UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Validação de métodos para análise de estatinas em
medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência e
eletroforese capilar

Karina Litzi González Tejerina

Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Validação de métodos para análise de estatinas em
medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência e
eletroforese capilar

Karina Litzi González Tejerina

Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE

Orientador:

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

González Tejerina, Karina Litzi
G643v Validação de métodos para análise de estatinas em medicamentos
por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar /
Karina Litzi González Tejerina. -- São Paulo, 2011.
188p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Cromatografia em
líquido de alta eficiência : Análise química : Farmacologia
3. Eletroforese capilar : Análise química : Farmacologia I. T. II.
Santoro, Maria Inês Rocha Miritello, orientador.

615.19015 CDD

Karina Litzi González Tejerina

Validação de métodos para análise de estatinas em
medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência e
eletroforese capilar

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Aos meus pais pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida. Por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar e fazer o mestrado em São Paulo, longe deles, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grata.

Ao meu marido Igo e filho Alefinho pelo apoio valioso e incondicional que souberam me dar e a compreensão nos momentos de ausência em função deste trabalho.

“Agradeço a princípio a Deus, que me permitiu a vida, o existir”.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da universidade de São Paulo.

À Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pelas orientações precisas em todos os momentos solicitados e confiança depositada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Anil Kumar Singh que me guiou ao longo da pesquisa.

À Profa. Dra. María S. Aurora Prado pelas sugestões e estímulos, muito importantes para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Angel Gaona Galdos pela amizade sincera e conhecimento, que foram guias sempre presentes ao longo da pesquisa.

“O correr da vida embrulha tudo. Ávida é assim, esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, aquieta e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da alegria. E ainda mais no meio da tristeza. Todo o caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”.

(João Guimarães Rosa em “Grande Sertão Veredas”, 1956).

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVI
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS	XXIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XXV
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. Estatinas.....	4
3.1.1. Estrutura e atividade farmacológica das estatinas	5
3.1.2. Mecanismo de ação das estatinas	11
3.1.3. Absorção, metabolismo e excreção das estatinas.....	12
3.2. Fluvastatina	13
3.2.1. Propriedades farmacológicas	13
3.2.2. Farmacocinética	13
3.2.3. Farmacodinâmica	14
3.2.4. Propriedades físico-químicas	14
3.3. Atorvastatina.....	15
3.3.1. Propriedades farmacológicas	15
3.3.2. Farmacocinética	16
3.3.3. Farmacodinâmica	17
3.3.4. Propriedades físico-químicas	18
3.4. Rosuvastatina	19
3.4.1. Propriedades farmacológicas	19
3.4.2. Farmacocinética	19
3.4.3. Farmacodinâmica	20
3.4.4. Propriedades físico-químicas.....	21
3.5. Controle de qualidade.....	22
3.6. Métodos instrumentais.....	24
3.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	24

3.6.1.1. Vantagens	26
3.6.1.2. Limitações	27
3.6.2. Eletroforese capilar	27
3.6.2.1. Eletroforese capilar de zona (CZE).....	30
3.6.2.2. Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)	31
3.6.2.3. Vantagens	31
3.6.2.4. Limitações	32
3.7. Validação de metodologias analíticas	32
3.7.1. Pré-validação.....	33
3.7.1.1. Parâmetros de validação	33
3.7.1.2. Metodologia analítica.....	35
3.7.1.2.1. Especificidade e seletividade.....	36
3.7.1.2.2. Linearidade.....	37
3.7.1.2.3. Intervalo.....	37
3.7.1.2.4. Precisão.....	38
3.7.1.2.5. Limite de detecção.....	39
3.7.1.2.6. Limite de quantificação	40
3.7.1.2.7. Exatidão.....	41
3.7.1.2.8. Robustez	42
3.8. Revisão das metodologias publicadas para estatinas	43
4. JUSTIFICATIVA	48
5. MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Material.....	49
5.1.1. Substâncias empregadas como padrões.....	49
5.1.2. Amostras comerciais	49
5.1.3. Placebo.....	51
5.1.4. Reagentes e solventes	52
5.1.5 Aparelhos e equipamentos	52
5.2. Métodos.....	54
5.2.1. Caracterização e identificação dos princípios ativos	54
5.2.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	54
5.2.3. Espectrofotometria no ultravioleta	54
5.2.4. Análise cromatográfica	55

5.2.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	55
5.2.4.2. Validação dos métodos analíticos para determinação quantitativa de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	55
5.2.4.2.1. Determinação da seletividade para a fluvastatina	55
5.2.4.2.2. Determinação da seletividade para a atorvastatina	56
5.2.4.2.3. Determinação de seletividade para a rosuvastatina	56
5.2.4.2.4. Determinação da linearidade para a fluvastatina.....	56
5.2.4.2.5. Determinação da linearidade para a atorvastatina	56
5.2.4.2.6. Determinação da linearidade para a rosuvastatina	57
5.2.4.2.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	57
5.2.4.2.8.1. Determinação da precisão intermediária para a fluvastatina	58
5.2.4.2.8.2. Determinação da precisão intermediária para a atorvastatina.....	58
5.2.4.2.8.3. Determinação da precisão intermediária para a rosuvastatina.....	59
5.2.4.2.8.4. Preparação das amostras para determinação da repetibilidade inter e intra-dia para a fluvastatina	59
5.2.4.2.8.5. Preparação das amostras para determinação da repetibilidade inter e intra-dia para a atorvastatina	59
5.2.4.2.8.6. Preparação das amostras para determinação da repetibilidade inter e intra-dia para a rosuvastatina	60
5.2.4.2.9 Preparação das soluções de padrão e das amostras para realização de teste de exatidão para a fluvastatina.....	60
5.2.4.2.10. Preparação das soluções de padrão e das amostras para realização de teste de exatidão para a atorvastatina.....	61
5.2.4.2.11. Preparação das soluções de padrão e das amostras para realização de teste de exatidão para a rosuvastatina.....	62
5.2.4.2.17. Teste de robustez para a fluvastatina.....	63
5.2.4.2.18. Teste de robustez para a atorvastatina	64
5.2.4.2.19. Teste de robustez para a rosuvastatina.....	64
5.2.4.2.20. Teste de estresse	64
5.2.4.2.21. Reação em meio neutro para a fluvastatina	64
5.2.4.2.22. Reação em meio neutro para a atorvastatina.....	65
5.2.4.2.23. Reação em meio neutro para a rosuvastatina	65
5.2.4.2.24 Reação em meio de oxidação para a fluvastatina	66
5.2.4.2.25. Reação em meio de oxidação para a atorvastatina.....	66

5.2.4.2.26. Reação em meio de oxidação para a rosuvastatina	66
5.2.4.2.27. Reação em meio ácido para a fluvastatina	67
5.2.4.2.28. Reação em meio ácido para a atorvastatina	67
5.2.4.2.29. Reação em meio ácido para a rosuvastatina	68
5.2.4.2.30. Reação em meio básico para a fluvastatina	68
5.2.4.2.31. Reação em meio básico para a atorvastatina	68
5.2.4.2.32. Reação em meio básico para a rosuvastatina	69
5.2.4.2.33. Teste de adequabilidade do sistema para a fluvastatina	69
5.2.4.2.34. Teste de adequabilidade do sistema para a atorvastatina	69
5.2.4.2.35. Teste de adequabilidade do sistema para a rosuvastatina	70
5.2.4.2.36. Comparação estatística dos resultados obtidos pelos métodos propostos	70
5.3. Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)	73
5.3.1. Desenvolvimento do método	73
5.3.2. Preparação das soluções e tampões	76
5.3.2.1. Solução tampão estoque de tetraborato de sódio 100 mM	76
5.3.2.2. Solução estoque de SDS 100 mM	76
5.3.2.3. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM	76
5.3.2.4. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM: SDS 50 mM	76
5.3.2.5. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM: SDS 50 mM	76
5.3.2.6. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM: SDS 30 mM: metanol 10% v/v	77
5.3.2.7. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM: SDS 30 mM: metanol 15% v/v	77
5.3.2.8. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM: SDS 30 mM: metanol 10% v/v	77
5.3.2.9. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM: SDS 30 mM: acetonitrila 10% v/v	77
5.3.2.10. Preparação das soluções padrão estoque (1,0 mg/mL) das estatinas.	78
5.3.2.11. Preparação da solução estoque do padrão interno (diclofenaco de sódio)	78
5.3.2.12 Preparação da mistura-teste (MT) das estatinas e padrão interno (p.i.)	78
5.3.3. Condições analíticas	78
5.3.4. Tratamento do capilar	79
5.3.5. Preparação do eletrólito padronizado para os testes	79
5.3.6. Validação	80

5.3.6.1. Construção da curva analítica	80
5.3.6.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	80
5.3.6.3. Precisão do método.....	81
5.3.6.4. Precisão intermediária (inter-dia):.....	81
5.3.6.5. Aplicação do método padronizado a amostras comerciais.....	82
5.3.6.5.1. Preparação das soluções padrão de fluvastatina, atorvastatina, e padrão interno (diclofenaco de sodio).....	82
5.3.6.5.2. Preparação das soluções das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina	82
5.3.6.5.3. Preparação das soluções placebo das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina	83
5.3.6.5.4. Determinação do teor de fluvastatina e atorvastatina nas amostras comerciais	83
5.3.6.6. Teste de recuperação.....	84
5.3.6.6.1. Preparação das soluções padrão de fluvastatina, atorvastatina e padrão interno (diclofenaco de sódio).....	84
5.3.6.6.2. Preparação das soluções das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina	84
5.3.6.7. Teste de estresse	86
5.3.6.7.1. Reação em meio neutro para a fluvastatina e atorvastatina.....	86
5.3.6.7.2 Reação em meio de oxidação para a fluvastatina e atorvastatina.....	87
5.3.6.7.3. Reação em meio ácido para a fluvastatina e atorvastatina	87
5.3.6.7.4. Reação em meio básico para a fluvastatina e atorvastatina.....	88
5.4. Análise eletroforética: método analítico (CZE)	89
5.4.1. Preparação das soluções e tampões.....	92
5.4.1.1. Solução tampão estoque de tetraborato 100 mM.....	92
5.4.1.2. Solução tampão de tetraborato 20 mM.....	92
5.4.1.3. Preparação das soluções padrão estoque (1,0 mg/mL) da rosuvastatina.	92
5.4.1.4. Preparação da solução estoque do padrão interno (ibuprofeno).....	92
5.4.1.5 Preparação da mistura-teste (MT) da estatina e padrão interno (p.i.)	92
5.4.1.6. Condições analíticas.....	93
5.4.1.7. Tratamento do capilar	93
5.4.1.8. Preparo analítico do eletrólito padronizado para os testes	94
5.4.2. Validação.....	94
5.4.2.1. Construção da curva analítica	94

5.4.2.1.1. Preparação das soluções padrão de rosuvastatina e padrão interno	94
5.4.2.1.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	94
5.4.2.2. Precisão do método	95
5.4.2.2.1. Repetibilidade (intra-dia)	95
5.4.2.2.2. Precisão intermediária (inter-dia)	95
5.4.2.2.3. Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	96
5.4.2.2.3.1. Preparação das soluções padrão de rosuvastatina e padrão interno	96
5.4.2.2.3.2. Preparação das soluções placebo das amostras comerciais de rosuvastatina	96
5.4.2.2.4. Teste de recuperação	96
5.4.2.2.4.1. Preparação das soluções padrão de rosuvastatina e padrão interno	96
5.4.2.2.4.2. Preparação das soluções amostra de rosuvastatina e padrão interno	97
5.4.2.2.5. Teste de estresse	98
5.4.2.2.5.1. Reação em meio neutro	99
5.4.2.2.5.2. Reação em meio oxidante	99
5.4.2.2.5.3. Reação em meio ácido	99
5.4.2.2.5.4. Reação em meio básico	100
5.4.2.2.6. Robustez	100
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
6.2. Controle de qualidade	103
6.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)	104
6.3. Espectrofotometria no ultravioleta	107
6.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	108
6.5. Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência. (CLAE)	108
6.5.1. Curvas analíticas obtidas pelo método cromatográfico	111
6.5.1.1. Fluvastatina	111
6.5.1.2. Atorvastatina	112
6.5.1.3. Rosuvastatina	113
6.5.3. Precisão	115
6.5.4. Resultados do teste de recuperação	116
6.5.5. Teste de estresse	117
6.6. Validação do método por (MEKC)	126
6.6.1. Precisão do sistema	126
6.6.2. Curva analítica (linearidade)	127

6.6.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	128
6.6.4. Precisão do método.....	128
6.6.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO PADRONIZADO ÀS AMOSTRAS COMERCIAIS .	130
6.6.5.1. Pesquisa de interferentes	130
6.6.5.2. Determinação do teor das estatinas nas amostras comerciais.....	133
6.6.5.3. Teste de recuperação.....	134
6.6.5.5. Teste de estresse	139
6.7. Validação do método por (CZE)	146
6.7.1. Linearidade	146
6.7.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	148
6.7.3. Precisão.....	149
6.7.4. Teste de estresse	151
6.7.4.1. Reação em meio neutro	151
6.7.4.2. Reação em meio oxidante	152
6.7.4.3. Reação em meio ácido	153
6.7.4.4. Reação em meio básico	154
6.7.5. Pesquisa de interferentes	155
6.7.6. Exatidão.....	156
7. CONCLUSÕES	157
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159
ANEXOS.....	174

RESUMO

As estatinas são os fármacos mais usados para tratamento das hiperlipidemias em prevenção primária e secundária, com o propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos de doença arterial-coronária (DAC) (WITZTUM, 2005). Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril-CoA redutase), com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol. Estas substâncias, (fluvastatina FS, atorvastatina ATC e rosuvastatina RC) são capazes de mimetizar o substrato natural. Podem ser divididas em naturais e sintéticas e diferem fundamentalmente, em termos de potência, perfil farmacocinético, interação farmacológica e efeito indesejado relacionado à miotoxicidade.

Na presente pesquisa foram desenvolvidos e validados métodos analíticos de separação (cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar) para cada fármaco. Estes métodos foram aplicados a medicamentos comercializados no Brasil.

O método por CLAE foi realizado em coluna LiChrospher® RP-18 (125x4 mm, 5µm) Merck® e uma fase móvel composta por metanol:água (70:30 v/v) para FS e ATC, (60:40 v/v) para RC, com 5 mM trietilamina e pH ajustado para 3.0 com ácido ortofosfórico. O método mostrou boa linearidade (r 0,9915), (LD 2,02 e LQ 6,12) FS; (r 0,9959), (LD 0,44 e LQ 1,34) ATC e (r 0,9945), (LD 1,55 e LQ 4,70) RC. A exatidão foi expressa em porcentagem de recuperação (R% 99,59) FS, (R% 100,24) ATC e (R% 99,2). Pelo método MEKC foi realizado utilizando capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato 20 mM: SDS 30 mM: metanol 10% v/v pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s, apresentaram linearidade (r 0,9997), (LD 0,94 e LQ 2,85) FS; (r 0,9999), (LD 2,36 e LQ 7,17) ATC. A porcentagem de recuperação (R% 104,61) FS, (R% 103,96) ATC. Pelo método CZE foi realizado utilizando sílica fundida de 40,2 cm de comprimento sendo 30 cm até o detector, 75 µm de d.i. e 375 µm de d.d., eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM, pH 9,20; voltagem aplicada: +25kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s, apresentou linearidade (r 0,9989), (LD 4,92 e LQ 14,91) RC; A porcentagem de recuperação (R% 100,66) RC.

Palavras-chave: Atorvastatina, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar de zona, fluvastatina, formulações farmacêuticas, rosuvastatina, validação.

ABSTRACT

Statins are the drugs most commonly used for treatment of hyperlipidemia in primary and secondary prevention, with the aim of reducing levels of lipoproteins rich in cholesterol and reduce the risk of coronary-artery disease (CAD) (Witztum, 2005). These effects are due to the inhibitory activity of statins on the enzyme HMG-CoA reductase (hydroxymethylglutaryl CoA reductase), with the property to block the conversion of the substrate HMG-CoA to mevalonic acid, inhibiting the first steps of cholesterol biosynthesis. These substances (fluvastatin FS, atorvastatin ATC and rosuvastatin RC) may mimic the natural substrate, can be divided into natural and synthetic, and differ fundamentally in terms of potency, pharmacokinetics, drug interactions and unwanted effects related to muscle-toxicity. In the present study were developed and fully validated analytical methods of separation (high efficiency liquid chromatography and capillary electrophoresis) for each drug. These methods were applied to drugs marketed in Brazil. The method was performed by HPLC column LiChrospher® RP-18 (125x4 mm, 5mm) Merck® and a mobile phase consisting of methanol: water (70:30 v / v) for FS and ATC (60:40 v / v) to RC, with 5 mM triethylamine and pH adjusted to 3.0 with orthophosphoric acid. The method showed good linearity (r 0.9915), (2.02 LD and LQ 6.12) FS; (r 0.9959), (0.44 LD and LQ 1.34) ATC; (r 0.9945), (1.55 LD and LQ 4.70) for RC. The accuracy was expressed as a percentage of recovery (R% 99.59%) FS, (R% 100.24) ATC and (R 99.2%) RC. The MEKC method was performed using a fused silica capillary of 40.2 cm x 75 μ m i.d. (30 cm to detector); electrolyte: 20 mM borate buffer: 30 mM SDS: methanol 10% v / v pH 9.24, applied voltage: +22 kV, injection: hydrodynamic psi/3s 0.5 showed linearity (r 0.9997), (LQ 0.94 and LD 2.85) FS, (r 0.9999), (LQ 2.36 and LD 7.17) ATC. The percentage recovery (% R 104.61) FS, (R 103.96%) ATC. The CZE method was performed using fused silica of 40.2 cm long and 30 μ m i.d. and 375 μ m i.d. to the detector, electrolyte: sodium tetraborate buffer 20 mM, pH 9.20, applied voltage: +25 kV, injection: hydrodynamic psi/5s 0.5, showed linearity (r 0.9989), (4.92 LD and LQ 14.91) RC; The percentage recovery (% R 100.66) RC.

Keywords: fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis, validation, pharmaceutical formulations

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das estatinas inibidoras da enzima HMG-CoA redutase

Figura 2. Interações do substrato (2A), extraído do PDB código ID IDQA, e inibidor rosuvastatina (8B), código ID 1HWL, complexadas no sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase: 2A ilustra as interações mais importantes da unidade de ácido 3-hidróxi-metilglutarílico do substrato, após clivagem e liberação de CoASH, 2B mostra, comparativamente, as interações do inibidor rosuvastatina, semelhante ao substrato.

Figura 3. Estrutura química da fluvastatina sódica

Figura 4. Estrutura química da atorvastatina cálcica

Figura 5. Estrutura química da rosuvastatina cálcica

Figura 6. Representação de um equipamento de CLAE

Figura 7. Representação da instrumentação da EC

Figura 8. Estrutura química da superfície de um capilar de sílica fundida

Figura 9. Esquema da formação e do sentido do fluxo eletroosmótico em presença de uma solução tampão.

Figura 10. Tipos de perfis radiais de velocidade de fluxo característicos dos sistemas: a)CLAE e b)CE

Figura 11. Espectro de absorção da fluvastatina no infravermelho (IV).

Figura 12. Espectro de absorção da atorvastatina no infravermelho (IV).

Figura 13. Espectro de absorção da rosuvastatina no infravermelho (IV).

Figura 14. Espectro de absorção do padrão de fluvastatina na região do ultravioleta (λ máximo em 302,2 nm), solução padrão de fluvastatina contendo 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M.

Figura 15. Espectro de absorção do padrão de atorvastatina na região do ultravioleta (λ máximo em 240,4 nm), solução padrão de atorvastatina contendo 14,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M.

Figura 16. Espectro de absorção do padrão de rosuvastatina na região do ultravioleta (λ máximo em 241 nm), solução padrão de rosuvastatina contendo 12,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M.

Figura 17. Cromatograma da solução padrão de fluvastatina. Concentração: 40,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol : água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,6 mL/minuto, volume de injeção 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 18. Cromatograma da solução padrão de atorvastatina. Concentração: 28,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol:água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 19. Cromatograma da solução padrão de rosuvastatina. Concentração: 28,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 20. Curva analítica da solução padrão de fluvastatina. Nas faixas de concentração: 24,0; 32,0; 40,0; 48,0 e 56,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas:

Coluna: LiChrospher[®] C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,6 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 21. Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica da fluvastatina nas concentrações de 24,0; 32,0; 40,0; 48,0 e 56,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,6 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 22. Curva analítica da solução padrão de atorvastatina. Nas faixas de concentração: 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 23. Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica da atorvastatina nas concentrações de 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 24. Curva analítica da solução padrão de rosuvastatina. Nas faixas de concentração: 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica da rosuvastatina nas concentrações de 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 26. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio neutro de 2h. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 27. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 µg/mL) após reação em meio neutro. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 28. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 µg/mL) após reação em meio neutro. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 29. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio oxidante com H₂O₂ 3%. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 30. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 µg/mL) após reação em meio oxidante com H₂O₂ 3%. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 31. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 µg/mL) após oxidante com H₂O₂ 3%. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 32. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio ácido com HCl 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 33. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 µg/mL) após reação em meio ácido com HCl 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 34. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 µg/mL) após reação em meio ácido com HCl 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 35. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 36. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 µg/mL) após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 37. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 µg/mL) após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 38. Curva analítica da fluvastatina (FS) na faixa de concentrações de 128,0 a 192,0 µg/mL. Padrão interno (p.i), diclofenaco de sódio (200,0 µg/mL).

