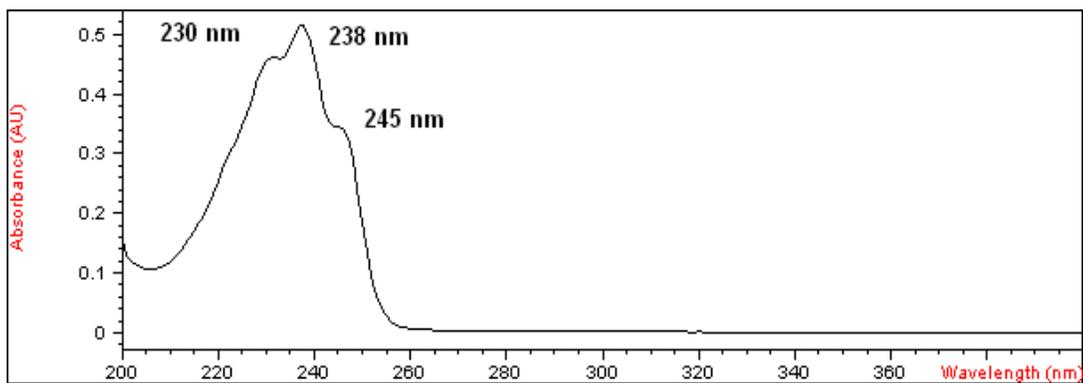


Figura 7 - Espectro de absorção na região do UV de pravastatina sódica matéria-prima (10 $\mu\text{g/mL}$, metanol).

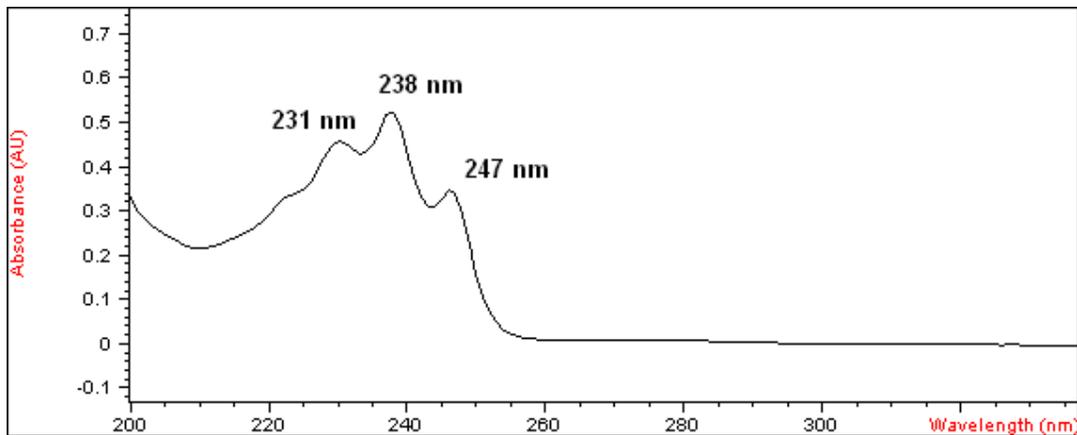


Figura 8 - Espectro de absorção na região do UV de sinvastatina matéria-prima (8 $\mu\text{g/mL}$, ACN).

4.3.2 Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina

As condições cromatográficas utilizadas foram coluna C₈, fase móvel constituída de ACN:H₃PO₄ 0,1% (65:35), fluxo 1,5 mL/min para lovastatina e sinvastatina ou 1,0 mL/min para pravastatina sódica, temperatura 30 °C, detecção UV λ 238 nm e volume de injeção 10 µL. Nessas condições cromatográficas, os fatores de retenção (k) obtidos foram 4,6 (tr 5,6minutos) para lovastatina, 1,3 (tr 2,3minutos) para pravastatina sódica e 5,4 (tr 6,4minutos) para sinvastatina (**Figuras 9 e 10**). Esses valores estão dentro da faixa recomendada (0,5<k<20) por Snyder e colaboradores (1997), bem como os fatores de cauda obtidos dos respectivos picos foram menores que 2, valor limite recomendado pelo FDA (U.S FOOD, 1994).

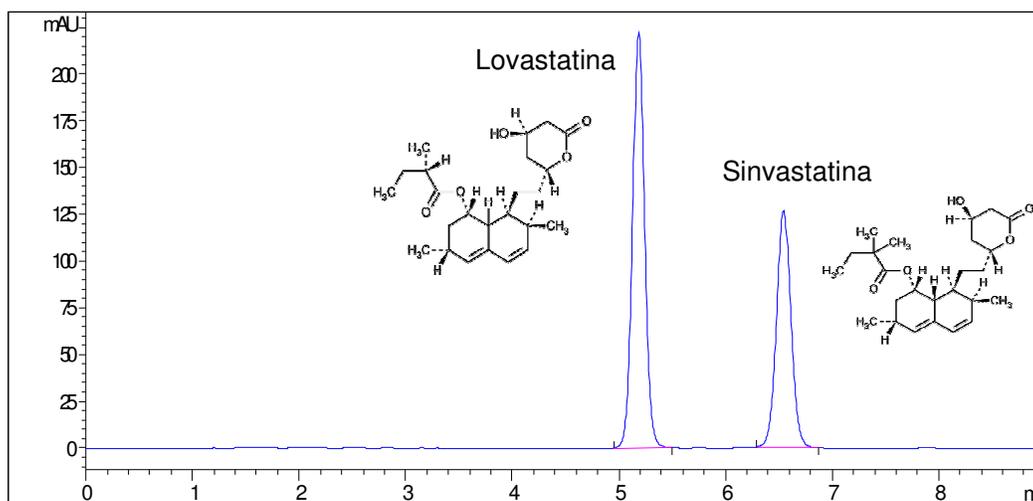


Figura 9 - Cromatograma de lovastatina (fator de cauda 0,981) e sinvastatina (fator de cauda 0,967) (40 µg/mL, em ACN).

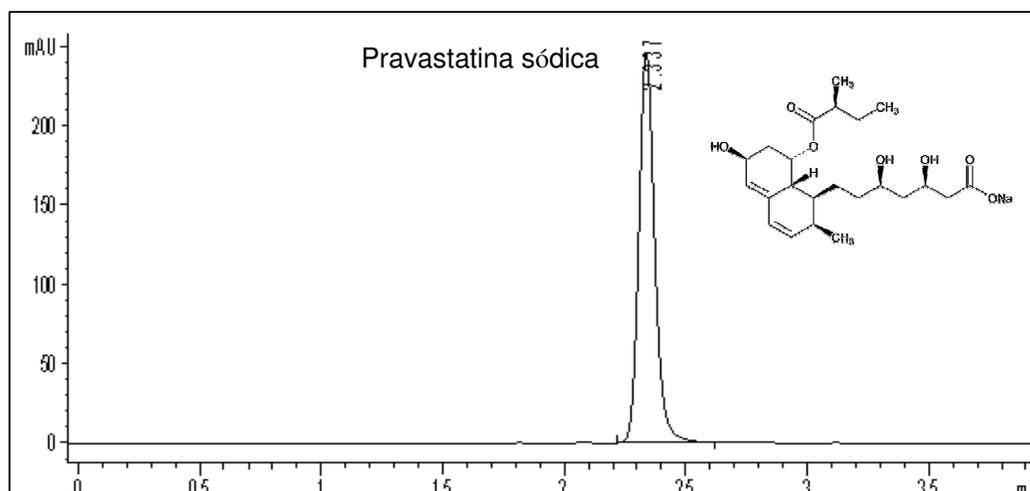


Figura 10 - Cromatograma de pravastatina sódica (fator de cauda 1,184) (40 µg/mL, em ACN).

4.3.2.1 Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade foi realizado a fim de verificar presença de possíveis produtos de degradação, de modo a permitir a avaliação da figura de mérito, seletividade, para o método desenvolvido.

4.3.2.1.1 Hidrólises neutra, ácida e básica

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 11 a 16 foram obtidos após hidrólise ácida, básica e neutra da lovastatina e da sinvastatina. O estudo de estabilidade não foi realizado para pravastatina devido à sua menor retenção na coluna cromatográfica.

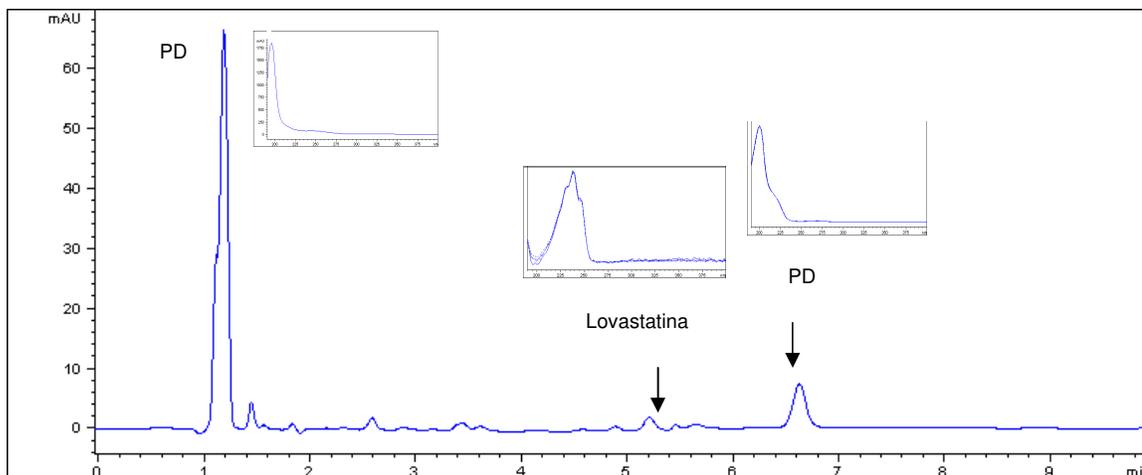


Figura 11 - Cromatograma obtido após hidrólise ácida de lovastatina (5,203 min, R 8,50). Picos correspondentes a produtos de degradação (PD, tr 1,182 min e tr 6,623 min). Condições: HCl 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.

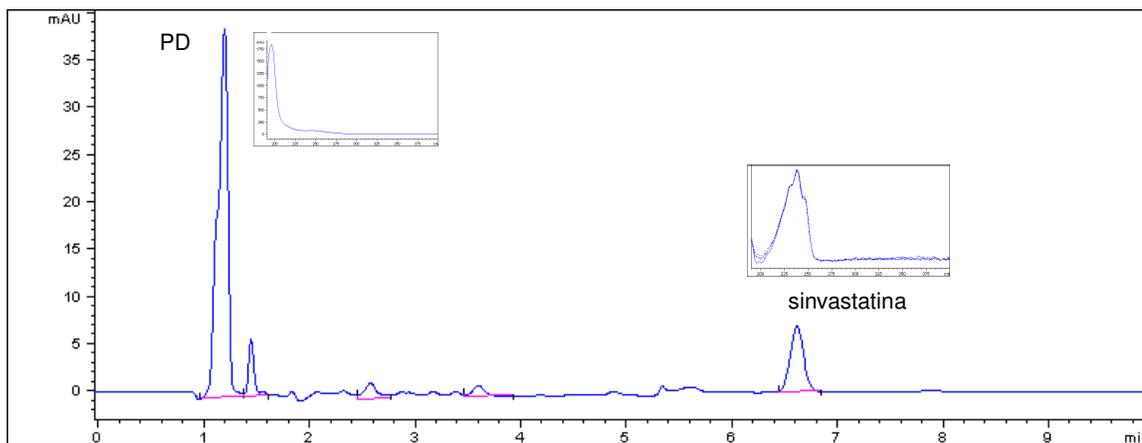


Figura 12 - Cromatograma obtido após hidrólise ácida de simvastatina (tr 6,611 min, R 13,55). Pico principal correspondente a produto de degradação (PD, tr 1,185 min). Condições: HCl 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.

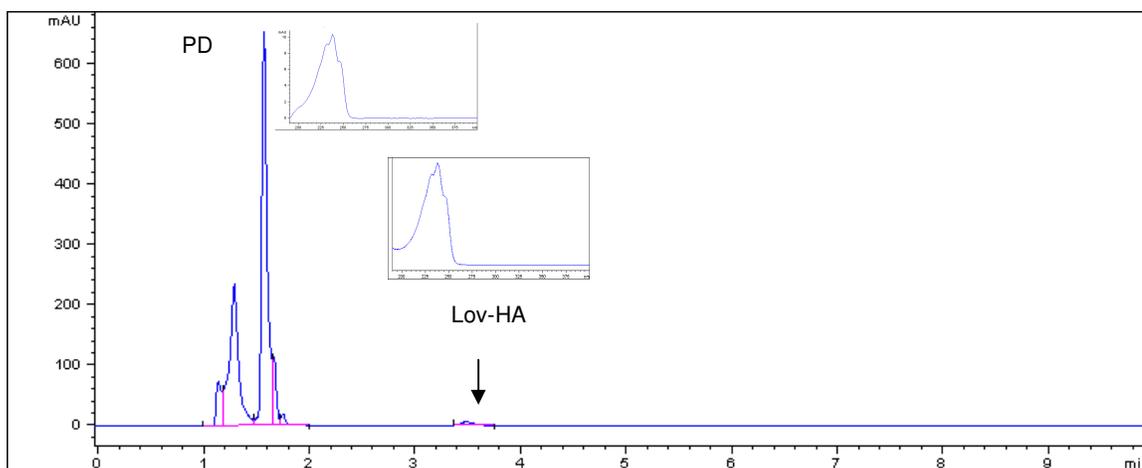


Figura 13 - Cromatograma obtido após hidrólise básica de lovastatina. Possíveis produtos de degradação (hidroxiácido, Lov-HA, tr 3,494 min e não identificado, PD, tr 1,610 min). Condições: NaOH 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.

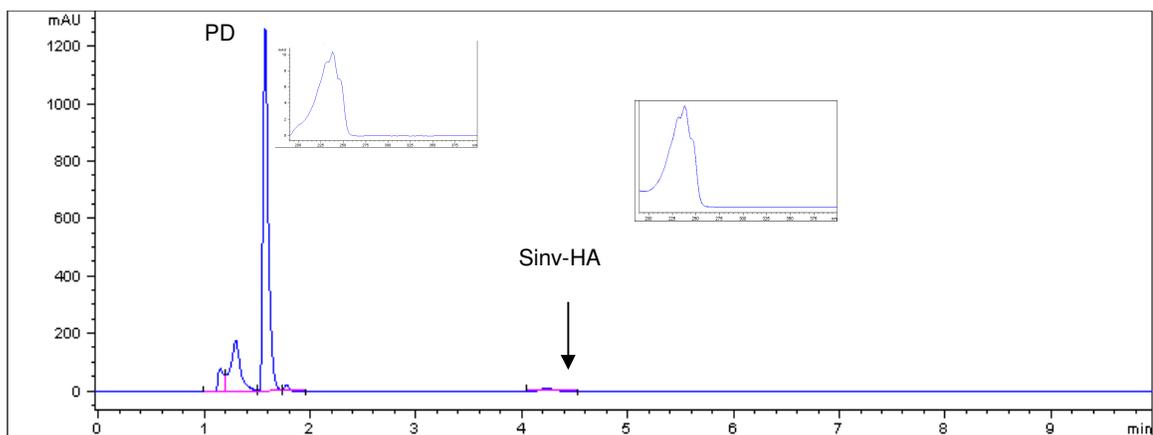


Figura 14 - Cromatograma obtido após hidrólise básica de simvastatina. Possíveis produtos de degradação (hidroxiácido, Sinv-HA, tr 4,235 min e não identificado, PD, tr 1,571 min). Condições: NaOH 1 N em banho-maria a 100 °C por 4 h.

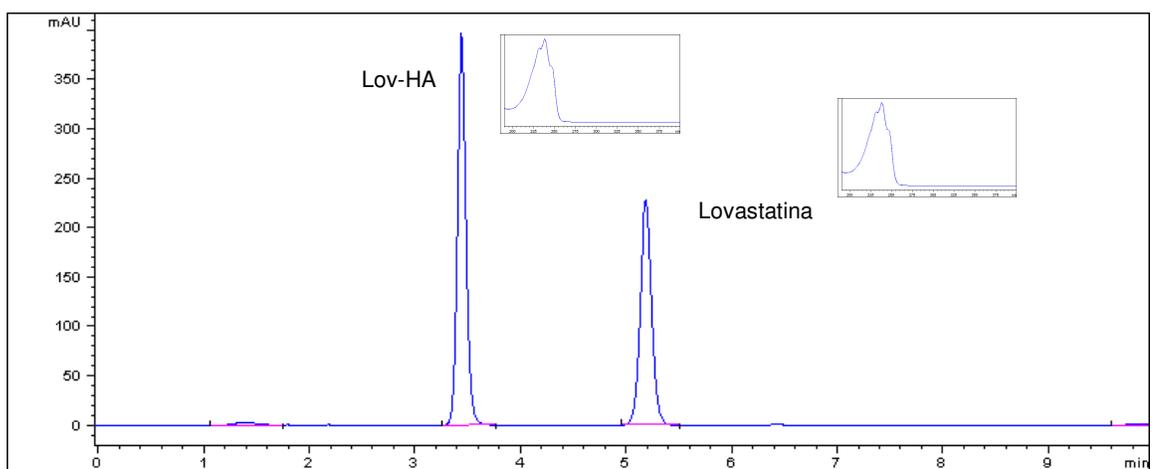


Figura 15 - Cromatograma obtido após hidrólise neutra de lovastatina (tr 5,184 min, R 10,0). Possível produto de degradação (hidroxiácido, Lov-HA, tr 3,438 min). Condições: banho-maria a 100 °C por 4 h.

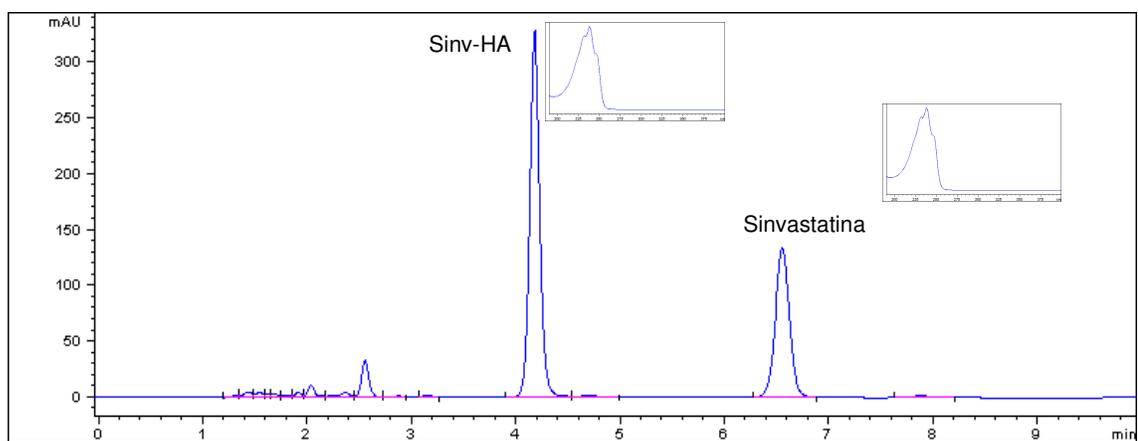


Figura 16 - Cromatograma obtido após hidrólise neutra de simvastatina (tr 6,551 min, R 6,53). Possível produto de degradação (hidroxiácido, Sinv-HA, tr 4,230 min). Condições: banho-maria a 100 °C por 4 h.

Tanto a lovastatina quanto a sinvastatina foram mais sensíveis à hidrólise básica (**Figuras 13 e 14**) com degradação completa. Esse resultado está de acordo com o estudo relatado por Alvarez-Lueje e colaboradores (2005) que avalia a estabilidade da lovastatina frente a diferentes meios e temperaturas. Segundo os pesquisadores os valores de energia de ativação e da constante hidrolítica calculados para o meio básico (NaOH 0,1 N) permitiram concluir que a degradação é maior neste meio, no qual se observou degradação instantânea à temperatura ambiente.

Em um estudo conduzido por Yang e Hwang (2006) relatou-se que a conversão de estatinas na forma lactona para a forma de hidroxiácido é quase completa em meio alcalino (NaOH 0,1 N preparado com 25 ou 50% de ACN, a 45 °C) e ocorre em menor proporção em meio neutro (70% ACN em água por até 48 h à temperatura ambiente ou somente água a 100 °C por até 2 h). Assim, os picos com tr 3,494minutos (**Figura 13**) e tr 4,234minutos (**Figura 14**) e com espectros na região do UV idênticos ao da lovastatina e ao da sinvastatina, respectivamente, presentes nos cromatogramas obtidos após hidrólise básica, podem ser considerados suas formas hidroxiácidas. Os mesmos picos, com tr próximos aqueles previamente citados, também estão presentes nos cromatogramas referentes à hidrólise neutra (**Figuras 15 e 16**), porém, com áreas maiores devido à degradação parcial da lovastatina e da sinvastatina.

A maior conversão das formas lactonas de lovastatina e sinvastatina observada para as suas formas hidroxiácidas, no presente trabalho, após hidrólise neutra da lovastatina e sinvastatina em comparação com a hidrólise básica das mesmas, está em contradição ao estudo relatado por Yang e Hwang (2006). Esse fato pode ser explicado pelas condições de degradação utilizadas. Yang e Hwang (2006) realizaram a hidrólise alcalina em solução de NaOH 0,1 M preparada com 25% ou 50% de ACN, a 45 °C por apenas 1 h e a hidrólise neutra foi realizada em água com 70% de ACN, à temperatura ambiente por até 48 h ou em água a 100 °C por até 2 h. Tais condições são menos drásticas do que as utilizadas no presente trabalho (NaOH 1 M para hidrólise alcalina e água para hidrólise neutra, ambos os meios com 17% de ACN e a 100 °C por 4 h). Assim, as formas hidroxiácidas formadas durante as drásticas condições de hidrólise alcalina podem ter sido degradadas posteriormente, justificando os menores valores de áreas. Já as condições mais brandas de hidrólise neutra levaram à conversão das formas lactonas para as formas ácidas, porém sem degradação posterior das mesmas.

Os picos principais presentes nas Figuras 13 e 14 (hidrólise básica) com tempos de retenção próximos a 1,56minutos apresentam espectros idênticos aos das duas estatinas,

sendo também produtos de degradação das mesmas. No cromatograma obtido após hidrólise ácida da lovastatina (**Figura 11**) há um pico referente à um possível produto de degradação não identificado (tr 6,623minutos) menos polar que a lovastatina e com espectro diferente da mesma.

4.3.2.1.2 Calor seco, exposição à radiação UV e oxidação

Os cromatogramas apresentados nas Figuras 17 a 22 foram obtidos após as seguintes condições: calor seco, exposição à radiação UV ou oxidação da lovastatina e da sinvastatina.

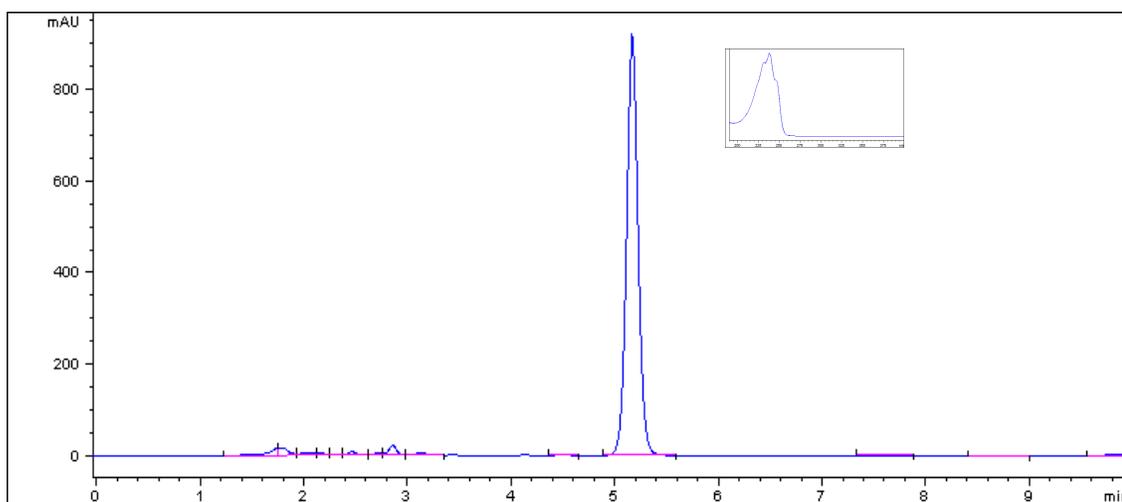


Figura 17 - Cromatograma obtido após aquecimento de lovastatina (pico principal, tr 5,183 min, R 3,29). Condições: calor seco a 105 °C, por 4 h.

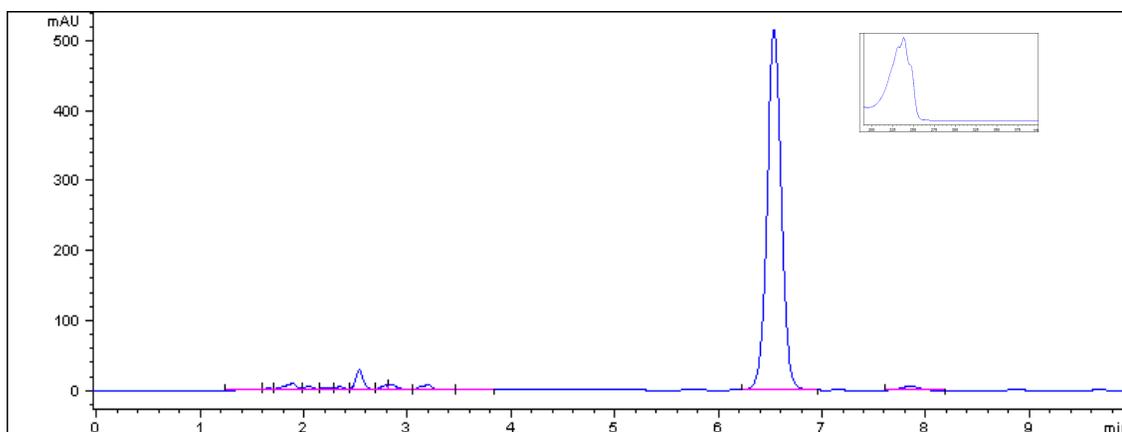


Figura 18 - Cromatograma obtido após aquecimento de sinvastatina (pico principal, tr 6,544 min, R 12,80). Condições: calor seco a 105 °C, por 4 h.

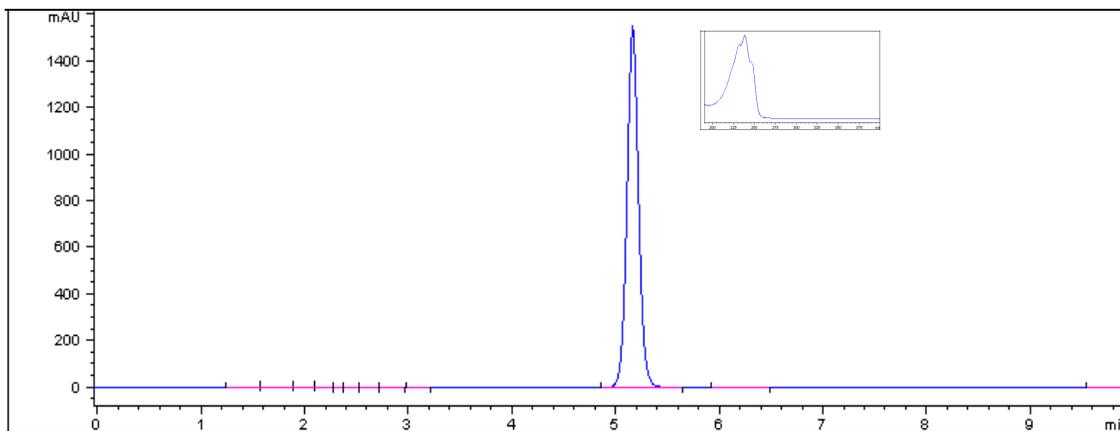


Figura 19 - Cromatograma obtido após exposição à radiação UV de lovastatina (tr 5,158 min). Condições: exposição à radiação UV, em λ 254 nm, por 4 h.