Figura 39. Curva analítica da atorvastatina (ATC) na faixa de concentrações de 128,0 a 192,0 µg/mL. Padrão interno (p.i), diclofenaco de sódio (200,0 µg/mL).

Figura 40. Eletroferogramas referentes às soluções do placebo, com p.i da amostra comercial de fluvastatina (A), padrão fluvastatina (160,0 µg/mL) (B) e da amostra comercial (160,0 µg/mL) (C). Picos: FL: fluvastatina, p.i: padrão interno diclofenaco de sódio (200,0 µg/mL).

Figura 41. Eletroferogramas referentes às soluções do placebo, com p.i da amostra comercial de atorvastatina (A), padrão atorvastatina (160,0 µg/mL) (B) e da amostra comercial (160,0 µg/mL) (C). Picos: ATC: atorvastatina, p.i: padrão interno diclofenaco de sódio (200,0 µg/mL).

Figura 42. Sistema 1, Eletroforese Capilar de Zona (CZE). Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 µm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato 10 mM pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 43. Sistema 2, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 µm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 10 mM SDS 50 mM, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 44. Sistema 3, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 µm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS 50 mM, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 45. Sistema 4, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (fluvastatina e atorvastatina) e dos padrões internos (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 57 cm x 75 µm d. i. (50 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 10 mM SDS 30 mM, 10% v/v metanol, pH 9,24; voltagem aplicada: +30 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 46. Sistema 5, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 57 cm x 75 µm d. i. (50 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 10 mM SDS 30 mM, 15% v/v metanol, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 47. Sistema 6, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 µm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS 30 mM, 10% v/v acetonitrila, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 48. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do PI (diclofenaco de sódio); após reação em meio neutro durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da atorvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem

aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 49. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio neutro durante 2h sob aquecimento a 80°C . Concentração final da fluvastatina $160,0 \mu\text{g/mL}$ e do p.i. $200,0 \mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 μm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 50. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio oxidante com H_2O_2 3%, durante 2h sob aquecimento a 80°C . Concentração final da atorvastatina $160,0 \mu\text{g/mL}$ e do p.i. $200,0 \mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 μm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 51. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio oxidante com H_2O_2 3%, durante 2h sob aquecimento a 80°C . Concentração final da fluvastatina $160,0 \mu\text{g/mL}$ e do p.i. $200,0 \mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 μm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 52. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio ácido com HCl 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C . Concentração final da atorvastatina $160,0 \mu\text{g/mL}$ e do p.i. $200,0 \mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 μm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 53. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio ácido com HCl 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C . Concentração final da fluvastatina $160,0 \mu\text{g/mL}$ e do p.i. $200,0 \mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 μm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 54. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C . Concentração final da atorvastatina $160,0 \mu\text{g/mL}$ e do p.i. $200,0 \mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 μm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 55. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C . Concentração final da fluvastatina $160,0 \mu\text{g/mL}$ e do p.i. $200,0 \mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 μm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24;

voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 56. Sobreposição dos eletroferogramas da curva analítica da rosuvastatina nas concentrações de 200,0; 225,0; 250,0; 275,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ com adição de padrão interno p.i..concentração 200,0 $\mu\text{g/mL}$ Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.x 375 μm (d.e); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C ; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

Figura 57. Curva de calibração da rosuvastatina na faixa de concentrações de 200,0 a 300,0 $\mu\text{g/mL}$. Padrão interno: ibuprofeno (200,0 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 58. Sobreposição dos eletroferogramas da precisão nas concentrações de 200,0; 250,0; 300,0 $\mu\text{g/mL}$ com adição de p.i. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.x 375 μm (d.e); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C ; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV em 220 nm.

Figura 59. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250,0 $\mu\text{g/mL}$ após 2 h de reação em meio neutro. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C ; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

Figura 60. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250,0 $\mu\text{g/mL}$ após 2 h de reação em meio oxidante. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C ; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

Figura 61. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250 $\mu\text{g/mL}$ após 2 h de reação em meio ácido. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C ; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

Figura 62. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250 $\mu\text{g/mL}$ após 2 h de reação em meio alcalino. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C ; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

Figura 63. Eletroferogramas referentes às soluções do placebo, com p.i. da amostra comercial de rosuvastatina (A), padrão rosuvastatina (250,0 $\mu\text{g/mL}$) (B) e da amostra comercial (250,0 $\mu\text{g/mL}$) (C). Picos: RC: rosuvastatina, p.i.: padrão interno ibuprofeno (200,0 $\mu\text{g/mL}$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Categorias dos testes.

Tabela 2. Parâmetros necessários para validação de acordo com a categoria dos testes.

Tabela 3. Intervalos para os ensaios.

Tabela 4. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.

Tabela 5. Métodos analíticos empregados para a determinação quantitativa de fluvastatina.

Tabela 6. Métodos analíticos empregados para a determinação quantitativa de rosuvastatina.

Tabela 7. Métodos analíticos empregados para a determinação quantitativa de atorvastatina.

Tabela 8. Especificações das matérias-primas empregadas como padrão e das amostras utilizadas na pesquisa.

Tabela 9. Composição do placebo utilizado na formulação de comprimidos de fluvastatina sódica.

Tabela 10. Composição do placebo utilizado na formulação de comprimidos de atorvastatina cálcica.

Tabela 11. Composição do placebo utilizado na formulação de comprimidos de rosuvastatina cálcica.

Tabela 12. Parâmetros estabelecidos para validação das estatinas.

Tabela 13. Ensaios realizados no desenvolvimento de metodologias por (CZE) e (MEKC) para a validação e quantificação de estatinas (RC).

Tabela 14. Procedimento para realização do teste de recuperação da (RC)

Tabela 15. Teste de estresse

Tabela 16. Ensaios realizados no desenvolvimento de metodologia por (CZE) e (MEKC) para a validação e quantificação de FS e ATC

Tabela 17. Procedimento para adição do padrão de FS na amostra para realização do teste de recuperação empregando o método cromatográfico.

Tabela 18. Procedimento para realização do teste de recuperação.

Tabela 19. Condições empregadas nos testes de estresse para o método por MEKC.

Tabela 20. Ensaios preliminares realizados no desenvolvimento de metodologia por (CZE) e (MEKC) para a validação e determinação quantitativa de rosuvastatina.

Tabela 21. Procedimento para realização do teste de recuperação.

Tabela 22. Condições avaliadas nos testes de estresse.

Tabela 23. Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez.

Tabela 24. Parâmetros dos dados de planejamento fatorial empregados para realização do teste de robustez.

Tabela 25. Bandas de absorção da fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina no espectro na região do infravermelho (pastilha de KBr).

Tabela 26. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na análise de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. Método: CLAE.

Tabela 27. Resultados estatísticos da precisão dos dados obtidos na determinação de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina em comprimidos. Método: CLAE

Tabela 28. Resultados estatísticos da precisão dos dados obtidos na determinação de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina em comprimidos. Método: CLAE

Tabela 29. Resultados obtidos na adequabilidade do sistema.

Tabela 30. Precisão do sistema. Método MEKC, com detecção UV a 240 nm.

Tabela 31. Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas analíticas das estatinas. Método MEKC.

Tabela 32. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação da rosuvastatina, atorvastatina e fluvastatina. Método MEKC.

Tabela 33. Resultados obtidos na determinação da precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária) para a atorvastatina e fluvastatina. Método MEKC.

Tabela 34. Resultados obtidos na determinação do teor de atorvastatina e fluvastatina nas amostras comerciais. Método: MEKC.

Tabela 35. Teste de recuperação das soluções padrão de atorvastatina e fluvastatina adicionadas à amostra e analisadas pelo método por MEKC.

Tabela 36. Resultados experimentais na determinação da curva analítica da rosuvastatina. Método: CZE.

Tabela 37. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação da rosuvastatina. Método: CZE.

Tabela 38. Resultados obtidos na determinação da repetibilidade da precisão. Método: CZE.

Tabela 39. Resultados obtidos no teste de recuperação da rosuvastatina. Método: CZE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATC	Atorvastatina cálcica
ApoA	Apolipoproteína A
ApoB	Apolipoproteína B
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
C_{máx}	Concetação maxima
CZE	Capillary zone electrophoresis
CV	Coeficiente de variação
d.e.	Diâmetro externo
d.i.	Diâmetro interno
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
EOF	Fluxo eletrosmótico
F	Quantidade total de analito (amostra+padrão)
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fluvastatina sódica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade-colesterol
ICH	International Conference on Harmonization
kV	Kilo volt
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade-colesterol
MeOH	Metanol
Min	Minuto
Mol	Mol
mMol	Milimol
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
O	Quantidade de analito encontrado no análise
PI	Padrão interno
RC	Rosuvastatina cálcica
SREBP	Proteínas de elemento de ligação reguladoras do esterol
TBS	Tetraborato de sódio
TEA	Trietilamina
TG	Triglicérides
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível
VLDL	Lipoproteína de densidade baixa
v/v	Volume/volume
µm	Micrometro
µg	Micrograma

μL	Microlitro
%R	Porcentagem de recuperação
λ	Lambda (comprimento de onda)
S	Quantidade de padrão adicionada
°C	Grau Celsius
n	Número de amostras

1. INTRODUÇÃO

O número de mortes causadas por doenças cardiovasculares e em especial, por doenças cardíacas coronarianas, tem declinado significativamente, mas as doenças cardiovasculares continuam sendo as responsáveis pelo alto índice de mortalidade e morbidade em homens com idade superior a 45 anos e em mulheres acima de 65 anos. O número de mortes por doenças cardiovasculares no mundo todo, no ano de 2002, foi de 16,7 milhões de pessoas, sendo que as doenças cardíacas coronárias foram responsáveis por 7,2 milhões das mortes verificadas (WHO, 2003; CAMPO, 2007). Nos Estados Unidos, cerca de 215.000 pessoas morrem a cada ano de doença cardiovascular, com 650.000 novos casos de infarto do miocárdio (FARNIER; DAVIGNON, 1998; ABBRAHAM, 2003; CAMPO, 2007).

No Brasil, de acordo com o anuário estatístico de 2001, 257.179 pessoas morreram no ano de 1999 devido a doenças do aparelho circulatório, representando 32,3% dos óbitos registrados. Deste valor, 76.639 mortes foram causadas por doenças isquêmicas do coração, 83.475 por doença cerebrovascular e 97.065 devido às demais doenças do aparelho circulatório. Em 2002, o número de mortes no Brasil, envolvendo doenças cardíacas, foi de 139.601 (WHO, 2003; CAMPO, 2007).

Diversos estudos epidemiológicos envolvendo pacientes hiperlipêmicos, com excesso de lipídios no sangue, têm mostrado uma relação direta entre o risco de desenvolvimento de lesões ateroscleróticas e doença arterial-coronária (DAC) ("Coronary Heart Disease", CHD) e lesões ateroscleróticas, devido aos altos níveis de lipídios sanguíneos, geralmente na forma de lipoproteínas (WITZTUM, 1997). A hiperlipidemia ou hiperlipemia pode ser causada por distúrbio genético, influências ambientais ou por uma combinação destes fatores (BRUNTON, 2006).

As estatinas compreendem um grupo de fármacos anticolesterolêmicos inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase. Esta enzima limita a velocidade na síntese hepática de colesterol, como consequência se produz um aumento da síntese dos receptores de LDL, aumentando assim, a depuração das LDL e reduzindo as concentrações plasmáticas de LDL colesterol. Além

disso, produz pequena redução dos triglicerídeos plasmáticos e pequena elevação do HDL colesterol (BRUNTON, 2006).

Existem dois grupos de inibidores da HMG-CoA redutase. As de primeira geração conhecidas como estatinas naturais, são produtos de fermentação de culturas de fungos. Fazem parte desse grupo, a rosuvastatina e a sinvastatina. As de segunda geração são moléculas totalmente sintéticas cuja estrutura química difere das estatinas de primeira geração. São representantes deste grupo a fluvastatina, a atorvastatina e a rosuvastatina (BRUNTON, 2006).

Para o desenvolvimento do presente projeto foram selecionadas três estatinas sintéticas, a fluvastatina sódica (FS), a atorvastatina cálcica (ATC) e a rosuvastatina cálcica (RC).

Com a finalidade de garantir a dosagem e pela escassa disponibilidade de trabalhos científicos a respeito, é necessário desenvolver e validar metodologias analíticas para determinações quantitativas que sejam simples, de baixo custo, de baixo impacto ambiental e que proporcionem resultados confiáveis, bem como métodos analíticos alternativos para os medicamentos que constam nos compêndios oficiais.

Sendo as estatinas a classe de fármacos mais utilizados como hipocolesterolemizantes, são de grande importância o desenvolvimento e a validação de métodos para análise destes fármacos em comprimidos comercializados no Brasil.

Considerando os fatos acima expostos, no presente trabalho foram propostas técnicas instrumentais de separação e quantificação como a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. Para os métodos analíticos validados, as características de desempenho avaliadas foram: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão intra-dia e inter-dia, exatidão, robustez, e testes de estresse da matéria-prima.

2. OBJETIVOS

- ✓ Desenvolver e validar métodos analíticos modernos, rápidos e confiáveis, para a determinação quantitativa de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina nas formas farmacêuticas de comprimidos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforeses capilar (EC).
- ✓ Validar as metodologias analíticas previamente desenvolvidas, segundo critérios da “International Conference on Harmonization (ICH)”, a “United States Pharmacopeia (USP)”, a “Association of Official Analytical Chemists (AOAC)” e a RE 899 (ANVISA).
- ✓ Aplicar os métodos validados em formulações farmacêuticas comercializadas no Brasil.
- ✓ Comparar a precisão e a exatidão dos resultados obtidos pelos métodos analíticos na determinação do teor das estatinas em estudo, empregando as técnicas selecionadas para a pesquisa.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Estatinas

As estatinas são metabólitos de fungos que atuam como potentes inibidores competitivos da enzima HMG-CoA redutase. São obtidas a partir de substâncias originárias de culturas de fungos. A primeira substância dessa família foi isolada em 1976, de uma cultura de *Penicillium citrinum*, sendo chamada compactina (MANO, 2005). Esta substância revelou-se excelente inibidora da síntese do colesterol, mas, devido à toxicidade, não apresentou condições para uso clínico. Posteriormente, foi isolada a lovastatina da cultura do *Aspergillus terreus* (1980) com as mesmas propriedades da substância anterior, mas com menor toxicidade (YAMAMOTO et al., 1986).

Em 1987 a Food and Drug Administration (FDA) aprovou outras estatinas, como a atorvastatina, a fluvastatina e a cerivastatina, que foram obtidas por modificações químicas da estrutura da lovastatina. Desde então foram produzidas várias outras substâncias com fórmulas estruturais semelhantes às acima referidas, todas mostrando efeito inibidor da síntese do colesterol. O grupo recebeu a denominação genérica de estatinas.

A mevastatina (ou compactina) foi o primeiro inibidor de HMG-CoA redutase descoberto em 1976, originalmente isolado como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinum*⁶, sendo sua afinidade pelo sítio enzimático cerca de 10.000 vezes superior ao substrato HMG-CoA (WERMUTH, 1996).

Por outro lado, a lovastatina (ou mevinolina) foi isolada posteriormente de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* com estrutura semelhante à mevastatina (grupo 6'-metílico adicional), mas com potência superior (CAMPO, 2007). Em 1987 a lovastatina foi aprovada pelo FDA para uso terapêutico, enquanto que a mevastatina foi abandonada, pois ocasionou problemas na morfologia intestinal, quando testada em cães e toxicidade hepatocelular, verificada em ratos (KAJINAMI et al., 2003).

A introdução de novos derivados sintéticos da classe das estatinas ocorreu em 1996 e 1997, com a atorvastatina (Lipitor) e a cerivastatina (Baycon), respectivamente. No entanto, em agosto de 2001, a Bayer retirou a cerivastatina do mercado devido à incidência de mais de 100 casos de rabdomiólise fatal, relacionados a dano severo da

musculatura esquelética com alteração das células musculares, liberação de mioglobina, freqüentemente, acompanhada de problemas renais (WEN, A.; BI. ZHANG 2007). A maioria dos casos foi observada em tratamentos com doses excessivas de cerivastatina ou em doses normais associadas ao uso de genfibrosil, fármaco da classe dos fibratos empregados no tratamento das hipertrigliceridemias (WHIGAN, D.B e COHEN, A.I 1989).

Investigações recentes têm mostrado diversos efeitos importantes da cerivastatina e outras estatinas, tais como, ação antineoplásica (KAJINAMI. K; SAITO,Y 2003), inibição da reabsorção óssea aumento da disponibilidade de óxido nítrico endotelial (KOCIJAN, A.; GRAHEK, R. 2005), atenuação da hipertrofia do miócito cardíaco induzida pelo endotélio (OTTER,K.; MIGNAT, C. 1998), inibição da proliferação de células endoteliais induzidas por fatores angiogênicos, e diminuição dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-6, liberada pelo tecido adiposo. (PURATCHIKODY, A.; VALARMATHY, R.; 2003).

Em 2002, a atorvastatina foi o fármaco mais vendido no mundo, rendendo para o fabricante Pfizer cerca de US\$ 8 bilhões. A rosuvastatina (AstraZeneca), aprovada em agosto de 2003 pelo FDA, deverá concorrer por este mercado, enquanto que a pitavastatina, nova estatina sintética, em estudos pela empresa japonesa Kowa Company, apresentou grande eficácia em reduzir os níveis de colesterol, com doses diárias de 1 a 4 mg com ação similar ou superior à atorvastatina (MUKHTAR, R. Y. A.; REID, J., 2005)

No momento, seis estatinas são empregadas clinicamente: a lovastatina (Mevacor), a pravastatina (Pravacol), a sinvastatina (Zocor), derivado semi-sintético, e a fluvastatina (Lescol), primeiro agente totalmente sintético, derivado da mevalonolactona produzido na forma racêmica, (WERMUTH, C. G, 1996). A nova geração de estatinas sintéticas, enantiomericamente puras, é representada pela atorvastatina (Lipitor) e pela rosuvastatina (Crestor).

3.1.1. Estrutura e atividade farmacológica das estatinas

Todas as estatinas têm em comum um anel hexaidronaftaleno.

A pravastatina foi obtida, de cultura dos fungos *Nocardia autrophica*. A sinvastatina resultou de pequena modificação na estrutura da lovastatina (adição de radical metila). A fluvastatina, a atorvastatina e a cerivastatina são fármacos sintéticos.

As estatinas sintéticas e a pravastatina são compostos ativos na forma estrutural de anéis abertos. A lovastatina e a sinvastatina são pró-farmacos, sendo ativas apenas "in vivo", depois de metabolizadas para a forma estrutural de anel aberto. Esses fármacos apresentam efeitos metabólicos muito semelhantes, ainda que haja entre eles, várias diferenças estruturais moleculares. (Figura 1, WERMUTH, 1996).

Figura 1. Estrutura química das estatinas inibidoras da enzima HMG-CoA redutase

De forma geral, os fármacos naturais e sintéticos possuem grupos lipofílicos ligados a uma cadeia lateral comum, representada por uma unidade de ácido 3,5-di-hidroxicaprílico ou 3,5-di-hidroheptanoico, com substituintes na posição C7, com grande analogia estrutural não só com o substrato natural HMG-CoA da enzima HMG-CoA

redutase, mas também com o produto da ação enzimática, o ácido mevalônico (KUMAR, T.R.; MULLANGI, R.; 2006)

As estatinas são inibidores competitivos da enzima HMGR bastante potentes, com valores de constante de inibição (K_i) na faixa nanomolar (0,1 a 2,3). Por exemplo, a afinidade de HMG-CoA redutase pela mevastatina e pela lovastatina é, respectivamente, 7140 e 16700 vezes superior que pelo substrato, confirmando a presença de duas regiões de ligações fundamentais no sítio ativo da enzima, uma para ligação do grupo hidroximetilglutaril, no qual o substrato ou a porção de ácido 3,5-di-hidroxisovalérico das estatinas se ligam e, uma região adjacente hidrofóbica para complexação do grupo volumoso das estatinas (KUIHUA, C.; BINGYAN, T.; 1996).

As estatinas mais potentes devem ser capazes de fornecer grupos carboxilato e hidroxílicos não substituídos, preservando a função ácido 3,5-di-hidroxisovalérico (na forma hidroxiácido ou lactona. Todas as estatinas possuem um grupo hidroximetilglutarílico (HMG) que se liga na mesma região enzimática do grupo HMG do substrato, bloqueando seu acesso ao sítio catalítico.