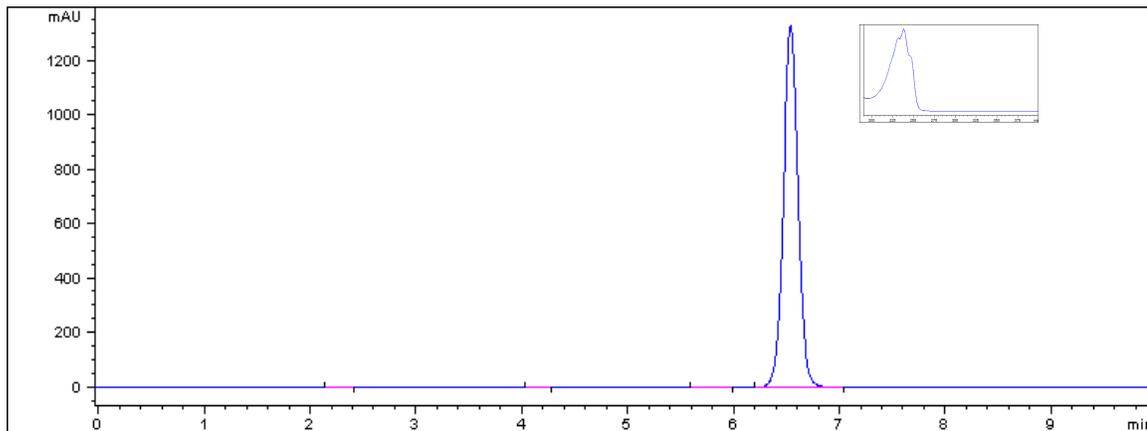


Figura 20 - Cromatograma obtido após exposição à radiação UV de simvastatina (tr 6,546 min). Condições: exposição à radiação UV, em λ 254, nm por 4 h.

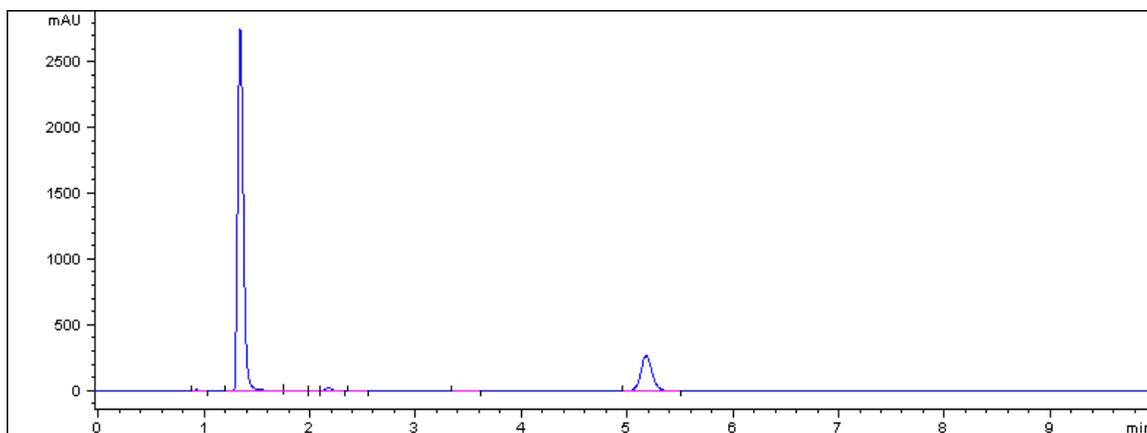


Figura 21 - Cromatograma obtido após oxidação de lovastatina (tr 5,189 min). Condições: H_2O_2 30% V/V, em banho-maria a $100^\circ C$ por 4 h. O pico em tr 1,350 min corresponde ao solvente (H_2O_2).

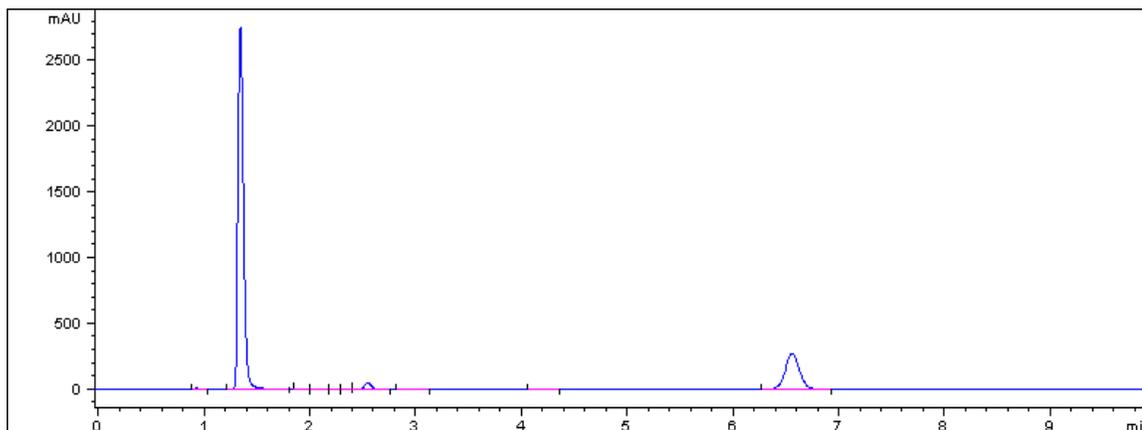


Figura 22 - Cromatograma obtido após oxidação de sinvastatina (tr 6,566 min). Condições: H₂O₂ 30% V/V, em banho-maria a 100° C por 4 h. O pico em tr 1,350 min corresponde ao solvente (H₂O₂).

Comparando-se as condições de degradação, calor seco, exposição à radiação UV e oxidação (**Figuras 17 a 22**) a maior degradação ocorreu no meio oxidativo. Entretanto, não foi observado nenhum pico de degradação. Isso pode ser explicado pela formação de produto de baixo peso molecular que não apresenta cromóforo em sua estrutura. As duas estatinas apresentaram menor sensibilidade à exposição ao calor seco e à luz (**Figuras 17 a 20**) em comparação aos meios hidrolíticos ácido, básico e neutro (**Figuras 11 a 16**).

A resolução entre os picos de possíveis interferentes e os picos de interesse (lovastatina ou sinvastatina) foi adequada ($R \geq 2$) (SNYDER *et al.*, 1997) e a pureza dos fármacos comprovada com auxílio de detector UV/DAD.

4.3.2.2 Seletividade

A seletividade de um método pode ser investigada pela resposta do analito na presença de possíveis interferentes como produtos de degradação, impurezas de síntese, intermediários e excipientes (RIBANI *et al.*, 2004; GREEN, 1996). Um método analítico que seja capaz de separar o fármaco frente a seus produtos de degradação é de grande importância para monitorar a qualidade de um medicamento (ÁLVAREZ-LUEJE *et al.*, 2005).

Os cromatogramas obtidos após a análise das soluções degradadas de lovastatina e de sinvastatina não apresentaram picos de substâncias interferentes nos tempos de retenção

das mesmas, nas condições empregadas, conforme ilustrado nas Figuras 11 a 22 no item 4.3.2.1.

Os cromatogramas dos placebos A, B, C e D (**Figura 23**) também não apresentaram picos no mesmo tempo de retenção da pravastatina sódica (tr 2,3minutos).

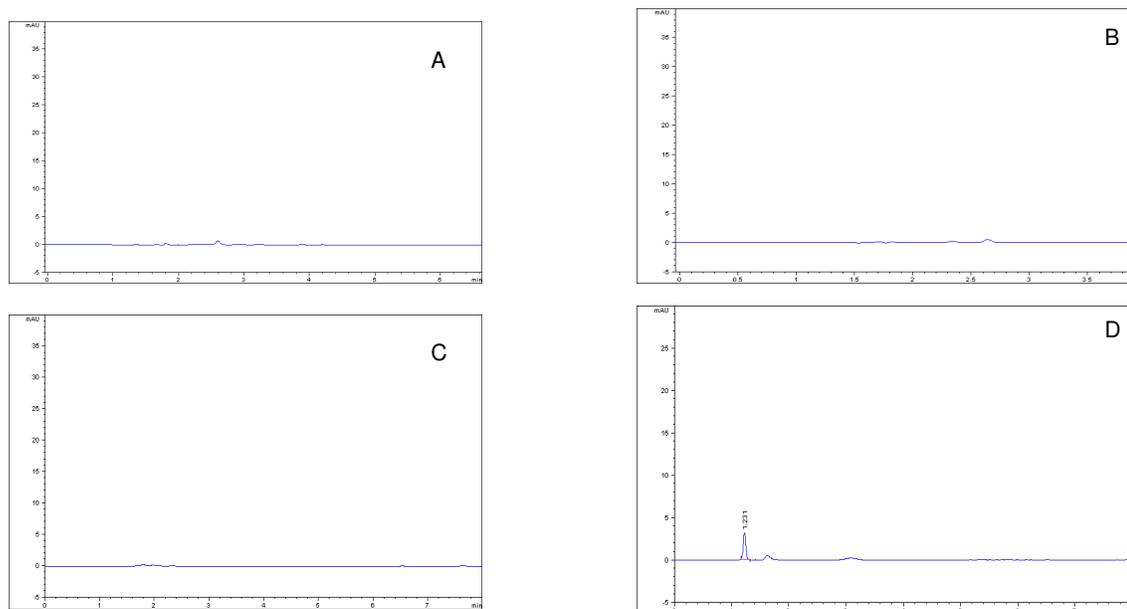


Figura 23 - Cromatogramas de soluções de placebos A, B C e D (concentração equivalente a 40 µg/mL do fármaco, em ACN).

4.3.2.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa especificada (BRASIL, 2003, RIBANI *et al.*, 2004).

Para a determinação da linearidade do método para lovastatina, pravastatina sódica e para sinvastatina foram preparadas, separadamente, soluções correspondentes a 70%, 85%, 100%, 115% e 130% da concentração de trabalho (40 µg/mL). Os resultados do teste de linearidade para lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

Tabela 4 - Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de lovastatina por CLAE, em triplicata.

Faixa percentual analítica (%)	n	Lovastatina (X) (µg/ml)	Área do pico (Y)	Fator de resposta (Y/X)
70	1	28,0	615,53	21,87
	2		628,95	22,26
	3		619,70	22,00
85	1	34,0	749,94	21,93
	2		761,05	22,18
	3		755,84	22,10
100	1	40,0	893,92	22,22
	2		891,42	22,09
	3		886,26	22,02
115	1	46,0	1028,23	22,23
	2		1025,43	22,09
	3		1022,97	22,10
130	1	52,0	1158,97	22,16
	2		1163,50	22,17
	3		1158,80	22,15
Média				22,10
DPR (%)				0,50

Tabela 5 - Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de pravastatina sódica por CLAE, em triplicata.

Faixa porcentual analítica (%)	Replicata	Pravastatina sódica (X) ($\mu\text{g/ml}$)	Área do pico (Y)	Fator de resposta (Y/X)
70	1	28,0	817,89	28,32
	2		817,89	28,26
	3		809,08	27,95
85	1	34,0	1002,90	28,60
	2		979,82	27,88
	3		994,54	28,29
100	1	40,0	1175,47	28,49
	2		1147,67	27,76
	3		1159,97	28,05
115	1	46,0	1340,90	28,26
	2		1331,53	28,01
	3		1335,13	28,07
130	1	52,0	1525,23	28,44
	2		1495,93	27,84
	3		1512,23	28,12
Média				28,15
DPR (%)				0,88

Tabela 6 - Resultados da avaliação da linearidade do método para determinação de sinvastatina por CLAE, em triplicata.

Faixa porcentual analítica (%)	Replicata	Sinvastatina (X) (µg/ml)	Área do pico (Y)	Fator de resposta (Y/X)
70	1	28,0	602,60	21,52
	2		597,76	21,35
	3		594,41	21,23
85	1	34,0	737,10	21,68
	2		728,30	21,42
	3		722,17	21,24
100	1	40,0	865,31	21,63
	2		868,13	21,70
	3		852,24	21,30
115	1	46,0	996,73	21,67
	2		985,29	21,42
	3		980,03	21,30
130	1	52,0	1127,16	21,68
	2		1115,18	21,44
	3		1108,66	21,32
Média				21,46
DPR (%)				0,77

As curvas analíticas para lovastatina, pravastatina sódica ou para sinvastatina construídas com os resultados das Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente, estão representadas na Figura 24.

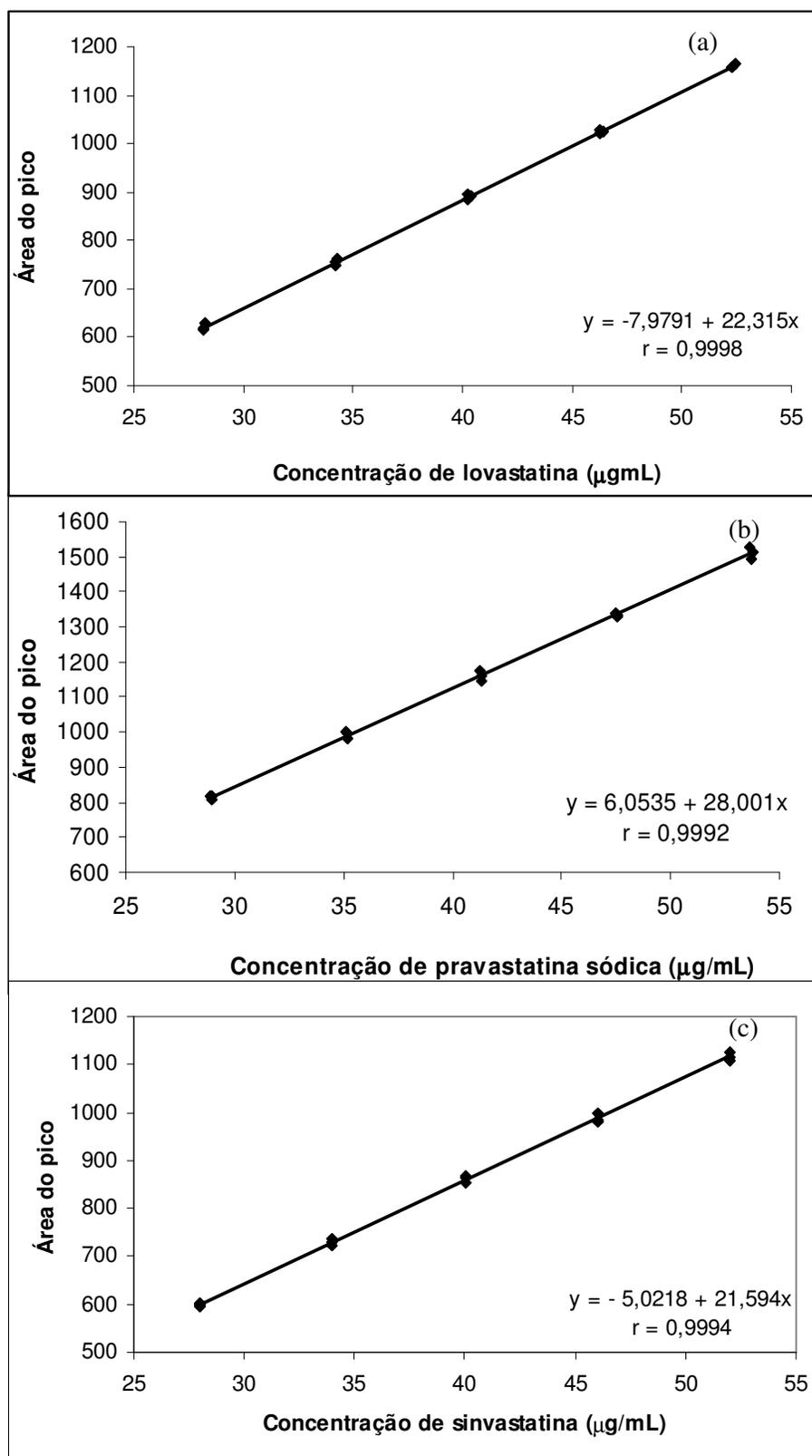


Figura 24 - Curvas analíticas médias obtidas (28 a 52 $\mu\text{g/mL}$, ACN, λ 238 nm) para a determinação de (a) lovastatina (b) pravastatina sódica e (c) simvastatina por CLAE.

O método dos mínimos quadrados foi utilizado para cálculo da regressão linear. As equações das retas e os valores de DPR obtidos foram $y = -7,9791 + 22,315x$ e 0,4% para lovastatina, $y = 6,0535 + 28,001x$ e 0,9% para pravastatina sódica e $y = -5,0218 + 21,594x$ e 0,8% para sinvastatina. Os coeficientes de correlação de Pearson (r) obtidos foram satisfatórios ($r > 0,999$) (BRASIL, 2003). A linearidade do método foi confirmada para os três fármacos, pois os valores de coeficiente de correlação foram superiores a 0,99. Os interceptos não foram diferentes de zero no nível de significância de 5%.

Plotando-se concentração versus fator de resposta ao quadrado (FR^2) de cada estatina obtém-se uma linha reta por toda faixa de concentração. A análise de regressão linear desta curva revela que não há correlação significativa entre concentração e FR^2 no nível de significância de 5%, indicando, assim, que há uma resposta linear para toda faixa de concentração de lovastatina, pravastatina sódica e de sinvastatina. Os valores de DPR dos fatores de resposta das três estatinas foram menores que 1%, indicando homogeneidade entre a relação dos valores de área dos picos de cada estatina e seus respectivos valores de concentração (GREEN, 1996).

Os resíduos seguem à distribuição normal no nível de significância de 5%, de acordo com a análise estatística realizada, por meio do teste de normalidade de Ryan-Joiner, para os resultados obtidos de cada estatina,.

Na Tabela 7 estão listados os parâmetros obtidos para regressão linear para quantificação de cada fármaco.

Tabela 7 - Resultados obtidos para análise da regressão linear para determinação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por CLAE.

Parâmetros	Lovastatina	Pravastatina sódica	Sinvastatina
Intercepto (a)	-7,9791	6,0535	-5,0218
Coeficiente angular (b)	22,315	28,001	21,594
Coeficiente de correlação (r)	0,9998	0,9992	0,9994
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9997	0,9984	0,9987
Erro padrão da regressão	3,5388	10,6742	7,0853
Valor p - intercepto	0,0931 ^a	0,6560 ^a	0,5786 ^a
Valor p - inclinação	2,66.10 ⁻²⁴ ^b	1,69.10 ⁻¹⁹ ^b	3,67.10 ⁻²⁰ ^b

^anão significativo para $\alpha = 0,05$.

^bsignificativo para $\alpha = 0,05$.

4.3.2.4 Precisão intra-ensaio e inter-ensaio

A precisão é a dispersão dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão foi avaliada em dois níveis: precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio.

Para avaliar a precisão intra-ensaio e inter-ensaio do método foram preparadas soluções de baixa, média e alta concentração correspondendo a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho (40 µg/mL) de cada estatina. Este procedimento foi realizado em dois dias consecutivos. Os valores de DPR para precisão intra e inter-dia estão apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10 para lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, respectivamente. O intervalo de confiança da média a 95% foi calculado por meio do erro padrão da média (EP) e da estatística t Student. O valor de t Student tabelado ($t_{\alpha/2;2 \text{ G.L.}}$) é 4,30 no nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) e n-1 graus de liberdade (G.L).

Tabela 8 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de lovastatina por CLAE, em triplicata.

Lovastatina (µg/mL)	Dia	Área do pico	Intervalo de confiança a 95% (Média ± $t_{(\alpha/2;G.L.)} \times EP^*$)	Precisão DPR (%)	
				Intra-ensaio	Inter-ensaio
28,0	1	615,53 628,95 619,70	621,40 ± 17,06	1,10	0,88
	2	620,85 629,64 623,98	624,824 ± 11,07	0,71	
40,0	1	893,92 891,42 886,26	890,53 ± 9,71	0,44	0,54
	2	901,11 893,91 893,50	896,17 ± 10,64	0,48	
52,0	1	1158,97 1163,50 1158,80	1160,42 ± 6,62	0,23	0,18
	2	1162,00 1161,93 1163,30	1162,41 ± 1,91	0,07	

*erro padrão da média.

Tabela 9 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de pravastatina sódica por CLAE, em triplicata.

Pravastatina sódica (µg/mL)	Dia	Área do pico	Intervalo de confiança a 95% (Média ± $t_{(\alpha/2;G.L.)} \times EP^*$)	Precisão DPR (%)	
				Intra-ensaio	Inter-ensaio
28,0	1	792,89	785,54 ± 15,89	0,81	0,75
		781,26			
		782,47			
	2	794,58	787,01 ± 16,59	0,85	
		784,51			
		781,94			
40,0	1	1139,55	1123,94 ± 36,43	1,30	1,31
		1110,45			
		1121,81			
	2	1147,43	1127,74 ± 44,24	1,58	
		1112,77			
		1123,00			
52,0	1	1478,63	1462,85 ± 38,76	1,07	1,06
		1447,42			
		1462,49			
	2	1487,44	1465,98 ± 47,02	1,29	
		1451,65			
		1458,85			

*erro padrão da média.

Tabela 10 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de sinvastatina por CLAE, em triplicata.

Sinvastatina ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	Área do pico	Intervalo de confiança a 95% (Média $\pm t_{(\alpha/2;G.L.)} \times EP^*$)	Precisão DPR (%)	
				Intra-ensaio	Inter-ensaio
28,0	1	602,60 597,76 594,41	598,26 \pm 10,24	0,69	1,06
	2	601,96 591,16 586,34	593,16 \pm 19,87	1,35	
40,0	1	865,31 868,13 852,24	861,89 \pm 21,07	0,98	1,32
	2	865,18 844,02 843,07	850,76 \pm 31,04	1,47	
52,0	1	1127,16 1115,18 1108,66	1117,00 \pm 23,30	0,84	0,99
	2	1118,20 1102,34 1096,84	1105,80 \pm 27,55	1,00	

*erro padrão da média.

Os valores de DPR encontrados para a precisão intra-dia e inter-dia para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e de sinvastatina são satisfatórios e estão de acordo com o especificado pela ANVISA (nenhum valor acima de 2%) (BRASIL, 2003).

4.3.2.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação a um valor referência aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003, RIBANI *et al.*, 2004).

Para avaliar a exatidão do método foram adicionadas quantidades conhecidas de cada estatina em placebo. As concentrações finais avaliadas correspondem a 70%, 100% e 130% da concentração de trabalho (40 µg/mL). A porcentagem de recuperação foi calculada por meio da razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica. As Tabelas 11, 12, e 13 apresentam os resultados obtidos para exatidão do método aplicado ao doseamento de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, respectivamente.

Tabela 11 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de lovastatina adicionada ao placebo, por CLAE, em triplicata.

Faixa de concentração	Amostra	Concentração adicionada de lovastatina (µg/ml)	Concentração observada de lovastatina (µg/ml)*	Recuperação (%)	Média (%)
70%	1	28,04	28,65	102,19	101,59
	2	28,14	28,37	100,82	
	3	28,10	28,59	101,76	
100%	1	40,06	40,40	100,85	101,21
	2	40,20	40,66	101,15	
	3	40,14	40,79	101,63	
130%	1	52,08	52,57	100,94	101,53
	2	52,26	52,75	100,95	
	3	52,18	53,59	102,69	
Média				101,44	
DPR (%)				0,66	

*concentração corrigida de acordo com o padrão utilizado.

Tabela 12 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de pravastatina sódica adicionada ao placebo, por CLAE, em triplicata.

Faixa de concentração	Amostra	Concentração adicionada de pravastatina (µg/ml)	Concentração observada de pravastatina (µg/ml)*	Recuperação (%)	Média (%)
70%	1	28,21	28,071	99,50	100,14
	2	28,23	28,094	99,53	
	3	28,30	28,689	101,39	
100%	1	40,30	40,170	99,67	100,18
	2	40,32	40,371	100,12	
	3	40,42	40,723	100,74	
130%	1	52,39	52,119	99,47	99,80
	2	52,42	52,335	99,84	
	3	52,55	52,603	100,10	
Média				100,04	
DPR (%)				0,65	

*concentração corrigida de acordo com o padrão utilizado.

Tabela 13 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de sinvastatina adicionada ao placebo, por CLAE, em triplicata.

Concentração de trabalho	n	Concentração adicionada de sinvastatina (µg/ml)	Concentração observada de sinvastatina (µg/ml)*	Recuperação (%)	Média (%)
70%	1	27,94	27,59	98,76	99,75
	2	27,81	27,84	100,10	
	3	27,80	27,91	100,41	
100%	1	39,91	39,23	98,29	99,57
	2	39,73	39,69	99,91	
	3	39,71	39,91	100,50	
130%	1	51,88	51,46	99,20	100,30
	2	51,65	51,98	100,64	
	3	51,62	52,17	101,06	
Média				99,87	
DPR (%)				0,93	

*Concentração corrigida de acordo com o padrão utilizado.

As médias das porcentagens de recuperação encontradas para lovastatina (101,44%), para pravastatina sódica (100,04%) e para sinvastatina (99,87%) estão dentro da faixa especificada de 98,0% a 102,0% (BRASIL, 2003; GREEN, 1996).

4.3.2.6 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os valores teóricos de LD e LQ estimados pelas equações dadas no item 4.2.2.6 foram 0,59 µg/mL e 1,97 µg/mL para lovastatina; 1,42 µg/mL e 4,74 µg/mL para pravastatina sódica e 1,22 µg/mL e 4,08 µg/mL para sinvastatina.

4.3.2.7 Robustez

A capacidade do método de resistir a pequenas alterações nos parâmetros analíticos que, eventualmente, possam ocorrer na rotina foi verificada alterando-se a proporção de fase

móvel ($\pm 2\%$ modificador orgânico), o fluxo da fase móvel ($\pm 0,1$ unidade), a temperatura do forno (± 5 °C) e verificando-se a influência dessas alterações nos resultados de teores obtidos de 6 soluções a 100% da concentração de trabalho. Para a pravastatina sódica não foi testada a temperatura 35 °C ($+5$ °C), pois nessa temperatura a mesma não é retida na coluna. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16 para lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, respectivamente.

Tabela 14 - Resultados obtidos para robustez do método aplicado à determinação de lovastatina, a 100% da concentração de trabalho (40 µg/mL), por CLAE.

Lovastatina (40 µg/mL)							
Condição Amostra	Nominal*	63% ACN	67% ACN	1,4 mL/min	1,6 mL/min	25 °C	35 °C
1	40,77	40,78	40,80	40,80	41,04	40,75	40,86
2	40,32	40,29	40,76	40,25	40,54	40,36	40,56
3	40,80	40,65	40,57	40,75	40,98	40,75	40,80
4	39,94	39,96	39,72	39,95	41,17	39,74	40,02
5	39,89	39,94	39,67	40,06	41,26	39,70	39,95
6	39,85	39,75	39,74	39,82	41,07	40,40	39,99
Média	40,26	40,23	40,24	40,27	41,01	40,28	40,36

*Fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,5 mL/min, 30 °C.

Tabela 15 - Resultados obtidos para robustez do método aplicado à determinação de pravastatina sódica, a 100% da concentração de trabalho (40 µg/mL), por CLAE.

Pravastatina sódica (40 µg/mL)						
Condição Amostra	Nominal	63% ACN	67% ACN	0,9 mL/min	1,1 mL/min	25 °C
1	38,77	38,98	39,00	43,15	35,40	39,13
2	36,94	37,04	37,12	40,99	33,64	37,17
3	36,91	37,03	37,10	41,06	33,64	37,21
4	36,56	36,78	36,80	40,06	33,35	37,01
5	37,90	38,01	38,02	42,15	34,51	38,24
6	38,64	38,87	38,83	42,96	35,23	39,11
Média	37,62	37,79	37,81	41,73	34,30	37,98

*Fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,0 mL/min, 30 °C.

Tabela 16 - Resultados obtidos para robustez do método aplicado à determinação de sinvastatina, a 100% da concentração de trabalho (40 µg/mL), por CLAE.

Sinvastatina (40 µg/mL)							
Condição Amostra	Nominal	63% ACN	67% ACN	1,4 mL/min	1,6 mL/min	25 °C	35 °C
1	37,85	37,99	37,80	37,84	37,88	37,89	37,93
2	38,49	38,49	38,76	38,52	38,53	38,54	38,69
3	38,36	39,06	38,57	38,54	38,67	38,71	38,80
4	38,70	39,39	38,72	38,84	38,84	38,83	38,92
5	38,75	39,13	38,97	38,71	38,74	38,73	38,88
6	38,32	38,63	38,44	38,40	38,37	38,36	38,46
Média	38,41	38,78	38,54	38,47	38,50	38,51	38,61

*Fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,5 mL/min, 30 °C, detecção UV em λ 238 nm.

A comparação das médias obtidas utilizando o teste de Tukey após a análise de variância (ANOVA) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas de teores de lovastatina e de sinvastatina, nas condições testadas. Entretanto, para a pravastatina sódica houve diferença estatisticamente significativa entre a média obtida com a condição nominal e as médias obtidas com o fluxo alterado para 0,9 mL/min e para 1,1 mL/min. Isto indica que o fluxo da fase móvel é crítico para o doseamento dessa estatina empregando o método proposto, já que o fármaco é um sal, possui alta polaridade e é rapidamente eluído.

O método proposto por eluição isocrática apresenta as vantagens de menor consumo de reagentes, reduzido tempo de análise, boa resolução e única variação de fluxo possível para pravastatina sódica na mesma faixa de concentração, mesmo λ , solvente e eluente, frente àquele descrito para sinvastatina matéria-prima na USP31, que difere pela coluna de octadecilsilano (C₁₈), eluição gradiente por meio de soluções A (ACN: H₃PO₄ 0,1% na proporção 50:50) e B (H₃PO₄ 0,1%) a 3,0 mL/min (THE UNITED, 2008). O método também demonstrou que pode ser utilizado para avaliar a estabilidade para sinvastatina e lovastatina, pois não há interferências dos produtos de degradação, quando submetidas a condições de degradação forçada (oxidação, hidrólise ácida, básica e neutra, exposição à radiação UV e calor seco).

4.3.3 Desenvolvimento e validação de método analítico por espectrofotometria derivada na região do UV para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina

Os espectros de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, na região do UV, foram traçados em zero ordem e sobrepostos com os placebos. Entretanto, devido à semelhança entre os espectros apresenta-se somente o espectro da sinvastatina (**Figura 25**).

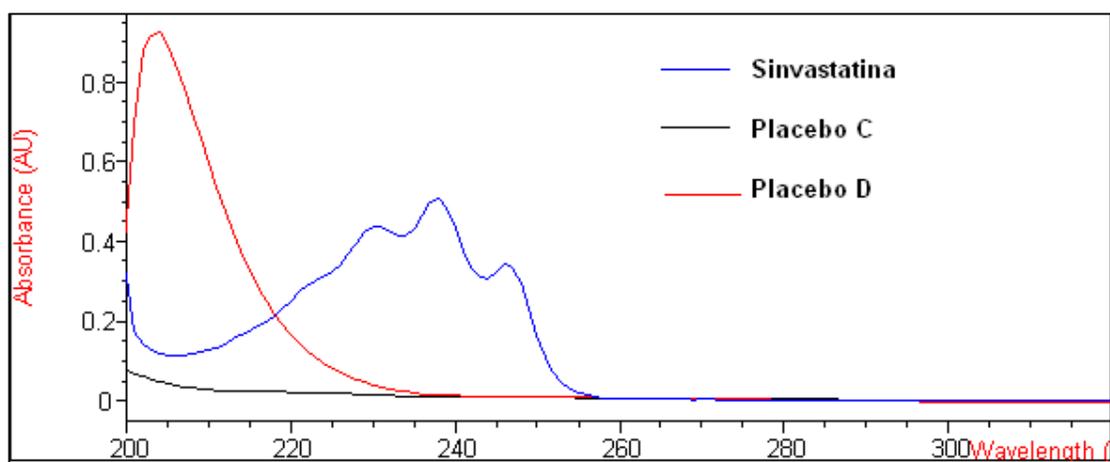


Figura 25 - Espectros na região do UV em zero ordem de sinvastatina 10 $\mu\text{g/mL}$ e placebos C e D na concentração equivalente a 10 $\mu\text{g/mL}$ de sinvastatina, em metanol.

A constituição dos placebos C e D difere apenas pela presença de PEG6000 e PVP, respectivamente. A banda de absorção do PVP, presente no placebo D, se estende, sobrepondo-se os máximos de absorção das estatinas. As porcentagens de interferência espectral na região UV, zero ordem λ 238 nm, dos placebos C e D sobre solução de sinvastatina a 50% da concentração de trabalho (4 $\mu\text{g/mL}$, em metanol) foi 1,15% e 1,16%, respectivamente. Em relação à sinvastatina a 125% da concentração de trabalho (10 $\mu\text{g/mL}$, em metanol) essa interferência foi 1,34% devido ao placebo C e 3,18% devido ao placebo D.

A Figura 26 apresenta o espectro, em segunda ordem, de uma solução de sinvastatina, a 100% da concentração de trabalho (8 $\mu\text{g/mL}$, em metanol), sobreposto com os espectros, também em segunda ordem, de soluções dos placebos C e D (concentração correspondente a 8 $\mu\text{g/mL}$ de sinvastatina, em metanol). O espectro em segunda derivada da sinvastatina, na faixa λ 200 nm a 400 nm, é caracterizado por três picos e três vales, cada qual com sua respectiva absorção. Em λ 255 nm há um pico satélite, em que não é adequado para medidas. Idealmente, deve-se buscar um comprimento de onda com

absorção máxima e maior amplitude, no qual não existam interferências. Portanto, a menor interferência e a maior sensibilidade para a detecção da sinvastatina foram verificadas nos espectros obtidos em segunda derivada e no comprimento de onda de máxima absorção situado em λ 247 nm, pelo método zero pico (ZP) (**Figura 26**). A mesma conclusão é válida para lovastatina e pravastatina sódica por apresentarem espectros idênticos ao da sinvastatina.

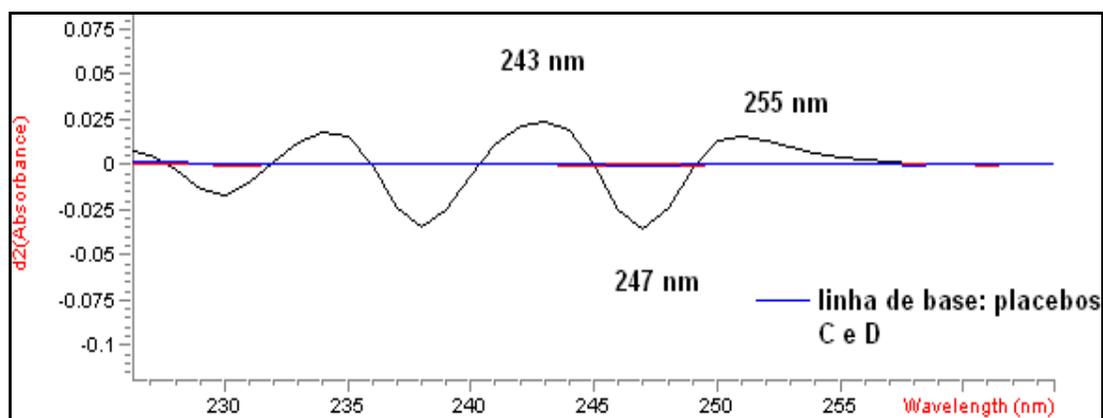


Figura 26 - Espectro de absorção da sinvastatina e placebo (linha de base), em segunda derivada (8 $\mu\text{g/mL}$, metanol).

Na literatura, há dois métodos descritos para quantificação de sinvastatina em comprimidos por EDU em segunda ordem de derivada e método de quantificação ZP, entretanto os comprimentos de onda selecionados diferem entre os estudos. Wang e Asgharnejad (2000) selecionaram λ 243 nm e Gomes e colaboradores (2009) selecionaram λ 255 nm. Nos máximos λ 243 nm e 255 nm, segunda derivada, detectou-se, experimentalmente, interferência de até 2,29% e até 2,90%, respectivamente. O λ 255 nm tem a desvantagem adicional de ser um pico satélite podendo levar a resultados com baixa precisão e, portanto, baixa repetitividade.

4.3.3.1 Seletividade

Em λ 247 nm, a interferência dos placebos C e D nas leituras de absorvância das três estatinas estudadas em baixa e média concentração é de apenas 0,15% em 50% da concentração de trabalho (4 $\mu\text{g/mL}$, metanol) e, de até 0,53% em 100% da concentração de trabalho (8 $\mu\text{g/mL}$, metanol).

4.3.3.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método de quantificação de estatinas por EDU foi realizada utilizando-se soluções de lovastatina e sinvastatina que correspondem a 50 a 150% da concentração de trabalho (8,0 µg/mL, em metanol) e soluções de pravastatina sódica que correspondem a 60 a 140% da concentração de trabalho (10 µg/mL, em metanol). Os resultados da avaliação da linearidade por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, para lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina estão apresentados nas Tabelas 17, 18 e 19, respectivamente.

Tabela 17 - Resultados da avaliação da linearidade do método para a determinação de lovastatina por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, em triplicata.

Faixa analítica (%)	Lovastatina (µg/mL) (X)	Replicata	A/nm ² λ 247 nm (Y)	Fator de resposta (Y/X)
50	4,0	1	0,0179	0,00446
		2	0,0180	0,00449
		3	0,0180	0,00449
75	6,0	1	0,0271	0,00451
		2	0,0270	0,00448
		3	0,0269	0,00448
100	8,0	1	0,0366	0,00456
		2	0,0367	0,00457
		3	0,0367	0,00458
125	10,0	1	0,0457	0,00455
		2	0,0456	0,00455
		3	0,0457	0,00456
150	12,0	1	0,0553	0,00459
		2	0,0552	0,00459
		3	0,0549	0,00456
Média				0,00453
DPR (%)				0,99

Tabela 18 - Resultados da avaliação da linearidade do método para a determinação de pravastatina sódica por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, em triplicata.

Faixa analítica (%)	Pravastatina sódica ($\mu\text{g/mL}$) (X)	Replicata	A/ nm^2 λ 247 nm (Y)	Fator de resposta (Y/X)
60	6,0	1	0,0123	0,00205
		2	0,0123	0,00205
		3	0,0121	0,00202
80	8,0	1	0,0164	0,00205
		2	0,0163	0,00204
		3	0,0164	0,00205
100	10,0	1	0,0204	0,00204
		2	0,0204	0,00204
		3	0,0204	0,00204
120	12,0	1	0,0245	0,00204
		2	0,0245	0,00204
		3	0,0246	0,00205
140	14,0	1	0,0287	0,00205
		2	0,0288	0,00206
		3	0,0284	0,00203
Média				0,00204
DPR (%)				0,48

Tabela 19 - Resultados da avaliação da linearidade do método para a determinação de sinvastatina por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol , em triplicata.

Faixa analítica (%)	Sinvastatina ($\mu\text{g/mL}$) (X)	Replicata	A/nm ² λ 247 nm (Y)	Fator de resposta (Y/X)
50	4,0	1	0,0181	0,00454
		2	0,0175	0,00440
		3	0,0176	0,00442
75	6,0	1	0,0269	0,00450
		2	0,0271	0,00453
		3	0,0271	0,00452
100	8,0	1	0,0360	0,00451
		2	0,0359	0,00451
		3	0,0360	0,00451
125	10,0	1	0,0448	0,00449
		2	0,0449	0,00450
		3	0,0443	0,00445
150	12,0	1	0,0542	0,00453
		2	0,0542	0,00453
		3	0,0536	0,00448
Média				0,00450
DPR (%)				0,94

As curvas analíticas para lovastatina, pravastatina sódica ou para sinvastatina construídas com os resultados das Tabelas 17, 18 ou 19, respectivamente, estão representadas na Figura 27.

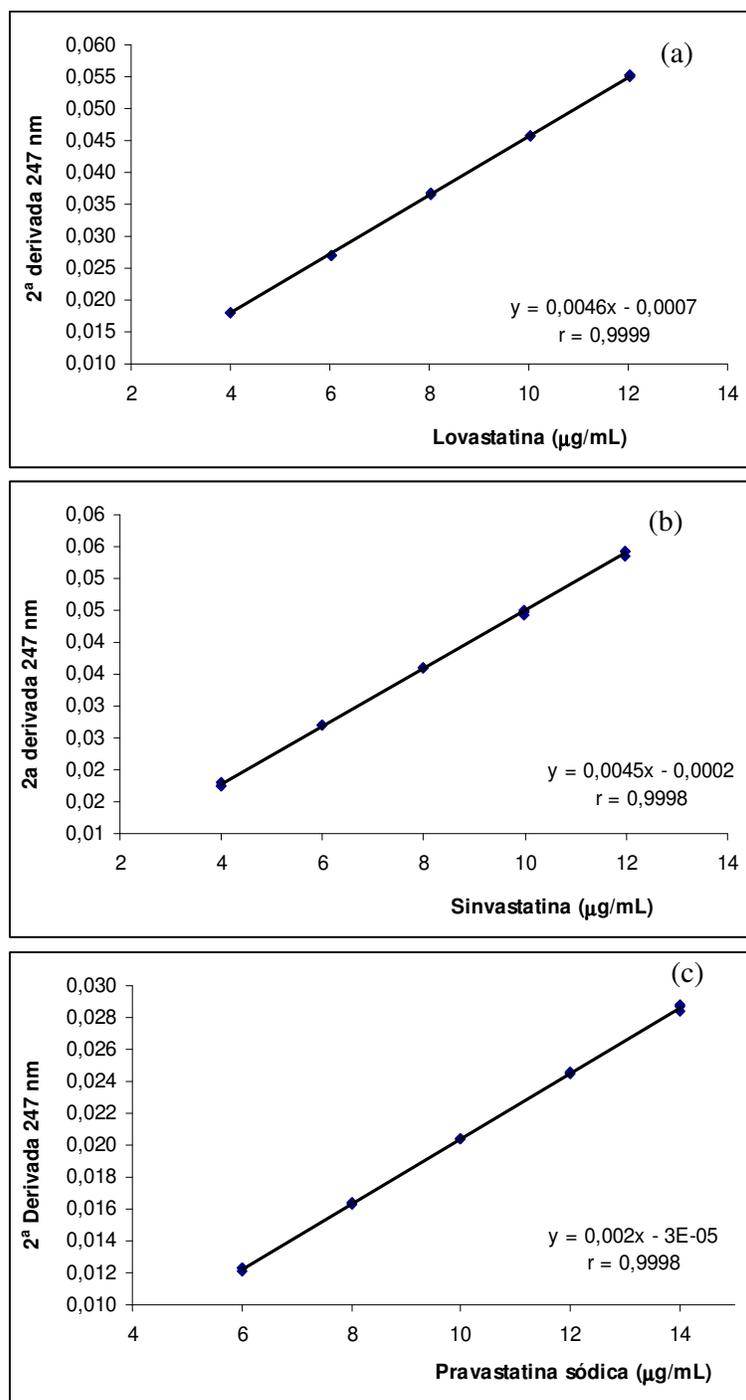


Figura 27 - Curvas analíticas médias obtidas para a determinação de (a) lovastatina, (c) sinvastatina (ambas 4 a 12 $\mu\text{g/mL}$, metanol) e de (b) pravastatina sódica (6 a 14 $\mu\text{g/mL}$, metanol) por EDU, segunda derivada, λ 247.

As equações das retas e os valores de DPR obtidos foram $y = -0,00071 + 0,004636x$; 0,47% para lovastatina, $y = -3,0 \cdot 10^{-5} + 0,002x$; 0,52% para pravastatina sódica e $y = -0,00016 +$

0,004519x; 0.73% para sinvastatina. Todos os coeficientes de correlação de Pearson (r) obtidos foram satisfatórios ($r > 0,999$) (BRASIL, 2003). A linearidade do método foi confirmada para os três fármacos, pois, os valores de coeficiente de correlação foram superiores a 0,99 e os valores p da inclinação foram significativos. Os interceptos obtidos para sinvastatina e para pravastatina sódica não foram estatisticamente diferentes de zero no nível de significância de 5%. Para lovastatina o intercepto foi diferente de zero, entretanto não foi superior a 2% da resposta obtida a 100% da concentração de trabalho, conforme recomendado por Green (1996).

Os valores de DPR dos fatores de resposta para as três estatinas foram menores que 1%, indicando homogeneidade entre a relação dos valores de área dos picos de cada estatina e seus respectivos valores de concentração (GREEN, 1996).

Os resíduos seguem a distribuição normal no nível de significância de 5%, de acordo com a análise estatística realizada, por meio do teste de normalidade de Ryan-Joiner, para os resultados obtidos de cada estatina.

A Tabela 20 lista os parâmetros obtidos para regressão linear para quantificação de cada fármaco.

Tabela 20 - Resultados obtidos para análise da regressão linear para a determinação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol.

Parâmetros	Lovastatina	Pravastatina sódica	Sinvastatina
Intercepto (a)	$-0,71 \cdot 10^{-3}$	$-3,0 \cdot 10^{-5}$	$-0,16 \cdot 10^{-3}$
Coeficiente angular (b)	0,0046	0,0020	0,0045
Coeficiente de correlação (r)	0,9999	0,9998	0,9998
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9998	0,9997	0,9996
Erro padrão da regressão	$0,17 \cdot 10^{-3}$	$0,11 \cdot 10^{-3}$	$0,26 \cdot 10^{-3}$
Valor p - intercepto	$0,14 \cdot 10^{-3}$ ^b	0,77 ^a	0,45 ^a
Valor p - inclinação	$2,68 \cdot 10^{-26}$ ^b	$2,33 \cdot 10^{-24}$ ^b	$1,04 \cdot 10^{-23}$ ^b

^anão significativo para $\alpha = 0,05$.

^bsignificativo para $\alpha = 0,05$.

4.3.3.3 Precisão intra-ensaio e inter-ensaio

Avaliou-se a precisão preparando-se soluções de baixa, média e alta concentração correspondentes a 60%, 100% e 150% da concentração de trabalho (8 µg/mL) de lovastatina e sinvastatina e, correspondentes a 60%, 100% e 140% da concentração de trabalho de pravastatina sódica (10 µg/mL). Esse procedimento foi realizado em três dias consecutivos por analistas diferentes. Os valores de DPR para precisão intra e inter-ensaio estão apresentados nas Tabelas 21, 22 e 23 para lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, respectivamente. O intervalo de confiança da média a 95% foi calculado conforme descrito no item 4.3.2.4.

Tabela 21 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de lovastatina por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, avaliada em triplicata e por analistas diferentes.

Lovastatina (µg/mL)	Dia	A/nm ² λ 247 nm	Intervalo de confiança a 95% (média $\pm t_{(\alpha/2;G,L)} \times EP^*$)	Precisão DPR (%)	
				Intra-ensaio	Inter-ensaio
4,0	1	0,0178 0,0180 0,0180	$1,79 \cdot 10^{-2} \pm 1,88 \cdot 10^{-4}$	0,42	1,81
	2	0,0186 0,0187 0,0187	$1,87 \cdot 10^{-2} \pm 8,75 \cdot 10^{-5}$	0,19	
	3	0,0184 0,0183 0,0182	$1,83 \cdot 10^{-2} \pm 2,78 \cdot 10^{-4}$	0,60	
8,0	1	0,0364 0,0365 0,0364	$3,64 \cdot 10^{-2} \pm 1,62 \cdot 10^{-4}$	0,18	1,94
	2	0,0381 0,0380 0,0382	$3,81 \cdot 10^{-2} \pm 2,85 \cdot 10^{-4}$	0,30	
	3	0,0370 0,0370 0,0371	$3,70 \cdot 10^{-2} \pm 1,13 \cdot 10^{-4}$	0,12	
12,0	1	0,0551 0,0551 0,0547	$1,79 \cdot 10^{-2} \pm 5,16 \cdot 10^{-4}$	0,38	1,93
	2	0,0576 0,0572 0,0574	$1,87 \cdot 10^{-2} \pm 5,14 \cdot 10^{-4}$	0,36	
	3	0,0560 0,0559 0,0557	$1,83 \cdot 10^{-2} \pm 3,95 \cdot 10^{-4}$	0,28	

*erro padrão da média.

Tabela 22 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de pravastatina sódica por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, avaliada em triplicata e por analistas diferentes.

Pravastatina sódica ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	A/nm ² λ 247 nm	Intervalo de confiança a 95% (média $\pm t_{(a/2;G,L)} \times EP^*$)	Precisão DPR (%)	
				Intra-ensaio	Inter-ensaio
6,0	1	0,0123	$1,22 \cdot 10^{-2} \pm 2,58 \cdot 10^{-4}$	0,85	1,41
		0,0123			
		0,0121			
	2	0,0122	$1,22 \cdot 10^{-2} \pm 1,04 \cdot 10^{-4}$	0,34	
		0,0122			
		0,0121			
3	0,0120	$1,19 \cdot 10^{-02} \pm 1,96 \cdot 10^{-4}$	0,66		
	0,0119				
	0,0118				
10,0	1	0,0204	$2,04 \cdot 10^{-2} \pm 6,70 \cdot 10^{-5}$	0,13	1,79
		0,0204			
		0,0204			
	2	0,0204	$2,04 \cdot 10^{-2} \pm 3,36 \cdot 10^{-4}$	0,66	
		0,0205			
		0,0203			
3	0,0197	$1,97 \cdot 10^{-2} \pm 3,88 \cdot 10^{-5}$	0,08		
	0,0197				
	0,0197				
14,0	1	0,0287	$2,86 \cdot 10^{-2} \pm 5,74 \cdot 10^{-4}$	0,81	1,97
		0,0288			
		0,0284			
	2	0,0286	$2,86 \cdot 10^{-2} \pm 1,70 \cdot 10^{-4}$	0,24	
		0,0286			
		0,0287			
3	0,0276	$2,75 \cdot 10^{-2} \pm 1,67 \cdot 10^{-4}$	0,24		
	0,0275				
	0,0275				

*erro padrão da média.

Tabela 23 - Resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio para a determinação de sinvastatina por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, avaliada em triplicata e por analistas diferentes.

Sinvastatina ($\mu\text{g/mL}$)	Dia	A/nm ² λ 247 nm	Intervalo de confiança a 95% (média $\pm t_{(a/2;G,L)} \times EP^*$)	Precisão DPR (%)	
				Intra-ensaio	Inter-ensaio
6,0	1	0,0182	$1,78 \cdot 10^{-2} \pm 7,78 \cdot 10^{-4}$	1,76	1,52
		0,0176			
		0,0177			
	2	0,0174	$1,74 \cdot 10^{-2} \pm 7,19 \cdot 10^{-5}$	0,17	
		0,0173			
		0,0174			
3	0,0175	$1,74 \cdot 10^{-2} \pm 1,90 \cdot 10^{-4}$	0,44		
	0,0174				
	0,0173				
10,0	1	0,0361	$3,61 \cdot 10^{-2} \pm 6,96 \cdot 10^{-5}$	0,08	1,75
		0,0360			
		0,0361			
	2	0,0353	$3,52 \cdot 10^{-2} \pm 3,60 \cdot 10^{-4}$	0,41	
		0,0351			
		0,0351			
3	0,0344	$3,47 \cdot 10^{-2} \pm 8,46 \cdot 10^{-4}$	0,98		
	0,0351				
	0,0347				
14,0	1	0,0544	$5,42 \cdot 10^{-2} \pm 7,99 \cdot 10^{-4}$	0,59	1,44
		0,0543			
		0,0538			
	2	0,0530	$5,29 \cdot 10^{-2} \pm 1,97 \cdot 10^{-4}$	0,15	
		0,0528			
		0,0529			
3	0,0521	$5,26 \cdot 10^{-2} \pm 9,85 \cdot 10^{-4}$	0,75		
	0,0527				
	0,0529				

*erro padrão da média.

Os valores de DPR encontrados para a precisão intra e inter-ensaio para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina são satisfatórios e estão abaixo do limite de 2%.

4.3.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada adicionando-se quantidades conhecidas de cada estatina ao placebo D. As concentrações finais avaliadas correspondem a 50%, 100% e 150% da concentração de trabalho para lovastatina e sinvastatina e, 60%, 100% e 140% para pravastatina sódica. As Tabelas 24, 25 e 26 apresentam os resultados obtidos para exatidão, expressos em porcentagem de recuperação, para lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina, respectivamente.

Tabela 24 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de lovastatina adicionada ao placebo por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, em triplicata.

Faixa de concentração	Amostra	Concentração adicionada de lovastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração observada lovastatina ($\mu\text{g/ml}$)*	Recuperação (%)	Média (%)
50%	1	4,03	3,97	98,54	99,12
	2	4,03	3,99	99,04	
	3	4,03	4,02	99,79	
100%	1	8,06	8,07	100,20	100,68
	2	8,06	8,14	101,04	
	3	8,06	8,12	100,80	
150%	1	12,08	12,30	101,76	101,65
	2	12,08	12,29	101,68	
	3	12,08	12,27	101,51	
Média				100,49	
DPR (%)				1,16	

*Concentração corrigida de acordo com o padrão utilizado.

Tabela 25 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de pravastatina adicionada ao placebo sódica por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, em triplicata.

Faixa de concentração percentual	Amostra	Concentração adicionada de pravastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração observada pravastatina ($\mu\text{g/ml}$)*	Recuperação (%)	Média (%)
60%	1	6,03	5,90	97,85	98,26
	2	6,03	5,92	98,10	
	3	6,03	5,96	98,83	
100%	1	10,06	10,02	99,67	98,83
	2	10,06	9,95	98,91	
	3	10,06	9,84	97,91	
140%	1	14,08	13,89	98,64	99,34
	2	14,08	14,10	100,14	
	3	14,08	13,97	99,24	
Média				98,81	
DPR (%)				0,80	

*Concentração corrigida de acordo com o padrão utilizado.

Tabela 26 - Resultados da exatidão do método aplicado à determinação de sinvastatina adicionada ao placebo por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol, em triplicata.

Faixa de concentração	Amostra	Concentração adicionada de sinvastatina ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração observada sinvastatina ($\mu\text{g/ml}$)*	Recuperação (%)	Média (%)
50%	1	3,99	3,92	98,31	98,56
	2	3,99	3,94	98,77	
	3	3,99	3,94	98,59	
100%	1	7,98	7,83	98,11	98,45
	2	7,98	7,88	98,77	
	3	7,98	7,86	98,49	
150%	1	11,97	11,75	98,13	98,62
	2	11,97	11,77	98,32	
	3	11,97	11,90	99,40	
Média				98,54	
DPR (%)				0,41	

*Concentração corrigida de acordo com o padrão utilizado.

As médias de porcentagens de recuperação encontradas para lovastatina (100,49%), para pravastatina sódica (98,81%) e para sinvastatina (98,54%) estão dentro da faixa especificada de 98,0% a 102,0% (BRASIL, 2003; GREEN, 1996) e o método pode ser considerado exato nas condições estudadas.

4.3.3.5 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os valores teóricos de LD e LQ estimados utilizando-se os valores de desvio padrão da resposta e de inclinação da curva analítica foram menores para lovastatina, 0,086 $\mu\text{g/mL}$ e 0,29 $\mu\text{g/mL}$ e, maiores para pravastatina sódica, 0,15 $\mu\text{g/mL}$ e 0,49 $\mu\text{g/mL}$, e 0,13 $\mu\text{g/mL}$ e 0,45 $\mu\text{g/mL}$ para sinvastatina.

4.3.3.6 Robustez

A robustez foi avaliada comparando-se os teores obtidos de seis amostras a 100% da concentração de trabalho em dois equipamentos diferentes. Os resultados estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 - Resultados obtidos para avaliação de robustez do método aplicado ao doseamento de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol.

Condição Amostra	Lovastatina		Pravastatina sódica		Sinvastatina	
	HP 8453	UV 1800	HP 8453	UV 1800	HP 8453	UV 1800
1	8,05	7,92	9,73	9,67	7,49	7,57
2	8,06	7,90	9,59	9,69	7,55	7,72
3	8,01	7,92	9,76	9,69	7,57	7,64
4	8,39	8,16	10,21	10,07	7,79	7,81
5	8,40	8,13	10,15	10,13	7,73	7,76
6	8,49	8,18	10,02	10,00	7,75	7,75
Média	8,234	8,035	9,91	9,88	7,65	7,71

A comparação das médias obtidas por meio do teste de Tukey após a análise de variância (ANOVA) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as médias de teores obtidas para lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina em dois equipamentos diferentes.