A Figura 2A ilustra as interações moleculares mais relevantes do grupo HMG do substrato no sítio catalítico. Por outro lado, a Figura 2B mostra, comparativamente, as interações do inibidor rosuvastatina complexado no sítio catalítico de HMGR. Outras interações são observadas entre a base adenina e o grupo fosfato do substrato e a molécula de NADPH, no entanto, a Figura 2 se refere apenas às interações relevantes do sítio catalítico.

Figura 2. Interações do substrato (2A), extraído do PDB código ID IDQA, e inibidor rosuvastatina (8B), código ID 1HWL, complexadas no sítio catalítico da enzima HMG-CoA redutase: 2A ilustra as interações mais importantes da unidade de ácido 3-hidróxi-metilglutarílico do substrato, após clivagem e liberação de CoASH, 2B mostra, comparativamente, as interações do inibidor rosuvastatina, semelhante ao substrato (WITZTUM, J.L. GILMAN, A.G.; 1997)

Pontes de grupo etil ou (E)-etenil fornecem a melhor distância entre o carbono 5-carbinólico e a região lipofílica da decalina das estatinas de primeira geração, enquanto que a cadeia lateral da lovastatina, contendo grupo éster 2(S)-metilbutírico [$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CO}_2^-$], pode sofrer pequena modificação, como a introdução de grupo metílico adicional na posição 3. Esta variação deu origem à sinvastatina [$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CO}_2^-$], cerca de 2.5 vezes mais ativa do que a lovastatina (LEITERSDORF, E.; BR. J. CLIN., 1994). Modificações do grupo lipofílico, como **substituição de decalina** (mevinolina, lovastatina, sinvastatina e pravastatina) por anéis heterocíclicos substituídos, **como indol (fluvastatina), piridina (cerivastatina), pirrol (atorvastatina) e pirimidina (rosuvastatina)** conduzem a derivados que preservam a atividade hipolipidêmica (WIERZBICKI, A. S.; MIKHAILIDIS, D. P.; WRAY, R.; SCHACHTER, M., 2003).

Os grupos volumosos das estatinas, contendo grupo decalina ou anéis heterocíclicos, adotam diferentes conformações com o sítio de ação que conduzem a interações hidrofóbicas.

As estatinas sintéticas possuem um grupo 4-fluorofenil que participa de interações adicionais através do anel aromático e do átomo de flúor com o grupo guanidínico do resíduo Arg590. Por outro lado, a cadeia lateral de ácido butírico das estatinas, contendo grupo decalina, como a pravastatina, ocupa regiões semelhantes no sítio catalítico. Além destas interações, a atorvastatina e a rosuvastatina contém uma cadeia lateral polar com grupo carbonila ou sulfonamida, respectivamente, que realiza interação por ligação de hidrogênio com o resíduo de Ser565. Somente a rosuvastatina realiza interação polar com o resíduo de Arg568, através de grupo sulfonamido (INSTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J., 2001) .

A pravastatina é usada na forma de hidróxiácido livre, enquanto que a mevastatina, a lovastatina e a sinvastatina são usadas como pró-farmacos na forma de lactonas, que serão enzimaticamente convertidas pela ação de esterases aos correspondentes hidróxiácidos (ácido 3,5-di-hidroxivalérico), ativos na inibição de HMG-CoA redutase. A pravastatina é o metabólito da mevastatina, enquanto que a sinvastatina é análoga da lovastatina com grupo metílico adicional na cadeia lateral. *In vivo*, a forma lactônica de pró-fármacos de estatinas está em equilíbrio reversível com a forma de hidróxiácido ativa, capaz de mimetizar estruturalmente o substrato natural HMG-CoA.

A molécula de mevinolina, assim como as estatinas clássicas, possui sete centros assimétricos, mas estudos de Relação Estrutura Atividade (REA) têm mostrado que, pelo menos cinco destes centros quirais, presentes na porção hexahidronaftalênica e cadeia lateral (posição 8), são desnecessários para inibição efetiva de HMG-CoA redutase. Por outro lado, a configuração do carbono 5 dos derivados lactônicos parece importante, pois o epímero da lovastatina não apresenta qualquer atividade hipolipêmica (WIERZBICKI, A. S.; MIKHAILIDIS, D. P., 2003). A atorvastatina e a rosuvastatina são exemplos de estatinas que preservam apenas dois centros assimétricos da molécula da mevastatina original e, mesmo assim, são potentes inibidores enzimáticos (FARNIER, M.; DAVIGNON, J., 1998).

Os pró-fármacos lovastatina e sinvastatina são menos solúveis em água, enquanto que a pravastatina, mais hidrossolúvel, possui baixa penetração em células hepáticas, maior seletividade para inibição de HMG-CoA redutase hepática e início de ação mais rápida, atingindo picos de concentração em apenas 1 hora.

Os efeitos de diminuição de LDL-colesterol em pacientes hipercolesterolêmicos parecem ser semelhantes entre as estatinas clássicas, ou seja, cerca de 25 a 45%, dependendo da dose. No entanto, a lovastatina e a sinvastatina parecem mais vantajosas em relação à pravastatina porque produzem maior nível de HDL-colesterol e maior diminuição de triglicerídeos séricos, triglicerídeos VLDL e colesterol VLDL.

Atualmente, diversos dados da literatura mostram que as estatinas não só promovem diminuição de LDL-colesterol e aumento de HDL-colesterol, como também conduzem à diminuição dos níveis de triglicerídeos, (WERMUTH, 1996). De forma geral, as estatinas causam redução dos níveis de triglicerídeos, mas este efeito parece ser observado apenas em pacientes hipertrigliceridêmicos. Os valores praticamente constantes obtidos da relação triglicerídeos/LDL-colesterol, nestes estudos, mostram que quanto maior a atividade de estatina para diminuir o LDL-colesterol, maior será o efeito na diminuição dos níveis de triglicerídeos, (MUKAI, Y; SHIMOKAWA, H., 2003).

A lovastatina, a pravastatina e, mais recentemente, a sinvastatina apresentaram atividade antiaterogênica, relacionada à melhora da disfunção endotelial e vasomotora, diminuição da formação de trombos plaquetários e modulação na atividade fibrinolítica em pacientes hipercolesterolêmicos. Estes efeitos contribuem para redução de quadros de isquemia do miocárdio e incidência de infarto, com conseqüente diminuição do índice de mortalidade total causado por doenças cardiovasculares (FARNIER, M.; DAVIGNON, J., 1998).

As estatinas são bem toleradas com boa margem de segurança durante a utilização prolongada. Os efeitos colaterais não são freqüentes, mas um dos mais sérios está relacionado à ação hepatotóxica, com possível aumento das enzimas aspartato e alanina transaminases. Miopatias, com evolução à rabdomiólises e insuficiência renal, são raras, mas são efeitos graves associados ao uso de estatinas. Parece que o uso concomitante de estatinas com eritromicina, ciclosporina, niacina e fibratos, aumenta o risco de miopatias em 10-30% dos pacientes.

3.1.2. Mecanismo de ação das estatinas

As estatinas exercem seu principal efeito na redução de níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), através de uma porção parecida com o ácido mevalônico que inibe de maneira competitiva a HMG-CoA redutase, (ALBERTS et al., 1989).

As estatinas reduzem os níveis de colesterol do sangue inibindo a colesterogênese no fígado, o que resulta em aumento da expressão do gene receptor LDL. Em resposta ao conteúdo reduzido de colesterol livre em hepatócitos, as proteínas de elemento de ligação reguladoras do esterol (SREBP), ligadas à membrana, são clivadas através de protease e deslocadas para o núcleo. Os fatores de transição são então ligados pelo elemento de resposta ao esterol do gene receptor de LDL, aumentando a transcrição e finalmente acentuando a síntese dos receptores LDL. A degradação dos receptores LDL também é reduzida. O número maior de receptores LDL na superfície dos hepatócitos resulta em remoção aumentada de LDL do sangue (BILHEIMER et al., 2003), diminuindo assim os níveis de LDL colesterol (BRUNTON, 2006).

Alguns pesquisadores sugerem que as estatinas podem também reduzir os níveis de LDL aumentando a remoção dos precursores LDL lipoproteínas de baixa densidade e lipoproteínas de densidade intermediária (VLDL e IDL), diminuindo ainda a produção de VLDL hepático (GRUNDY E VEGA, 1987; AGUILAR-SALINAS et al., 1998). Como os remanescentes de VLDL são ricos em apoE, um aumento induzido pelas estatinas no número de receptores LDL, que reconhecem, tanto apoB-100 como apoE, aumenta a depuração desses precursores de LDL. Acredita-se que a redução na produção de VLDL hepático, induzida pelas estatinas, seja mediada pela síntese reduzida de colesterol, um componente necessário do VLDL (THOMPSON et al.,

1996). Esse mecanismo também é provavelmente responsável pelo efeito de redução de triglicerídeos pelas estatinas (GINSBERG, 1998).

3.1.3. Absorção, metabolismo e excreção das estatinas

Após a administração oral, a absorção intestinal das estatinas varia de 30 a 85%. Todas as estatinas, à exceção da sinvastatina e a lovastatina, são administradas na forma de β -hidróxiácido, que é a forma que inibe a HMG-CoA redutase. A sinvastatina e a lovastatina são administradas na forma de lactonas inativas que devem ser transformadas, no fígado, em seus respectivos β -hidróxiácidos, a sinvastatina ácida e a lovastatina ácida. Intensa captação hepática de primeira passagem ocorre com todas as estatinas, porém o mecanismo de entrada no fígado difere de acordo com a estatina. A captação de pravastatina, atorvastatina e da rosuvastatina é mediada pelo transporte de ânions orgânicos 2 (OATP2) (HSIANG et al., 1999; SCHNECK et al., 2004). Em virtude da extensa captação hepática de primeira passagem, a biodisponibilidade sistêmica das estatinas e de seus metabólitos hepáticos varia de 5 a 30%. (BELLOSTA et al., 2004). No plasma mais de 95% das estatinas e seus metabólitos estão ligados a proteínas, com exceção da pravastatina e de seus metabólitos, cuja ligação é de apenas 50%.

Após uma dose oral, as estatinas atingem a concentração máxima em 1 a 4 horas. As meias-vidas dos compostos originais são de 1 a 4 horas, exceto no caso da atorvastatina e da rosuvastatina, que apresentam meias-vidas de cerca de 20 horas. As meias-vidas mais longas da atorvastatina e a rosuvastatina podem contribuir para maior eficácia na redução do colesterol (CORSINI et al., 1999). O fígado biotransforma as estatinas e mais de 70% de seus metabólitos são excretados pelo mesmo órgão, com eliminação subsequente nas fezes (BELLOSTA et al., 2004).

3.2. Fluvastatina

3.2.1. Propriedades farmacológicas

A fluvastatina é um agente redutor de colesterol, totalmente sintético. É um inibidor competitivo da HMG-CoA redutase, que é responsável por sua conversão em mevalonato, um precursor de esteróis, inclusive do colesterol. Está indicada como adjuvante da dieta na redução dos níveis elevados de colesterol total, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (colesterol-LDL), apolipoproteína B (apo-B) e triglicéridos e no aumento do colesterol das lipoproteínas de alta densidade (colesterol-HDL) em doentes com hipercolesterolemia e dislipidemia mista primárias (Tipos IIa e IIb de Fredrickson) (DOGRUKOL-AK, D.; KIRCALI, K., 2001)

Este fármaco, comercializado sob a forma de fluvastatina sódica (Lescol®) está indicado para retardar a progressão da aterosclerose das artérias coronárias em doentes com hipercolesterolemia primária, incluindo as formas ligeiras, e doença cardíaca coronária. Está também indicado na prevenção secundária de efeitos adversos cardíacos maiores (morte cardíaca, enfarte do miocárdio não fatal e revascularização coronária) em doentes com doença cardíaca coronária após cateterismo coronário (BRUNTON, L.L., 2006).

3.2.2. Farmacocinética

Antes de iniciar o tratamento com fluvastatina o doente deve ser submetido a uma dieta padrão de redução do colesterol que deve manter-se durante o tratamento. A dose inicial recomendada é de 40 mg (1 cápsula de fluvastatina 40 mg) ou 80 mg (1 comprimido de fluvastatina 80 mg ou duas cápsulas de fluvastatina 40 mg) uma vez por dia. A dose de 20 mg de fluvastatina (1 cápsula de fluvastatina 20 mg) pode ser adequada em casos não muito graves. As doses iniciais devem ser individualizadas de acordo com os níveis basais de colesterol-LDL e com o objectivo terapêutico a atingir.

Em doentes com doença cardíaca coronária após cateterismo coronário a dose adequada é de 80 mg por dia (BRUNTON, L.L., 2006).

A fluvastatina ou Lescol XL® pode ser administrada como uma dose única em qualquer momento do dia, com ou sem alimentos. Os comprimidos devem ser ministrados inteiros com um copo de água. O efeito hipolipemiante máximo com uma dada dose do fármaco é obtido em 4 semanas. As doses devem ser ajustadas de acordo com a resposta do doente e os ajustamentos posológicos devem ser realizados em intervalos de 4 semanas ou mais. O efeito terapêutico da fluvastatina mantém-se com a administração prolongada (CAMPO, V.L.; CARVALHO, I., 2007)

3.2.3. Farmacodinâmica

A fluvastatina exerce o seu principal efeito no fígado e é uma mistura racêmica de dois eritro enantiómeros, dos quais um exerce a atividade farmacológica. A inibição da biossíntese do colesterol reduz o colesterol nas células hepáticas, o que estimula a síntese de receptores das LDL, e desse modo aumenta a absorção de partículas LDL. O resultado final destes mecanismos é uma redução da concentração plasmática de colesterol (BRUNTON, L.L., 2006).

A biodisponibilidade total avaliada a partir das concentrações sanguíneas sistêmicas é de 24%. O volume de distribuição aparente do fármaco é de 330 mL. Mais de 98% do fármaco presente na circulação encontra-se ligado às proteínas plasmáticas e esta ligação não é afectada pela concentração de fluvastatina (BRUNTON, L.L., 2006).

3.2.4. Propriedades físico-químicas

Nome químico	Mono sal de sódio de [R*,S*-(E)]-(±)-7-[3-(4-fluorofenil)-1-(1-metiletil)-1H-indol-2-il]-3,5-diidroxi-6-ácido heptanóico
Substância (Sigla)	Fluvastatina sódica (FS)
Formula molecular	C ₂₄ H ₂₅ FNNaO ₄
Massa molecular	433,46
Ponto de fusão	194 - 197°
pKa	4,27 ± 0,10

Solubilidade	Solúvel em metanol e água, meio alcalino e pH neutro. Levemente solúvel em meio ácido e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter.
Cor	Amarela
Aspecto físico	Pó fino

Figura 3. Estrutura química da fluvastatina sódica (MERCK.2010)

3.3 Atorvastatina

3.3.1. Propriedades farmacológicas

A atorvastatina diminui os níveis plasmáticos de colesterol e de lipoproteínas através da inibição da HMG-CoA redutase e da síntese de colesterol no fígado. Aumenta o número de receptores de LDL hepáticos na superfície da célula, aumentando a absorção e o catabolismo do LDL.

A atorvastatina comercializada com o nome de (Citalor®), reduz a produção e o número de partículas de LDL. Produz um aumento marcante e prolongado na atividade do receptor de LDL, além de promover uma alteração benéfica na qualidade das partículas de LDL circulantes. Tem ação em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica e heterozigótica, uma população que não responde normalmente à medicação de redução lipídica. Para as formas não familiar de hipercolesterolemia e dislipidemia mista, a atorvastatina reduz o colesterol total, LDL-C (lipoproteína de baixa densidade) e apolipoproteína B. A atorvastatina também reduz o VLDL-C (lipoproteínas de densidade muito baixa) e os triglicérides e produz aumentos variáveis no HDL-C (lipoproteínas de alta densidade) (BRUNTON, L.L., 2006).

O principal sítio de ação da atorvastatina é o fígado, que é o principal local de síntese de colesterol e *clearance* de LDL. A redução no LDL - colesterol está mais relacionada à dose do fármaco do que a sua concentração sistêmica no paciente (CAMPO, V.L.; CARVALHO, I., 2007)

3.3.2. Farmacocinética

A atorvastatina é rapidamente absorvida após administração oral e concentrações plasmáticas máximas são atingidas dentro de 1 a 2 horas. A extensão da absorção e as concentrações plasmáticas aumentam em proporção à sua dose. A biodisponibilidade absoluta é de aproximadamente 14% e a disponibilidade sistêmica da atividade inibitória sobre a HMG-CoA redutase é de aproximadamente 30%. A baixa biodisponibilidade sistêmica é atribuída ao *clearance* pré-sistêmico na mucosa gastrintestinal e ao metabolismo hepático pré-sistêmico da primeira passagem. Embora o alimento diminua a taxa e a extensão da absorção do fármaco em aproximadamente 25% na $C_{m\acute{a}x}$ e 9% na AUC, respectivamente. A redução do LDL-C é semelhante se a atorvastatina for administrada com ou sem alimentos. As concentrações plasmáticas de atorvastatina são mais baixas (aproximadamente 30% para $C_{m\acute{a}x}$) após a administração do medicamento à noite, quando comparada à administração pela manhã. Entretanto, a redução no LDL-C é independente da hora em que o fármaco é administrado (CAMPO, V.L.; CARVALHO, I., 2007)

O volume médio de distribuição da atorvastatina é de aproximadamente 381 litros. A atorvastatina apresenta uma taxa de ligação às proteínas plasmáticas igual ou superior a 98%. Uma proporção glóbulo vermelho do sangue/plasma de aproximadamente 0,25 indica baixa penetração do fármaco nos glóbulos vermelhos do sangue (eritrócitos).

A atorvastatina é amplamente metabolizada a derivados orto e para-hidroxilados e a vários produtos de beta-oxidação. A inibição da HMG-CoA redutase pelos metabólitos orto e para-hidroxilados *in vitro* é equivalente àquela observada com a atorvastatina. Aproximadamente 70% da atividade inibitória circulante sobre a HMG-CoA redutase é atribuída aos metabólitos ativos. Estudos *in vitro* sugerem a importância do metabolismo da atorvastatina pelo citocromo hepático P450 3A4, de acordo com a ocorrência de elevadas concentrações plasmáticas de atorvastatina (MERCK index. 2006).

A atorvastatina e seus metabólitos são eliminados principalmente na bile após metabolismo hepático e/ou extra-hepático; entretanto, o fármaco parece não sofrer recirculação entero-hepática. A meia-vida de eliminação plasmática média em humanos é de aproximadamente 14 horas, mas a meia-vida da atividade inibitória para a HMG-CoA redutase é de 20 a 30 horas, devido à contribuição dos metabólitos ativos. Menos de 2% de uma dose de atorvastatina é recuperada na urina após administração oral. A CYP3A4 é a principal isoenzima hepática conhecida por estar envolvida na biotransformação da atorvastatina. A dose pode variar de 10 a 80 mg, em dose única diária. As doses podem ser administradas a qualquer hora do dia, com ou sem alimentos. As doses inicial e de manutenção devem ser individualizadas de acordo com os níveis basais de LDL-C, a meta do tratamento e a resposta do paciente. Após o início do tratamento e/ou durante o ajuste de dose de atorvastatina, os níveis lipídicos devem ser analisados dentro de 2 a 4 semanas, e a dose deve ser ajustada adequadamente (MERCK index. 2006).

3.3.3. Farmacodinâmica

O Citalor® (atorvastatina cálcica) é indicado como um adjunto à dieta para o tratamento de pacientes com níveis elevados de CT, LDL-C, apo B e triglicérides, para aumentar os níveis de HDL-C em pacientes com hipercolesterolemia primária (hipercolesterolemia heterozigótica familiar e não familiar), hiperlipidemia combinada (mista) (Fredrickson tipos IIa e IIb), níveis elevados de triglicérides séricos (Fredrickson tipo IV) e para pacientes com disbetalipoproteinemia (Fredrickson tipo III) que não respondem de forma adequada à dieta (MERCK index. 2006).

O Citalor® também é indicado para a redução do CT e do LDL-C em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica e para pacientes com doença cardiovascular e/ou dislipidemia. O Citalor® está indicado na síndrome coronária aguda (angina instável e infarto do miocárdio não-transmural – sem onda Q) para a prevenção secundária do risco combinado de morte, infarto do miocárdio não fatal, parada cardíaca e re-hospitalização de pacientes com angina do peito. Em pacientes com doença cardíaca coronariana clinicamente evidente, o Citalor® é indicado para redução do risco de infarto do miocárdio não fatal; acidente vascular cerebral fatal e

não fatal; procedimentos de revascularização; hospitalização por insuficiência cardíaca congestiva e angina (MERCK index. 2006).

3.3.4. Propriedades físico-químicas

Nome químico	Sal de cálcio triidratado de R-(R*,R*) -2- (4-fluorofenil)-β,δ-diidroxi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4-[(fenilamino) carbonil]-1H-pirrol-1-ácido heptanóico.
Substância (Sigla)	Atorvastatina cálcica (ATC)
Formula molecular	C ₆₆ H ₆₈ CaF ₂ N ₄ O ₁₀
Massa molecular	1155,36
Ponto de fusão	159,2 – 160,7°
pKa	4,29 ± 0,10
Solubilidade	Solúvel em metanol e água, meio alcalino e pH neutro. Levemente solúvel em meio ácido e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter.
Cor	Branca
Aspecto físico	Pó fino e cristalino

Figura 4. Estrutura química da atorvastatina cálcica (MERCK 2006)

3.4. Rosuvastatina

3.4.1. Propriedades farmacológicas

Reconhecida como uma estatina totalmente sintética e ativa por via oral, a rosuvastatina apresenta características farmacocinéticas e farmacodinâmicas que, certamente, vão transformá-la em fármaco de primeira escolha para grande parte dos pacientes com dislipidemia.

Como tem sido demonstrado para as estatinas tradicionais, a rosuvastatina liga-se diretamente, e de uma maneira forte e reversível, a uma área específica da enzima HMG-CoA redutase. Desse modo, a adição de um grupo sulfonamido-metano à molécula de rosuvastatina não somente aumenta sua hidrofiliidade, como amplia sua interação com a enzima HMG-CoA1, proporcionando resultados clínicos mais expressivos (MERCK index. 2010).

A rosuvastatina cálcica comercializada com o nome de (Crestor®) é indicado para pacientes com hipercolesterolemia primária, dislipidemia combinada (mista) e hipertrigliceridemia isolada (incluindo os tipos IIa, IIb e IV de Fredrickson; e a hipercolesterolemia familiar heterozigótica) como adjuvante à dieta, quando a resposta à dieta e aos exercícios é inadequada.

O Crestor reduz o LDL-colesterol, o colesterol total e os triglicérides elevados e aumenta o HDL-colesterol, capacitando assim a maioria dos pacientes a atingir as diretrizes relevantes de tratamento. O Crestor também diminui a ApoB, o não-HDL-C, o VLDL-C e o VLDL-TG, reduz as relações de LDL-C/HDL-C, C-total/HDL-C, não-HDL-C/HDL-C e ApoB/ApoA-I e aumenta a ApoA-I (BELLOSTA,S; BAETA,R., 2009).

É também indicado a pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica, tanto isoladamente quanto como adjuvante à dieta e a outros tratamentos de redução de lipídios.

3.4.2. Farmacocinética

Após a administração, a absorção é moderadamente rápida com picos plasmáticos ocorrendo entre 3-5 horas após administração. O tempo de semi-vida é relativamente longo (18-20 horas). A absorção aumenta de forma linear com doses maiores de rosuvastatina, com exposição sistêmica proporcional às doses existentes.

Verificou-se que a farmacocinética da rosuvastatina permaneceu inalterada em múltiplas dosagens, com estabilização da dose atingida em 5 dias. A co-administração de rosuvastatina com alimento reduziu a taxa, mas não a extensão de absorção e não afetou a redução LDL-colesterol (MERCK index. 2010).

A rosuvastatina é distribuída predominantemente no plasma com aproximadamente 90% ligada a proteínas, principalmente a albumina. O volume de distribuição é de aproximadamente de 134 litros (BELLOSTA, S; BAETA, R., 2009).

Estudos “in vitro” demonstram que o metabolismo da rosuvastatina se produz nos hepatócitos. Ocorre principalmente pelo Citocromo P450 2C9 e com menor contribuição, pelo Citocromo P450 2C19. O maior metabolito forma pelo Citocromo P450 2C9 é o N-desmetil rosuvastatina, que possui cerca de 50% da atividade inibitória do componente ativo. Há pouco ou nenhum metabolismo via Citocromo P450 3A4, indicando reduzido potencial para interações com substâncias metabolizadas por esta enzima (ASTRA-ZENECA, DRUGBANK, 2010).

A rosuvastatina sofre metabolismo de aproximadamente 10%, principalmente para a forma N-desmetilada, e 90% são eliminados como fármaco inalterado nas fezes, sendo o restante excretado na urina (BELLOSTA, S; BAETA, R., 2009).

3.4.3. Farmacodinâmica

A rosuvastatina é um seletivo e potente inibidor competitivo da HMG-CoA redutase, a enzima que limita a taxa de conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A para mevalonato, um precursor do colesterol. Os triglicérides (TG) e o colesterol são incorporados no fígado à apolipoproteína B (ApoB), e liberados no plasma como lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), para serem distribuídos nos tecidos periféricos. As partículas VLDL são ricas em triglicérides. A lipoproteína de baixa densidade (LDL), rica em colesterol, é formada a partir de VLDL e captada principalmente através do receptor de LDL de alta afinidade no fígado (BELLOSTA, S; BAETA, R., 2009).

A rosuvastatina exerce seus efeitos modificadores de lipídios de duas maneiras: ela aumenta o número de receptores LDL hepáticos na superfície celular, aumentando a

captação e o catabolismo do LDL, e inibe a síntese hepática de VLDL, reduzindo, assim, o número total de partículas de VLDL e LDL (MERCK Index. 2010).

A lipoproteína de alta densidade (HDL) que contém ApoA-I é envolvida no transporte do colesterol dos tecidos de volta para o fígado (transporte reverso de colesterol).

Estudos epidemiológicos estabeleceram que altos níveis de LDL-C e TG altos e baixos de HDL-C e ApoA-I, foram associados a um maior risco de doença cardiovascular. Estudos de intervenção mostraram os benefícios da redução de LDL-C e TG ou do aumento do HDL-C sobre as taxas de mortalidade e de eventos cardiovasculares (CV). Dados mais recentes associaram os efeitos benéficos dos inibidores da HMG-CoA redutase à diminuição do não-HDL (todo colesterol circulante que não está em HDL) e da ApoB ou à redução da relação da ApoB/ApoA-I (MERCK Index. 2010).

3.4.4. Propriedades físico-químicas

Nome químico	Sal de cálcio do bis [(E)-7-[4-(4-fluorofenil)-6-isopropil-2-[met (metilsulfonil) amino] pirimidina-5-il](3R,5S)-3,5-ácido diidrox-hept-6-enóico]
Substância (SIGLA)	Rosuvastatina cálcica (RC)
Formula molecular	(C ₂₂ H ₂₇ FN ₃ O ₆ S) ₂ Ca
Massa molecular	1001,14
Ponto de fusão	126 – 128°
pKa	4,25 ± 0,10
Solubilidade	Solúvel em metanol e água, meio alcalino e pH neutro. Levemente solúvel em meio ácido e praticamente insolúvel em clorofórmio e éter.
Cor	Branca
Aspecto físico	Pó fino e cristalino

Figura 5. Estrutura química da rosuvastatina cálcica (MERCK 2010).

3.5. Controle de qualidade

Diversos conceitos subjetivos levam a uma única idéia de qualidade. O controle de qualidade é um Conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos e demais produtos abrangidos por este regulamento, para que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade (ANVISA, Lei nº 9.787, de 10 de Fevereiro de 1999).

No contexto histórico, o controle de qualidade passou por três diferentes fases: inspeção, controle estatístico e qualidade total. A inspeção de produtos em pequena quantidade era feita em todas as unidades produzidas. Com o advento da revolução industrial, o controle da qualidade de produtos fabricados em larga escala, deu origem ao processo de amostragem e localização de erros. A estatística foi a principal forma de análise e avaliação. Atualmente, o termo Controle Total (Integral) da Qualidade resume o esforço organizado dentro de uma empresa, constituindo o Sistema de Qualidade desta empresa (TAVARES, tese. 2010).

Em laboratórios e indústrias farmacêuticas, quando se fala em Sistema de Qualidade engloba-se o Controle de Qualidade, as Boas Práticas de Fabricação e o Controle Total da Qualidade, a fim de se idealizar, produzir, manter e assegurar as características em cada unidade do produto através de padrões ou níveis de qualidade (GIL, 2007; SANTORO, 1988).

De acordo com a RDC17 de 16 de abril de 2010 da ANVISA, o Controle de Qualidade pode ser definido como o conjunto de ensaios qualitativos realizados com o

objetivo de avaliar matérias-primas, produtos intermediários, produtos acabados, materiais de embalagem, e verificar se apresentam conformidade com as especificações estabelecidas. Portanto, o objetivo é examinar o produto, detectar o defeito, desvios e erros. Desta maneira, o Controle de Qualidade se resume em um trabalho de detecção (BRASIL, 2010; GIL, 2007).

Outras atribuições do Controle de Qualidade são estabelecer, validar e implementar os procedimentos dentro da indústria, seguindo Procedimentos Operacionais Padrão aprovados e registrados (GIL, 2007).

A grande maioria das formas farmacêuticas acabadas são misturas de princípios ativos e diversos materiais inertes (excipientes), que asseguram a qualidade e a estabilidade do medicamento, garantindo assim a aceitabilidade, a eficiência, a confiabilidade e a segurança do paciente. Apesar das vantagens destas complexas misturas, o controle de qualidade deve ser feito, o que só é possível se houver a separação completa dos componentes destas formulações (LEITE, 2002).

O controle de qualidade se subdivide em microbiológico e físico-químico. Os ensaios realizados em laboratórios de controle físico-químico para avaliação qualitativa e quantitativa são basicamente ensaios de identificação, pureza, potência, físicos, estabilidade, empregando técnicas analíticas para determinação quantitativa (GIL, 2007).

O controle de qualidade tem ainda outras atribuições, tais como: estabelecer, validar e implementar seus procedimentos, avaliar, manter e armazenar os padrões de referência das substâncias ativas utilizadas ; verificar a correta rotulagem dos recipientes de materiais e dos produtos; garantir a estabilidade dos princípios ativos e garantir que os produtos sejam monitorados; participar da investigação de reclamações relacionadas com a qualidade do produto e participar no monitoramento ambiental.

O tratamento estatístico de dados se tornou parte de qualquer procedimento, pois quando aplicado em qualquer fase de controle de qualidade, auxilia na avaliação de um grande número de resultados e fatores experimentais, utilizando cálculos matemáticos, reduzindo assim o trabalho, o tempo e o custo dos procedimentos (BARROS NETO et al., 2007).

3.6 Métodos instrumentais

Os métodos instrumentais tornaram-se ferramentas fundamentais para o controle de qualidade, tanto no laboratório físico-químico, como no microbiológico ou no controle de processos. A maior importância está no grande avanço tecnológico, o que possibilitou o aumento da sensibilidade dos métodos e agilidade na obtenção de resultados e avaliação de erros (GIL, 2007).

Os métodos instrumentais utilizados na presente pesquisa foram a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC), métodos validados utilizando estas duas técnicas analíticas foram empregados para a quantificação das estatinas selecionadas para o estudo.

3.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é um processo analítico para separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias em razão das afinidades relativas pelas duas fases: a fase móvel e a fase estacionária (COLLINS, C.H.,1995).

A cromatografia líquida de alta eficiência emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostra, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS, C.H.,1995).

A separação cromatográfica é o resultado de interações específicas entre moléculas da amostra e as fases móvel e estacionária. Uma vez que a migração diferencial é dinâmica e depende do equilíbrio de distribuição de cada componente entre a fase móvel e a fase estacionária, a composição de ambas fases e a temperatura de separação serão as variáveis que afetarão o processo. A mobilidade exibida pelo soluto dar-se-á em função de diferenças na adsorção, partição, solubilidade, pressão de vapor, tamanho da molécula ou densidade de carga iônica (CASS; DEGANI, 2001).

Conforme a Figura 6, o equipamento de CLAE é basicamente constituído de seis componentes. O reservatório de solventes (Reservoir) é o local onde se encontram os

solventes da fase móvel que é impulsionada até a coluna cromatográfica por um sistema de bomba (Pump) composto de uma ou mais bombas de alta pressão. A coluna cromatográfica (Coluna) é o local onde ocorre a separação da amostra que é introduzida através de um injetor (Injetor) que se localiza entre a bomba e a coluna. A composição do efluente que passa pela coluna gera sinais elétricos através de um detector (Detector) e esses sinais são compilados em um processador de dados (Data System), um computador, que os transforma em um conjunto de picos conhecido como cromatograma (COLLINS et al., 2006; GIL, 2007).

Figura 6. Representação de um equipamento de CLAE (F. REIS, 2009)

A principal característica é que a fase móvel dissolve a amostra sem qualquer interação química entre ambas. Esta fase deve ter alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, para que se possam fazer análises de alta sensibilidade, pois as impurezas podem interferir na detecção do analito por ultravioleta (UV). A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila (F. REIS, 2009).

Como fase estacionária utilizam-se sólidos ou compostos semi-rígidos, cujas partículas porosas esféricas ou irregulares, apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão até 350 bar (COLLINS et al., 2006).

A coluna cromatográfica é feita de um material inerte que resiste a todas as pressões em que ela vai ser usada. A capacidade da coluna é determinada pelo comprimento, diâmetro e pelo material de recheio. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (C18, RP18, ODS), octil (C8, RP8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina). Quanto aos detectores, não existe um que apresente todas as propriedades para que ele seja ideal para CLAE. Não são versáteis, ou universais, mas existem detectores que apresentam ampla faixa de aplicações. A sensibilidade de um detector é determinada a partir da relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal. A linearidade é a faixa linear do sistema, onde o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do soluto (F. REIS, 2009).

Os detectores mais empregados na CLAE são os fotométricos, baseados na absorbância no ultravioleta e no visível. Os detectores de fluorescência, utilizados como método de detecção específica, são sensíveis para substâncias que fluorescem. Este tipo de detector pode detectar quantidades da ordem picograma. Também são utilizados detectores por índice de refração, os quais acompanham continuamente a diferença no índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo os componentes da amostra. A resposta deste detector é moderada, geralmente de ordem micrograma (COLLINS et al., 2006; SNYDER et al., 1997).

3.6.1.1. Vantagens

- ✓ Menor tempo de análise, devido à alta eficiência da coluna e à vazão rápida da fase móvel através da coluna.
- ✓ Alta resolução, pela possibilidade de análise de misturas complexas.
- ✓ Resultados quantitativos de fácil execução e grande precisão.
- ✓ Boa sensibilidade pelo uso de detectores que permitem medidas em nanogramas.

- ✓ Versatilidade, pois pode ser aplicada a compostos orgânicos e inorgânicos, amostras líquidas em solução, iônicas ou covalentes.
- ✓ Automatização conseguida com o emprego de microcomputadores conjugados ao sistema cromatográfico (COLLINS et al., 1995).

3.6.1.2. Limitações

- ✓ Alto custo de instrumentação, representando alto investimento;
- ✓ Alto custo de operação pelas fases móveis de alto grau de pureza e pela contínua reposição das fases estacionárias;
- ✓ Falta de detector que seja simultaneamente universal e sensível (COLLINS et al., 1995).

3.6.2. Eletroforese capilar

A eletroforese foi descrita, pioneiramente, por Tiselius na década de 30 (TAVARES, 1996), e definida como migração de espécies eletricamente carregadas em um condutor líquido, usualmente aquoso, sob a ação de um campo elétrico. O autor denominou-a de "eletroforese de fronteira móvel" e esta técnica encontra-se, ainda hoje, sendo largamente utilizada para a separação de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas. Mais recentemente, a aplicação de um campo elétrico a um tubo capilar contendo um líquido condutor tem ampliado as suas aplicações analíticas. Um diagrama esquemático do sistema CE é apresentado na Figura 7.

Figura 7. Representação da instrumentação da EC (GERVASIO, 2008)

R1 e R2 são os recipientes contendo solução eletrolítica onde se encontram os eletrodos (e_1 e e_2) conectados à fonte de potência (F). Os círculos brancos representam os íons, as áreas representam as massas e os sinais negativos e positivos indicam as cargas. A detecção radial da absorção molecular é representada por uma fonte de radiação (v) um detector (D) acoplado a um computador (C). No retângulo é mostrado o registro temporal dos sinais.

Na EC, o capilar é preenchido com uma solução tampão de composição constante, a qual está presente tanto no ânodo como no cátodo. Em uma amostra tem-se uma mistura de espécies carregadas eletricamente e espécies neutras, as primeiras, ou seja, os íons apresentam tamanhos e cargas diferentes. De modo geral, a amostra é introduzida na extremidade anódica do tubo e, ao ser aplicada uma diferença de potencial entre as extremidades da coluna, os íons migram através do tubo com diferentes velocidades e em diferentes sentidos. A velocidade e o sentido de migração dependem do tamanho e da magnitude de carga de cada íon. Deve ser ressaltado que as espécies neutras não sofrem influência do campo elétrico e por isso migram conjuntamente com o fluxo eletrosmótico (TAVARES, 1996; HARRIS, 2005).

Na EC, além dos solutos, a solução tampão, normalmente, move-se através do capilar sob o efeito de um campo elétrico. Este fenômeno é denominado fluxo

eletrosmótico (EOF: "Electroosmotic Flow") ou eletro-endosmótico. Durante uma operação convencional, o EOF origina-se no ânodo e dirige-se ao cátodo devido à formação de uma dupla camada iônica que ocorre na interface entre o capilar de sílica fundida e a solução nele contida. Os grupos silanóis presentes na superfície do capilar são ácidos fracos que se ionizam a partir de pH 3-4 (estando totalmente ionizados em meio alcalino), criando uma superfície carregada negativamente. Esta camada negativa na superfície atrai para sua proximidade as espécies carregadas positivamente da solução, formando uma camada positiva, a qual será mobilizada pela presença do campo elétrico. A atração dessa camada pelo cátodo arrasta a solução do interior da coluna, criando assim um fluxo com perfil reto, em contraste com o perfil parabólico que é criado em sistemas pressurizados como a HPLC (GIL, 2007) (Figuras 8 – 10).

Figura 8. Estrutura química da superfície de um capilar de sílica fundida (http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/fluele_2/fluele_2.htm)

Figura 9. Esquema da formação e do sentido do fluxo eletroosmótico em presença de uma solução tampão

(http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/fluele_2/fluele_2.htm)

Figura 10. Tipos de perfis radiais de velocidade de fluxo característicos dos sistemas: a)CLAE e b)CE

(http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/elecap_4/fluele_2/fluele_2.htm)

3.6.2.1. Eletroforese capilar de zona (CZE)

Na eletroforese capilar de zona, a composição do tampão é constante na região de separação. O potencial aplicado faz com que os diferentes componentes iônicos da mistura migrem de acordo com sua própria mobilidade e se separem em zonas que podem ser completamente resolvidas ou apresentar superposição parcial. A situação é análoga à eluição em cromatografia em coluna, na qual as regiões da fase móvel estão localizadas entre zonas contendo os analitos separados (SKOOG et al., 2002).

3.6.2.2. Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)

Em 1984, Tarabe e colaboradores introduziram a MEKC. Neste tipo de EC a solução tampão contém um tensoativo que atua de maneira similar à fase estacionária de uma coluna de fase reversa em CLAE. O tensoativo é introduzido dentro do capilar em concentração acima da concentração micelar crítica. As micelas ionizadas atuam como fase pseudo-estacionária. Portanto, os compostos mais hidrofóbicos permanecem mais tempo na micela carregada negativamente e, conseqüentemente, eluem por último. Os compostos ionizados mais hidrofílicos não são solubilizados na micela, sendo separados de acordo com a mobilidade eletroforética. O dodecil sulfato de sódio (SDS) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) são os tensoativos mais empregados em cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC) (ALTRIA, K.D., 1996, BAKER, D.R., 1995).

3.6.2.3 Vantagens

- ✓ Separações de alta eficiência: utiliza colunas de até um milhão de pratos teóricos. A eficiência da separação está diretamente relacionada à mobilidade do soluto à alta voltagem utilizada na separação.
- ✓ Utiliza colunas capilares duradouras, o mesmo capilar pode ser utilizado para separações e análises de compostos polares, compostos não-polares, compostos quirais e biomoleculares de alta massa molecular;
- ✓ São requeridos volumes de injeção pequenos de amostras, na ordem de nanolitros (1 a 20 nL);
- ✓ São utilizadas quantidades pequenas de reagentes;
- ✓ As análises podem ser realizadas em grande intervalo de pH, podendo-se caracterizar o comportamento de analitos fortemente ácidos ou básicos;
- ✓ Podem ser analisados diferentes tipos de amostras pelos diversos tipos de eletroforese capilar;
- ✓ É utilizada para a determinação de constantes de dissociação, pontos isoeletrônicos de proteínas ácidas e básicas;

- ✓ A quantificação da amostra é feita em poucos minutos;
- ✓ A análise é realizada à temperatura ambiente;
- ✓ As análises são econômicas, pelo baixo consumo de reagentes em comparação com CLAE.

3.6.2.4. Limitações

A maior desvantagem da EC é que não estão disponíveis os injetores de volume fixo e, portanto, a precisão da injeção pode ser mais pobre que com CLAE, a menos que sejam empregados um padrão interno e altas concentrações da amostra (ALTRIA, K.D., 1996, BAKER, D.R.,1995).

3.7. Validação de metodologias analíticas

A ANVISA, através da RDC 17 de 16 de abril de 2010, define validação como “ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema, realmente conduza aos resultados esperados” (BRASIL, 2010).

A palavra validação originou-se do latim *validus* que significa forte e sugere que algo deve ser provado que é verdadeiro e útil, sendo assim aceito como padrão. Desta maneira, este termo refere-se à capacidade de medir o “real” ou a capacidade que um instrumento tem de evitar o erro (ARAUJO, 2009). “O processo de validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA). A validação de métodos assegura sua credibilidade durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP). “Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (OMS).