4.3.4 Comparação entre os métodos desenvolvidos: EDU e CLAE

Os resultados de teores de amostras, a 100% da concentração de trabalho, preparadas a partir de um mesmo *pool* de comprimidos de sinvastatina e analisadas pelos dois métodos desenvolvidos estão representados na Tabela 28.

Tabela 28 - Resultados comparativos para o doseamento de sinvastatina em comprimidos obtidos entre os métodos CLAE* e EDU, segunda ordem, λ 247 nm, metanol.

Massa de sinvastatina (mg)		
Amostra	CLAE	EDU
1	10,80	10,90
2	10,36	11,01
3	10,81	11,24
4	10,50	11,22
5	11,27	11,12
Média	10,73	11,10
DPR (%)	3,26	1,31

*Fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,5 mL/min, 30 °C, detecção UV em λ 238 nm.

O teste *t* realizado para comparação das médias de teor obtidos por meio dos métodos CLAE e EDU (segunda ordem, λ 247 nm, metanol) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as médias de teor obtidas por meio de análise realizada com os dois métodos propostos a 5% de significância. O teste de comparação dos métodos CLAE e EDU para lovastatina e pravastatina sódica não foi realizado.

5 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS E DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS DE SINVASTATINA

5.1 Material

5.1.1 Substâncias químicas e amostras

- Sinvastatina matéria-prima doada por Laboratório Globo Ltda. (São José da Lapa, MG), lote 2113002/2007, teor 99,2% declarado pelo fabricante Biocon Limited (Bangalore, Índia) e sinvastatina padrão de trabalho doado por Medley S/A Indústria Farmacêutica (Campinas, SP), lote 0080/00348, teor 99,1%, fabricante Biocon Limited (Bangalore, Índia).

5.1.2 Material e reagentes

- Água destilada e água ultrapurificada (Milli-Q Millipore, Milford, MA, EUA);
- carboximetilcelulose (Purifarma, São Paulo, SP);
- coluna cromatográfica de fase reversa LiChrospher 100 RP-C₈e de 250 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octilsilano (C₈) e tamanho de partícula 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- dieta hiperlipêmica: amido 27%, caseína 2%, colesterol 2%, colina 0,2%, mistura de sais 5%, mistura de vitaminas 0,8%, sacarose 27% e óleo de milho 20%;
- dispositivos filtrantes de celulose 15 mm; 0,45 µm (Minisart, Goettingen, Alemanha);
- excipientes ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, EUA), ácido cítrico (Henrifarma - São Paulo, SP), celulose microcristalina Microcel[®] MC102 (Blanver, Taboão da Serra, SP), dióxido de silício coloidal Aerosil[®] (Emelfar, São Bernardo do Campo, SP), estearato de magnésio (Ipiranga Química, Santos, SP), glicolato de amido sódico (Henrifarma, São Paulo, SP), hidróxitolueno butil (BHT) (Indukern, Osasco, SP), lactose Tabletose 100 (Ipiranga Química, Santos, SP), lauril sulfato de sódio (Pharmacopéia, Attivos Magistrais - Barueri, SP), polietilenoglicol 4000 e 6000 (Labsynth, Diadema, SP), polivinilpirrolidona K15 (Sigma-Aldrich, EUA) e talco (Proquímios, Bangu, RS);
- fitas reagentes para colesterol Acctrend (Roche[®], São Paulo, SP).
- membrana de celulose com diâmetro de 47 mm, 0,45 µm (Sartorius, Goettingen, Alemanha);
- solventes e reagentes grau analítico ou cromatográfico: acetonitrila (J. T. Baker, Philipsburg, MT, EUA), ácido fosfórico (Merck, Darmstadt, Alemanha), fosfato de sódio

monobásico (F. Maia Indústria e Comércio, Cotia, SP) e metanol (Tedia Company, Fairfield, Iowa, EUA);

- solução salina a 0,9%.

5.1.3 Equipamentos

- Aparelho de ultra-som MaxiClean 1400 (Unique[®], Indaiatuba, SP);
- aparelho para determinação de colesterol Accutrend GCT (Roche[®], São Paulo, SP);
- aparelho para determinação de densidade de pós Erweka SVM GWF;
- balança analítica BP210D com precisão de 0,01 mg (Sartorius, Goettingen, Alemanha);
- banho-maria 120/2 (Fanem[®], São Paulo, SP);
- banho-maria B.M.A 12 com 12 tubos de nessler (Thelga, Belo Horizonte, MG)
- calorímetro Modulate DSC 2910 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA);
- centrífuga Jouan B4i (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA);
- compressora rotativa com 10 punções (Riva Piccola, Aldershot, Inglaterra);
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência HP 1100 e equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA);
- desintegrador ZT3 (Erweka, Hamburg, Alemanha);
- difratômetro Geigerflex (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan);
- dissolutor DT80 (Erweka, Hamburg, Alemanha);
- durômetro TBH 30 (Erweka, Hamburg, Alemanha);
- espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) HP8453 com programa interno de diferenciação automático (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA);
- friabilômetro TA3R Boeckel e Co (Erweka, Hamburg, Alemanha);
- medidor de compressibilidade de pós GWF(Erweka, Hamburg, Alemanha);
- rotavapor Heating Bath B - 441 (Buchi Labortechnik, Flawil, Suíça).

5.2 Métodos

5.2.1 Desenvolvimento de dispersões sólidas de sinvastatina

As dispersões sólidas (DS) de sinvastatina foram preparadas com três carreadores poliméricos: PEG4000, PEG6000 ou PVP, em diferentes proporções de sinvastatina e polímero: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5. Foram preparadas, também, misturas físicas (MF) nas mesmas proporções, para fins de comparação.

As DS de sinvastatina com PVP foram preparadas pelo método de evaporação de solvente que consistiu em solubilizar o PVP e a sinvastatina em quantidade suficiente de etanol, levar a solução obtida ao rotavapor com banho a ± 58 °C até total eliminação do solvente com obtenção de um filme viscoso. A mistura obtida foi deixada em dessecador de sílica-gel até completa eliminação de resíduos de etanol e obtenção de produto sólido. A DS foi, então, pulverizada a pó fino, em gral de vidro.

As DS de sinvastatina com PEG4000 ou 6000 foram preparadas, em todas as proporções, por meio do método de fusão que consistiu em fundir o polímero em banho-maria a 58 ± 2 °C, incorporar a sinvastatina, gradualmente e sob constante agitação manual. Após a adição de sinvastatina ao PEG previamente fundido, as DS foram resfriadas em banho de gelo e pulverizadas a pó fino, em gral de vidro.

Adicionalmente, preparou-se uma DS de sinvastatina e PEG6000 na proporção de 1:5 pelo método misto “fusão-evaporação”. Nesse caso, a sinvastatina foi dissolvida em etanol, em seguida, acrescentou-se PEG6000 sólido e a mistura foi aquecida no rotavapor a 58 °C. Nessa temperatura ocorre a evaporação do solvente e fusão do carreador polimérico e formação de uma mistura homogênea. Após remoção do solvente e formação de uma mistura homogênea, o balão foi resfriado em congelador durante 10 minutos. A DS resultante foi pulverizada em gral de vidro.

5.2.2 Caracterização das dispersões sólidas

As DS foram caracterizadas por calorimetria diferencial exploratória e por difração de raios X de pó.

5.2.2.1 Difração de raios X de pó (DRXP)

Os padrões de difração de raios X (pó ou policristal) de sinvastatina, dos polímeros, das MF e das DS, nas proporções 1:1, 1:3 e 1:5, foram coletados com intervalo angular 2θ entre 5° e 50° , passo de $0,05^\circ$ e comprimento de onda $1,5418 \text{ \AA}$ (radiação $\text{CuK}\alpha$).

5.2.2.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A análise térmica da sinvastatina e suas DS e MF foi realizada por DSC com ajuste modulado de temperatura a $\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 s. A calibração do equipamento foi realizada utilizando-se safira. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidas a uma temperatura constante ($5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$) na faixa de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e utilizando nitrogênio como gás de purga ($50 \text{ mL}/\text{min}$).

5.2.3 Avaliação da solubilidade parcial de sinvastatina em DS

O teste de solubilidade foi realizado para avaliar o aumento de solubilidade da sinvastatina presente nas DS em relação à sinvastatina apenas. Para esse fim, quantidades de DS e de MF equivalentes a 4 mg de sinvastatina (correspondente a 5,3 vezes sua concentração de saturação em água) foram, exatamente, pesadas e adicionadas a 25 mL de solução tampão fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) $\text{pH } 7,40 \pm 0,20$. Após agitação magnética por 1 h , em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, as soluções foram filtradas em unidades filtrantes de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ e analisadas por espectrofotometria de absorção na região UV, em $\lambda 239 \text{ nm}$. O mesmo procedimento foi realizado para sinvastatina. A concentração de saturação da sinvastatina, após 1 h de teste e a quantidade de sinvastatina liberada a partir das DS e MF foram comparadas (AMBIKE *et al.*, 2005; PATEL e PATEL, 2008).

O teste foi realizado em triplicata para todas as amostras, utilizando solução tampão NaH_2PO_4 , $\text{pH } 7,40 \pm 0,20$ para ajuste do zero.

5.2.3.1 Curva analítica para avaliação da solubilidade da sinvastatina em DS

Para avaliação do aumento da solubilidade de sinvastatina em DS em relação à sinvastatina apenas, foi construída uma curva analítica pesando-se, exatamente, cerca de 10 mg de sinvastatina padrão de trabalho e transferindo para balão volumétrico de 100 mL . O volume

foi completado com solução tampão NaH_2PO_4 , pH 7,40 contendo LSS 0,3%. As diluições foram preparadas tomando-se alíquotas de 1,0, 2,5, 4,0, 5,5, 7,0 e 8,5 mL para balões volumétricos de 50 mL e completando-se o volume com a mesma solução. As concentrações finais obtidas foram 2,0, 5,0, 8,0, 11,0, 14,0 e 17,0 $\mu\text{g/mL}$. Todas as diluições foram feitas em triplicata e analisadas por espectrofotometria de absorção no UV, em λ 239 nm e utilizando solução tampão NaH_2PO_4 , pH 7,40 e LSS 0,3% para ajuste do zero.

5.2.4 Avaliação de degradação de sinvastatina em DS por CLAE

Para verificar possível degradação de sinvastatina durante o processo de preparo das DS ou MF, as mesmas foram analisadas pelo método desenvolvido para quantificação de estatinas por CLAE, descrito no item 4.3.2.

As amostras foram preparadas na concentração 28 $\mu\text{g/mL}$ de sinvastatina em ACN (70% da concentração de trabalho).

5.2.5 Desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos contendo DS de sinvastatina

Com base na avaliação da solubilidade e na avaliação de degradação de sinvastatina por CLAE descritos nos itens 5.2.3 e 5.2.4, respectivamente, foram selecionadas duas DS que proporcionaram maior liberação e menor degradação de sinvastatina durante o seu preparo para a fabricação de comprimidos na dosagem de 10 mg de sinvastatina.

Os comprimidos foram fabricados no LTF/FAFAR/UFMG, utilizando os excipientes e proporções apresentadas na Tabela 29 (mesma constituição dos placebos C e D, item 4.2.2.2).

Os comprimidos foram produzidos por compressão direta; os constituintes da formulação foram pesados e tamisados separadamente. Em seguida, procedeu-se a mistura de pós, adicionou-se o lubrificante e, finalmente, a mistura de pós foi comprimida.

Tabela 29 - Excipientes e proporções utilizadas na fabricação dos comprimidos contendo DS^a.

Constituição	Porcentagem (%)	
	Ácido ascórbico	0,05
Ácido cítrico	0,85	0,85
Aerosil	0,50	0,50
BHT	0,50	0,50
Celulose microcristalina	41,35	43,00
Estearato de magnésio	0,50	0,50
Glicolato de amido sódico	2,00	2,00
Lactose	41,00	37,75
Lauril sulfato de sódio	0,5	0,5
DS sinvastatina:PEG6000 (1:5)	b	15,00
DS sinvastatina:PVP (1:3)	10,10	b
Talco	1,00	1,00

^apeso teórico: 400 mg.

^bausente.

A fluidez da mistura de pós para a fabricação dos comprimidos com DS foi avaliada, indiretamente, pela determinação do índice de compressibilidade. As medidas de densidades aparentes (antes da compactação) e compactadas (após compactação) foram determinadas pesando-se quantidade de massa que ocupasse metade do volume de uma proveta de 100 mL. Realizou-se a medida do volume aparente ocupado pelo pó. A densidade aparente foi calculada dividindo-se a massa pesada pelo volume inicial ocupado. Em seguida, a proveta foi encaixada no aparelho e submetida a batidas até que o volume ocupado permanecesse constante (1.250 batidas a uma velocidade de 250 batidas/minuto). Após as batidas, o volume ocupado final foi medido para cálculo da densidade compactada (massa pesada/volume final ocupado). O índice de compressibilidade foi calculado conforme a equação (AULTON, 2005):

$$IC(\%) = \frac{Dc - Da}{Dc} \times 100,$$

em que: *IC (%)*, índice de compressibilidade em porcentagem; *Da*, densidade aparente; *Dc*, densidade compactada.

5.2.6 Controle de qualidade dos comprimidos contendo DS de sinvastatina

Os seguintes testes foram realizados para a avaliação da qualidade dos comprimidos desenvolvidos: determinação de peso, determinação da resistência mecânica por dureza e friabilidade, desintegração, doseamento e uniformidade de doses unitárias. Realizou-se, também o perfil de dissolução.

5.2.6.1 Determinação de peso

A determinação de peso foi realizada de acordo com o procedimento descrito no método geral V.1.1 da F. Bras. IV (FARMACOPÉIA, 1988). Pesaram-se individualmente 20 comprimidos e determinaram-se o peso médio e os desvios individuais.

5.2.6.2 Determinação de resistência mecânica e friabilidade

Os testes de resistência mecânica, dureza e friabilidade foram avaliados de acordo com os métodos gerais V.1.3.1 e V.1.3.2, respectivamente, de acordo com a F. Bras IV (FARMACOPÉIA, 1988). A dureza, medida em Newton, foi avaliada em 10 comprimidos submetidos à uma força aplicada diametralmente, capaz de quebrá-los. A friabilidade foi avaliada em 20 comprimidos submetendo-os à ação abrasiva gerada por 100 rotações no equipamento.

5.2.6.3 Desintegração

O teste de desintegração foi realizado de acordo com o método geral V.1.4 da F. Bras. IV (FARMACOPÉIA, 1988). Utilizaram-se 6 comprimidos para o teste. Cada comprimido foi colocado em um dos seis tubos de aparelho de desintegração, sob os discos de acrílicos. O meio de desintegração utilizado foi água destilada a 37 ± 1 °C. Os comprimidos foram observados durante todo o processo de desintegração e o tempo de desintegração foi registrado.

5.2.6.4 Doseamento

O método de doseamento utilizado para a quantificação dos comprimidos de DS de sinvastatina foi o método desenvolvido e validado por CLAE, descrito no item 4.2.2.

As amostras foram preparadas, em sextuplicata, conforme procedimento descrito no item 4.2.2.5 para preparação de amostras a serem quantificadas por CLAE, na concentração 40 µg/mL (100% da concentração de trabalho, em ACN).

5.2.6.5 Uniformidade de doses unitárias

O teste de uniformidade de conteúdo de doses unitárias foi avaliado pelo método uniformidade de conteúdo, de acordo com o método geral V.1.6 da F. Bras. IV (FARMACOPÉIA, 1996). O método utilizado para quantificação de estatinas foi aquele desenvolvido por CLAE (4.2.2). As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.2.5 a 100% da concentração de trabalho (40 µg/mL).

5.2.6.6 Perfil de dissolução

Os estudos de perfis de dissolução dos comprimidos desenvolvidos e do medicamento referência (Zocor® - 10 mg de sinvastatina) foram conduzidos em 900 mL de meio de dissolução e utilizando pás na velocidade de rotação 50 rpm por 60 minutos e 150 rpm por mais 15 minutos. Os meios de dissolução testados foram solução tampão NaH₂PO₄, pH 7,40 ± 0,20, a mesma solução tampão com LSS 0,3% ou com LSS 0,5%. Este último meio de dissolução é o meio preconizado na monografia de sinvastatina comprimidos da USP32 (THE UNITED, 2009). As amostras foram coletadas nos tempos: 5, 10, 15, 30, 60 e 75 minutos, sem reposição de meio.

Os perfis de dissolução foram realizados com seis comprimidos, em dois dias diferentes para os comprimidos desenvolvidos e, em apenas um dia para o medicamento referência quando utilizou-se a solução tampão pH 7,40 sem adição de tensoativo ou tampão com LSS 0,3%. No meio de dissolução tampão com LSS 0,5%, avaliou-se o perfil em apenas um dia. Alíquotas de 5 mL foram retiradas com o auxílio de pipeta volumétrica, filtradas por meio de seringa contendo unidade filtrante (poros de 0,45 µm) na extremidade. Após retirada de alíquota em 60 minutos, a velocidade das pás foi aumentada para 150 rpm por mais 15 minutos e a última alíquota foi realizada em 75 minutos.

As alíquotas foram analisadas pelo método de quantificação desenvolvido por EDU, descrito no item 4.2.3. Devido ao pequeno deslocamento no comprimento de onda provocado pelo meio de dissolução em relação ao metanol, utilizado com solvente na validação do método por EDU, as leituras foram realizadas em segunda derivada, λ 248 nm, ao invés de λ 247 nm.

A curva analítica para quantificação de sinvastatina liberada no meio de dissolução por EDU foi construída conforme descrito no item 5.2.3.1, entretanto, as leituras foram realizadas em segunda derivada, λ 248 nm.

Os valores de absorvância obtidos foram lançados na equação da reta analítica e expressos como porcentagem de liberação de sinvastatina. As curvas dos perfis foram construídas plotando-se a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo. Os valores de área sob a curva (ASC) e eficiência de dissolução (ED) foram calculados a partir das curvas de dissolução, no intervalo compreendido entre 0 e 60 minutos, pelo programa computacional GraphPad Prism Software Inc[®] versão 4 considerando a ASC total do retângulo igual a 6000%min. A ED foi calculada conforme a equação:

$$ED(\%) = \frac{ASC_{(t_0-t)}}{ASC_{(ret)}} \times 100,$$

em que: $ED(\%)$, eficiência de dissolução em porcentagem; $ASC_{(t_0-t)}$, área sob a curva de dissolução do tempo zero até um determinado tempo; $ASC_{(ret)}$, área do retângulo correspondente a 100% de dissolução no mesmo período de tempo.

5.2.7 Teste *in vivo*

Realizou-se teste *in vivo* para comparar a eficácia terapêutica de: a) sinvastatina, b) DS de sinvastatina e PEG6000 1:5, preparadas por meio do método misto fusão-evaporação, c) medicamento referência (Zocor[®]) e d) comprimidos fabricados com DS. O teste consistiu na avaliação da redução de colesterol plasmático em 30 camundongos da raça Swiss com 50 dias. O protocolo referente a esse estudo foi avaliado e aprovado pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA/UFMG) (**ANEXO A**).

O estudo foi delineado com base em estudos relatados na literatura que investigam outros efeitos da sinvastatina, além do efeito de redução de colesterol estabelecido (SACALIA *et al.*, 2001; CHOUDHURY *et al.*, 2004; CIBYCKOVA *et al.*, 2009) ou comparam o efeito da sinvastatina com extratos vegetais (LUO *et al.*, 2008). Há também descrito, um estudo

conduzido por Ambike e colaboradores (2005) que compara a eficácia terapêutica da sinvastatina e de uma DS de sinvastatina contendo PVP e aerosil na proporção de 1:2:2 em 12 ratos alimentados com óleo de coco, por meio de três grupos, controle, referência e teste. Inicialmente, os 30 animais receberam dieta hiperlipêmica por uma semana sem receberem nenhum tipo de tratamento. Após 7 dias, os animais foram divididos em 5 grupos com 6 animais cada, como mostrado na Tabela 30. Iniciou-se o tratamento dos animais com sinvastatina apenas e contida em diferentes formulações (medicamento referência, DS sinvastatina:PEG6000 1:5 ou comprimidos contendo DS pulverizados). A estatina, sob qualquer uma das formas, foi administrada, na dose 12 mg/kg, por gavagem oral, dispersa em solução de carboximetilcelulose (CMC) a 1% em solução salina. O tratamento foi conduzido diariamente, por uma semana. Durante todo o período de tratamento, os animais continuaram recebendo a dieta hiperlipídica. O colesterol total foi dosado aplicando de 3 a 4 gotas de sangue, obtido após pequeno corte na cauda dos camundongos, em fita reagente para colesterol. A leitura foi realizada em um aparelho sensível a colesterol. A dosagem de colesterol foi realizada 3 vezes durante todo o estudo, ou seja, no início, antes de começar a dieta hiperlipêmica, após a primeira semana com a dieta hiperlipêmica sem tratamento e, no final do estudo após os 7 dias de tratamento hipolipêmico.

Tabela 30 - Grupos de animais (n = 6) e tratamentos utilizados na comparação da eficácia terapêutica de sinvastatina sob formas diversas.

Grupo	Dieta/Tratamento
1 (controle)	Hiperlipêmica/veículo (CMC a 1% em solução salina)
2 (referência)	Hiperlipêmica/sinvastatina
3	Hiperlipêmica/DS de sinvastatina e PEG6000
4	Hiperlipêmica/Zocor®
5	Hiperlipêmica/comprimidos fabricados com DS

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Desenvolvimento de dispersões sólidas de sinvastatina

Com o objetivo de aumentar a solubilidade da sinvastatina e melhorar seu perfil de liberação foram manipuladas DS e MF constituídas de sinvastatina e PVP, PEG4000 ou PEG6000 como carreadores hidrofílicos nas proporções 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5. Preparou-se, também, DS de sinvastatina e PEG6000 (1:5) pelo método misto “evaporação-fusão” a fim de verificar a influência do método de preparo na solubilidade da estatina. O PEG6000 foi selecionado para o preparo dessa DS, pois já existe descrita na literatura DS de sinvastatina e PEG4000 (1:10) preparada por fusão ou pelo método de evaporação (PATEL e PATEL, 2008).

5.3.2 Caracterização das dispersões sólidas

5.3.2.1 Difração de raios X de pó (DRXP)

As análises por difração de raios X foram realizadas para avaliar possíveis alterações na estrutura cristalina da sinvastatina, forma cristalina ou amorfa dos constituintes, interações polímero-fármaco, ou o efeito de redução de partículas na dispersão sólida.

Os padrões de DRXP para a sinvastatina e para as suas respectivas DS e MF estão apresentados nas Figuras 28 a 33.

Dos diversos picos de difração da sinvastatina na forma cristalina, três são característicos nos padrões estudados, com valores de 2θ iguais a $8,10^\circ$, $9,60^\circ$ e $11,14^\circ$ (**Figura 28**). Estes auxiliam com clareza a confirmação da presença desse composto na forma cristalina. Os polímeros PEG4000 e 6000 também exibem padrão de difração típico de material cristalino (**Figura 29-a**), entretanto o padrão de difração de raios X para o PVP é típico de material amorfo, caracterizado pela completa ausência de picos de difração (**Figura 29-b**). A Figura 29 ilustra a sobreposição dos picos da sinvastatina com misturas físicas contendo 50% de PVP ou PEG6000.

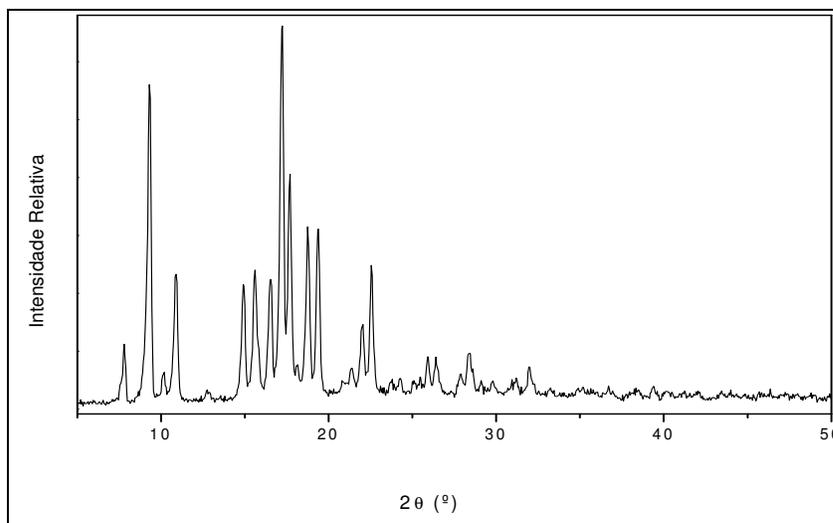


Figura 28 - Padrão de difração de raios X de pó para simvastatina.

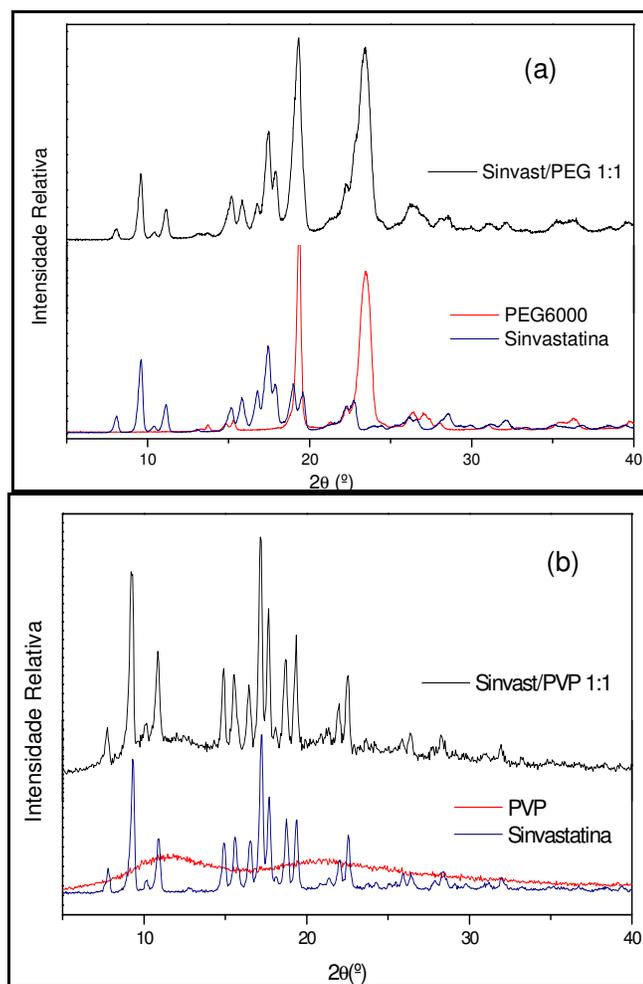


Figura 29 - Padrão de difração de raios X de pó para (a,b) simvastatina, para os polímeros (a) PEG6000, (b) PVP e para as respectivas MF (1:1, estatina:polímero).

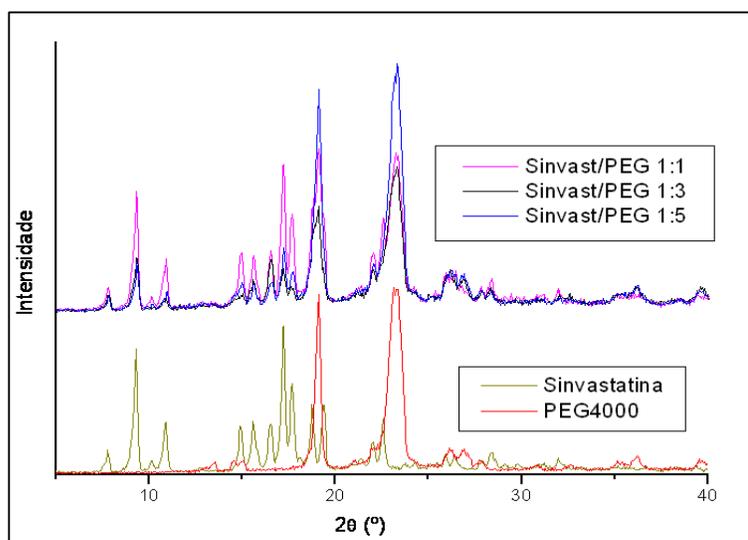


Figura 30 - Padrão de difração de raios X de pó para sinvastatina, PEG4000 e para DS de sinvastatina e PEG4000 (1:1, 1:3 e 1:5) preparadas pelo método de fusão.