A “The International Conference on Harmonization” (ICH, 2005) foi resultado de uma conferência realizada por representantes de indústrias e agências reguladoras dos

EUA, Europa e Japão, na tentativa de harmonizar todas as definições, parâmetros, requerimentos para metodologias analíticas com aplicações farmacêuticas. Desta maneira, cada país tem sua legislação e procedimentos e todos visam o mesmo objetivo: demonstrar que as análises executadas fornecem resultados que permitam uma avaliação dos parâmetros específicos de qualidade do produto, assegurando a implementação do método e verificando a confiabilidade dos resultados analíticos em função do procedimento utilizado (RIBANI et al., 2004; SHABIR, 2003).

3.7.1. Pré-validação

Na pré-validação al ser estabelecida a definição do objetivo, a qualificação e a adequação do sistema, a amostragem, a preparação de amostras, as condições de análises e a avaliação dos resultados. Dessa forma, o propósito da pré-validação resume-se em determinar a melhor forma de alcançar o objetivo da validação, e, assim documentar o método como adequado para sua finalidade (ARAUJO, 2009; SHABIR, 2003).

3.7.1.1. Parâmetros de validação

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Essas informações aplicam-se a técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); métodos não-cromatográficos, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável (por exemplo: titulometria, espectrofotometria UV-VIS); testes imunológicos ou microbiológicos, desde que observado o grau de variabilidade usualmente associado a estas técnicas.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequada à análise. Devem-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, deve-se recorrer a outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso

da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.

Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

Nos testes considera-se corrida analítica as medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas nas mesmas condições: método, analista, instrumentação, local, condições de utilização e em intervalo de tempo curto entre as medições.

Devem ser avaliados os seguintes parâmetros:

especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez.

Os testes, de uma maneira geral são classificados em 4 categorias, conforme a

Tabela 1.

Tabela 1. Categorias dos testes (ANVISA. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003)

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de desempenho (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Tabela 2. Parâmetros necessários para validação de acordo com a categoria dos testes (ANVISA. Resolução-RE nº899, de 29 de maio de 2003)

Parâmetro de desempenho analítico	Categoria I	Categoria II		Categoria III		Categoria IV
		Quantitativo	Teste limite			
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*		Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*		Não *
Intervalo	Sim	Sim	*	*		Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim		Não
Intermediária	**	**	Não	**		Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*		Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*		Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*		Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não		Não

*Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

**Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

3.7.1.2. Metodologia analítica

Deverá ser revalidada nas seguintes circunstâncias:

- ✓ Mudanças na síntese da substância ativa;
- ✓ Mudanças na composição do produto acabado;
- ✓ Mudanças no procedimento analítico.

Outras mudanças, dependendo da natureza, podem requerer nova validação do método.

3.7.1.2.1. Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para a análise qualitativa (testes de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Este fato deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas sim compostos estruturalmente semelhantes.

Para a análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, podem-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo, metodologia farmacopéica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por exemplo: luz, calor, umidade, hidrólise ácido-básica, oxidação).

Em métodos cromatográficos, devem-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) é interessante para demonstrar que determinado pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

3.7.1.2.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos da Tabela 3.

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, deverá ser realizada uma transformação matemática. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $\geq 0,99$. Devem-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático).

3.7.1.2.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente este intervalo é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas, quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias, dentro do intervalo especificado.

Tabela 3. Intervalos para os ensaios. (ANVISA, Resolução – RE nº 899, 2003).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e de detecção devem ser adequadas às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais do que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

3.7.1.2.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, e é considerada em três níveis:

- ✓ Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

- ✓ Precisão intermediária (precisão inter-corridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

- ✓ Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Equação 1

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

3.7.1.2.5. Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável.

No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, entre outros. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

Equação 2

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

3.7.1.2.6. Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/v, partes por milhão) na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação:

$$LD = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Equação 3

em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

3.7.1.2.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

Fármaco: aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência); comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;

Forma Farmacêutica: na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado); nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

Impurezas: análise pelo método de adição de padrão, no qual adicionam-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco; no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

Equação 4

3.7.1.2.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. A Tabela 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 4. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico (ANVISA. Resolução- RE nº 899, de 29 de maio de 2003.)

Operação e técnicas	Fatores
Preparo das Amostras	· Estabilidade das soluções analíticas.
	· Tempo de extração
	· Variação do pH da solução
Espectrofotometria	· Temperatura
	· Diferentes fabricantes de solventes
	· Variação do pH da fase móvel
Cromatografia à Líquido	· Variação na composição da fase móvel
	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	· Temperatura
	· Fluxo da fase móvel
Cromatografia à Gas	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	· Temperatura
	· Velocidade do gás de arraste

3.8. Revisão das metodologias publicadas para estatinas

Pelo levantamento bibliográfico efetuado, constatou-se que já estão descritos alguns métodos analíticos para a determinação quantitativa de estatinas.

Na área farmacêutica, a CLAE possui um campo de utilização extenso e diversificado. Como exemplos podem ser citados os ensaios de biodisponibilidade e bioequivalência e as análises qualitativas no controle de qualidade, nas quais a CLAE é, frequentemente, empregada como técnica analítica de escolha. (Tabela 5).

Tabela 5. Métodos analíticos empregados para a determinação quantitativa de fluvastatina

Método	Condições	Referência
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: tampão hidróxido de tetrametilamonio, com uma mistura de metanol e acetonitrila (3:2), (87,5:12,5).	USP, 2008
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: 20 mmol/L fosfato de sódio di-hidrogênio básico e acetonitrila (70:30, v/v) com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico. Detector: fluorescência.	AL-RAWITHI <i>et al.</i> , 2003
CG/MS	Derivatização do analito com bis(trimetilsilano) e análise com detector de massas por ionização química.	LEIS <i>et al.</i> , 2005
EC	Eletrólito: tampão borato 10mM, detecção 239 nm, foi utilizado fenobarbital como padrão interno.	DOGRUKOL-AK <i>et al.</i> , 2001
UV	Solvente: metanol.	UYAR <i>et al.</i> , 2007
CLAE	Coluna: C 18. Fase móvel: ácido fórmico 0,05 M e acetonitrila.	KUMAR <i>et al.</i> , 2006
CLAE/MS	Deteção: espectrometria de massas com íon electrospray.	GAO <i>et al.</i> , 2007
CLAE/MS	Deteção: espectrometria de massas com íon electrospray.	LAN <i>et al.</i> , 2007
CLAE-MS	Deteção: espectrometria de massas com íon electrospray.	WEN <i>et al.</i> , 2007
CLAE-MS	Deteção: espectrometria de massas com íon electrospray.	XU <i>et al.</i> , 2006
CLAE/MS	Deteção: espectrometria de massas com íon electrospray.	TRIVEDI <i>et al.</i> , 2005

Tabela 6. Métodos analíticos empregados para a determinação quantitativa de rosvastatina

Método	Condições	Referência
CLAE	Coluna: 5 μ Hypersil phenyl-2. Fase móvel: acetato de amônio 0,1 M (pH 6,5) e acetonitrila (28:72, v/v), detecção em 242 nm.	QUTAB <i>et al.</i> , 2007
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: acetonitrila e tampão NaH ₂ PO ₄ (55:45, v/v) com pH ajustado para 4,5.	MOHAMMADI <i>et al.</i> , 2007
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: acetonitrila e tampão di-hidrogênio fosfato de potássio 0,05 mM (50:50, v/v).	RAJKONDAWAR <i>et al.</i> , 2006
CLAE	Coluna: C18. fase móvel: acetonitrila e tampão fosfato 0,03 M (55:45, v/v) com pH ajustado para 2,9.	RAJESWARI <i>et al.</i> , 2006
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: metanol, acetonitrila e KH ₂ PO ₄ 50 mM (20:50:30, v/v/v) com pH ajustado para 3,5.	SHAH <i>et al.</i> , 2006
CLAE	Coluna: C8. Fase móvel: acetonitrila e tampão acetato de amônio (65:35, v/v) com pH ajustado para 4,0.	SHEN, <i>et al.</i> , 2006
CLAE	Coluna: C 18. Fase móvel: acetato de amônio 0,01 M, acetonitrila e metanol (50:40:10, v/v/v).	VITTAL <i>et al.</i> , 2006
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: acetonitrila e 0,05% de ácido acético (65:35, v/v).	SHEN <i>et al.</i> , 2005
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: tampão fosfato de sódio e metanol (33:67, v/v) com pH ajustado para 4,0.	BAHRAMI <i>et al.</i> , 2005
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: tampão fosfato de di-hidrogênio e acetonitrila (60:40, v/v) com ajuste do pH para 5,5.	ZARGHI <i>et al.</i> , 2005

Tabela 7. Métodos analíticos empregados para a determinação quantitativa de atorvastatina.

Método	Condições	Referência
CLAE	Coluna: C18. Fase móvel: acetonitrila, tampão acetato de amônio e tetraidrofurano com pH ajustado para 4,0.	ERTURK <i>et al.</i> , 2003
CLAE	Coluna: C 18. Fase móvel: acetonitrila e 0,1 % ácido fosfórico.	PURATCHIKODY <i>et al.</i> , 2003
UV	Solvente: metanol.	KHAN <i>et al.</i> , 2006
UV	Solvente: etanol.	PRABHAKAR <i>et al.</i> , 2005
EC	Eletrolito utilizado: tampão fosfato com pH 8,5 e a tensão aplicada foi de 16 kV.	FENG <i>et al.</i> , 2003
CLAE-MS	Deteção: espectrometria de massas com ion electrospray	BOREK-DOHALSKY <i>et al.</i> , 2006
CLAE-MS	Deteção: espectrometria de massas com ion electrospray	HERMANN <i>et al.</i> , 2005

Outros trabalhos encontrados foram:

- ✓ Süslü, M. Celebier e S. Altinöz (2007) descreveram o método por eletroforese capilar de zona (CZE) como técnica da EC para quantificação de rosuvastatina cálcica em formulações farmacêuticas. Este método foi validado utilizando-se buffer borato 50.0 M, pH 9.5, temperatura do capilar 30°C e voltagem de 25kV. O tempo de migração varia de: 3.20 ± 0.01 e 4.20 ± 0.02 . Tempo total de análise aproximadamente 6 minutos.
- ✓ Tran Quoc Trung e colaboradores (2008) descreveram método por eletroforese capilar para quantificação de fluvastatina e determinação de seus enantiômeros. Este método foi validado utilizando-se solução borato 100 mM que contém (2-hidroxipropil)- β ciclodextrina (HP- β -CD) 30 mg/mL de solução buffer e padrão interno fenoprofeno. A voltagem aplicada foi de 10 kV, comprimento de onda 239

nm, temperatura do capilar 15°C. Os tempos de migração foram 14 e 15 minutos para os enantiômeros.

- ✓ Fábio Pereira Gomes (2008) Descreve o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na análise de pravastatina (fase móvel, metanol: água 60:40 v/v pH 3,0 com ácido orto-fosfórico; tempo de retenção 4,02 minutos), fluvastatina (fase móvel, metanol:água 70:30 v/v pH 3,0 com ácido orto-fosfórico; tempo de retenção 4,95 minutos), atorvastatina (fase móvel, metanol:água 70:30 v/v pH 3,0 com ácido orto-fosfórico; tempo de retenção 3,85 minutos), rosuvastatina (fase móvel, metanol:água 60:40 v/v pH 3,0 com ácido orto-fosfórico; tempo de retenção 4,18 minutos).

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura referem-se a análise de estatinas em amostras biológicas. Os métodos já estudados, além de serem muito trabalhosos, possuem um alto custo, que acabam não sendo acessíveis para todos os laboratórios de controle de qualidade de medicamentos.

4. JUSTIFICATIVA

Na atualidade, as estatinas têm sido amplamente utilizadas em grande número de pacientes que manifestam arteriopatia coronária, cardiopatia isquêmica, hipertensão e obesidade, o que constitui um grande problema de saúde pública para a sociedade e reforça a importância do estudo e desenvolvimento de novos medicamentos hipocolesterolemizantes. Em consequência, existe a necessidade do desenvolvimento e validação dos métodos analíticos que garantam a determinação quantitativa, a segurança, a confiabilidade, a biodisponibilidade e a estabilidade destes medicamentos.

Para aprimorar o controle de qualidade de formulações farmacêuticas deve-se continuamente, estudar o desenvolvimento e a validação de novas metodologias, implicadas na quantificação de fármacos em medicamentos (SANTORO, 1988). Os métodos analíticos devem apresentar confiabilidade no processo de análises. Este processo deve garantir, através de estudos experimentais, que as exigências das aplicações analíticas sejam atendidas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1. Substâncias empregadas como padrões

Os padrões de trabalho utilizados foram:

Fluvastatina sódica: Pureza 99,90% (Doação Novartis)

Atorvastatina cálcica: Pureza de 99,70% (Doação Pfizer)

Rosuvastatina cálcica: Pureza de 99,90%. (Doação Astra- Zeneca).

Ibuprofeno: Pureza de 97,8% (Doação Aché). Empregado como padrão interno (Método CZE)

Diclofenaco de sódio: Pureza de 98,6% (Sigma-Aldrich®). Empregado como padrão interno (Método MECK).

5.1.2. Amostras comerciais

Para a realização do trabalho experimental, foram utilizados comprimidos revestidos contendo:

Fluvastatina sódica: Comprimidos contendo 20, 40 e 80mg do fármaco/comprimido.

Atorvastatina cálcica: Comprimidos contendo 10, 40 e 80mg do fármaco/comprimido.

Rosuvastatina cálcica: Comprimidos contendo 10, 20 e 40mg do fármaco/comprimido.

As amostras foram enviadas em embalagens comerciais contendo *blisters* com dez comprimidos em cada. As amostras foram doadas por indústrias farmacêuticas. As características e especificações das amostras e das matérias primas empregadas como padrões estão apresentadas na Tabela 8

Tabela 8. Especificações das matérias-primas empregadas como padrão e das amostras utilizadas na pesquisa.

FS	N° de amostra	Lote	Validade	Peso médio dos comprimidos (mg)	Pureza
Padrão	-	R4580	06/2008	-	99,90%
Comprimido 20 mg	1	Z0002	04/2010	200,70	-
Comprimido 40 mg	2	Z0008	04/2010	395,44	-
Comprimido 80 mg	3	Z0058	05/2010	454,68	-
ATC		Lote	Validade	Peso médio dos comprimidos (mg)	Pureza
Padrão	-	60127005B	05/2009	-	99,70%
Comprimido 10 mg	4	90435022A	03/2012	153,54	-
Comprimido 40 mg	5	0320088	07/2011	482,89	-
Comprimido 80 mg	6	1275118	10/2010	612,26	-
RC		Lote	Validade	Peso médio dos comprimidos (mg)	Pureza
Padrão	-	RL83000G01	05/2011	-	99.90%
Comprimido 10 mg	7	90147	11/2010	154,52	-
Comprimido 20 mg	8	90151	10/2010	306,58	-
Comprimido 40 mg	9	90088	09/2010	309,25	-

5.1.3. Placebo

Tabela 9. Composição do placebo utilizado na formulação de comprimidos de fluvastatina sódica

Placebo utilizado nas análises, representando o comprimido triturado sem adição de fluvastatina para 20 g:

Estearato de magnésio.....	0.5 g
Hipromelose.....	1.5 g
Hiprollose....	0.4 g
Celulose microcristalina.....	12.0 g
Hidrogenocarbonato de potássio.....	1.4 g
Povidona.....	2.5 g
Pré-mistura para revestimento amarelo.....	qsp

Tabela 10. Composição do placebo utilizado na formulação de comprimidos de atorvastatina cálcica

Placebo utilizado nas análises, representando o comprimido triturado sem adição de atorvastatina para 10 g:

Carbonato de cálcio.....	1.5 g
Celulose microcristalina.....	4.4 g
Lactose monoidratada.....	1.3 g
Croscamelose sódica.....	0.3 g
Polissorbato 80.....	0.6 g
Hipromelose....	0.9 g
Estearato de magnésio.....	0.5 g
Corante branco Opadry® YS-1-7040.....	0.4 g
Emulsão simeticona	0.5 g
Água purificada	

Tabela 11. Composição do placebo utilizado na formulação de comprimidos de rosuvastatina cálcica.

Placebo utilizado nas análises, representando o comprimido triturado sem adição de rosuvastatina para 10 g:

Lactose monoidratada.....	1.2 g
Celulose microcristalina.....	5.0 g
Fosfato de cálcio tribásico.....	1.3 g
Crospovidona.....	0,7 g
Estearato de magnésio....	0.6 g
Hipromelose.....	0.6 g
Triacetina.....	0.2 g
Dióxido de titânio.....	0.1g
Óxido férrico.....	0.3 g

5.1.4. Reagentes e solventes

- Metanol (MeOH), (Merck®) grau HPLC;
- Acetonitrila (ACN), (Merck®) grau HPLC
- Hidróxido de sódio grau analítico (Merck®) e solução 0,1M;
- Tetraborato de sódio decaidratado (TBS) (Sigma®);
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma®);
- Água Milli Q® Plus.
- Água destilada

5.1.5 Aparelhos e equipamentos

As metodologias analíticas foram desenvolvidas e validadas nas instalações do Laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

- Espectrofotômetro Shimadzu®. Modelo UV-1601, equipado com cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico e acoplado a computador e impressora;
- Aparelho de eletroforese capilar modelo P/ACE MDQ, Beckman Coulter Instruments (Fullerton, CA, USA) equipado com um sistema de detecção de arranjo de diodos (DAD), "software" para aquisição e tratamento de dados (32 Karat TM Software v. 8.0) e detector UV/VIS e termostatização de amostras (Part. 285400 – Beckman Coulter®);
- Capilar, POLYMICRO TECHNOLOGIES, Inc., de sílica fundida de 75 µm d.i., 57, 50,2 e 40,2 cm de comprimento total.
- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência marca Shimadzu, composto por "software" controlador *LC Workstation Class-VP* (Shimadzu Corporation, Japão); equipado com detector UV-VIS do tipo DAD (*diode array detector*) SPD/M 10Avp (Shimadzu Corporation, Japão), bombas de solvente LC -10Advp (Shimadzu Corporation, Japão), desgasificador *online* modelo DGU 14 A (Shimadzu Corporation, Japão), injetor automático com *loop* de 50µL modelo SIL 10 –AD vp (Shimadzu Corporation, Japão) e forno para controlar temperatura de coluna modelo CTO 10-AS vp. (Shimadzu Corporation, Japão)
- Fase estacionária LiChrospher® RP-18 (125x4 mm, 5µm) Merck® (Darmstadt, Germany);
- Espectrofotômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) Marca/Modelo: Bomem/MB-102
- Medidor de pH DIGIMED, modelo TE-901.
- Aparelho de ultra-som, THORNTON, modelo T-14 (Brasil).
- Balança analítica Mettler Toledo®, modelo AB 204.
- Banho-maria ETICA;
- Aparelho MilliQ®-plus, Millipore para obtenção de água deionizada.
- Membranas filtrantes HV 0,45µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore®);

5.2. Métodos

5.2.1. Caracterização e identificação dos princípios ativos

5.2.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica instrumental que auxilia na caracterização e identificação de substâncias. Os espectros foram realizados mediante o método de preparação de pastilhas em brometo de potássio (KBr) (USP, 2008).

5.2.3. Espectrofotometria no ultravioleta

Os espectros foram obtidos após preparação das soluções dos princípios ativos em hidróxido de sódio 0,1 M com concentração de 20,0 µg/mL para a fluvastatina e 14,0 µg/mL para a atorvastatina e para a rosuvastatina.

5.2.4. Análise cromatográfica

5.2.4.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Tabela 12. Parâmetros estabelecidos para validação das estatinas.

Parâmetros estabelecidos	Fluvastatina	Atorvastatina	Rosuvastatina
Fase móvel	metanol: água (70:30 v/v): Trietilamina 5 mM, pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico	metanol: água (70:30 v/v): Trietilamina 5 mM, pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico	metanol: água (60:40 v/v): Trietilamina 5 mM, pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico
Vazão	1,6 mL/min.	1,4 mL/min.	1,4 mL/min.
Detecção	UV a 238 nm	UV a 238 nm	UV a 238 nm
Coluna	LiChrospher® RP-18 (125x4 mm, 5µm) Merck®	LiChrospher® RP-18 (125x4 mm, 5µm) Merck®	LiChrospher® RP-18 (125x4 mm, 5µm) Merck®
Volume de injeção	10 µL	10 µL	10 µL
Temperatura	25±1°C	25±1°C	25±1°C
Tempo de retenção	3,80 min.	2,76 min.	2,93 min.

5.2.4.2 Validação dos métodos analíticos para determinação quantitativa de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.2.4.2.1 Determinação da seletividade para a fluvastatina

Foi exatamente pesada uma quantidade de placebo equivalente a 10,0 mg de fluvastatina e transferida para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se fase móvel até completar o volume. A seguir foram retiradas duas alíquotas de 1,0 mL e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, que foram completadas com a mesma fase móvel,

obtendo-se concentração equivalente a 40,0 µg/mL de fluvastatina sódica. Todas as medidas foram feitas em triplicatas.

5.2.4.2.2. Determinação da seletividade para a atorvastatina

Foi exatamente pesada uma quantidade de placebo equivalente a 10,0 mg de atorvastatina e transferida para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se fase móvel até completar o volume. A seguir foram retiradas duas alíquotas de 0,7 mL e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, que foram completadas com a mesma fase móvel, obtendo-se concentração equivalente a 28,0 µg/mL de atorvastatina cálcica. Todas as medidas foram feitas em triplicatas.

5.2.4.2.3. Determinação de seletividade para a rosuvastatina

Foi exatamente pesada uma quantidade de placebo equivalente a 12,5 mg de rosuvastatina e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se fase móvel até completar o volume. A seguir foram retiradas duas alíquotas de 1,4 mL e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, que foram completadas com a mesma fase móvel, obtendo-se concentração equivalente a 28,0 µg/mL de rosuvastatina cálcica. Todas as medidas foram feitas em triplicatas.

5.2.4.2.4. Determinação da linearidade para a fluvastatina

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução. A seguir, foram transferidas alíquotas (de 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 e 1,4 mL) para balões volumétricos de 25 mL e os volumes completados com fase móvel para obter soluções com intervalo de concentração de 24,0 a 56,0 µg/mL de fluvastatina.

Determinou-se o erro padrão da estimativa e o coeficiente de correlação de curva. Os cálculos foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados.

5.2.4.2.5. Determinação da linearidade para a atorvastatina

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de padrão de atorvastatina e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de

fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução. A seguir, foram transferidas alíquotas (de 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 e 1,1 mL) para balões volumétricos de 25 mL e os volumes completados com fase móvel para obter soluções com intervalo de concentração de 12,0 a 44,0 µg/mL de atorvastatina.

Determinou-se o erro padrão da estimativa e o coeficiente de correlação de curva. Os cálculos foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados.

5.2.4.2.6. Determinação da linearidade para a rosuvastatina

Foram pesados exatamente cerca de 12,5 mg de padrão de rosuvastatina e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução. A seguir, foram transferidas alíquotas (de 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; e 2,2 mL) para balões volumétricos de 25 mL e os volumes completados com fase móvel para obter soluções com intervalo de concentração de 12,0 a 44,0 µg/mL de rosuvastatina.

Determinou-se o erro padrão da estimativa e o coeficiente de correlação de curva. Os cálculos foram efetuados pelo método dos mínimos quadrados.

5.2.4.2.7. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os cálculos para determinação do LD e do LQ foram baseados na estimativa do desvio padrão da resposta (equação da curva analítica) e a inclinação da curva.

$$\text{Limite de Detecção} = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{Limite de Quantificação} = 10 \times \frac{\sigma}{S} \quad \text{Equação 6}$$

Onde σ é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e S é a inclinação da curva analítica.

As concentrações encontradas através destas fórmulas, para linearidade de cada método, foram testadas preparando as soluções a partir de uma solução estoque e analisadas sequencialmente por dez vezes em cada método.

5.2.4.2.8. Precisão

Neste estudo a precisão dos métodos desenvolvidos por CLAE, MEKC e CZE foi baseada em dois ensaios diferentes: repetibilidade da precisão (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Ambas as análises são expressas em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de validação (CV).

$$\text{DPR ou CV} = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde, σ é o desvio padrão e $\bar{X}$ é a média das áreas ou respostas obtidas das análises.

5.2.4.2.8.1. Determinação da precisão intermediária para a fluvastatina

Uma massa equivalente a 10,0 mg de fluvastatina padrão foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução. A seguir foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para 3 balões de 25 mL. Completaram-se os volumes com a fase móvel, obtendo-se concentração final de 40,0 µg/mL de fluvastatina.

5.2.4.2.8.2. Determinação da precisão intermediária para a atorvastatina

Uma massa equivalente a 10,0 mg de atorvastatina padrão foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução. A seguir foram transferidas alíquotas de 0,7 mL para 3 balões de 25 mL. Completaram-se os volumes com a fase móvel, obtendo-se concentração final de 28,0 µg/mL de atorvastatina.

5.2.4.2.8.3. Determinação da precisão intermediária para a rosuvastatina

Uma massa equivalente a 12,5 mg de rosuvastatina padrão foi exatamente pesada e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução. A seguir foram transferidas alíquotas de 1,4 mL para 3 balões de 25 mL. Completaram-se os volumes com a fase móvel, obtendo-se concentração final de 28,0 µg/mL de rosuvastatina.

5.2.4.2.8.4. Preparação das amostras para determinação da repetibilidade inter e intra-dia para a fluvastatina

Os comprimidos foram triturados e pesada exatamente uma quantidade, equivalente a 10,0 mg de fluvastatina, que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se fase móvel, agitou-se e completou-se o volume com a mesma solução. A solução foi filtrada com papel de filtro Whatman 40, rejeitando-se os primeiros 4,0 mL. Desta solução foram transferidas 3 alíquotas de 0,6; 1,0 e 1,4 mL para balões de 25 mL preparadas em triplicata. Os volumes foram completados com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 24,0; 40,0 e 56,0 µg/mL correspondentes a porcentagens de 80,0; 100,0 e 120,0%. Após filtração com membrana de filtro Millipore® de 0,45 µm e desgaseificação com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas na coluna (10 µL). A solução estoque foi armazenada na geladeira. Repetiu-se o mesmo procedimento por mais dois dias consecutivos, efetuando-se as leituras em triplicata.

5.2.4.2.8.5. Preparação das amostras para determinação da repetibilidade inter e intra-dia para a atorvastatina

Os comprimidos foram triturados e pesada exatamente uma quantidade, equivalente a 25,0 mg de atorvastatina, que foi transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se fase móvel, agitou-se e completou-se o volume com a mesma solução. A solução foi filtrada com papel de filtro Whatman 40, rejeitando-se os primeiros 4,0 mL. Desta solução foram transferidas 3 alíquotas de 0,3; 0,7 e 1,1 mL para balões de 25 mL preparadas em triplicata. Os volumes foram completados com a

fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 12,0; 28,0 e 44,0 µg/mL correspondentes a porcentagens de 80,0; 100,0 e 120,0%. Após filtração com membrana de filtro Millipore® de 0,45 µm e desgaseificação com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas na coluna (10 µL). A solução estoque foi armazenada na geladeira. Repetiu-se o mesmo procedimento por mais dois dias consecutivos, efetuando-se as leituras em triplicata.

5.2.4.2.8.6. Preparação das amostras para determinação da repetibilidade inter e intra-dia para a rosuvastatina

Os comprimidos foram triturados e pesada exatamente uma quantidade, equivalente a 25,0 mg de rosuvastatina, que foi transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se fase móvel, agitou-se e completou-se o volume com a mesma solução. A solução foi filtrada com papel de filtro Whatman 40, rejeitando-se os primeiros 4,0 mL. Desta solução foram transferidas 3 alíquotas de 0,3; 0,7 e 1,1 mL para balões de 25 mL preparadas em triplicata. Os volumes foram completados com a fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 12,0; 28,0 e 44,0 µg/mL correspondentes a porcentagens de 80,0; 100,0 e 120,0%. Após filtração com membrana de filtro Millipore® de 0,45 µm e desgaseificação com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas na coluna (10 µL). A solução estoque foi armazenada na geladeira. Repetiu-se o mesmo procedimento por mais dois dias consecutivos, efetuando-se as leituras em triplicata.

5.2.4.2.9 Preparação das soluções de padrão e das amostras para realização de teste de exatidão para a fluvastatina

A exatidão do método foi avaliada através do estudo de recuperação através da comparação do resultado do padrão com a amostra enriquecida com padrão. Foram pesados exatamente cerca de 40,0 mg do padrão de fluvastatina e transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até dissolução e completou-se o volume com a mesma solução, obtendo-se uma concentração de 800,0 µg/mL. Da solução do padrão foram transferidas 1,25 mL para balão de 25 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma concentração de 40,0 µg/mL.

Os comprimidos foram triturados e exatamente pesadas quantidades de pó equivalentes a 40,0 mg de fluvastatina e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se fase móvel, agitou-se o volume com a mesma solução. A solução foi filtrada com papel de filtro Whatman 40, rejeitando-se os primeiros 4,0 mL.

As amostras enriquecidas foram preparadas a partir de ambas as soluções estoques. Da solução da amostra (20,0 mg) foram transferidas 1,25 mL para balão de 50 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma concentração de 40,0 µg/mL. Alíquotas da última diluição do padrão e da amostra foram transferidas a cinco balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com fase móvel conforme o esquema a seguir:

Tabela 13. Procedimento para adição do padrão de fluvastatina na amostra para realização do teste de recuperação empregando o método cromatográfico.

Balões	Concentração da Solução padrão 40,0 µg/mL Volume da solução Padrão (µg/mL)	Concentração da Solução amostra 40,0 µg/mL Volume da solução Padrão (µg/mL)	Concentração Total fluvastatina (µg/mL)
Padrão	0,2	-	40,0
Amostra	-	0,2	40,0
Amostra enriquecida 01	0,2	0,2	80,0
Amostra enriquecida 02	0,3	0,2	100,0
Amostra enriquecida 03	0,4	0,2	120,0

5.2.4.2.10. Preparação das soluções de padrão e das amostras para realização de teste de exatidão para a atorvastatina

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg do padrão de atorvastatina e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até dissolução e completou-se o volume com a mesma solução, obtendo-se uma concentração de 1000,0 µg/mL. Da solução do padrão foram transferidas 0,7 mL para balão de 25 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma concentração de 28,0 µg/mL.

Os comprimidos foram triturados e exatamente pesadas quantidades de pó equivalentes a 25,0 mg de atorvastatina e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se fase móvel, agitou-se o volume com a mesma solução. A solução foi filtrada com papel de filtro Whatman 40, rejeitando-se os primeiros 4,0 mL. As amostras enriquecidas foram preparadas a partir de ambas as soluções estoques. Da solução da amostra (10 mg) foram transferidas 7,0 mL para balão de 25 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma concentração de 28,0 µg/mL.

Alíquotas da última diluição do padrão e da amostra foram transferidas a cinco balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com fase móvel conforme o esquema a seguir:

Tabela 14. Procedimento para adição do padrão de atorvastatina na amostra para realização do teste de recuperação empregando o método cromatográfico.

Balões	Concentração da Solução padrão 28,0 µg/mL Volume da solução Padrão (µg/mL)	Concentração da Solução amostra 28,0 µg/mL Volume da solução Padrão (µg/mL)	Concentração Total atorvastatina (µg/mL)
Padrão	0,5	-	28,0
Amostra	-	0,5	28,0
Amostra enriquecida 01	0,5	0,5	56,0
Amostra enriquecida 02	0,9	0,5	78,4
Amostra enriquecida 03	1,3	0,5	100,8

5.2.4.2.11. Preparação das soluções de padrão e das amostras para realização de teste de exatidão para a rosuvastatina

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg do padrão de rosuvastatina e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até dissolução e completou-se o volume com a mesma solução, obtendo-se uma concentração de 1000,0 µg/mL. Da solução do padrão foram transferidas 0,7 mL

para balão de 25 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma concentração de 28,0 µg/mL.

Os comprimidos foram triturados e exatamente pesadas quantidades de pó equivalentes a 25,0 mg de rosuvastatina e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se fase móvel, agitou-se o volume com a mesma solução. A solução foi filtrada com papel de filtro Whatman 40, rejeitando-se os primeiros 4,0 mL. As amostras enriquecidas foram preparadas a partir de ambas as soluções estoques. Da solução da amostra (10 mg) foram transferidas 7,0 mL para balão de 25 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma concentração de 28,0 µg/mL.

Alíquotas da última diluição do padrão e da amostra foram transferidas a cinco balões volumétricos de 10 mL (triplicata). O volume foi completado com fase móvel conforme o esquema a seguir:

Tabela 15. Procedimento para adição do padrão de rosuvastatina na amostra para realização do teste de recuperação empregando o método cromatográfico.

Balões	Concentração da Solução padrão 28,0 µg/mL Volume da solução Padrão (µg/mL)	Concentração da Solução amostra 28,0 µg/mL Volume da solução Padrão (µg/mL)	Concentração Total rosuvastatina (µg/mL)
Padrão	0,5	-	28,0
Amostra	-	0,5	28,0
Amostra enriquecida 01	0,5	0,5	56,0
Amostra enriquecida 02	0,9	0,5	78,4
Amostra enriquecida 03	1,3	0,5	100,8

5.2.4.2.17. Teste de robustez para a fluvastatina

Para o teste de robustez foi variada a composição da fase móvel e o pH em 0,1 unidades. Variou-se também a temperatura de coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$. A fase móvel foi constituída de metanol-água (68,6: 31,4 v/v) e (71,4: 28,6v/v), com o pH ajustado para 3,2 com ácido orto-fosfórico. A vazão foi de 1,0 mL/min.

5.2.4.2.18. Teste de robustez para a atorvastatina

Para o teste de robustez foi variada a composição da fase móvel e o pH em 0,1 unidades. Variou-se também a temperatura de coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$. A fase móvel foi constituída de metanol-água (68,6: 31,4 v/v) e (71,4: 28,6v/v), com o pH ajustado para 3,2 com ácido orto-fosfórico. A vazão foi de 1,0 mL/min.

5.2.4.2.19. Teste de robustez para a rosuvastatina

Para o teste de robustez foi variada a composição da fase móvel e o pH em 0,1 unidades. Variou-se também a temperatura de coluna em $\pm 5^\circ\text{C}$. A fase móvel foi constituída de metanol-água (61,2: 38,8 v/v) e (58,2: 41,8v/v), com o pH ajustado para 3,2 com ácido orto-fosfórico. A vazão foi de 1,0 mL/min.

5.2.4.2.20. Teste de estresse

Os testes de estresse foram realizados em diferentes condições que podem ser vistas na Tabela 16.

Tabela 16. Condições empregadas nos testes de estresse para os métodos cromatográficos (KLICK ET AL., 2005).

Condição	Aquecimento banho-maria	Tempo (horas)	Solvente
Meio neutro	80°C	2	Água
Meio oxidativo	80°C	2	H ₂ O ₂ 3%
Meio ácido	80°C	2	HCl 0.1 mol L ⁻¹
Meio alcalino	80°C	2	NaOH 0.1 mol L ⁻¹

5.2.4.2.21. Reação em meio neutro para a fluvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com água purificada para a

obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas à temperatura ambiente, o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 40,0 µg/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.22. Reação em médio neutro para a atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de atorvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com água purificada para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 0,7 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas à temperatura ambiente, o volume foi completado com a fase móvel (metanol: água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 µg/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.23. Reação em meio neutro para a rosuvastatina

Pesou-se uma massa de 12,5 mg de padrão de rosuvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com água purificada para a obtenção de uma solução de concentração 500,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1,4 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas a temperatura ambiente, o volume foi completado com a fase móvel (metanol: água 60:40) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 µg/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.24 Reação em meio de oxidação para a fluvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diluído a 3% para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1,0 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas à temperatura ambiente, o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 40,0 $\mu\text{g/mL}$. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.25. Reação em meio de oxidação para a atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de atorvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diluído a 3% para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 0,7 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas a temperatura ambiente, o volume foi completado com a fase móvel (metanol: água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 $\mu\text{g/mL}$. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.26. Reação em meio de oxidação para a rosuvastatina

Pesou-se uma massa de 12,5 mg de padrão de rosuvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) diluído a 3% para a obtenção de uma solução de concentração 500,0 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de

0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1,4 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas a temperatura ambiente, o volume foi completado com a fase móvel (metanol: água 60:40) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 ug/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.27. Reação em meio ácido para a fluvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1,0 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas à temperatura ambiente. Neutralizou-se com uma alíquota de 1 mL de NaOH 0,1 mol/L e o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 40,0 ug/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.28. Reação em meio ácido para a atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de atorvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 0,7 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas à temperatura ambiente. Neutralizou-se com uma alíquota de 1 mL de NaOH 0,1 mol/L e o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 ug/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.29. Reação em meio ácido para a rosuvastatina

Pesou-se uma massa de 12,5 mg de padrão de rosuvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 500,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1,4 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas à temperatura ambiente. Neutralizou-se com uma alíquota de 1,0 mL de NaOH 0,1 mol/L e o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 60:40) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 µg/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.30. Reação em meio básico para a fluvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1,0 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas a temperatura ambiente. Neutralizou-se com uma alíquota de 1,0 mL de HCl 0,1 mol/L e o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 40,0 µg/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.31. Reação em meio básico para a atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de atorvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de

0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 0,7 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas a temperatura ambiente. Neutralizou-se com uma alíquota de 1,0 mL de HCl 0,1 mol/L e o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 70:30) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 ug/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.32. Reação em meio básico para a rosuvastatina

Pesou-se uma massa de 12,5 mg de padrão de rosuvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 500,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Nos períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos foram retiradas alíquotas de 1,4 mL e transferidas para um balão de 25 mL, após resfriadas a temperatura ambiente. Neutralizou-se com uma alíquota de 1,0 mL de HCl 0,1 mol/L e o volume foi completado com a fase móvel (metanol:água 60:40) com o pH ajustado para 3,0 com ácido orto-fosfórico. Obteve-se solução com concentração final de 28,0 ug/mL. A solução final foi injetada em triplicata.

5.2.4.2.33. Teste de adequabilidade do sistema para a fluvastatina

Para verificar a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico foram exatamente pesados cerca de 10,0 mg de fluvastatina e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com fase móvel. Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel. Obteve-se uma solução com concentração final de 40,0 ug/mL.

A solução foi injetada cinco vezes e calculado o desvio padrão relativo de cada parâmetro analisado.

5.2.4.2.34. Teste de adequabilidade do sistema para a atorvastatina

Para verificar a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico foram exatamente pesados cerca de 10,0 mg de atorvastatina e transferidos para balão

volumétrico de 10 mL. Completou-se o volume com fase móvel. Transferiu-se uma alíquota de 0,7 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel. Obteve-se uma solução com concentração final de 28,0 ug/mL.

A solução foi injetada cinco vezes e calculado o desvio padrão relativo de cada parâmetro analisado.

5.2.4.2.35. Teste de adequabilidade do sistema para a rosuvastatina

Para verificar a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico foram exatamente pesados cerca de 12,5 mg de rosuvastatina e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com fase móvel. Transferiu-se uma alíquota de 1,4 mL para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com fase móvel. Obteve-se uma solução com concentração final de 28,0 ug/mL.

A solução foi injetada cinco vezes e calculado o desvio padrão relativo de cada parâmetro analisado.

5.2.4.2.36. Comparação estatística dos resultados obtidos pelos métodos propostos

Testes de significância são empregados com a finalidade de verificar se a diferença entre dois resultados é representativo ou pode ser atribuída ao caso (CAILCUTT e BODDY, 1983; MILLER ET AL., 1993). Estes testes foram utilizados para comparar os métodos propostos para a determinação das estatinas no estudo.

O teste F é um parâmetro estatístico que é utilizado para comparar as precisões de dois grupos de dados, ou seja, os resultados de duas ou três metodologias diferentes (MILLER ET AL., 1993). O valor é calculado pela equação:

$$F = \frac{S^2A}{S^2B} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

S²A = maior desvio padrão

S²B = menor desvio padrão

O desvio padrão maior sempre é colocado no numerador, fazendo com que o valor de F seja sempre maior do que a unidade. A significância do valor obtido para F é então verificado por comparação com valores da tabela F para um determinado nível de confiança (MILLER ET AL., 1993). Se o valor encontrado para F excede ao valor tabelado, considera-se que a diferença entre os resultados dos métodos é significativa, para um determinado nível de significância (CAULCUTT e BODDY, 1993), (MILLER ET AL., 1993).

Outro teste de significância importante é o teste t , empregado para verificar a significância de uma média ou da diferença entre duas medidas dos valores experimentais obtidos por dois métodos diferentes para um determinado nível de significância.

Sejam $\bar{X}_1$ e $\bar{X}_2$ as medidas obtidas nas análises de uma mesma amostra, através de dois métodos diferentes ((MEKC) e (CZE), EC e CLAE). A variância baseada em ambas as amostras é dada pela equação:

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) S^2_1 + (n_2 - 1) S^2_2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Equação 9}$$

Onde:

S^2_1 = variância da amostra pelo método 1

S^2_2 = variância da amostra pelo método 2

n_1 = número de determinações pelo método 1

n_2 = número de determinações pelo método 2

O valor de t é calculado pela equação:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Equação 10

Onde:

$\bar{x}_1$ = média da amostra pelo método 1

$\bar{x}_2$ = média da amostra pelo método 2

S = é o desvio padrão, obtido a partir da raiz da variância calculada para ambos os métodos.

t tem $(n_1 + n_2) - 2$ graus de liberdade.

Se o valor encontrado para t excede ao valor tabelado, considera-se que a diferença entre os resultados dos dois métodos é significativa, para um determinado nível de significância (CAULCUTT e BODDY, 1983; MILLER ET AL., 1993).