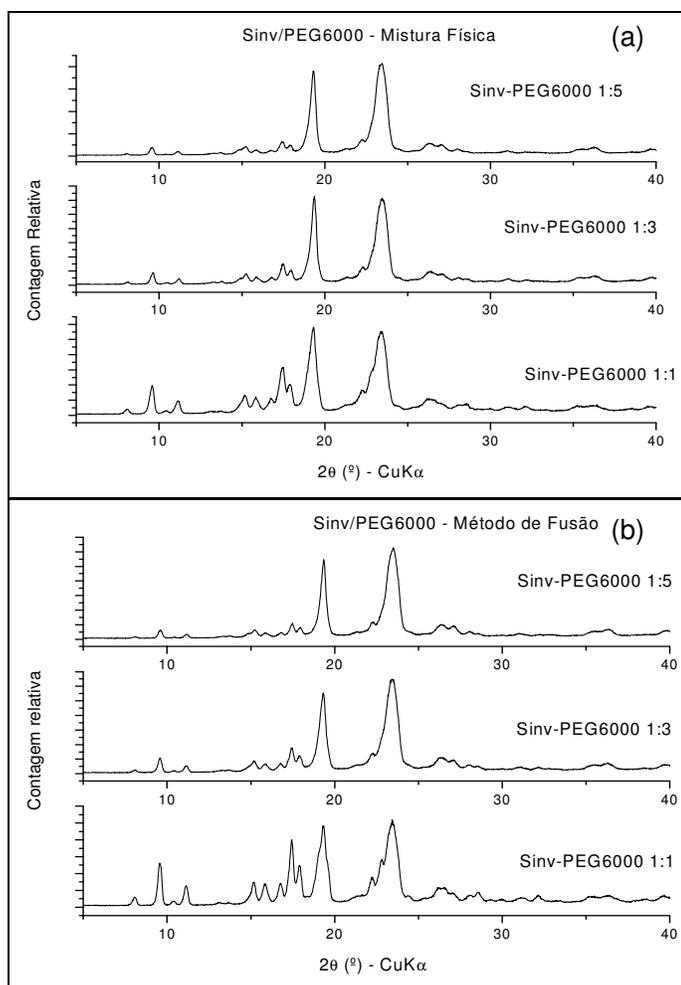


Figura 31 - Padrão de difração de raios X de pó para (a) MF de sinvastatina e PEG6000 e para (b) respectivas DS preparadas pelo método de fusão.

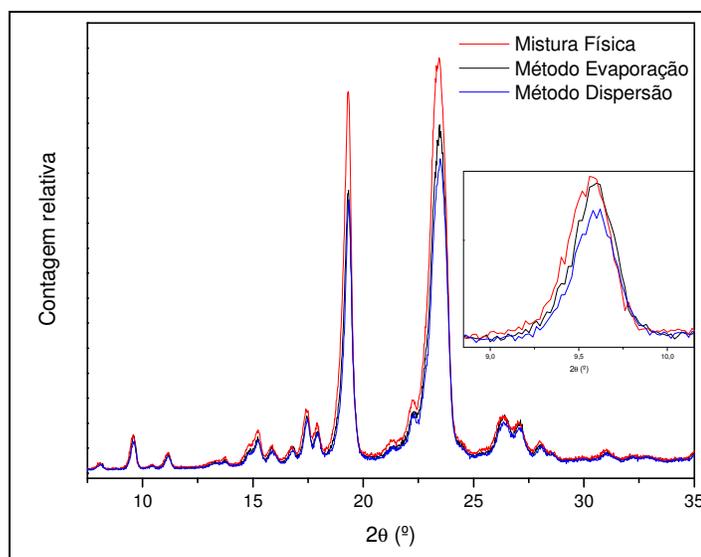


Figura 32 - Padrão de difração de raios X de pó para MF de sinvastatina e PEG6000 e para as respectivas DS preparadas pelo método de fusão (dispersão) e pelo método misto “fusão-evaporação”, na proporção 1:5 (estatina:polímero).

A análise dos padrões de DRXP das DS e MF de sinvastatina com PEG4000 ou 6000 (**Figuras 30 e 31**) revela apenas a coexistência das duas fases cristalinas em todas as amostras, sem diferenças nas posições dos máximos de difração. As diferenças de intensidades e largura dos picos de difração são pouco significativas, quando se compara as MF com as DS. Também, não se observa alterações nos padrões de DRXP entre as DS de sinvastatina e PEG6000 (1:5) preparadas pelo método de fusão e fusão-evaporação de solvente (**Figura 32**). Não foi possível confirmar a presença de sinvastatina na forma amorfa ou em interação com PEG.

Em diversos estudos (MOORE e WILDFONG, 2009; FORD, 1986, VASCONCELOS, 2007) relatam-se que um dos vários fatores que explicam o aumento da solubilidade do fármaco pode ser a redução do tamanho de partícula por meio da redução da energia necessária para a solubilização, favorecendo, assim a liberação do fármaco. Entretanto, no presente trabalho, não constatou-se alteração significativa da largura dos picos de sinvastatina e, portanto, não é possível concluir se houve redução do tamanho de partícula da sinvastatina após o tratamento de preparo das dispersões (**Figura 32**).

Os padrões de DRXP das MF preparadas com PVP K15 indicaram a presença de sinvastatina cristalina, com alteração somente na intensidade dos picos devido às diferentes proporções da estatina entre as preparações. Nas DS, os picos de difração da sinvastatina estão presentes na proporção 1:1 (estatina:PVP), mas, estão ausentes ou bastante

atenuados na DS 1:3 e 1:5 (**Figura 33**). Este fato indica que a estatina pode estar, em grande proporção, amorfa ou incorporada dentro da matriz polimérica. Resultados semelhantes também foram relatados por Patel e Patel (2008) para DS de sinvastatina e PVP K30 na proporção estatina:polímero de 1:10. Nesse estudo também foi relatada a presença de sinvastatina amorfa em uma DS preparada com PEG4000, pelo método de evaporação de solvente, na proporção 1:10 (estatina:polímero).

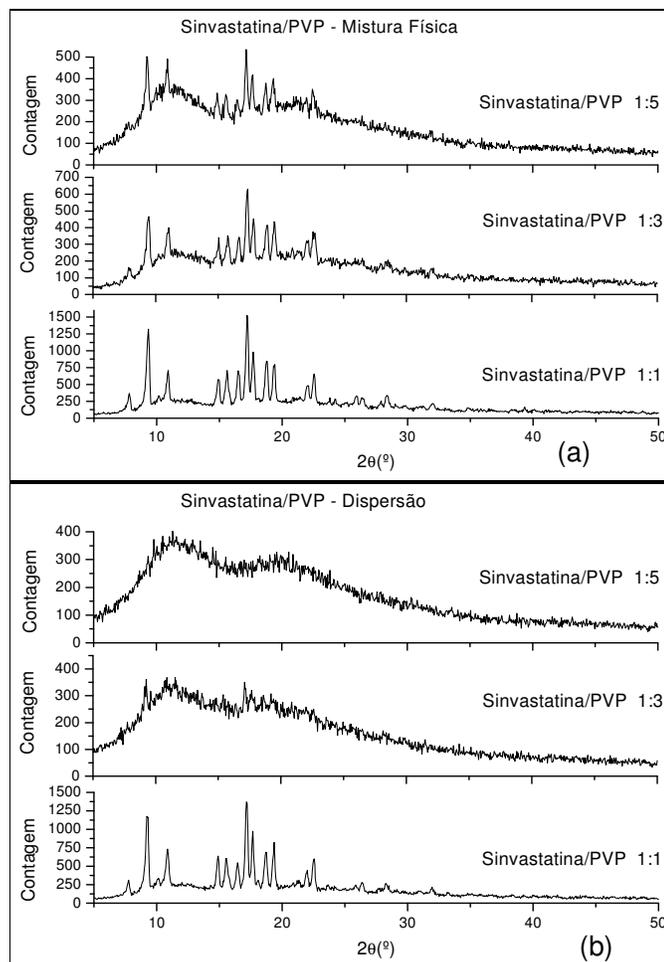


Figura 33 - Padrão de difração de raios X de pó para (a) MF de sinvastatina e PVP e para as respectivas (b) DS preparadas pelo método de fusão.

Para a confirmação da presença de sinvastatina como material amorfo seria necessária a caracterização por técnicas adicionais como a microscopia eletrônica, termomicroscopia e análise em conjunto para se chegar a uma conclusão.

5.3.2.2 Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

Pela análise das curvas DSC foi possível avaliar a cinética térmica do fármaco nas DS e nas MF e sua compatibilidade com os polímeros. As curvas DSC da sinvastatina e de suas DS e MF, nas proporções (sinvastatina:polímero) 1:1, 1:3 e 1:5 são apresentadas nas Figuras 34 a 40.

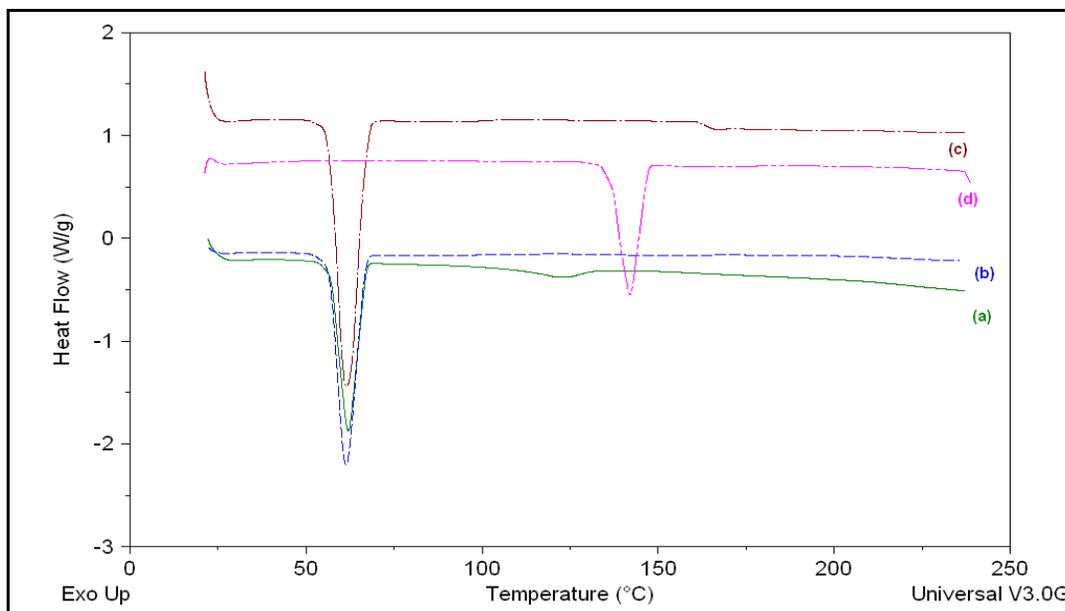


Figura 34 - Curvas DSC de (d) sinvastatina e suas misturas físicas com PEG4000 nas proporções (sinvastatina:PEG4000) (a) 1:1, (b) 1:3 e (c) 1:5.

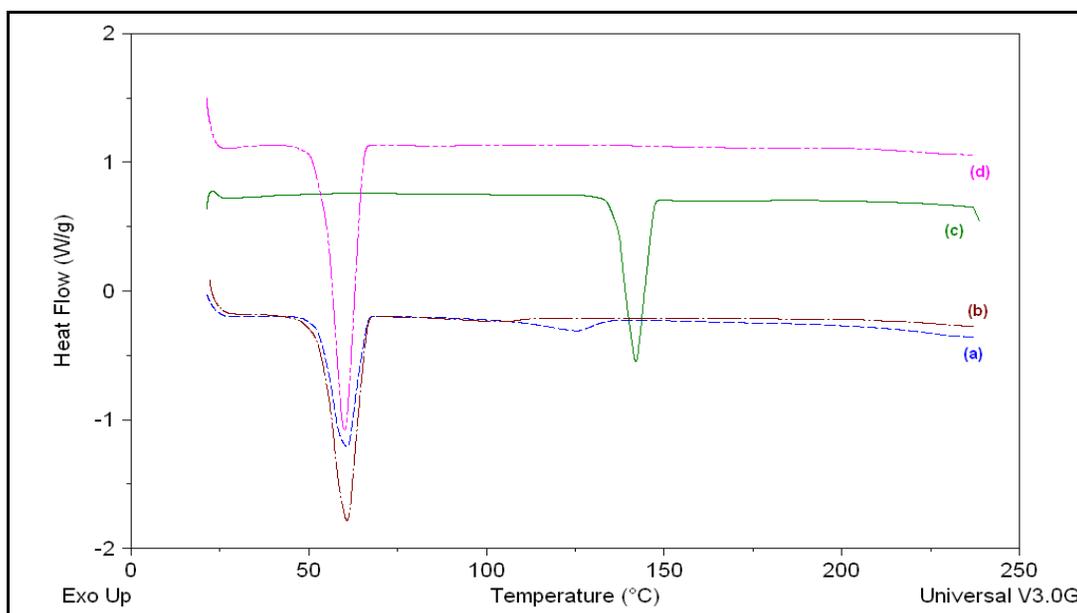


Figura 35 - Curvas DSC de (c) sinvastatina e suas dispersões sólidas com PEG4000 preparadas por meio do método de fusão, nas proporções (sinvastatina:PEG4000) (a) 1:1, (b) 1:3 e (d) 1:5.

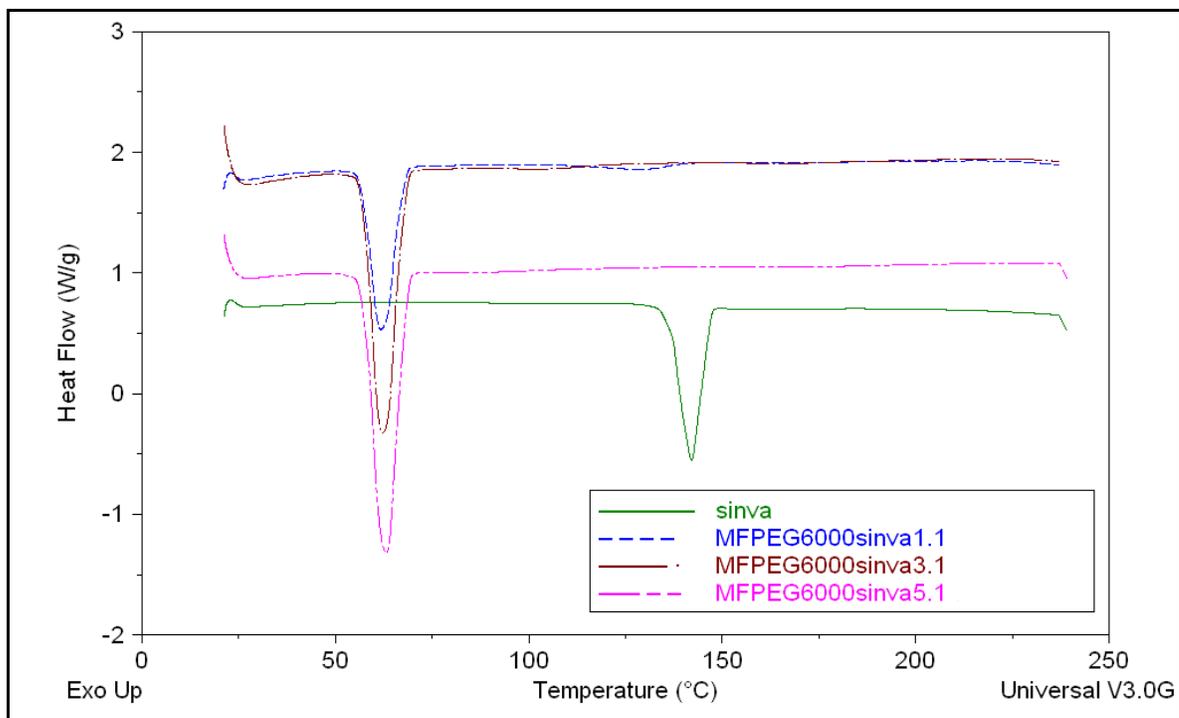


Figura 36 - Curvas DSC de simvastatina e suas misturas físicas com PEG6000 nas proporções (simvastatina:PEG6000) 1:1, 1:3 e 1:5.

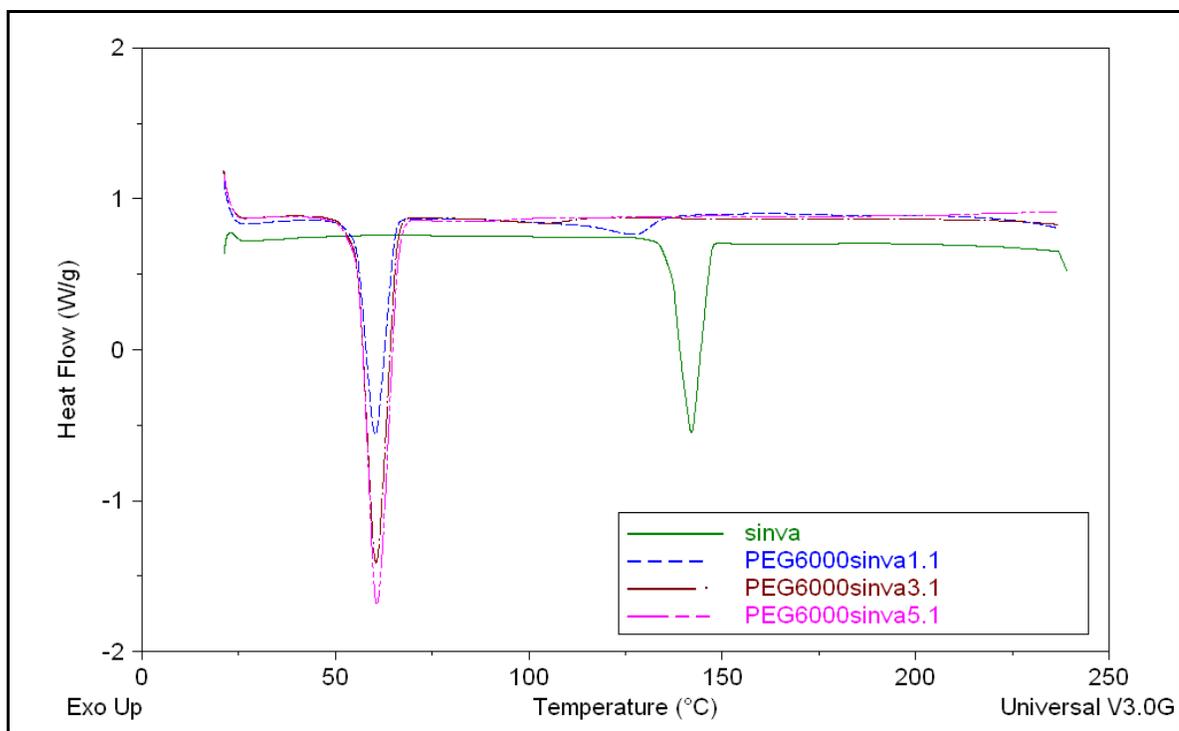


Figura 37 - Curvas DSC de simvastatina e suas dispersões sólidas com PEG6000 preparadas por meio do método de fusão, nas proporções (simvastatina:PEG6000) 1:1, 1:3 e 1:5.

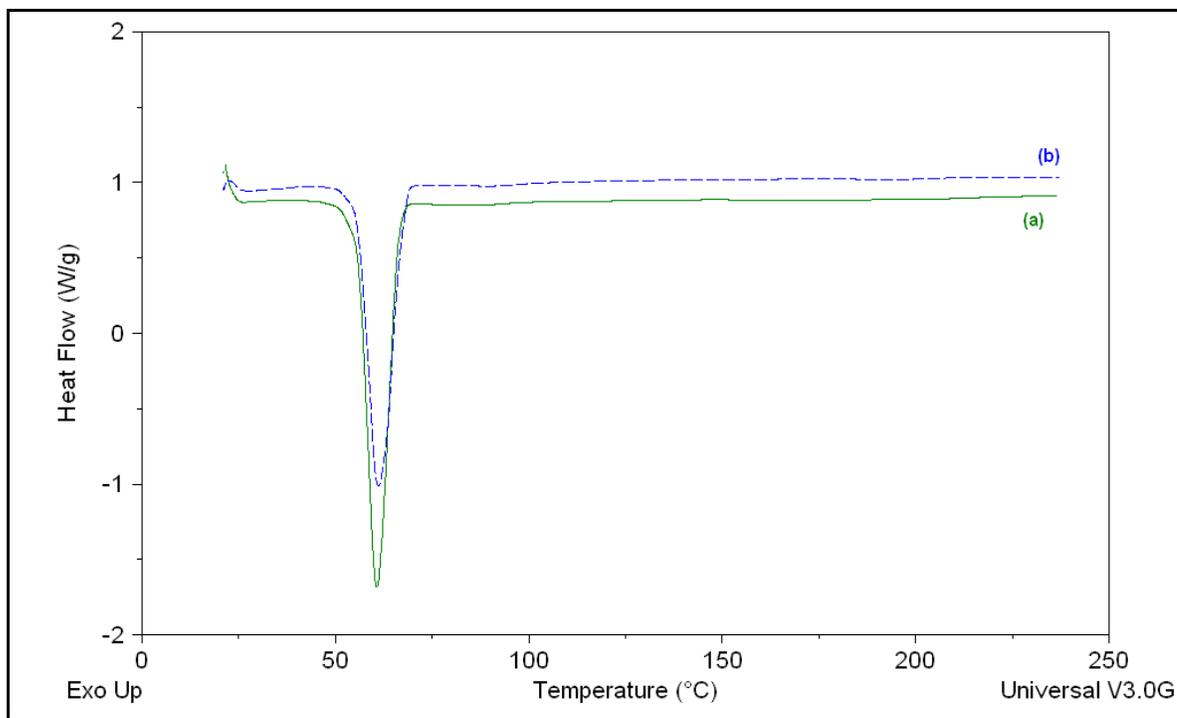


Figura 38 - Curvas DSC das DS de sinvastatina e PEG6000 preparadas por meio do (a) método de fusão e por meio do (b) método de fusão-evaporação de solvente, na proporção 1:5 (estatina:polímero).

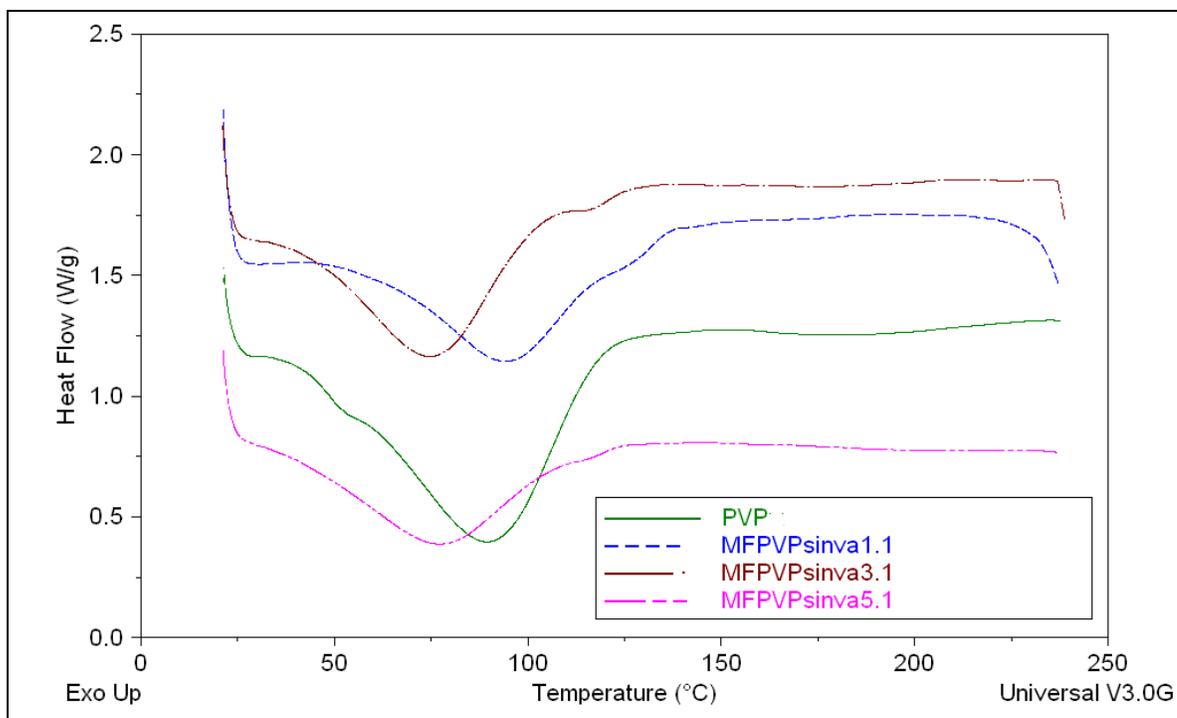


Figura 39 - Curvas DSC das misturas físicas de sinvastatina e PVP nas proporções (sinvastatina:PVP) 1:1, 1:3 e 1:5.

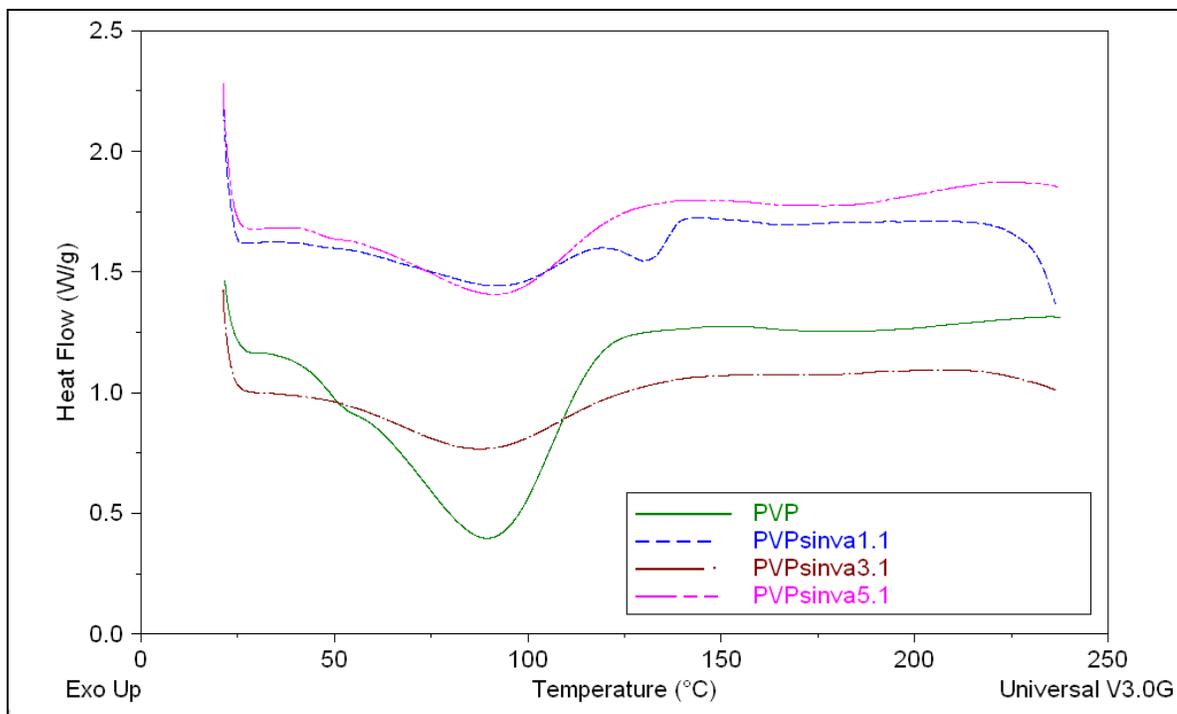


Figura 40 - Curvas DSC das dispersões sólidas de sinvastatina e PVP preparadas por meio do método de evaporação de solvente, nas proporções (sinvastatina:PVP) 1:1, 1:3 e 1:5.

A sinvastatina foi caracterizada por um pico endotérmico (fusão) em 142,5 °C com uma variação de entalpia (ΔH) de 706,5 J/g (**Figura 34 a 37**). As curvas DSC das DS e das MF com PEG4000 ou 6000 (**Figuras 34 a 38**), em todas as proporções, apresentaram pico endotérmico próximo a 60 °C correspondente a fusão dos polímeros. As curvas DSC das MF de sinvastatina e PEG4000 ou PEG6000 e das respectivas DS, na proporção 1:1, (**Figuras 34 e 36**) apresentaram pico de fusão da sinvastatina com deslocamento para temperaturas inferiores e uma redução significativa na entalpia de fusão conforme apresentado na Tabela 31. O evento endotérmico referente à fusão da sinvastatina não é observado nas curvas DSC das MF com PEG4000 e 6000, na proporção 1:3, na MF com PEG6000 na proporção 1:5 e, também, não está presente nas DS 1:3 e 1:5 com os dois polímeros (**Tabela 31**). Não houve diferença nas curvas de DSC das DS de sinvastatina com PEG6000 (1:5) preparadas por meio dos métodos de fusão e fusão-evaporação de solvente.

A ausência de pico de fusão de uma substância, em uma curva de DSC, pode indicar a existência da substância amorfa, como relatado previamente por Ambike e colaboradores (2005) e por Patel e Patel (2008). Entretanto, apesar do pico de fusão da sinvastatina estar ausente nas curvas DSC de algumas DS e MF preparadas com PEG4000 ou PEG6000 (**Tabela 31**), os resultados da caracterização das mesmas por DRXP (item 5.3.2.1) indicam

que a sinvastatina presente nesses materiais continua cristalina, apesar do tratamento realizado. Assim, a redução ou ausência do pico endotérmico característico da sinvastatina nas curvas DSC das preparações com PEG4000 ou PEG6000 estudadas pode ser devido ou a sua solubilização parcial ou total no polímero fundido ou a um efeito de diluição do fármaco.

O deslocamento do pico de fusão da sinvastatina observado nas curvas DSC de algumas DS e MF preparadas com PEG4000, 6000 ou com PVP pode ser indicativo de interações entre o polímero e a estatina, as quais poderiam favorecer a solubilização da sinvastatina em meio aquoso.

A curva DSC de PVP apresenta uma banda larga na faixa de 60 °C a 120 °C devido à perda de água (**Figuras 39 e 40**). Como observado para algumas MF e DS de sinvastatina e PEG4000 ou 6000, as curvas DSC das MF de sinvastatina e PVP nas proporções 1:1 e 1:3 e da DS 1:1 apresentaram pico de fusão da sinvastatina com deslocamento para temperaturas inferiores e uma redução significativa na entalpia de fusão (**Tabela 31**). O mesmo pico está ausente nas curvas DSC da MF 1:5 e das DS 1:3 e 1:5 (estatina:PVP). A ausência do pico de fusão da sinvastatina na curva DSC de DS 1:3 e 1:5 (estatina:PVP) confirma os resultados apresentados por DRXP (item 5.3.2.1), que revelam que a sinvastatina está presente na sua forma amorfa ou está incorporada dentro da matriz polimérica nessas DS. Entretanto, o mesmo não pode ser afirmado para a MF 1:5, que apesar da curva DSC não apresentar o pico endotérmico da sinvastatina, o seu espectro DRXP revela a presença de sinvastatina cristalina. Resultados semelhantes foram obtidos por Ambike e colaboradores (2005), os quais caracterizaram DS e MF de sinvastatina, aerosil e PVP (1:1:1 e 1:2:2), dentre outras técnicas, por DSC e por DRXP e relataram a ausência do pico de fusão da estatina nas curvas DSC e ausência de picos característicos de material cristalino nos padrões de DRXP para as DS.

Tabela 31 - Resultados obtidos para avaliação das DS e MF de sinvastatina por DSC.

Amostra	Sinvastatina	
	Temperatura de fusão (°C)	ΔH de fusão (J/g)
Sinvastatina	142,50	706,50
MF de Sinvastatina:PEG4000 (1:1)	124,74	83,37
MF de Sinvastatina:PEG6000 (1:1)	131,84	47,91
MF de Sinvastatina:PVP (1:1)	132,63	293,1
MF de Sinvastatina:PEG4000 (1:3)	a	a
MF de Sinvastatina:PEG6000 (1:3)	a	a
MF de Sinvastatina:PVP (1:3)	117,37	179,2
MF de Sinvastatina:PEG4000 (1:5)	152,10	212,2
MF de Sinvastatina:PEG6000 (1:5)	a	a
MF de Sinvastatina:PVP (1:5)	a	a
DS de Sinvastatina:PEG4000 (1:1)	126,69	91,13
DS de Sinvastatina:PEG6000 (1:1)	128,85	128,00
DS de Sinvastatina:PVP (1:1)	99,57	571,1
DS de Sinvastatina:PEG4000 (1:3)	a	a
DS de Sinvastatina:PEG6000 (1:3)	a	a
DS de Sinvastatina:PVP (1:3)	a	a
DS de Sinvastatina:PEG4000 (1:5)	a	a
DS de Sinvastatina:PEG6000 (1:5 – método de fusão)	a	a
DS de Sinvastatina:PEG6000 (1:5 – método de evaporação)	a	a
DS de Sinvastatina:PVP (1:5)	a	a

^anão observado.

Dispersões sólidas com fármacos amorfos apresentam a vantagem de favorecer a dissolução pelo aumento da superfície de contato, mas podem ser instáveis devido a cristalização gradual do fármaco durante o armazenamento e estocagem (FORD, 1986).

5.3.3 Avaliação da solubilidade parcial de sinvastatina em DS

Para investigar o aumento da dissolução das preparações em relação à sinvastatina, os valores de absorvância obtidos foram lançados na equação da reta analítica (5.3.2.3.1) e

calculada a quantidade de sinvastatina liberada no meio. A concentração de saturação de sinvastatina encontrada após 1 h de teste foi 3,03 µg/mL, determinada em sextuplicata (DPR 2,76%). Os resultados do teste, em triplicata, expressos em aumento porcentual da concentração de saturação para as preparações em relação à estatina, estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 - Aumento porcentual da concentração de sinvastatina liberada em solução tampão NaH₂PO₄ pH 7,40, a partir de DS e MF, após 1 h de teste de solubilidade parcial.

Aumento porcentual da concentração de sinvastatina (± s) ^a						
	PEG6000		PEG4000		PVP	
Método/proporção	MF	DS	MF	DS	MF	DS
Fusão/1:1	b	21,67 (0,06)	1,68 (0,02)	24,13 (0,03)	11,32 (0,03)	39,94 (0,0028)
Fusão/1:2	5,89 (0,01)	50,58 (0,02)	9,43 (0,04)	89,07 (0,06)	30,85 (0,01)	146,35 (0,05)
Fusão/1:3	17,82 (0,03)	46,63 (0,04)	34,25 (0,03)	91,23 (0,03)	60,38 (0,03)	305,04 (0,03)
Fusão/1:4	31,47 (0,06)	51,89 (0,05)	34,60 (0,01)	111,79 (0,0032)	108,42 (0,08)	251,56 (0,11)
Fusão/1:5	42,54 (0,06)	88,66 (0,07)	44,30 (0,04)	113,99 (0,04)	52,13 (0,02)	273,31 (0,20)
Misto/1:5		147,51 (0,01)		—		—

^adesvio padrão

^bnão observado.

Com os dados apresentados na Tabela 32, foram construídas as curvas ilustradas na Figura 41.

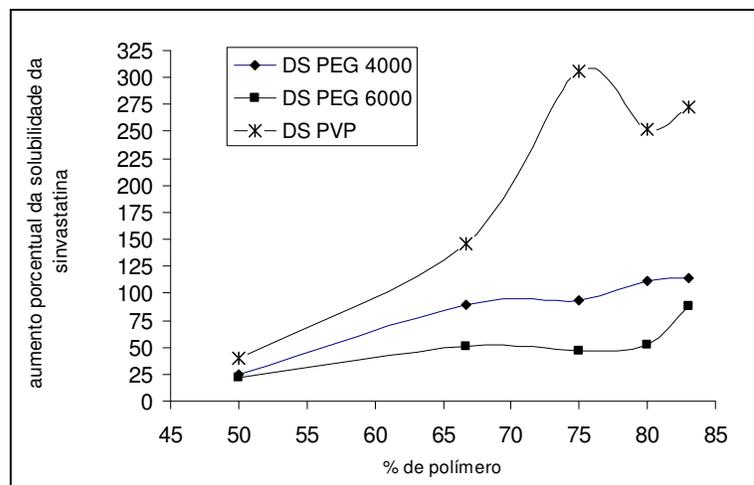


Figura 41 - Comparação do aumento de solubilidade da sinvastatina em DS preparadas com polímeros e proporções diferentes.

Pela análise dos resultados obtidos foi possível observar uma relação direta entre a proporção de polímero nas MF e DS com PEG4000 ou 6000 e a solubilidade da sinvastatina (**Tabela 32 e Figura 41**). Observa-se, também, que o aumento na solubilidade da sinvastatina é maior nas DS do que nas MF correspondentes, o que comprova que a formação de DS não se trata apenas de uma simples mistura entre fármaco e polímero.

O aumento da dissolução da sinvastatina a partir das DS com PEG4000 ou 6000 pode ser explicado pela formação de cristais de tamanhos reduzidos do fármaco ou a inibição de crescimento dos mesmos pela solução de alta viscosidade gerada pelos polímeros (FORD 1986; ANGUIANO-IGEA *et al.*, 1995).

Apesar dos resultados obtidos nas análises das DS com PEG4000 e 6000 por DRXP e DSC (itens 5.3.2.1 e 5.3.2.2) não revelarem nenhuma diferença significativa entre as mesmas, foi possível, por meio do teste de solubilidade, apontar a DS com PEG4000 como a mais eficaz no aumento da liberação de sinvastatina. Esse resultado pode ser explicado pela dissolução mais rápida do PEG de baixo peso molecular (PEG4000).

O efeito do tamanho da cadeia na solubilidade de fármacos pouco solúveis ainda não é totalmente conhecido e deve ser mais cuidadosamente investigado. A hipótese geral é que quanto menor o peso molecular do polímero mais rápida é a dissolução. Entretanto, há exemplos descritos na literatura em que a utilização de PEG de maior peso molecular aumentou a velocidade de dissolução de fármacos como clofibrato, meprobamato, sulfametoxidiazina e papaverina. Também há relatos na literatura de que o tamanho da

cadeia polimérica não influenciou na velocidade de dissolução (SALIB e EBIAN, 1978; DRAGUET-BRUGHMANS *et al.*, 1979; FORD 1986; ANGUIANO-IGEA *et al.*, 1995).

A DS sinvastatina:PEG6000 (1:5) preparada pelo método fusão-evaporação mostrou ser mais eficaz no aumento da liberação de sinvastatina (**Tabela 32**) em comparação com a mesma DS preparada pelo método de fusão. No método de fusão-evaporação, o fármaco dissolvido no solvente orgânico é totalmente miscível no polímero fundido, o que leva à formação de uma mistura mais homogênea, resultando em uma maior interação carreador-fármaco. Ao contrário, no método de fusão, uma parte considerável do fármaco não se dissolve no polímero fundido, o que dificulta a sua dispersão e, conseqüentemente, a formação de uma suspensão homogênea.

Para as MF e DS com PVP a concentração de saturação da sinvastatina aumenta somente até a proporção 1:4 e 1:3 (estatina:polímero), respectivamente (**Figura 41**). Esse dado sugere uma concentração ótima de PVP na DS na qual as interações polímero e sinvastatina são máximas. Uma avaliação mais detalhada utilizando quantidades de PVP superiores às investigadas, torna-se necessária para comprovação do exposto.

As DS preparadas com PVP apresentaram maior efeito na solubilidade da sinvastatina em relação às demais DS, observa-se um aumento de até 305% na concentração de estatina liberada (**Tabela 32 e Figura 41**). Esse aumento significativo pode ser explicado pela presença de sinvastatina como material amorfo conforme indicado pelos experimentos de DRXP ou incorporado dentro da matriz polimérica formando um complexo solúvel.

Vários estudos relatam que o PVP inibe a cristalização de fármacos em DS levando ao aparecimento de suas formas amorfas que são, geralmente, mais solúveis. Esse efeito do PVP pode ser explicado pela sua capacidade em formar ligações de hidrogênio com o fármaco (TAYLOR e ZOGRFI, 1997; MATSUMOTO e ZOGRFI, 1999; MOOTER *et al.*, 2001; SQUILLANTE e SETHIA, 2004; PATEL e PATEL, 2008).

As MF sinvastatina:PVP foram menos efetivas para o aumento da solubilidade do fármaco em comparação com as respectivas DS, em concordância com o que já foi discutido em relação às MF contendo PEG.

Os resultados do teste de solubilidade indicam que os fatores proporção de fármaco e polímero, método de preparo das DS e tipo de carreador polimérico são importantes na determinação da solubilidade do fármaco.

5.3.3.1 Curva analítica para avaliação da solubilidade de sinvastatina em DS

A equação da reta e o DPR da regressão obtidos para o teste de solubilidade por UV, λ 239 nm, em NaH_2PO_4 pH 7,40, foram $y = 0,0629x - 0,0018$ e 0,47%, respectivamente. O coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido, 0,9999, foi satisfatório ($r > 0,99$). O valor p da inclinação ($1,01 \times 10^{-34}$) foi significativo a 5% de probabilidade ($p < 0,05$), e, portanto, a resposta é linear na faixa de concentração estudada. O intercepto obtido não foi estatisticamente diferente de zero (valor p do intercepto igual a 0,21). A curva analítica resultante está apresentada na Figura 42.

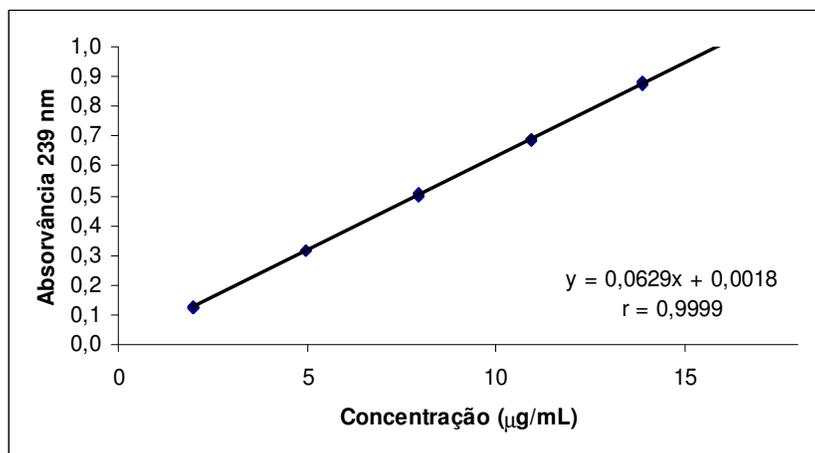


Figura 42 - Curva analítica para avaliação da solubilidade de sinvastatina por UV, λ 239 nm, em NaH_2PO_4 , pH 7,40.

5.3.4 Avaliação de degradação de sinvastatina em DS por CLAE

Verificou-se a possível degradação da sinvastatina após preparo das DS. O cromatograma da DS sinvastatina:PEG6000 (1:5), preparada pelo método misto “fusão-evaporação”, (correspondente a 28 $\mu\text{g/mL}$ de sinvastatina, em ACN) é apresentado na Figura 43.

As demais DS e respectivas MF com PEG4000 ou PEG6000 apresentaram cromatogramas semelhantes e não observaram-se picos referentes a produtos de degradação. Pela análise das DS de sinvastatina com PEG4000 ou 6000 preparadas pelo método de fusão ou pelo método de fusão-evaporação, foi possível confirmar que o processo de preparo das mesmas não acarretou em degradação da estatina e que não há incompatibilidades entre as substâncias.

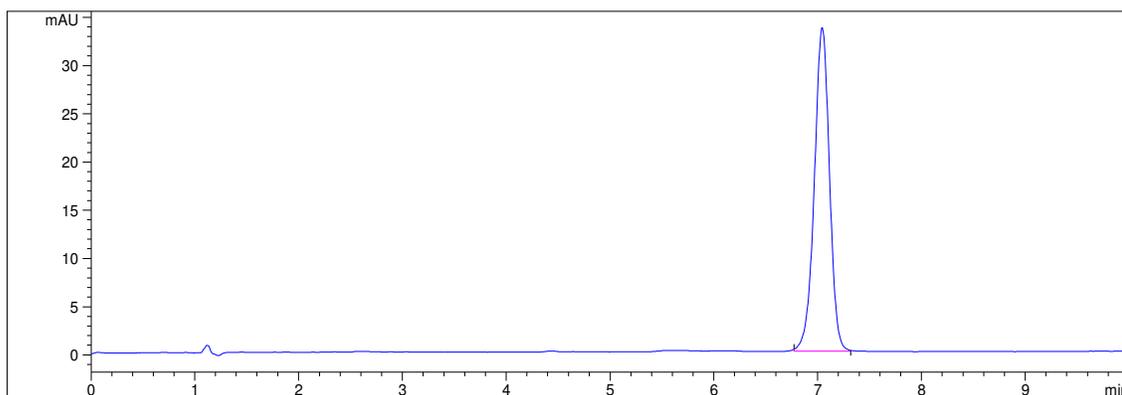


Figura 43 - Cromatograma da DS de simvastatina (pico principal, tr 7,215 min) e PEG6000 (1:5) preparada pelo método misto (fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,5 mL/min, 30 °C, detecção UV em λ 238 nm).

Os cromatogramas das DS de simvastatina:PVP 1:1, 1:3 e 1:5 (correspondente a 28 μ g/mL de simvastatina, em ACN) estão apresentados nas Figuras 44, 45 e 46, respectivamente.

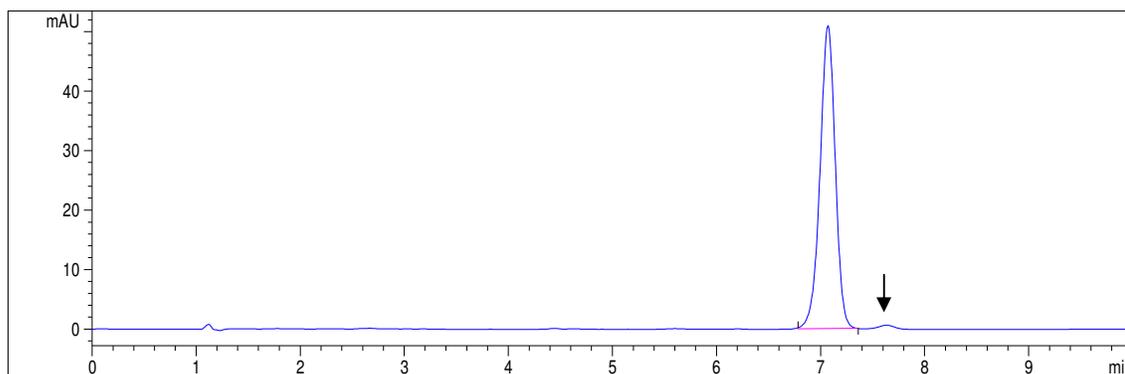


Figura 44 - Cromatograma da DS de simvastatina (pico principal) e PVP (1:1). A seta indica o pico referente a um produto de degradação (fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,5 mL/min, 30 °C, detecção UV em λ 238 nm).

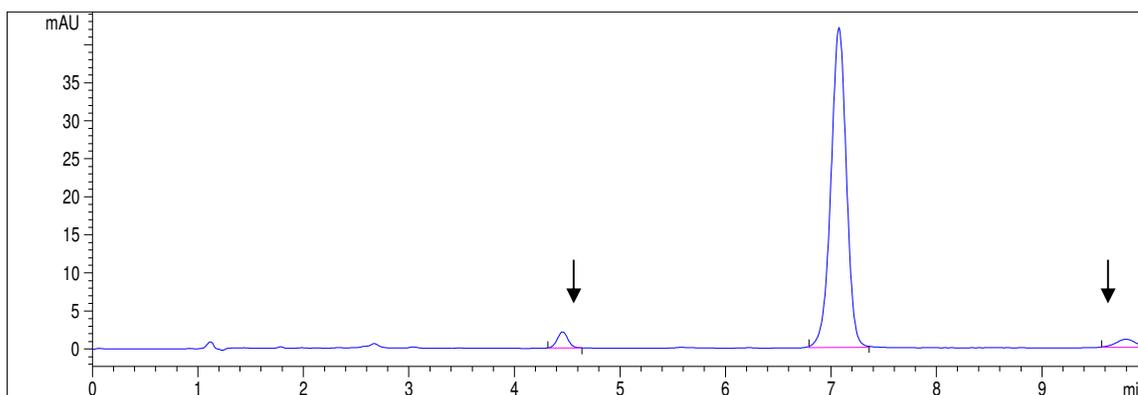


Figura 45 - Cromatograma da DS de simvastatina (pico principal) e PVP (1:3). As setas indicam picos referentes a produtos de degradação (fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,5 mL/min, 30 °C, detecção UV em λ 238 nm).

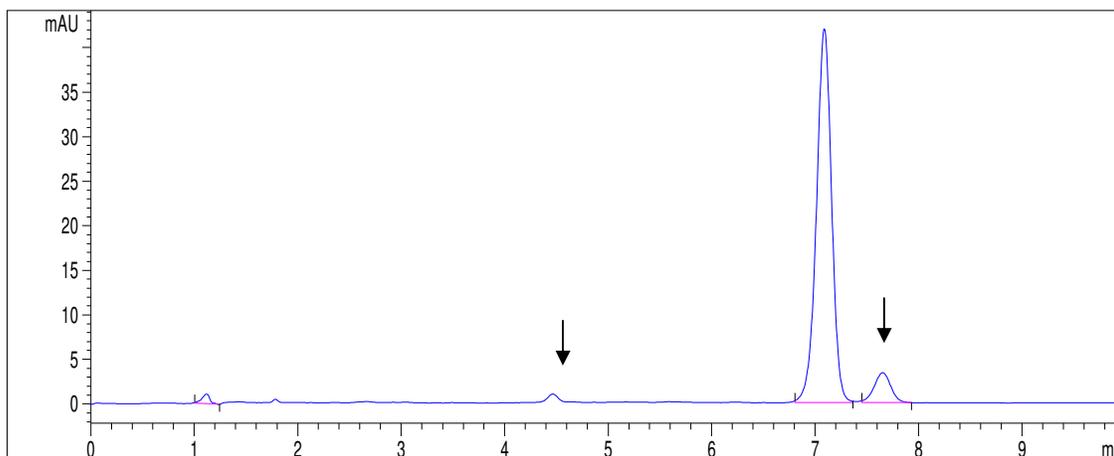


Figura 46 - Cromatograma da DS de sinvastatina (pico principal) e PVP (1:5). As setas indicam picos referentes a produto de degradação (fase móvel ACN:ácido fosfórico 0,1%, fluxo 1,5 mL/min, 30 °C, detecção UV em λ 238 nm).

Todas as DS de sinvastatina e PVP apresentaram picos referentes a produtos de degradação (**Figuras 44 a 46**). O cromatograma da DS 1:5 (estatina:PVP) apresentou o mesmo pico de degradação, próximo a 7,6 minutos, presente no cromatograma da DS 1:1 e um pico adicional próximo a 4,4 minutos (**Figura 46**) (possível hidroxiácido relatado no item 4.3.2.1). A DS 1:3 apresentou além do pico em 4,4 minutos, um pico em 9,7 minutos referente a um produto de degradação menos polar que a sinvastatina (**Figura 45**).

Em um estudo de degradação de lovastatina e sinvastatina conduzido por Yang e Hwang (2006) foi relatada a conversão das estatinas em suas formas hidroxiácidas e posterior formação de um éster metílico, menos polar que as correspondentes estatinas. O estudo foi conduzido por uma hora a 45 °C, em solução alcalina com porcentagens diferentes de metanol. A formação desses produtos de degradação aumentava com a concentração de metanol na solução alcalina. Com base nessas informações, acredita-se que os produtos de degradação menos polares que a sinvastatina, presentes nos cromatogramas das DS com PVP, podem ter sido formados após reação da estatina com etanol utilizado no preparo das mesmas (solubilização da sinvastatina e PVP em etanol e posterior evaporação do solvente a \pm 58 °C em rotavapor).

A área do produto de degradação encontrado no cromatograma da DS 1:1 (estatina:PVP) corresponde a menos que 1% da área da sinvastatina. O somatório dos dois produtos encontrados nas DS 1:3 e 1:5 correspondem a 6,81% e 10,46% da área de sinvastatina, respectivamente. Portanto, a degradação das DS contendo PVP foi crescente com o

aumento da quantidade de PVP. Esses resultados podem ser devido a volumes crescentes de etanol necessário para a solubilização do PVP durante o preparo das DS e, conseqüentemente maior tempo necessário para a evaporação do mesmo em rotavapor a uma temperatura elevada (± 58 °C), favorecendo a degradação. Além disso, a presença de PVP na DS parece ser importante para catalisar a formação desses produtos, já que na DS contendo PEG6000 preparada pelo método fusão-evaporação não detectou-se a formação de produtos de degradação. Entretanto, a possibilidade de incompatibilidade entre sinvastatina e PVP, independente da presença ou não de etanol, não pôde ser descartada. Um método comum para detectar possíveis incompatibilidades é por meio da análise da por DSC da MF fármaco-carreador. Nesse caso, pela análise das curvas DSC da mistura sinvastatina-PVP (item 5.3.2.2) não se observou a presença de eventos térmicos relacionados à formação de produtos de degradação. Esse resultado sugere que não há incompatibilidade direta entre os constituintes da DS e, portanto, é mais um indício de que a presença da mistura etanol-PVP é o fator que desencadeia a degradação do fármaco. Além disso, os cromatogramas das MF de sinvastatina com PVP não apresentaram nenhum pico adicional ao da sinvastatina.

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que apesar da maior solubilidade da sinvastatina nas DS preparadas com PVP, as mesmas apresentam a desvantagem de promover a degradação da sinvastatina, em relação às DS com PEG.

Esse estudo de avaliação de degradação das DS por CLAE não é relatado nos estudos conduzidos por Patel e Patel (2008) e por Ambike et al. (2005) nos quais DS de sinvastatina também são preparadas. Esses autores analisaram as DS por espectrofotometria no UV e, por meio dessa técnica, não é possível diferenciar a sinvastatina de seus produtos de degradação.

5.3.5 Desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos contendo DS de sinvastatina

Com base nos resultados da avaliação de solubilidade (5.2.3) e da avaliação de degradação das DS por CLAE (5.2.4), foram selecionadas, para utilização na preparação dos comprimidos, as DS que apresentaram maior aumento na solubilidade e menor tendência à degradação do fármaco.

Nenhuma das DS de sinvastatina com PEG6000 ou com PEG4000 apresentou degradação na avaliação por CLAE (5.2.4), entretanto observou-se uma maior solubilização da sinvastatina a partir da DS sinvastatina:PEG6000 (**Tabela 32**), na proporção 1:5, preparada por meio do método misto “fusão-evaporação”. Portanto, selecionou-se essa DS para fabricação de comprimidos.

Apesar da DS de sinvastatina:PVP (1:1) ter apresentado menor degradação na avaliação por CLAE, a mesma não resultou em um aumento significativo na solubilização do fármaco (**Tabela 32**). Portanto, foi selecionada a DS 1:3 que apresentou maior efeito positivo na solubilidade e menor degradação.

A fluidez das misturas de pós para a fabricação dos comprimidos com DS foi avaliada, indiretamente, por meio da determinação do índice de compressibilidade. A avaliação da fluidez é um parâmetro importante para a previsão do comportamento da mistura de pós durante a etapa de enchimento da matriz. Uma boa fluidez garante um preenchimento homogêneo e constante da matriz, resultando na formação de comprimidos com menor variação de peso e maior uniformidade de conteúdo. O índice de compressibilidade calculado para as misturas de pós contendo as DS de PEG6000 e PVP foi 16,0% e 21,0%, respectivamente.

Segundo Aulton (2005), a faixa de compressibilidade de 12% a 16% corresponde a um fluxo bom, comparável a grânulos de fluxo livre. A faixa de 18 a 21% corresponde a um fluxo escasso para grânulos, mas aceitável para pós. Portanto, a mistura de pós contendo a DS sinvastatina:PEG6000 apresentou um fluxo ideal. Ao contrário, o resultado da fluidez obtido para a mistura de pós contendo a DS sinvastatina:PVP está no limite da faixa considerada satisfatória.