5.3. Cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC)

5.3.1. Desenvolvimento do método

Para a realização dos testes iniciais foram utilizados alguns parâmetros médios, como voltagem de +22kV, temperatura de 20°C e introdução da amostra hidrodinâmica a 0,5 psi por 3 s. O capilar utilizado foi de sílica fundida de 40,4 cm x 70µm d.i.(30 cm até o detector) e o detector de arranjo diodos/ UV-VIS. Para tais testes, foram utilizadas soluções de fluvastatina e atorvastatina 100,0 µg/mL.

Inicialmente foram avaliados diferentes tampões: tetraborato de sódio (TBS) e fosfato de sódio em diferentes concentrações. Em seguida foi testado o comportamento dos picos de fluvastatina e atorvastatina frente à utilização de solventes orgânicos (metanol e acetonitrila) e também aditivos surfactantes, como por exemplo, o dodecilsulfato de sódio (SDS). Com a definição do eletrólito o próximo passo foi a definição do pH ótimo.

Para finalizar o desenvolvimento definiu-se a preparação e lavagem do capilar antes de cada introdução de amostra.

A escolha das condições instrumentais adequadas foi baseada na avaliação de diversos ensaios apresentados na Tabela 16. Estes ensaios foram sendo realizados conforme os resultados foram se aproximando do esperado.

Tabela 17. Ensaios preliminares realizados no desenvolvimento de metodologia por (CZE) e (MEKC) para a validação de método para determinação quantitativa de fluvastatina e de atorvastatina

Sistema		Deteção (UV nm)	Eletrólito	pH	Injeção (hidrodinâmica)	+Voltagem (kV)	Temperatura (°C)
1	Sílica fundida: 50,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 40 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (CZE)	TBS 10 mM	9,24	0,5 psi; 5s	25	22
2	Sílica fundida: 50,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 40 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 10 mM SDS 50 mM	9,24	0,5 psi; 5s	25	22
3	Sílica fundida: 50,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 40 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 20 mM SDS 50 mM	9,24	0,5 psi; 5s	25	22
4	Sílica fundida: 57 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 50 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 10 mM SDS 30 mM Metanol 10%v/v	9,24	0,5 psi; 5s	30	22
5	Sílica fundida: 57 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 50 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 10 mM SDS 30 mM Metanol 15%v/v	9,24	0,5 psi; 5s	25	22
6	Sílica fundida: 50,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 40 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 20 mM SDS 30 mM Acetonitrila 10%v/v	9,24	0,5 psi; 5s	25	22

7	Sílica fundida: 57 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 50 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 20 mM SDS 30 mM Metanol 10%v/v	9,24	0,5 psi; 5s	28	22
8	Sílica fundida: 40,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 30 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 20 mM SDS 30 mM Metanol 10%v/v	9,24	0,5 psi; 3s	22	22

5.3.2. Preparação das soluções e tampões

5.3.2.1. Solução tampão estoque de tetraborato de sódio 100 mM

Foram pesados 3,8137g de tetraborato de sódio e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi degaseificada com auxílio de banho de ultra-som por 30 min. e filtrada através de membrana de 0,45 µm (Solução A).

5.3.2.2. Solução estoque de SDS 100 mM

Foram pesados 2,884g de dodecil sulfato de sódio e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi degaseificada com auxílio de banho de ultra-som por 15 min. e filtrada através de membrana de 0,45 µm (Solução B).

5.3.2.3. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM

Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL da solução A de tetraborato para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.4. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM: SDS 50 mM

Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL da solução A de tetraborato e uma alíquota de 5,0 mL da solução B de SDS para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.5. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM: SDS 50 mM

Transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL da solução A de tetraborato e uma alíquota de 5,0 mL da solução B de SDS para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.6. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM: SDS 30 mM: metanol 10% v/v

Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL da solução A de tetraborato e uma alíquota de 3,0 mL da solução B de SDS para um balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada com auxílio de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.7. Solução tampão de tetraborato de sódio 10 mM: SDS 30 mM: metanol 15% v/v

Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL da solução A de tetraborato e uma alíquota de 3,0 mL da solução B de SDS para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1,5 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.8. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM: SDS 30 mM: metanol 10% v/v

Transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL da solução A de tetraborato e uma alíquota de 3,0 mL da solução B de SDS para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.9. Solução tampão de tetraborato de sódio 20 mM: SDS 30 mM: acetonitrila 10% v/v

Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL da solução A de tetraborato e uma alíquota de 3,0 mL da solução B de SDS para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se 1,0 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.10. Preparação das soluções padrão estoque (1,0 mg/mL) das estatinas.

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de fluvastatina, atorvastatina e transferidos para dois balões volumétricos âmbar de 10 mL. Dissolveram-se com 6 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções de concentrações finais de 1,0 mg/mL cada uma. As soluções foram colocadas em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtradas através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.11. Preparação da solução estoque do padrão interno (diclofenaco de sódio)

Foram pesados exatamente cerca de 20,0 mg de padrão de diclofenaco de sódio e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Dissolveu-se em 6 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®], obtendo-se uma concentração de 2000,0 µg/mL de diclofenaco de sódio. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.3.2.12 Preparação da mistura-teste (MT) das estatinas e padrão interno (p.i.)

Alíquotas de 200,0 µL da solução estoque de fluvastatina e atorvastatina e 100,0 µL da solução estoque de diclofenaco de sódio (p.i.) foram transferidas para frascos de Eppendorf de 2000 µL. O volume foi completado com água Milli Q[®]. A concentração final para cada estatina e diclofenaco de sódio foi de 100,0 µg/mL. As soluções foram degaseificadas com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos. e injetadas no capilar (injeção hidrodinâmica).

A mistura foi “*spiked*” com cada um dos analitos para identificar a ordem de cada pico.

5.3.3. Condições analíticas

- ✓ *Capilar*: sílica fundida de 40,2 cm de comprimento sendo 30 cm até o detector, 75 µm de d.i. e 375 µm de d.d., Beckman Coulter MDQ[®];
- ✓ *Eletrólito*: tampão tetraborato de sódio 20 mM, SDS 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24;
- ✓ *Voltagem*: +22kV;
- ✓ *Modo de injeção*: hidrodinâmica a 0,5 psi por 3 segundos;
- ✓ *Temperatura*: 25°C;

- ✓ *Comprimento de onda para leitura:* 240 nm;
- ✓ *Equipamento:* sistema de eletroforese capilar Beckman Coulter MDQ®;
- ✓ *Detecção:* arranjo diodo/ UV-vis;
- ✓ *Padrão interno:* diclofenaco de sódio.

5.3.4. Tratamento do capilar

Foi utilizado um capilar novo de sílica fundida de 40,2 cm de comprimento x 75 µm de diâmetro interno (d.i.) x 375 µm de diâmetro externo (d.e.) com revestimento externo de poliimida. Uma fenda óptica de aproximadamente 0,2 cm foi preparada através de um rápido aquecimento a fim da remoção da poliimida no local e em seguida realizou-se a limpeza com acetona.

O capilar foi ajustado ao equipamento com auxílio de um cartucho próprio e fixado a fenda ótica na posição do detector UV para passagem do feixe de luz, o comprimento do tubo até esta posição foi 30 cm.

A ativação deste capilar foi realizada sob temperatura de 22 a 25°C, e foi acondicionado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M 20 minutos, água purificada por 15 minutos e eletrólito de corrida por 20 minutos. Entre cada corrida o capilar foi lavado com NaOH 0,1 M durante 1 minuto e com o respectivo eletrólito, durante 2 minutos. Ao final do dia, o capilar foi lavado com NaOH 0,1 M por 10 minutos, água purificada por 5 minutos.

5.3.5. Preparação do eletrólito padronizado para os testes

Semanalmente, uma solução estoque de TBS na concentração de 100,0 mM foi preparada para diluição diária e preparo do eletrólito. Pesou-se uma massa de 3,8137 g de tetraborato de sódio e transferiu-se cuidadosamente para um balão de 100 mL, e diluiu-se em água purificada. Colocou-se o balão em banho de ultra-som até total diluição (30 minutos). Em seguida completou-se o volume do balão com água purificada e filtrou-se a solução com filtro Millipore® (0,45 µm).

Com a mesma frequência, uma solução estoque de SDS na concentração de 100 mM foi preparada para diluição diária e preparo do eletrólito. Pesou-se uma massa de 2,884 g de dodecil sulfato de sódio, transferiu-se cuidadosamente para um balão de 100 mL, e diluiu-se em água purificada. Colocou-se o balão em banho de ultra-som até

total diluição (15 minutos). Em seguida completou-se o volume do balão com água purificada e filtrou-se a solução com filtro Millipore[®] (0,45 µm).

5.3.6. Validação

A validação do método por MEKC foi realizada nas condições descritas no item 5.3.2.3., utilizando-se (p.i) e os parâmetros descritos nos itens 5.3.2.11 e 5.3.2.12.

5.3.6.1. Construção da curva analítica

Preparação das soluções padrão de fluvastatina, atorvastatina e padrão interno

Foram transferidas alíquotas de 256,0; 288,0; 320,0; 352,0 e 384,0 µL da solução padrão estoque de fluvastatina (1000,0 µg/mL) e 200 µL da solução padrão interno diclofenaco de sódio (2000,0 µg/mL). Transferiu-se para 5 frascos de Eppendorf de 2 mL cada e completou-se o volume com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 128,0; 144,0; 160,0; 176,0 e 192,0 µg/mL de fluvastatina e 200,0 µg/mL de diclofenaco de sódio em cada frasco. O mesmo procedimento foi seguido para a atorvastatina.

Após filtração através de membrana de filtro Millipore 0,45 µm e degaseificação com auxílio de banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas (injeção hidrodinâmica) no capilar. A curva analítica do método para cada estatina foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (estatina/padrão interno) obtidos dessas injeções. Foram realizadas triplicatas para cada concentração.

5.3.6.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através da resposta do desvio padrão residual (σ) da linha de regressão da curva analítica e sua inclinação (I), a partir das fórmulas $LD = 3,3 (\sigma/I)$ e $LQ = 10 (\sigma/I)^2$, para os limites de detecção e de quantificação, respectivamente.

5.3.6.3. Precisão do método

-Repetibilidade (*intra-dia*)

Preparação das soluções das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina

Após homogeneização dos comprimidos, foi pesada uma quantidade de pó equivalente a 10,0 mg de cada estatina (fluvastatina, atorvastatina) e transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL. Foram adicionados 6 mL de metanol para dissolução, completando-se o volume com água Milli Q[®]. Submeteu-se a banho de ultra-som por 15 minutos, filtrando-se com papel de filtro Whatman 40, desprezando as primeiras porções do filtrado (2,0 mL). Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 1000,0 µg/mL para cada estatina.

Procedimento analítico para as amostras comerciais de atorvastatina e fluvastatina

Alíquotas de 256,0; 320,0 e 384,0 µL das soluções de fluvastatina e atorvastatina (1000,0 µg/mL) foram transferidas para frascos de Eppendorf de 2 mL cada e adicionou-se 200,0 µL da solução estoque de padrão interno. Os volumes foram completados com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 128,0; 160,0 e 192,0 µg/mL de atorvastatina e fluvastatina e 200,0 µg/mL de padrão interno.

Após filtração com membrana de filtro Millipore[®] de 0,45 µm e degaseificação das soluções com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos foram injetadas no capilar (injeção hidrodinâmica).

5.3.6.4. Precisão intermediária (inter-dia):

Seguiu-se o mesmo procedimento que para a precisão *intra-dia*, mas para três dias diferentes.

5.3.6.5. Aplicação do método padronizado a amostras comerciais

Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

5.3.6.5.1. Preparação das soluções padrão de fluvastatina, atorvastatina e padrão interno

Foram transferidas alíquotas de 320,0 µL de cada solução padrão estoque de fluvastatina e atorvastatina de (1000,0 µg/mL). Transferiu-se, cada alíquota, para dois frascos de Eppendorf de 2 mL. Adicionou-se a cada frasco 200,0 µL da solução padrão interno diclofenaco de sódio (2000,0 mL) e completou-se o volume de cada tubo com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções com concentrações finais: no primeiro tubo de 160,0 µg/mL de fluvastatina e 200,0 µg/mL de diclofenaco de sódio, no segundo de 160,0 µg/mL de atorvastatina e 200,0 µg/mL de diclofenaco de sódio. Após filtração através de membrana de filtro Millipore[®] 0,45 µm e degaseificação com auxílio de banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas (injeção hidrodinâmica) no capilar. A curva analítica do método, para cada estatina, foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (estatina/padrão interno) obtidos dessas injeções.

5.3.6.5.2. Preparação das soluções das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina

Após homogeneização dos comprimidos, foi pesada uma quantidade de pó equivalente a 10,0 mg de cada estatina (fluvastatina e atorvastatina) e transferidas para balões volumétricos âmbar de 10 mL. Foram adicionados 6,0 mL de metanol para dissolução, completando-se o volume com água Milli Q[®]. Submeteu-se a banho de ultra-som por 15 minutos, filtrando-se com papel de filtro Whatman 40 desprezando as primeiras porções do filtrado (2,0 mL). Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 1000,0 µg/mL para cada estatina.

Procedimento analítico para as amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina

Alíquotas de 320,0 µL das soluções de fluvastatina e atorvastatina (1000,0 µg/mL) e 200 µL da solução padrão estoque do padrão interno foram transferidos para dois frascos de Eppendorf de (2,0 mL) cada e completaram-se os volumes com água Milli Q®. Obtiveram-se soluções de concentrações finais de 200,0 µg/mL e 160,0 µg/mL e de padrão interno, tanto no tubo com fluvastatina quanto no com atorvastatina. Após filtração com membrana de filtro Millipore® de 0,45 µm e degaseificação das soluções com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas no capilar (injeção hidrodinâmica).

5.3.6.5.3. Preparação das soluções placebo das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina

Foram pesadas quantidades teoricamente iguais às das amostras das estatinas utilizadas na preparação da solução das amostras comerciais do item anterior, seguindo-se o mesmo procedimento daquele item.

5.3.6.5.4. Determinação do teor de fluvastatina e atorvastatina nas amostras comerciais

Preparação das soluções padrão de fluvastatina, atorvastatina e padrão interno

Seguiu-se o mesmo procedimento para o preparo das soluções dos padrões fluvastatina, atorvastatina e padrão interno (diclofenaco de sódio) descritos no item 5.3.6.5.1.

Preparação das soluções das amostras comerciais de fluvastatina, atorvastatina

Seguiu-se o mesmo procedimento para o preparo das soluções das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina descritos no item 5.3.6.5.2.

5.3.6.6. Teste de recuperação

5.3.6.6.1. Preparação das soluções padrão de fluvastatina, atorvastatina e padrão interno (diclofenaco de sódio)

Alíquotas de 256,0; 320,0 e 384,0 μL das soluções padrão estoque de fluvastatina e atorvastatina (1000,0 $\mu\text{g/mL}$) foram transferidas para tubos de Eppendorf de 2 mL cada e adicionou-se 200,0 μL da solução estoque de padrão interno. Os volumes foram completados com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções de concentrações finais de 128,0; 160,0 e 192,0 $\mu\text{g/mL}$ de fluvastatina e atorvastatina e 200,0 $\mu\text{g/mL}$ de diclofenaco de sódio (padrão interno).

Após filtração com membrana de filtro Millipore[®] de 0,45 μm e degaseificação com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas no capilar (injeção hidrodinâmica).

5.3.6.6.2. Preparação das soluções das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina

Seguiu-se o mesmo procedimento para o preparo das soluções das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina descrito no item. 5.3.6.5.2.

Procedimento analítico para a amostra adicionada dos padrões das estatinas

O procedimento para a amostra adicionada dos padrões das estatinas (fluvastatina, atorvastatina) foi realizado segundo a Tabela 12.

Tabela 18. Procedimento para realização do teste de recuperação.

Sol.Padrão ATC, FS (µg/mL)	Sol.amostras comerciais das estatinas (µg/mL)		Padrão interno (µg/mL)	Concentração final (µg/2 mL)		
1000,0 Alíquotas (µL)	ATC 1000,0	FS 1000,0	2000,0	ATC	FS	P.I.
128,0	128,0		200,0	256,0		200,0
160,0	160,0		200,0	320,0		200,0
192,0	192,0		200,0	384,0		200,0
128,0		128,0	200,0		256,0	200,0
160,0		160,0	200,0		320,0	200,0
192,0		192,0	200,0		384,0	200,0

ATC: Atorvastatina

FS: Fluvastatina

P.I.: Padrão interno (diclofenaco de sódio)

Após filtração das amostras através de membrana Millipore[®] de 0,45 µm e degaseificação com auxílio de banho de ultra-som por 10 minutos, as soluções foram injetadas (injeção hidrodinâmica) no capilar. Os testes foram realizados em triplicatas.

As soluções de padrão e amostra foram analisados por seis vezes consecutivas e as amostras enriquecidas por quatro vezes consecutivas em cada metodologia desenvolvida.

A exatidão/recuperação é expressa em porcentagem (%R), na relação padrão e amostra. No método do EC foi calculado a partir da razão da área dos picos da fluvastatina e atorvastatina pela área do pico do (p.i), diclofenaco de sódio. Para formas farmacêuticas a legislação vigente tem como critério de aceitação de valores no intervalo de 98 a 102%.

A determinação dos valores de recuperação foi calculada na base de (F) quantidade total de analito (amostra+padrão); (O) quantidade de analito encontrado na análise e (S) quantidade de padrão adicionado:

$$\%R = \frac{F - \frac{1}{2}O}{S} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

5.3.6.7. Teste de estresse

Este foi executado para avaliar a interferência de produtos de degradação e metabólitos na eficiência dos picos de fluvastatina e atorvastatina. O teste de estresse foi realizado através de reações das amostras em diferentes meios e a altas temperaturas (Tabela13).

Tabela 19. Condições empregadas nos testes de estresse para o método por MEKC (KLICK et al., 2005).

Condição	Aquecimento banho-maria	Tempo (horas)	Solvente
Meio neutro	80°C	2	Água
Meio oxidativo	80°C	2	H ₂ O ₂ 3%
Meio ácido	80°C	2	HCl 0.1 mol L ⁻¹
Meio alcalino	80°C	2	NaOH 0.1 mol L ⁻¹

5.3.6.7.1. Reação em meio neutro para a fluvastatina e atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com água purificada para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida à temperatura de 80°C. Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 320,0 µL e transferida para um tubo de Eppendorf de (2,0 mL). Após resfriada à temperatura ambiente, o volume foi completado com água. Obteve-se uma

concentração final de 160,0 µg/mL, adicionou-se 200,0 µL de (p.i.) diclofenaco de sódio.

O mesmo procedimento foi seguido para atorvastatina.

A solução foi injetada em triplicata.

5.3.6.7.2 Reação em meio de oxidação para a fluvastatina e atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído a 3% para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 320,0 µL e transferida para um tubo de Eppendorf de (2,0 mL). Após resfriada à temperatura ambiente, o volume foi completado com água. Obteve-se uma concentração final de 160,0 µg/mL, adicionou-se 200,0 µL de (p.i.) diclofenaco de sódio.

O mesmo procedimento foi seguido para atorvastatina.

A solução foi injetada em triplicata.

5.3.6.7.3. Reação em meio ácido para a fluvastatina e atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 320,0 µL e transferida para um tubo de Eppendorf de (2,0 mL). Após resfriada à temperatura ambiente, neutralizou-se com uma alíquota de 1,0 mL de NaOH 0,1 mol/L, adicionou-se 200,0 µL de PI diclofenaco de sódio e o volume restante foi completado com água. Obteve-se uma concentração final de 160,0 µg/mL.

O mesmo procedimento foi seguido para a atorvastatina.

A solução foi injetada em triplicata.

5.3.6.7.4. Reação em meio básico para a fluvastatina e atorvastatina

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de padrão de fluvastatina e transferiu-se cuidadosamente para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de fase móvel até a dissolução e completou-se o volume com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol/L para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 320,0 µL e transferida para um tubo de Eppendorf de (2,0 mL). Após resfriada à temperatura ambiente, neutralizou-se com uma alíquota de 1,0 mL de HCl 0,1 mol/L, adicionou-se 200,0 µL de PI diclofenaco de sódio e o volume restante foi completado com água. Obteve-se uma concentração final de 160,0 µg/mL.

O mesmo procedimento foi seguido para a atorvastatina.

A solução foi injetada em triplicata.

5.4. Análise eletroforética: método analítico (CZE)

Desenvolvimento

Para a realização dos testes iniciais foram utilizados alguns parâmetros médios, como voltagem de +25kV, temperatura de 25°C e introdução da amostra hidrodinamicamente a 0,5 psi por 5 s. O capilar utilizado foi de sílica fundida de 40,4 cm x 70µm d.i.(30 cm até o detector), empregando detector de arranjo diodos/ UV-VIS. Para tais testes, foram utilizadas soluções de rosuvastatina 100,0 µg/mL.