5.3.6 Controle de qualidade dos comprimidos contendo DS de sinvastatina

5.3.6.1 Determinação do peso

Os resultados da determinação de peso médio e as variações obtidas para os comprimidos fabricados com DS de sinvastatina e PEG6000 (1:5) ou com PVP (1:3) estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33 - Resultados de peso médio^a e de variação para os comprimidos com DS de sinvastatina e PEG6000 ou PVP.

Comprimidos	DS sinvastatina:PEG6000	DS sinvastatina:PVP
Peso médio (n = 20)	411,2	405,4
Desvio (%)	-2,69 a 4,46	-7,14 a 6,96

^apeso médio teórico: 400,0 mg.

De acordo com a F. Bras IV (FARMACOPEIA, 1988), pode-se tolerar uma variação de peso com não mais que duas unidades fora do limite de $\pm 5,0$ % em relação ao peso médio (acima de 250 mg) e nenhuma unidade com desvio de $\pm 10,0$ %.

Os comprimidos com DS de sinvastatina e PEG6000 (1:5) apresentaram porcentagens de desvios em relação ao peso médio dentro do limite especificado pela F. Bras. IV (FARMACOPEIA, 1988). Entretanto, os comprimidos com DS de sinvastatina e PVP (1:3) apresentaram sete unidades com desvios superiores ao limite estabelecido. Essa grande variação de peso obtida para tais comprimidos pode ser explicada pela fluidez escassa encontrada (item 5.3.3) para a mistura de pós utilizada na preparação dos mesmos. Uma baixa fluidez pode acarretar em um preenchimento não uniforme das matrizes da compressora e, conseqüentemente, em grandes variações de peso.

5.3.6.2 Determinação de resistência mecânica e friabilidade

A dureza e a friabilidade são parâmetros importantes na avaliação da qualidade de formas farmacêuticas sólidas, indicativos da resistência a rupturas provocadas por golpes e à fricção durante os processos de revestimento, embalagem, transporte e armazenamento (FARMACOPÉIA, 1988).

O valor médio de dureza, sua variação e o resultado do teste de friabilidade para os comprimidos desenvolvidos estão apresentados na Tabela 34.

Tabela 34- Resultados obtidos para os testes de dureza (n=10) e friabilidade (n=20) para os comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG6000 ou PVP.

Comprimidos	Dureza (variação) (N)	Friabilidade (%)
DS sinvastatina:PEG6000	49,80 (47 a 60)	0,16
DS sinvastatina:PVP	58,30 (50 a 65)	0,02

De acordo com a F. Bras. IV, a dureza mínima aceitável é 30 N e a perda máxima de pó é 1,5% relativa ao valor do peso inicial, (FARMACOPEIA, 1988). Os comprimidos desenvolvidos apresentaram valor médio de dureza superior ao limite mínimo especificado e perda de pó inferior ao limite máximo estabelecido.

5.3.6.3 Desintegração

O limite de tempo estabelecido pela F. Bras. IV como critério geral para o teste de desintegração de comprimidos é de 30 minutos em água (FARMACOPEIA, 1988). Todos os comprimidos avaliados apresentaram tempo de desintegração inferior a 5 minutos.

5.3.6.4 Doseamento

Os comprimidos de sinvastatina devem conter no mínimo 90,0%, e, no máximo 110,0% da quantidade declarada conforme a monografia do produto descrita na USP32 (THE UNITED, 2009). Os resultados de teor para os comprimidos preparados com DS sinvastatina:PEG6000 ou PVP estão apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 - Resultados obtidos no doseamento de sinvastatina por CLAE a partir dos comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG6000 ou PVP, em sextuplicata.

Comprimidos		
	DS com PEG6000	DS com PVP
Teor (% VR ^a)	102,96 ^b	88,09 ^b
Variação (% VR ^a)	100,14 a 104,56 ^b	83,34 a 93,66 ^b

^avalor rotulado.

^bfaixa especificada (USP32): 90,0% a 110,0% VR.

O teor médio obtido para os comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG6000 estão de acordo com os limites especificados na monografia de sinvastatina comprimidos (THE UNITED, 2009). Entretanto, o teor médio encontrado para os comprimidos com DS de PVP está fora da faixa especificada na monografia (90,0 a 110,0% VR). A variação de teor encontrada para os comprimidos com DS de PVP foi maior do que a variação encontrada para os comprimidos preparados com DS de PEG6000 (**Tabela 35**).

O baixo teor de sinvastatina obtido nos comprimidos com DS de PVP pode ser explicado pela degradação da estatina que ocorre durante a fabricação da DS de sinvastatina com PVP (item 5.3.4).

5.3.6.5 Uniformidade de doses unitárias

Os resultados de teor (%VR, n = 10) encontrados para o teste de uniformidade de conteúdo para os comprimidos desenvolvidos estão apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 - Porcentagens de valor rotulado para o teste de uniformidade de conteúdo dos comprimidos preparados com DS sinvastatina e PEG6000 ou PVP.

Comprimidos	Uniformidade de conteúdo (%VR)	DPR (%)
DS sinvastatina:PEG	86,78 a 104,22	5,43
DS sinvastatina:PVP	81,26 a 98,68	6,69

De acordo F. Bras. IV, o produto passa no teste de uniformidade de conteúdo se a quantidade do fármaco em cada um das 10 unidades testadas estiver entre 85,0% e 115,0% VR e o DPR for menor ou igual a 6,0%. Se uma unidade estiver fora da faixa compreendida entre 85,0% e 115,0% VR e nenhuma estiver fora da faixa de 75,0% a 125,0% VR, ou se ambas as condições foram observadas, testar mais 20 unidades. O produto passa no teste se não mais que uma unidade em 30 estiver fora da faixa entre 85,0% e 115,0% VR e nenhuma unidade estiver fora da faixa entre 75,0% a 125,0% VR e, o DPR das 30 unidades testadas não exceder 7,8% (FARMACOPÉIA, 1988).

Os valores de porcentagem de VR e DPR encontrados para os comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PEG testados estão de acordo com os limites especificados na F. Bras. IV. Entretanto, os comprimidos com DS de PVP não passaram no teste, pois duas

unidades estavam fora da faixa especificada e o DPR encontrado foi maior que 6,0% (**Tabela 36**).

Os resultados obtidos, em desacordo com as especificações, nos testes de determinação de peso, de doseamento e de uniformidade de conteúdo para os comprimidos de DS de sinvastatina com PVP eram esperados devido à degradação da sinvastatina durante o preparo da DS e devido à baixa compressibilidade e fluidez da mistura de pós utilizada na preparação de tais comprimidos.

5.3.6.6 Perfil de dissolução

Os estudos de dissolução são ferramentas importantes para prever a performance *in vivo*, para assegurar a qualidade lote a lote de medicamentos, para o desenvolvimento e seleção de novas formulações e para assegurar a contínua qualidade e *performance* do medicamento depois de certas alterações na formulação ou no processo de fabricação (U.S. FOOD, 1997; MANADAS, 2002).

Para o processo de desenvolvimento e seleção de novas formulações deve-se trabalhar com condições que apresentam poder discriminativo e que sejam capazes de apontar diferenças entre as formulações. No caso de fármacos pouco solúveis como a sinvastatina, pode ser necessária a adição de surfactantes para favorecer a solubilização. Embora a concentração de surfactante seja adequada para o propósito de controle de qualidade do produto, isso claramente, não é suficiente para prever sua dissolução *in vivo*. Há necessidade de mais pesquisas para o desenvolvimento uniforme de meios de dissolução que mimetizem as condições fisiológicas (YU *et al.*; 2002; PHARMACOPEIAL, 2004).

Para avaliação dos perfis de dissolução, além dos parâmetros mais freqüentes como a determinação do tempo necessário para dissolução uma fração do teor rotulado e a determinação da fração liberada após um período de tempo pré-estabelecido, a ASC e a porcentagem de ED também são parâmetros úteis, uma vez que determina-se não apenas a quantidade liberada ao fim de um determinado tempo, mas também a cinética de liberação (MANADAS, 2002).

A curva analítica para quantificação de sinvastatina liberada no meio de dissolução (solução tampão de fosfato de sódio monobásico pH 7,40 com 0,3% de LSS) por EDU (2ª derivada, λ 248 nm) está apresentada na Figura 47.

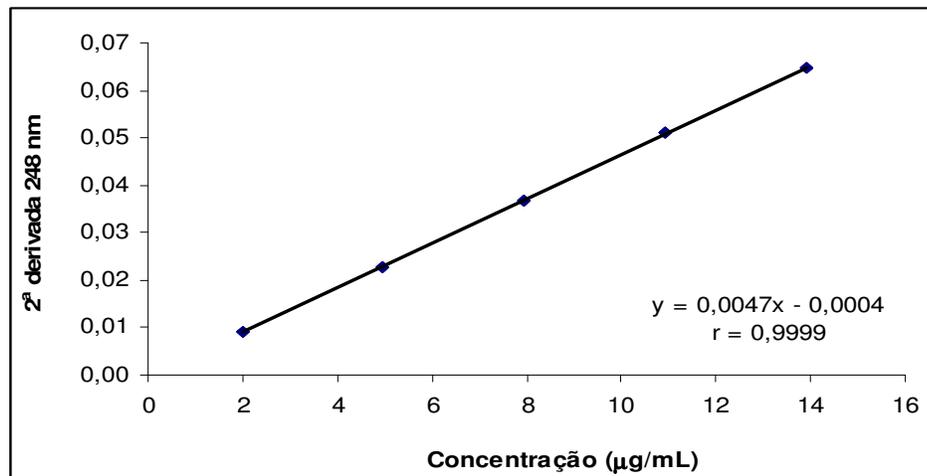


Figura 47 - Curva analítica para avaliação do perfil de dissolução da sinvastatina por EDU (2ª derivada, λ 248 nm, solução tampão de fosfato de sódio monobásico pH 7,40 com 0,3% de LSS).

A equação da reta e o DPR da regressão obtidos para o perfil de solubilidade foram $y = 0,0047x - 0,0004$, 0,40%, respectivamente. O coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido, 0,9999, foi satisfatório ($r > 0,99$). O valor p da inclinação ($2,07 \times 10^{-29}$) foi significativo no nível de 5% de significância, indicando que a resposta é linear na faixa de concentração estudada. O intercepto obtido foi significativo (valor p do intercepto igual a 0,0008), porém corresponde a, apenas, 0,97% da resposta média da concentração de trabalho. Em uma revisão sobre validação realizada por Green (1996), recomenda-se que o valor de intercepto, quando o mesmo é significativo, corresponda a menos que 2,0% da resposta média alvo.

Os limites de detecção e quantificação obtidos para a equação da reta estimados de acordo com a fórmula apresentada no item 4.2.2.6 foram 0,057 µg/mL e 0,174 µg/mL.

Os perfis de dissolução foram realizados em tampão fosfato, pH 7,40, sem adição de LSS no meio, a fim de verificar o efeito da DS no aumento da solubilidade da sinvastatina, sem a interferência do tensoativo que, por si só, já facilitaria a dissolução. Os perfis de dissolução foram realizados, também, em solução tampão com acréscimo de 0,3% ou 0,5% de LSS para verificar possíveis diferenças nas porcentagens de estatina dissolvida entre as duas concentrações de tensoativo.

Para os comprimidos preparados com DS de sinvastatina e PVP foi realizado o perfil de dissolução apenas em tampão fosfato, pH 7,40 com 0,3% de LSS, sem o acréscimo de 15 minutos com velocidade das pás elevada por 15 minutos. A avaliação completa do perfil de dissolução nos outros dois meios diferentes (tampão com 0,3% de LSS e com 0,5% de LSS)

não foi realizada, uma vez que os comprimidos preparados estavam em desacordo com os testes de determinação de peso, doseamento e uniformidade de conteúdo.

Os resultados de porcentagem dissolvida de sinvastatina nos diferentes tempos e a curva do perfil de dissolução nos três meios estudados estão apresentados nas Tabelas 37 e 38 e nas Figuras 48 a 50, respectivamente.

Tabela 37 - Resultados^a das porcentagens de liberação de sinvastatina, em tampão pH 7,4, sem adição de tensoativo, por EDU, 2^a ordem, λ 248 nm.

% média sinvastatina dissolvida (DPR %)						
	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	75 min
Comprimidos DS sinvastatina:PEG6000 (n = 12)	1,91 (21,59)	3,15 (19,94)	4,14 (17,35)	6,11 (18,66)	9,17 (17,25)	12,68 (21,17)
Zocor® (n = 6)	b	2,04 (29,19)	3,02 (13,90)	3,87 (19,73)	4,25 (9,75)	4,97 (3,98)

^a condições: pás, 50 rpm de 0 a 60 minutos e 150 rpm de 60 minutos a 75 minutos.

^b valor abaixo do limite de quantificação.

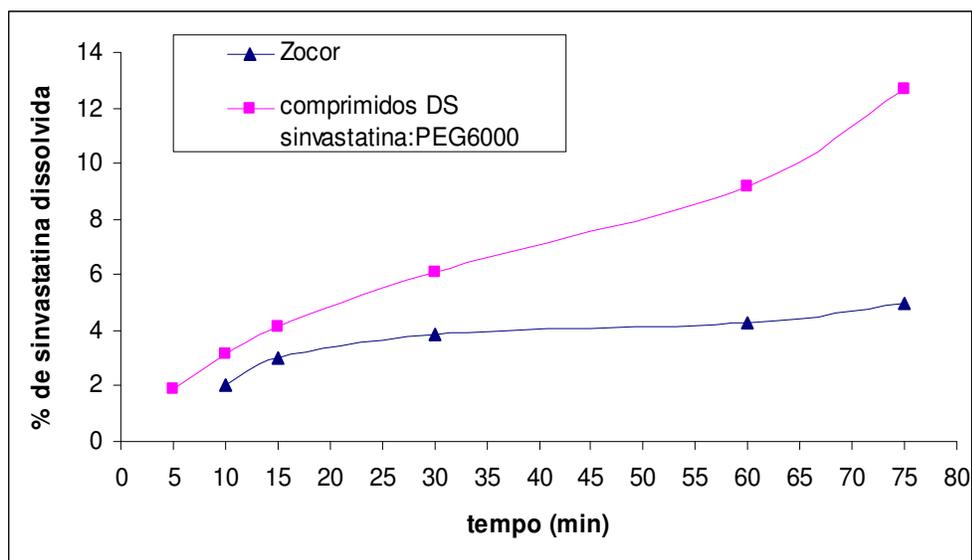


Figura 48 - Curva de perfil de dissolução dos comprimidos preparados com DS sinvastatina:PEG6000 (10 mg) e do Zocor® (10 mg), em tampão de NaH₂PO₄ pH 7,40, sem adição de LSS.

Tabela 38 - Resultados^a das porcentagens de liberação de sinvastatina, em tampão NaH₂PO₄ pH 7,40 com 0,3% de LSS ou com 0,5% de LSS.

% média sinvastatina dissolvida (DPR %)					
Tempo (min)	Comprimidos DS sinvastatina:PEG6000		Comprimidos DS sinvastatina:PVP	Zocor®	
	LSS 0,3% (n = 12)	LSS 0,5% (n = 6)	LSS 0,3% (n = 6)	LSS 0,3% (n = 6)	LSS 0,5% (n = 6)
5	13,64 (14,14)	13,34 (24,19)	12,16 (7,86)	11,70 (64,17)	14,50 (24,03)
10	23,03 (10,17)	23,51 (14,46)	22,70 (4,08)	58,21 (18,72)	60,10 (14,76)
15	30,36 (10,81)	33,47 (11,87)	30,96 (1,86)	83,91 (6,79)	84,57 (5,28)
30	49,49 (16,26)	49,73 (11,6)	51,02 (4,85)	90,41 (1,53)	92,37 (2,29)
60	79,88 (14,26)	83,56 (20,11)	77,30 (3,72)	91,16 (3,02)	93,74 (1,66)
75 ^b	95,77 (5,88)	105,25 (9,50)	b	91,36 (1,47)	93,55 (1,09)

^a condições do perfil de dissolução conforme descrito na Tabela 37.

^b etapa não realizada para os comprimidos DS sinvastatina:PVP.

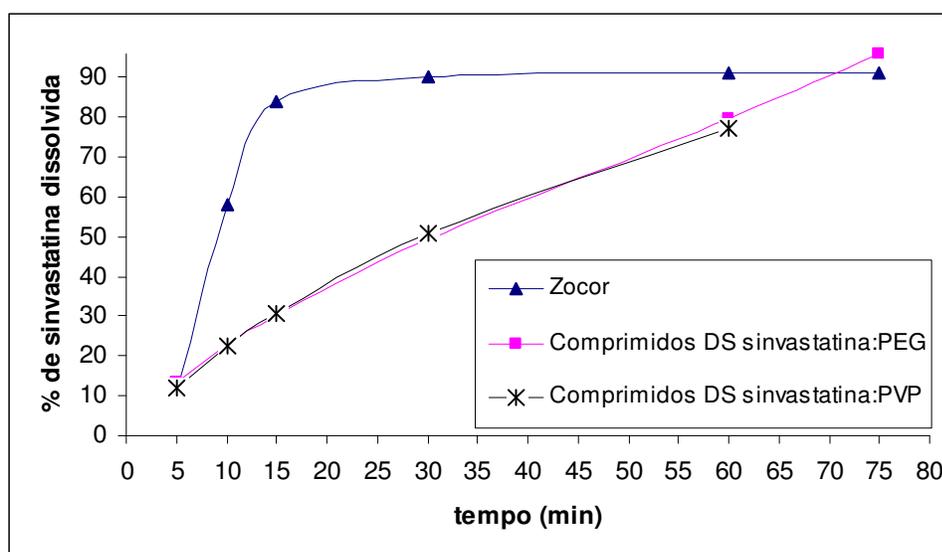


Figura 49 - Curva de perfil de dissolução de comprimidos preparados com DS de PEG ou PVP e do Zocor® (10 mg), em tampão de NaH₂PO₄ pH 7,40 com 0,3% de LSS.

Os resultados de ASC e ED estão apresentados na Tabela 39.

Tabela 39 - Resultados de ASC e porcentagem de ED dos perfis de dissolução calculados de 0 a 60 minutos de comprimidos contendo sinvastatina (10 mg).

	Comprimidos DS sinvastatina:PEG			Comprimidos DS sinvastatina:PVP	Zocor®		
	1	2	3	2	1	2	3
ASC	341,7	2799,0	2891,0	2791,0	196,3	4590,0	4703,0
ED (%)	5,69	46,65	48,18	46,52	3,27	76,50	78,38

1: Tampão NaH_2PO_4 pH 7,40, sem adição de tensoativo.

2: Tampão com 0,3% de LSS.

3: Tampão com 0,5% de LSS.

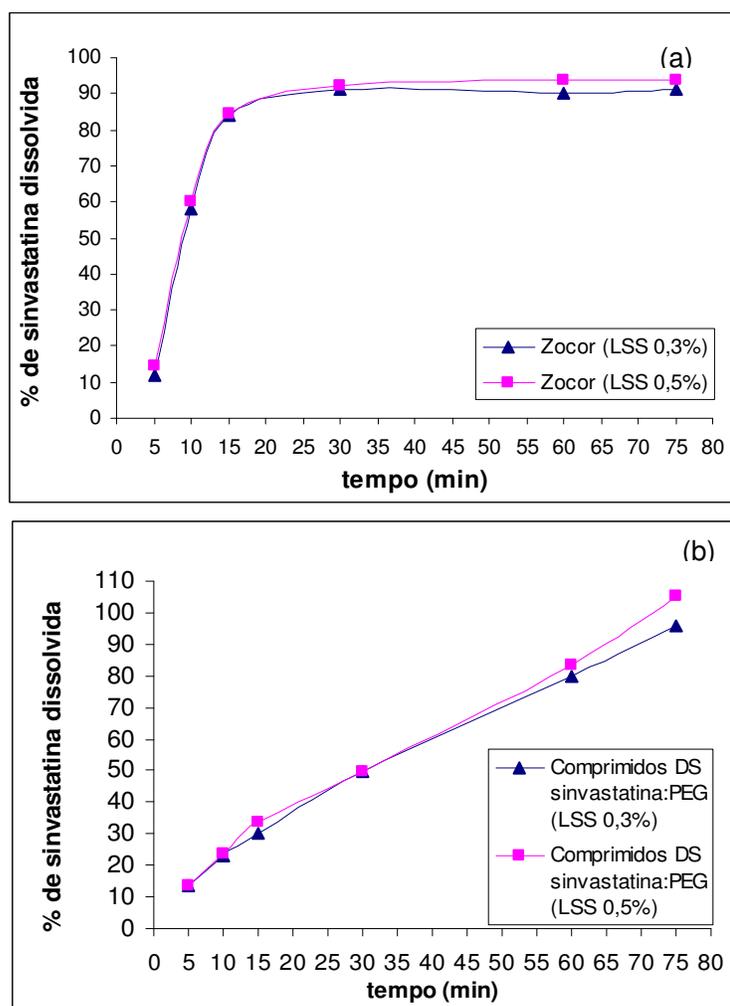


Figura 50 - Comparação dos perfis de dissolução do (a) medicamento referência e dos (b) comprimidos com DS de PEG em tampão NaH_2PO_4 pH 7,40 e 0,3% de LSS com os respectivos perfis de dissolução em tampão NaH_2PO_4 pH 7,40 e 0,5% de LSS.

A maior velocidade de rotação (150 rpm) provocou um acréscimo de 38% para os comprimidos com DS de PEG e de 17% para o medicamento referência em tampão sem surfactante e, de 20% e 26% para os comprimidos com DS de PEG nos meios com 0,3% e 0,5% de LSS, respectivamente. Esse aumento na porcentagem de dissolução com o aumento da velocidade de rotação das pás não foi observado para o medicamento referência nos meios com 0,3% ou 0,5% de LSS, uma vez que em 60 minutos 93,74% do valor rotulado de sinvastatina já havia dissolvido (**Tabela 38**).

Nos perfis de dissolução realizados em tampão NaH_2PO_4 pH 7,40, sem adição de LSS (**Figura 48**) observaram-se liberação maior de sinvastatina a partir dos comprimidos preparados com DS de PEG, assim como maiores valores de ASC e porcentagem de ED (**Tabela 39**) do que aqueles obtidos para o medicamento referência. Esses resultados indicam que a DS, por si só, favoreceu a solubilização da sinvastatina sem a influência de surfactante.

Nos perfis de dissolução com 0,3% de LSS observou-se maior liberação de sinvastatina a partir do medicamento referência e perfis semelhantes dos comprimidos com DS de PVP e com DS de PEG6000. A ASC e porcentagem de ED para os comprimidos contendo DS de PVP ou PEG6000 foram semelhantes entre si (ASC: 2791 e 2799; ED: 46,52% e 46,65%, respectivamente) e menores quando comparados com o Zocor® (4590, 76,50%, respectivamente) (**Figura 49 e Tabela 39**).

A baixa porcentagem de ED dos comprimidos com DS de PVP pode ser explicada (**Tabela 38**), entre outros fatores, devido ao seu teor abaixo do limite especificado na monografia de sinvastatina comprimidos da USP32 (90,0% a 110,0% VR) (THE UNITED, 2009).

A velocidade de dissolução de sinvastatina a partir dos comprimidos com DS de PVP e PEG6000, em tampão com 0,3% ou com 0,5% de LSS, é praticamente constante durante todo o tempo estudado, enquanto que para o medicamento referência foi observado uma liberação rápida da sinvastatina com mais de 80% em 15 minutos e máximo de liberação em 30 minutos nos dois meios citados (**Figuras 49 e 50; Tabela 39**).

Apesar dos comprimidos contendo DS de PEG6000 não terem atingido o mínimo de liberação especificado na monografia de sinvastatina comprimidos da USP32 (mínimo de 75% + 5% em 30 minutos), os mesmos apresentaram, em 60 minutos, 83,56% de dissolução em tampão com 0,5% de LSS (**Figura 50 e Tabela 39**), resultado explicado pelo perfil de liberação mais lento. Sugere-se a realização de coletas em dois tempos, uma coleta

em 15 minutos para incluir uma faixa de dissolução e outra em 30, 45 ou 60 minutos para assegurar 85% de dissolução, de acordo com recomendações do FDA para fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água e de alta permeabilidade (U.S. FOOD, 1997; THE UNITED, 2009).

A liberação gradual da sinvastatina observada a partir dos comprimidos contendo DS de PEG6000 nos três meios estudados pode estar relacionada à formação de uma solução viscosa em razão da presença de PEG de alto peso molecular, conforme relatado por Anguiano-Igea e colaboradores (1995) na dissolução de DS de clofibrato com PEG de diferentes pesos moleculares. Apesar da alta viscosidade do meio retardar a liberação do fármaco, esse fenômeno pode reduzir a velocidade de cristalização do fármaco e/ou favorecer a formação de cristais de tamanho muito reduzido, o que, em ambos os casos, facilita a sua dissolução (FORD, 1986; ANGUIANO-IGEA, 1995).

Não foram observados incrementos significativos entre as porcentagens de liberação de sinvastatina a partir do medicamento referência no meio com 0,3% de LSS, em relação ao meio contendo 0,5% de LSS. Em contrapartida, observaram-se incrementos significativos da porcentagem de liberação de sinvastatina a partir dos comprimidos com DS de PEG6000 no meio contendo 0,5% de LSS, em comparação com o meio contendo 0,3% de LSS nos tempos 60 e 75 minutos (**Tabela 39 e Figura 50**).

Considerando-se que em 60 minutos os comprimidos com DS de PEG atingem o mínimo de dissolução especificado na monografia de sinvastatina da USP32, em tampão LSS 0,5%, os mesmos apresentam a vantagem em relação ao medicamento referência de liberarem a sinvastatina de forma gradual, conseqüentemente, proporcionar manutenção mais prolongada do pico plasmático.

5.3.7 Teste *in vivo*

O teste *in vivo* foi realizado para fins de comparação da eficácia terapêutica da sinvastatina, da DS de sinvastatina e PEG6000 (1:5), do medicamento referência (Zocor[®]) e dos comprimidos fabricados com a mesma DS, por meio da verificação da redução de colesterol plasmático em camundongos alimentados com dieta rica em colesterol (2%).

No presente estudo, os camundongos foram divididos em cinco grupos conforme o tratamento aplicado. O grupo controle recebeu apenas o veículo, solução de

carboximetilcelulose a 1% em solução salina, o grupo referência foi tratado com sinvastatina pura, o terceiro grupo foi tratado com DS (grupo DS), o quarto grupo foi tratado com o medicamento referência (grupo Zocor®) e o quinto grupo recebeu tratamento com os comprimidos desenvolvidos (grupo comprimidos DS). As concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), medidas por meio de fitas específicas, estão apresentadas na Tabela 40.

Os resultados de CT obtidos, nas três dosagens realizadas, foram homogêneos e apresentaram valores de DPR até 9,67% (**Tabela 40**). Após sete dias com dieta hiperlipêmica e sem tratamento, os níveis de CT aumentaram na faixa de 4,85% a 7,67%. A porcentagem de aumento de CT obtida após dieta hiperlipêmica foi baixa comparada aos valores encontrados na literatura de até 47% como relatado por Ambike e colaboradores (2005).

A Tabela 41 foi construída com base nas porcentagens de alteração de CT após sete dias com tratamento hipolipêmico em relação ao CT inicial (com dieta e sem tratamento). A porcentagem de alteração foi calculada conforme a fórmula:

$$\frac{CT_{(após)} - CT_{(antes)}}{CT_{(antes)}} \times 100,$$

em que: $CT_{(após)}$, concentração plasmática de colesterol total após tratamento hipolipêmico; $CT_{(antes)}$, a concentração de colesterol plasmático total antes do tratamento hipolipêmico.

A comparação das médias por meio do teste de Tukey após a análise de variância (ANOVA) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as médias de CT obtidas para os grupos antes e após os tratamentos hipolipêmicos ou administração de veículo, no caso do grupo controle (**Tabela 41**).

Apesar dos valores baixos de DPR apresentados para as médias de colesterol plasmático nas três dosagens realizadas (**Tabela 40**), houve grande variação nos resultados de porcentagens de alteração de colesterol (**Tabela 41**). Em todos os grupos foram observados efeitos de redução e de aumento de CT, o que gerou uma grande variação nos resultados e, conseqüentemente, valores de DPR muito altos. Essa grande variação pode ser explicada pela variabilidade de metabolismo entre os camundongos e pelo fato da dieta não ter sido eficaz em aumentar o CT dos animais nos 7 dias antecedentes ao tratamento.

Tabela 40 - Concentração plasmática de colesterol em camundongos em três períodos: colesterol basal (antes de iniciar o estudo), colesterol após 7 dias com dieta hiperlipêmica e após 7 dias com tratamento hipolipêmico e dieta continuada.

CT basal (mg/dL)					
n	Controle	Referência	DS	Zocor®	Comprimidos DS
1	183,0	183,0	179,0	185,0	184,0
2	186,0	178,0	185,0	186,0	187,0
3	179,0	184,0	177,0	180,0	188,0
4	181,0	189,0	175,0	186,0	185,0
5	174,0	184,0	176,0	186,0	173,0
6	181,0	187,0	188,0	178,0	181,0
Média	180,7	184,2	180,0	183,5	183,0
DPR	2,5	2,0	2,9	1,9	3,0
CT (mg/dL) após 7 dias com dieta hiperlipêmica					
1	189,0	192,0	181,0	188,0	191,0
2	189,0	187,0	186,0	192,0	196,0
3	186,0	183,0	190,0	194,0	192,0
4	181,0	187,0	191,0	188,0	188,0
5	232,0	221,0	229,0	199,0	195,0
6	188	189	181,0	193,0	191,0
Média	194,0	193,2	193,0	192,0	192,1
DPR	9,67	7,2	9,4	2,15	1,52
CT (mg/dL) após 7 dias com tratamento hipolipêmico					
1	194,0	195,0	191,0	194,0	192,0
2	204,0	192,0	196,0	198,0	213,0
3	192,0	192,0	189,0	193,0	174,0
4	193,0	198,0	195,0	198,0	186,0
5	200,0	213,0	193,0	191,0	196,0
6	179,0	185,0	181,0	168,0	193,0
Média	193,67	195,8	190,8	190,33	192,3
DPR	4,4	4,8	2,9	5,9	6,6

Tabela 41 - Porcentagem de alteração de colesterol^a após 7 dias com tratamento hipolipêmico com sinvastatina sob diferentes formas (n=6).

Porcentagem de alteração de CT basal após tratamento hipolipêmico (%)					
n	Controle	Referência	DS	Zocor	Comprimidos DS sinvastatina:PEG
1	2,65	1,56	5,52	3,19	0,52
2	7,94	2,67	5,38	3,13	8,67
3	3,23	4,92	-0,53	-0,52	-9,38
4	6,63	5,88	2,09	5,32	-1,06
5	-13,79	-3,62	-15,72	-4,02	0,51
6	-4,79	-2,12	0,00	-12,95	1,05
Média	0,31	1,55	-0,54	-0,98	0,05
DPR	2651,90	244,04	1451,79	690,30	10862,47

^avalores negativos significam que houve redução do CT após o tratamento.

A fim de minimizar essa variação foram retirados dois camundongos de cada grupo com valores extremos de porcentagem de redução (valores negativos de CT) ou de aumento (valores positivos de CT) após tratamento hipolipêmico. Os resultados apresentados após esse tratamento estão apresentados na Tabela 42 e Figura 51.

Tabela 42 - Porcentagem de alteração de colesterol^a após 7 dias com tratamento hipolipêmico com sinvastatina sob diferentes formas (n=4).

Porcentagem de alteração de CT após tratamento hipolipêmico (%)					
n	Controle	Referência	DS	Zocor	Comprimidos de DS
1	2,65	1,56	^b	^b	0,52
2	^b	2,67	5,38	3,13	^b
3	3,23	4,92	-0,53	-0,52	^b
4	6,63	^b	2,09	5,32	-1,06
5	^b	^b	^b	-4,02	0,51
6	-4,79	-2,12	0,00	^b	1,05
Média	1,93	1,76	1,74	0,98	0,25
Desvio padrão	4,81	2,94	2,68	4,11	0,91
DPR	249,31	167,21	154,48	420,59	357,74

^avalores negativos significam que houve redução do CT após o tratamento.

^bvalores extremos retirados para reavaliação.

Após a exclusão dos valores extremos em cada grupo, as médias continuam iguais, a 5% de probabilidade, devido aos altos valores de desvios padrões obtidos. Entretanto, pela análise do gráfico de médias de porcentagens de alteração e respectivos desvios padrões, apresentado na Figura 51, observou-se uma tendência dos comprimidos com DS de sinvastatina e PEG apresentarem uma maior eficácia terapêutica. Todas as porcentagens de alteração foram positivas, ou seja, houve um aumento do CT após o tratamento hipolipêmico, porém o grupo dos comprimidos com DS apresentou uma menor média de alteração o que pode indicar que os mesmos foram eficazes em manter o CT, mesmo com dieta hiperlipêmica contínua. Além disso, esse grupo apresentou um menor desvio padrão (0,91) conferindo maior homogeneidade entre os resultados obtidos.

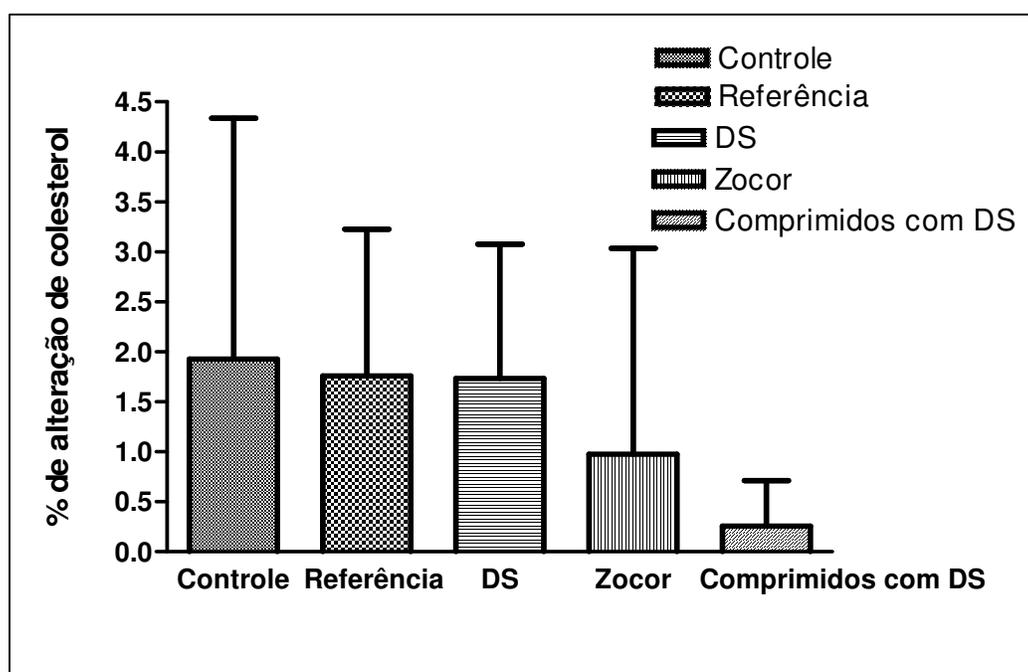


Figura 51 - Média de porcentagem de alteração de colesterol plasmático após 7 dias com tratamento hipolipêmico para cada grupo avaliado.

O efeito esperado da sinvastatina em reduzir o CT em 25% a 45% dependendo da dose não foi observado, possivelmente, devido ao fato da dieta hiperlipêmica não ter sido capaz de aumentar significativamente o CT dos animais (GOODMAN, GILMAN, 2003). No estudo conduzido por Ambike e colaboradores (2005) observou-se uma redução no CT, após 14 dias de tratamento, de 12,4% para o grupo tratado com sinvastatina e, de 24,12% para o grupo tratado com DS (sinvastatina, PVP e aerosil), uma redução duas vezes maior em relação a sinvastatina apenas.

Para um resultado conclusivo sobre a comparação da eficácia terapêutica da sinvastatina em relação à DS sinvastatina:PEG6000 e do medicamento referência em relação aos comprimidos desenvolvidos com DS, seria necessário repetir o estudo com um número maior de animais por grupo, validar uma dieta que aumente consideravelmente o CT de animais e investigar mais a respeito do tempo de tratamento.

6 CONCLUSÕES

O método analítico para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por CLAE apresentou seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez na faixa de concentração estudada e pode ser utilizado como indicativo de estabilidade.

O método analítico proposto para quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina por EDU permitiu eliminar interferências de até 3% devido à excipientes. Apresentou, também, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez adequados com a vantagem de ser mais rápido, simples e de menor custo para a aplicação na rotina de controle de qualidade de uma indústria farmacêutica.

Os métodos propostos por CLAE e EDU demonstraram ser estatisticamente equivalentes para a quantificação de lovastatina, pravastatina sódica e sinvastatina.

As DS desenvolvidas com PVP, PEG4000 ou PEG6000 aumentaram a velocidade de dissolução de sinvastatina com um efeito maior observado para a DS preparada com PVP na proporção de 1:3 (estatina:polímero). Dentre as DS produzidas com PEG4000 ou 6000, o efeito maior na solubilidade da sinvastatina foi observado com a DS 1:5 (estatina:PEG6000) preparada pelo método misto.

Nos comprimidos desenvolvidos com DS sinvastatina:PEG6000 houve dissolução gradual da sinvastatina durante o tempo estudado. Apesar da liberação mais lenta em relação ao medicamento referência, os comprimidos atingiram o mínimo especificado para o teste de dissolução, descrito na monografia de sinvastatina comprimidos da USP32, em 60 minutos. Os resultados do teste *in vivo* não foram conclusivos e há necessidade de um novo delineamento de estudo para posterior avaliação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTAS, S. E.; ERSOY, L.; ERTÜK, S.; FIÇCIOGLU, S. An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 1017-1023, 2003.
- ALVAREZ-LUEJE, A.; PASTINE, J.; SQUELLA, J. A.; NUÑEZ-VERGARA, L. J. Assessment of the hydrolytic degradation of lovastatin by HPLC. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 50, n. 4, p. 639-646, 2005.
- AMBIKE, A. A.; MAHADIK, K. R.; PRADKAR, A. Spray-dried amorphous solid dispersions of simvastatin, a low T_g drug: *In Vitro* and *in Vivo* evaluations. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 6, p. 990-998, 2005.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart disease & stroke statistics - 2009 update. 2009. Disponível em <
<http://www.americanheart.org/downloadable/heart/123783441267009Heart%20and%20Stroke%20Update.pdf> > Acesso em: 2 jun. 2009.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. C.; ALLEN JR., L. V. **Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6^a ed. São Paulo: Premier, 2000. p. 72-77.
- ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-EPINAR, F. J.; VILA-JATO, J. L.; BLANCO-MÉNDEZ, J. The properties of solid dispersion of clofibrate in polyethylene glycols. **J. Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 57-66, 1995.
- ARAYNE, M. S.; SULTANA, N.; HUSSAIN, F.; ALI, S. A. Validated spectrophotometric method for quantitative determination of simvastatin in pharmaceutical formulation and human serum. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 62, n. 6, p. 536-541, 2007.
- AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 28, p.1011-1040, 2002.
- BASAVIAH, K.; DEVI, O. Z. Cerimetric determination of simvastatin in pharmaceuticals based on redox and complex formation reactions. **Eclética Química**, v. 33, n. 2, p. 21-28, 2008.
- BASTARDA, A.; GRAHEK, R.; KOCIJAN, A.; KRALJ, Z. L. Fast analysis of pravastatin in production media. **Journal of Chromatography B**, v. 822, p. 311-315, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº. 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Poder Executivo, de 2 Jun. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 3.916 de 30 de outubro de 1998. D.O.U. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, de 10 de novembro de 1998.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Saúde Brasil 2006 Uma Análise da Desigualdade em Saúde, Brasília-DF, Ministério da Saúde, 1ª ed., p. 71-104, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude_brasil_2006.pdf> Acesso em: 7 mar. 2007.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Release Reviews**, v. 59, p. 645-666, 2007.

BRITISH pharmacopoeia. London: British Pharmacopoeia Commission Office, 2007. p. 1269, 1709, 1858.

BUDAVARI, S (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14ª ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 2006. p. 143, 722, 968, 1325, 1471.

CARRIER, R. L.; MILLER, L. A.; AHMED, J. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p. 78-99, 2007.

CARVALHO, I.; CAMPO, L. V. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CHEN, Y.; LU, Y.; CHEN, J.; LAI, J.; SUN, J.; HU, F. WU, W. Enhanced bioavailability of the poorly water-soluble drug fenofibrate by using liposomes containing a bile salt. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 376, p. 153-160, 2009.

CHOPRA, V.; CHOSKI, P. V.; CAVUSOGLU, E. Beyond lipid lowering: The anti-hypertensive role of statins. **Cardiovascular Drugs Therapy**, v. 21, p. 161-169, 2007.

CHOUDHURY, R. P.; CARELLI, A. L.; STERN, J. D.; CHERRESHNEV, I.; SOCCIO, R. ELMALEM, V. I.; FATLOON, J. T.; FISHER, E. A.; REIS, E. D. Effects of simvastatin on plasma lipoproteins and response to arterial injury in wild type and apolipoprotein-E-deficient mice. **Journal of Vascular Research**, v. 41, p. 75-83, 2004.

CIBYCKOVA, L., RADOMIR, H. STANISLAV, M., NORBERT, C., HELENA, Z., DANIEL, J., ALENA, T., EVA, B., VLADIMIR, P. The influence of simvastatin,

atorvastatin and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. **Steroids**, v. 74, p.13-19, 2009.

DRAGUET-BRUGHMANS, M.; AZIBI, M.; BOUCHE, R. Solubilité et vitesse de dissolution du méprobamate; des cas significatifs. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 34, p. 267-271, 1979.

ERTÜRK, S.; ÖNAL, A.; ÇETIN, S. M. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 793, p. 193-205, 2003.

European Pharmacopoeia. Supplement 6.0 to the 6^a ed. France: Directorate of Quality of Medicines of the Council of Europe, 2008. p. 2291, 2735, 2881.

European Pharmacopoeia. Supplement 6.4 to the 6^a ed. France: Directorate of Quality of Medicines of the Council of Europe, 2009. p. 4686.

FARMACOPÉIA brasileira 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1.

FARMACOPÉIA brasileira 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1996. pt. 2, Fascículo 1.

FARMACOPÉIA brasileira 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Fascículo 6.

FORD, J. L. The current status of solid dispersions. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 61, n. 3, p. 69-88, 1986.

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. 261-269, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 739-744.

GRAESER, K. A.; STRACHAN, C. J; PATTERSON, J. E.; GORDON, K. C.; RADES, T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 128-135, 2008.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

JONES, P.; KAFONEK, S.; LAURORA, I.; HUNNINGHAKE, D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the curves study). **American Journal of Cardiology**, v. 81, p. 582-587, 1998.

Japanese pharmacopoeia. 15^a ed. Tokyo: Society of Japanese Pharmacopoeia, 2006, p.1018.

JORNAL brasileiro de medicina. Dicionário de especialidades farmacêuticas. DEF 2006/07. 35. Ed. Rio de Janeiro: Epuc, 2006. 898 p.

KALÁSZ, H.; ANTAL, I. Drug excipients. **Current Medicinal Chemistry**, v 13, p. 2535-2563, 2006.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H. HUSSAIN, A. S.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G.L. Molecular properties of WHO Essential Drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2003.

LEUNER, C. DRESSMAN, J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersion. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 47-60, 2000.

LUO, Q-F., SUN, L., SI, J-Y, CHEN D-H. Hypocholesterolemic effect of stilbenes containing extract-fraction from *Cajanus cajan* L. on diet-induced hypercholesterolemia in mice. **Phytomedicine**, v. 15, p.932-939. 2008.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-398, 2002.

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**, v. 101, p. 207-213, 2000.

MARTINDALE the complete drug reference. 32^a ed. London: Pharmaceutical Press, 1999. 2314 p.

MATSUMOTO, T.; ZOGRAFI, G. Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly-(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl lactate) in relation to indomethacin crystallization. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1722-1728, 1999.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDAP, B. **Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3^a ed. London: Pharmaceutical Press, 2004, v. 2, p. 654,1059, 1191,1469,1561.

MOORE, M. D.; WILDFONG, P. L. D. Aqueous solubility enhancement through engineering of binary solid composites pharmaceutical application. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v. 4, p. 36-49, 2009.

MOOTER, G. V.; WUYTS, M.; BLATON, N.; BUSSON, R.; GROBET, P.; AUGUSTIJNS, P.; KINGET, R. Physical stabilization of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone K25. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 261-269, 2001.

MOGHADASIAN, M. H. Minireview. Clinical pharmacology of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. **Life Sciences**, v. 65, n. 13, p. 1329-1337, 1999.

MOLČÁNYIOVÁ, A.; STANČÁ-KOVÁ, A.; JAVORSKÝ, M.; TKÁČ, I. Beneficial effect of simvastatin treatment on LDL oxidation and antioxidant protection is more pronounced in combined hyperlipidemia than hypercholesterolemia. **Pharmacological Research**, v. 54, p. 203-207, 2006.

MOOTER, V. D. G.; WUYTS, M.; BLATON, N.; BUSSON, R. GROBET, P.; AUGUSTIJNS, P.; KINGET, R. Physical stabilization of amorphous ketoconazole in solid dispersions with polyvinylpyrrolidone K25. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 12, p. 261-269, 2001.

National Cholesterol Education Program Expert Panel - NCEP. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III). 2001. Disponível em <<http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3xsum.pdf>> Acesso em: 6 mar. 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4^a ed. New York: W. H. Freeman, 2005. p. 816-829.

NIROGI, R.; MUDIGONDA, K.; KANDIKERE, V. Chromatography-mass spectrometry methods for the quantification of statins in biological samples. **Pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, p. 379-387, 2007.

PARODI, P. W. Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? **International Dairy Journal**, v. 19, p. 345-361, 2009.

PASTERNAK, R. C.; SMITH, S. C.; BAIREY-MERZ, C. N.; GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; LENFANT, C. ACC/AHA/NHLBI Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2002. Disponível em: <<http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/statins.pdf>> Acesso em: 7 mar. 2007.

PATEL, R.; PATEL, M. Preparation, characterization, and dissolution behavior of a solid dispersion of simvastatin with polyethylene glycol 4000 and polyvinylpyrrolidone K30. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, p.193-204, 2008.

PETERSON, L.; DETMERS, P. A.; CHAO, Y. S.; WRIGHT, S. D. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 115-121, 2001.

PHARMACOPEIAL previews. *Pharmacopeial forum*, v. 30, n. 1, p. 351-363, 2004.

RENAME. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SALIB, N. H.; EBIAN, A. R. Enhancing dissolution rate of sulfamethoxydiazine via solid dispersion in polyethylene glycol 6000 and 20000. **Pharmazeutische Industrie**, v. 40, p. 262-265, 1978.

SCALIA, R.; GOOSZEN, M. E.; JONES, S. P.; HOFFMEYER, M.; RIMMER, D. M.; TROCHA, S. D.; HUANG, P. L.; SMITH, M. B.; LEFER, A. M.; LEFER, D. J. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. **Basic Science Reports**, v. 103, p. 2598-2603, 2001.

SERAJUDDIN, A. T. M. Salt formation to improve drug solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 603-616, 2007.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2ª ed., New York: John Wiley & Sons, 1997. p. 34, 35; 685-713.

SQUILLANTE, E.; SETHIA, S. Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 1-10, 2004.

SOUZA, M. A. F.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, M. C. D.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA, A. G. Thermal and kinetic study of statins simvastatin and lovastatin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 3, p. 859-863, 2007.

SPARROW, C. P.; BURTON, C. A.; HERNANDEZ, M.; MUNDT, S.; MASSING, H.; PATEL, S.; ROSA, R.; HERMANOWSKI-VOSATKA, A.; WANG, P. R.; ZHANG, D.; PETERSON, L.; DETMERS, P. A.; CHAO, Y. S.; WRIGHT, S. D. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p.115-121, 2000.

STUDER, M.; BRIEL, M.; LEIMENSTOLL, B.; GLASS, T. R.; BUCHER, H. C. Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality. A systematic Review. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, p. 725-730, 2005.

TAYLOR, L. S.; ZOGRAFI, G. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. **Pharmaceutical Research**, v. 14, p. 1691-1698, 1997.

TERASAKA, N.; YU, S.; CHARVET, L. WANG, N.; MZHAVIA, N.; LANGLOUS, R.; PAGLER, T.; LI, R.; WELCH, C. L.; GOLDBERG, I. J.; TALL, A. R. ABCG 1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3701-3713, 2008.

THE UNITED states pharmacopeia. National Formulary. USP 31. 31 rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008. p. 2815, 3359, 3557.

THE UNITED states pharmacopeia. National Formulary. USP 32. 32 rev. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009. p. 3081, 3645, 3855

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer guidance validation of chromatographic methods. Rockville, 1994.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry, dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville, 1997.

VASCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23/24, p.1068-1075, 2007.

WANG, L.; ASGHARNEJAD, M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 1243-1248, 2000.

WOOD, D.; BACKER, G. D., FAERGEMAN, O.; GRAHAM, I.; MANCIA, G.; PYÖRÄLÄ, K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the second joint task force of european and other societies on coronary prevention. **European Heart Journal**, v. 19, p. 1434-1503, 1998.

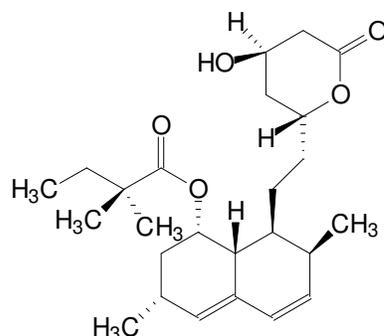
YANG, D.; HWANG, L. S. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxyl acid forms and their determination in Pu-Erh tea. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 277-284, 2006.

YU, L. X.; AMIDON, G. L.; POLLI, J. E.; ZHAO, H.; MEHTA, M. U.; CONNER, D. P.; SHAH, V. P.; LESKO, L. J.; CHEN, M. L.; LEE, V. H. L.; HUSSAIN, A. S.

Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions.
Pharmaceutical Research, v. 19, n. 7, p. 921-925, 2002.

APÊNDICE A - Proposta de monografia de sinvastatina matéria-prima para a Farmacopeia Brasileira

SINVASTATINA
Simvastatinum



$C_{25}H_{38}O_5$

418,57

79902-63-9

Ácido 2,2-dimetilbutanoico (1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1,2,3,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-[(2R, 4R)-tetrahydro-4-hidróxi-6-oxo-2H-piran-2-il]-etil]-1-naftalenil éster.

Contém, no mínimo, 98,0% e, no máximo, 102,0% de $C_{25}H_{38}O_5$, em relação à substância dessecada (THE UNITED, 2009).

DESCRIÇÃO

Características físicas. Pó cristalino branco ou quase branco (EUROPEAN, 2009).

Solubilidade. Praticamente insolúvel em água, muito solúvel em clorofórmio e diclorometano, facilmente solúvel em metanol e etanol, muito pouco solúvel em n-hexano (BUDAVARI, 2006; EUROPEAN, 2009).

Constantes físico-químicas

Faixa de fusão (V.2.2): 135 °C a 138 °C (BUDAVARI, 2006).

Poder rotatório específico (V.2.8): +285° a + 298°, em relação à substância dessecada (THE UNITED, 2009).

Determinar em solução a 0,5% (p/V) em acetoneitrila.

IDENTIFICAÇÃO

A. O espectro de absorção no infravermelho (V.2.14) da amostra, dispersa em cloreto 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 (EUROPEAN, 2009; THE UNITED, 2009).

B. O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *solução amostra*, obtida no método B de *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *solução padrão*. (EUROPEAN, 2009; THE UNITED, 2009).

ENSAIOS DE PUREZA

Metais pesados (V.3.2.3). *Método II*. No máximo 0,002% (20 ppm) (THE UNITED, 2009).

Perda por dessecação (V.2.9). Determinar em 1 g da amostra, em estufa a vácuo a 60 °C, por 3 horas, até peso constante. No máximo 0,5% (THE UNITED, 2009).

Cinzas sulfatadas (V.2.10). Determinar em 1 g da amostra. No máximo 0,1% (THE UNITED, 2009).

DOSEAMENTO

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta* (V.2.14). Pesar, exatamente, cerca, de 40 mg da amostra e dissolver 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 238 nm, utilizando metanol para ajuste do zero. Calcular o teor de C₂₅H₃₈O₅. Alternativamente, considerar A (1%, 1 cm) = 604, em 238 nm, em metanol.

B. Proceder conforme descrito em *Cromatografia líquida de alta eficiência* (V.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 µm), mantida a 30 °C; fluxo da fase móvel de 1,5 ml/minuto.

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

Solução amostra: dissolver quantidade exatamente pesada da amostra em acetonitrila para obter solução a 0,4 mg/ml. Transferir 5 ml dessa solução para balão volumétrico de 50 ml e completar o volume com acetonitrila, obtendo solução a 40 µg/ml.

Solução padrão: dissolver quantidade exatamente pesada de sinvastatina SQR em acetonitrila para obter solução a 0,4 mg/ml. Transferir 5 ml desta solução para balão volumétrico de 50 ml e completar o volume com acetonitrila, obtendo solução a 40 µg/ml.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µl das *soluções padrão* e *amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular o teor de C₂₅H₃₈O₅ 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.

Antihiperlipidêmico.

APÊNDICE B - Proposta de monografia de sinvastatina comprimidos para a Farmacopéia Brasileira

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 ser revestidos.

IDENTIFICAÇÃO

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

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (V.1.1). Cumpre o teste.

Dureza (V.1.3.1). Cumpre o teste.

Friabilidade (V.1.3.2). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (V.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (V.1.6). Cumpre o teste.

Procedimento para uniformidade de conteúdo. Pesar, individualmente, e transferir cada comprimido para balão volumétrico de 50 ml, adicionar não mais que 2 ml de água (não mais que 4% da capacidade do balão volumétrico). Agitar até desintegração do comprimido. Adicionar 35 ml de metanol, deixar em ultra-som por 15 minutos e completar o volume com o mesmo solvente. Prosseguir conforme descrito no método A de *Doseamento*, a partir de “Centrifugar por 4 minutos a 4000 rpm...”.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (V.1.5)

Meio de dissolução: solução contendo lauril sulfato de sódio a 0,5% p/V e fosfato de sódio 0,01 M. Dissolver 30 g de lauril sulfato de sódio e 8,28 g de fosfato de sódio monobásico em 6000 ml de água e ajustar o pH para 7,0 com solução de hidróxido de sódio 50% (p/V), 900 ml.

Aparelhagem: pás, 50 rpm.

Tempo: 30 minutos.

Procedimento: 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 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 a da solução de sinvastatina SQR na concentração 0,0008% (p/V), preparada no mesmo solvente.

Tolerância: não menos que 75% (T) da quantidade declarada de $C_{25}H_{38}O_5$ se dissolvem em 30 minutos (USP32).

DOSEAMENTO

A. Proceder conforme descrito em *Espectrofotometria de absorção no ultravioleta* (V.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 ultra-som 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 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. Transferir quantidade do pó para balão volumétrico de capacidade adequada, adicionar acetonitrila, cerca de 70% da

capacidade total do balão volumétrico, e deixar em ultra-som 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 µg/ml, utilizando acetonitrila como solvente.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µl das *soluções padrão* e *amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de C₂₅H₃₈O₅ nos comprimidos a partir das respostas obtidas com as *soluções padrão* e *amostra*.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

ANEXO A - Certificado de aprovação do CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 103/2009**, relativo ao projeto intitulado "*Avaliação comparativa do efeito terapêutico de simvastatina entre medicamento referência e medicamento fabricado em dispersão sólida*", que tem como responsável(is) **Cristina Duarte Vianna Soares**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **12/ 08/2009**.

Este certificado expira-se em **12/ 08/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 103/2009**, related to the project entitled "*Comparative evaluation of therapeutic effect of simvastatin between reference dosage form and in house manufactured solid dispersion tablets*", under the supervisors of **Cristina Duarte Vianna Soares**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 12, 2009**.

This certificate expires in **August 12, 2014**.

Belo Horizonte, 17 de Agosto de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br