Inicialmente foram avaliados diferentes tampões: tetraborato de sódio (TBS) e fosfato de sódio em diferentes concentrações. Em seguida foi testado o comportamento dos picos de rosuvastatina frente a utilização de solventes orgânicos (metanol e acetonitrila) e também aditivos surfactantes [dodecilsulfato de sódio (SDS)]. Com a definição do eletrólito o próximo passo foi a definição do pH ótimo. Para finalizar o desenvolvimento definiu-se a preparação e lavagem do capilar antes de cada introdução de amostra.

Tabela 20. Ensaios preliminares realizados no desenvolvimento de metodologia por (CZE) e (MEKC) para a validação e determinação quantitativa de rosuvastatina.

Sistema		Detecção (UV nm)	Eletrólito	pH	Injecção (hidrodinâmica)	+Voltagem (kV)	Temperatura (°C)
1	Sílica fundida: 40,2 cm de comprimento e 70 µm de diâmetro interno, 30 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (CZE)	TBS 20 mM	9,20	0,5 psi; 5s	25	25
2	Sílica fundida: 50,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 40 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 10 mM SDS 50 mM	9,24	0,5 psi; 5s	25	22
3	Sílica fundida: 50,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 40 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 20 mM SDS 50 mM	9,24	0,5 psi; 5s	25	22
4	Sílica fundida: 57 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 50 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 10 mM SDS 30 mM Metanol 10%v/v	9,24	0,5 psi; 5s	30	22
5	Sílica fundida: 57 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 50 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 10 mM SDS 30 mM Metanol 15%v/v	9,24	0,5 psi; 5s	25	22

6	Sílica fundida: 40,2 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 30 cm até o detector.	230 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 20 mM SDS 30 mM Metanol 10%v/v	9,21	0,5 psi; 5s	30	25
7	Sílica fundida: 57 cm de comprimento e 75 µm de diâmetro interno, 50 cm até o detector.	240 nm ± 10 nm (MEKC)	TBS 20 mM SDS 30 mM Metanol 10%v/v	9,24	0,5 psi; 5s	28	22

5.4.1. Preparação das soluções e tampões

5.4.1.1. Solução tampão estoque de tetraborato 100 mM

Foram pesados 3,8137g de tetraborato de sódio e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi desgaseificada com auxílio de banho de ultra-som por 30 min e filtrada através de membrana de 0,45 µm (Solução A).

5.4.1.2. Solução tampão de tetraborato 20 mM

Transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL da solução A de tetraborato para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água Milli Q[®]. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm. (pH de solução = 9.2)

5.4.1.3. Preparação das soluções padrão estoque (1,0 mg/mL) da rosuvastatina.

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de rosuvastatina e transferidos para um balão volumétrico âmbar de 10 mL. Dissolveram-se com 6 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções de concentração final de 1000,0 µg/mL. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min. e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.4.1.4. Preparação da solução estoque do padrão interno (ibuprofeno)

Foram pesados exatamente cerca de 20,0 mg de padrão de ibuprofeno e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Dissolveu-se em 6 mL de metanol e completou-se o volume com água Milli Q[®], obtendo-se uma concentração de 2000,0 µg/mL de diclofenaco de sódio. A solução foi colocada em banho de ultra-som por 15 min e em seguida filtrada através de uma membrana de 0,45 µm.

5.4.1.5 Preparação da mistura-teste (MT) da estatina e padrão interno (p.i.)

Alíquotas de 200,0 µL da solução estoque de rosuvastatina e 100,0 µL da solução estoque de ibuprofeno (p.i) foram transferidas para um frasco de Eppendorf de

2000 μL . O volume foi completado com água Milli Q[®]. A concentração final para a rosuvastatina foi de 100,0 $\mu\text{g/mL}$. A solução foi desgaseificada com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos e injetada no capilar (injeção hidrodinâmica).

A mistura foi “*spiked*” com cada um dos analitos para identificar a ordem de cada pico.

5.4.1.6. Condições analíticas

- ✓ *Capilar*: sílica fundida de 40,2 cm de comprimento sendo 30 cm até o detector, 75 μm de d.i. e 375 μm de d.d., Beckman Coulter MDQ[®];
- ✓ *Eletrólito*: tampão tetraborato de sódio 20 mM, pH 9,20;
- ✓ *Voltagem*: +25kV;
- ✓ *Modo de injeção*: hidrodinâmica a 0,5 psi por 5 segundos;
- ✓ *Temperatura*: 25°C;
- ✓ *Comprimento de onda para leitura*: 220 nm;
- ✓ *Equipamento*: sistema de eletroforese capilar Beckman Coulter MDQ[®];
- ✓ *Deteção*: arranjo diodo/ UV-vis;
- ✓ *Padrão interno*: ibuprofeno.

5.4.1.7. Tratamento do capilar

Foi utilizado um capilar novo de sílica fundida de 40,2 cm de comprimento x 75 μm de diâmetro interno (d.i.) x 375 μm de diâmetro externo (d.e.) com revestimento externo de poliimida. Uma fenda óptica de aproximadamente 0,2 cm foi preparada através de um rápido aquecimento a fim da remoção da poliimida no local e em seguida realizou-se a limpeza com acetona.

O capilar foi ajustado ao equipamento com auxílio de um cartucho próprio e fixado a fenda ótica na posição do detector UV para passagem do feixe de luz; o comprimento do tubo até esta posição foi 30 cm.

A ativação deste capilar foi realizada sob temperatura de 25°C, e foi condicionado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M por 20 minutos, água purificada por 15 minutos e eletrólito de corrida por 20 minutos. Entre cada corrida o capilar foi lavado com NaOH 0,1 M durante 1 minuto e com o respectivo eletrólito, durante 2 minutos. Ao final do dia, o capilar foi lavado com NaOH 0,1M por 10 minutos e água purificada por 5 minutos.

5.4.1.8. Preparação do eletrólito padronizado para os testes

Semanalmente, uma solução estoque de TBS na concentração de 100,0 mM foi preparada para diluição diária e preparo do eletrólito. Pesou-se uma massa de 3,8137 g de tetraborato de sódio, transferiu-se cuidadosamente para um balão de 100 mL, e diluiu-se em água purificada. Colocou-se o balão em banho de ultra-som até total diluição (30 minutos). Em seguida completou-se o volume do balão com água purificada e filtrou-se a solução com filtro Millipore® (0,45 µm).

5.4.2. Validação

A validação do método por CZE foi realizada nas condições descritas no item 5.4.1.5. utilizando-se (p.i) e os parâmetros descritos nos itens 5.4.1.6. e 5.4.1.8.

5.4.2.1. Construção da curva analítica

5.4.2.1.1. Preparação das soluções padrão de rosuvastatina e padrão interno

Foram transferidas alíquotas de 400,0; 450,0; 500,0; 550,0 e 600,0 µL da solução padrão estoque de rosuvastatina (1000,0 µg/mL) e 200,0 µL da solução padrão interno ibuprofeno (2000,0 µg/mL). Transferiu-se para 5 frascos de Eppendorf de 2 mL cada e completou-se o volume com água Milli Q®. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 200,0; 225,0; 250,0; 275,0 e 300,0 µg/mL de rosuvastatina e 200,0 µg/mL de ibuprofeno em cada frasco.

Após filtração através de membrana de filtro Millipore® 0,45 µm e degaseificação com auxílio de banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas (injeção hidrodinâmica) no capilar. A curva analítica do método rosuvastatina foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (estatina/padrão interno) obtidos dessas injeções. Foram realizadas triplicatas para cada concentração.

5.4.2.1.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados através da resposta do desvio padrão residual (σ) da linha de regressão da curva analítica e sua

inclinação (I), a partir das fórmulas $LD = 3,3 (\sigma/I)$ e $LQ = 10 (\sigma/I)^2$, para os limites de detecção e de quantificação, respectivamente.

5.4.2.2. Precisão do método

5.4.2.2.1. Repetibilidade (intra-dia)

Preparação da solução das amostras comerciais de rosuvastatina

Após homogeneização dos 20 comprimidos, de rosuvastatina foi calculado o peso médio de 154,52 mg. De acordo com o valor declarado o peso médio contém 10,0 mg de rosuvastatina cálcica (Crestor 10 mg). Estes comprimidos foram triturados cuidadosamente em um cadinho com pistilo de porcelana e o pó transferido, para um balão volumétrico âmbar de 10 mL. Foi adicionado 6,0 mL de metanol para dissolução, completando-se o volume com água Milli Q[®]. A mistura foi colocada em banho de ultra-som por 15 minutos e em seguida filtrada com papel de filtro Whatman 40, desprezando as primeiras porções do filtrado (2,0 mL). Obteve-se solução com concentração final de 1000,0 µg/mL.

Procedimento analítico para as amostras comerciais de rosuvastatina

Alíquotas de 400,0; 500,0 e 600,0 µL das soluções de rosuvastatina (1000,0 µg/mL) foram transferidas para frascos de Eppendorf de 2,0 mL cada e adicionou-se 200,0 µL da solução estoque de padrão interno. Os volumes foram completados com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 200,0; 250,0 e 300,0 µg/mL de rosuvastatina e 200,0 µg/mL de ibuprofeno (padrão interno).

Após filtração com membrana de filtro Millipore[®] de 0,45 µm e degaseificação das soluções com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos foram injetadas no capilar (injeção hidrodinâmica).

5.4.2.2.2. Precisão intermediária (inter-dia)

Seguiu-se o mesmo procedimento que o já descrito para a precisão *intra-dia*, mas para três dias diferentes.

5.4.2.2.3. Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

5.4.2.2.3.1. Preparação das soluções padrão de rosuvastatina e padrão interno

Foram transferidas alíquotas de 400,0; 500,0 e 600,0 μL da solução padrão estoque de rosuvastatina de (1000,0 $\mu\text{g/mL}$). Transferiu-se, cada alíquota, para três frascos de Eppendorf de 2,0 mL. Adicionou-se a cada frasco, 200,0 μL da solução padrão interno ibuprofeno (2000,0 mL) e completou-se o volume de cada tubo com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções com concentrações finais: de 200,0; 250,0; e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ com o padrão interno. Após filtração através de membrana de filtro Millipore[®] 0,45 μm e desgaseificação com auxílio de banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas (injeção hidrodinâmica) no capilar. A curva analítica do método, para a rosuvastatina, foi construída a partir dos resultados da razão das áreas dos picos (estatina/padrão interno) obtidos dessas injeções.

5.4.2.2.3.2. Preparação das soluções placebo das amostras comerciais de rosuvastatina

Foram pesadas quantidades teoricamente iguais às das amostras de rosuvastatina utilizadas na preparação da solução das amostras comerciais do item anterior, seguindo-se o mesmo procedimento daquele item. 5.4.2.2.1.

5.4.2.2.4. Teste de recuperação

5.4.2.2.4.1. Preparação das soluções padrão de rosuvastatina e padrão interno

Foram transferidas alíquotas de 400,0; 500,0 e 600,0 μL da solução padrão estoque de rosuvastatina padrão (1000,0 $\mu\text{g/mL}$) e 200,0 μL da solução padrão interno ibuprofeno (2000,0 $\mu\text{g/mL}$). Transferiu-se para três frascos de Eppendorf de 2 mL cada e completou-se o volume com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 200,0; 250,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ de rosuvastatina e 200,0 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno em cada frasco.

5.4.2.2.4.2. Preparação das soluções amostra de rosuvastatina e padrão interno

Alíquotas de 400,0; 500,0 e 600,0 μL das soluções de rosuvastatina amostra (1000,0 $\mu\text{g/mL}$) foram transferidas para os frascos de Eppendorf de 2 mL cada e adicionou-se 200,0 μL da solução estoque de padrão interno. Os volumes foram completados com água Milli Q[®]. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 200,0; 250,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ de rosuvastatina e 200,0 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno (p.i).

Após filtração com membrana de filtro Millipore[®] de 0,45 μm e degaseificação com auxílio do banho de ultra-som por 15 minutos, as soluções foram injetadas no capilar (injeção hidrodinâmica).

Tabela 21. Procedimento para realização do teste de recuperação.

Sol. Padrão RC	Amostra Crestor 10 mg. ($\mu\text{g/mL}$)	Padrão Interno Ibuprofeno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)	
1000,0 Alíquotas (μL)	RC 1000,0	2000,0	RC	P.I.
400,0	400,0	200,0	200,0	200,0
500,0	500,0	200,0	250,0	200,0
600,0	600,0	200,0	300,0	200,0

RC: rosuvastatina

p.i: Padrão interno (Ibuprofeno)

Após filtração das amostras através de membrana Millipore[®] de 0,45 μm e degaseificação com auxílio de banho de ultra-som por 10 minutos, as soluções foram injetadas (injeção hidrodinâmica) no capilar. Os testes foram realizados em triplicatas.

As soluções de padrão e amostra foram analisadas por seis vezes consecutivas e as amostras enriquecidas por quatro vezes consecutivas em cada metodologia desenvolvida.

A exatidão/recuperação é expressa em porcentagem (%R), na relação padrão e amostra. No método do EC foi calculado a partir da razão da área do pico da rosuvastatina pela área do pico do p.i. ibuprofeno. Para formas farmacêuticas a legislação vigente tem como critério de aceitação o intervalo entre 98% até 102%.

A determinação dos valores de recuperação foi calculada na base de (F) quantidade total de analito (amostra + padrão); (O) quantidade de analito encontrado no análise e (S) quantidade de padrão adicionado:

$$\%R = \frac{F - \frac{1}{2}O}{S} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

5.4.2.2.5. Teste de estresse

Este teste foi executado para avaliar a interferência de produtos de degradação e metabólitos na eficiência do pico da rosuvastatina. O teste de estresse foi realizado através da mudança do comportamento da amostra em diferentes meios e alta temperatura. (Tabela 22).

Tabela 22. Condições avaliadas nos testes de estresse.

Condição	Aquecimento banho-maria	Tempo (horas)	Solvente
Meio neutro	80°C	2	Água
Meio oxidativo	80°C	2	H ₂ O ₂ 3%
Meio ácido	80°C	2	HCL 0,1M
Meio alcalino	80°C	2	NaOH 0,1M

5.4.2.2.5.1. Reação em meio neutro

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de rosuvastatina padrão e transferiu-se cuidadosamente para um balão volumétrico de 10 mL. Dissolveu-se a massa e completou-se o volume do balão com água purificada para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C.

Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 1,25 mL e transferida para um balão de 5 mL. Após resfriada à temperatura ambiente, o volume foi completado com água. Obteve-se uma concentração final de 250,0 µg/mL, adicionou-se 200,0 µL de (p.i) ibuprofeno. A solução foi injetada em triplicata.

5.4.2.2.5.2. Reação em meio oxidante

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de rosuvastatina padrão e transferiu-se cuidadosamente para um balão volumétrico de 10 mL. Dissolveu-se a massa e completou-se o volume do balão com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído a 3% para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C.

Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 1,25 mL e transferida para um balão de 5 mL. Após resfriada à temperatura ambiente, o volume foi completado com água. Obteve-se uma concentração final de 250,0 µg/mL, adiciono-se 200,0 µL de (p.i.) ibuprofeno. A solução foi injetada em triplicata.

5.4.2.2.5.3. Reação em meio ácido

Pesou-se uma massa de 10,0 mg de rosuvastatina padrão e transferiu-se cuidadosamente para um balão volumétrico de 10 mL. Dissolveu-se a massa e completou-se o volume do balão com ácido clorídrico (HCl) 0,1M para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C.

Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 1,25 mL e transferida para um balão de 5 mL. Após resfriada à temperatura ambiente, neutralizou-se com uma alíquota de 1mL de NaOH 0,1M e o volume foi completado com água. Obteve-se

uma concentração final de 250,0 µg/mL, adicionou-se 200,0µL de (p.i.) ibuprofeno. A solução foi injetada em triplicata.

5.4.2.2.5.4. Reação em meio básico

Pesou-se uma massa de 10 mg de rosuvastatina padrão e transferiu-se cuidadosamente para um balão volumétrico de 10 mL. Dissolveu-se a massa e completou-se o volume do balão com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M para a obtenção de uma solução de concentração 1000,0 µg/mL. Em seguida esta solução foi submetida a uma temperatura de 80°C. Completados os 120 minutos foi retirada uma alíquota de 1,25 mL e transferida para um balão de 5 mL. Após resfriada a temperatura ambiente, neutralizou-se com uma alíquota de 1mL de HCl 0,1M e o volume foi completado com água. Obteve-se uma concentração final de 250,0 µg/mL, adicionou-se 200,0 µL de (p.i.) ibuprofeno. A solução foi injetada em triplicata.

5.4.2.2.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada através do estudo da estabilidade das soluções e de planejamento fatorial fracionário, do tipo saturado com resolução três, para variação em dois níveis de seis fatores.

Estabilidade das soluções:

Foi avaliada a estabilidade da solução de rosuvastatina de concentração 250,0 µg/mL equivalente a 100%. Foram feitas injeções no dia de preparação (tempo zero) a após acondicionamento em temperatura ambiente (25°C) e no refrigerador (2°C), durante três dias.

Para demonstrar a estabilidade das soluções, as respostas de área obtidas para os diferentes dias e condições de acondicionamento foram comparadas com as respostas obtidas no tempo zero. Com base na resposta relativa do tempo zero, foram calculados a resposta relativa média dos três dias e o correspondente RSD.

Foi feita avaliação estatística dos dados através da análise de variância para determinar se há diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos durante o estudo de estabilidade das soluções.

Planejamento fatorial: seis fatores em dois níveis:

Para demonstrar a robustez do método quanto às pequenas variações foi estudado o efeito de seis potenciais fatores, em dois níveis. A ordem de atribuição dos fatores, de um a trinta e dois, é concordante com o grau de importância esperado para os efeitos. Os ensaios foram realizados de modo randomizado, conforme apresentado na Tabela 23.

Tabela 23. Dados do planejamento fatorial para o teste de robustez.

Ensaio	Ordem de corrida	TBS (C) Mmol/L	pH	Voltagem (Kv)	Tempo de injeção	Pressão (psi)	T° C
1.2.3.4.5.6.7.8	5.23.18.21.14.9.13 .31	15	9.0 e 9.4	+23	7 seg	0,7	27
9.10.11.12.13. 14.15.16	20.2.11.15.3.10.17 .22	25	9.0 e 9.4	+23	3 seg	0,3	23
17.18.19.20.2 1.22.23.24	32.27.8.30.16.19.1 2.24	15	9.0 e 9.4	+27	3 seg	0,3	23
25.26.27.28.2 9.30.31.32	6.29.26.25.7.28.1. 4.	25	9.0 e 9.4	+27	7 seg	0,7	27

Nota: Tetraborato de sódio decaidratado TBS.

Tabela 24. Parâmetros dos dados de planejamento fatorial empregados para realização do teste de robustez.

Fator	Nível: (-)	(o)	(+)	Variação
TBS(C)	15	20	25	$\pm 5 \text{ mmol L}^{-1}$
pH do tampão TBS	9.0	9.2	9.4	$\pm 0.2 \text{ unidade}$
Voltagem	23	25	27	$\pm 2\text{Kv}$
Tempo de injeção	3	5	7	$\pm 2 \text{ segundos}$
Pressão	0,3	0,5	0,7	$\pm 0,2 \text{ psi}$
Temperatura	23	25	27	$\pm 2^{\circ}\text{C}$

De acordo com testes prévios, a variação do pH e da concentração do tetraborato de sódio TBS na fase móvel pode interferir de modo significativo na retenção e seletividade. Por este motivo, estes foram considerados os fatores principais, derivando deles as relações de equivalência para os quatro fatores restantes.

Foi feito um ensaio adicional no nível zero, a fim de avaliar o sistema antes de executar o planejamento experimental para o teste de robustez.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Estatinas

A pesquisa de novos agentes anticolesterolêmicos tem sido continua e crescente nos últimos anos, devido a ampla aceitação destes compostos no contexto mundial, por apresentarem eficácia de ação superior a de muitos fármacos de origem natural. Por pequenas modificações na estrutura química destes compostos, foram obtidos fármacos apresentando melhor espectro de ação. Este fato motivou a abertura de espaço para o constante avanço terapêutico na área.

6.2. Controle de qualidade

A melhor maneira de garantir a qualidade de um produto é controlar o processo de fabricação desde a seleção da matéria-prima até os produtos acabados e embalados, de que os medicamentos atendam as especificações exigidas.

Com o aparecimento de um grande número de estatinas quimicamente semelhantes, muitos métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa foram encontrados na literatura, mas muitos são direcionados ao monitoramento de resíduos e doseamento em fluidos biológicos e raros são os que apresentam a possibilidade de aplicação em controle físico-químico de qualidade, pois são procedimentos trabalhosos e custosos, ou seja, inviáveis para a rotina de laboratórios farmacêuticos de controle de qualidade.

Um dos maiores desafios para o controle de qualidade de formas acabadas é que o método analítico deve separar misturas complexas de princípios ativos e excipientes. Para tanto, na validação, a seletividade, mais especificamente, a avaliação de interferentes no placebo é um importante parâmetro a ser determinado. A validação de métodos analíticos foi importante para a determinação da eficiência de cada técnica utilizada nesta pesquisa, visando a comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas analíticas selecionadas (CLAE e EC).

Para a identificação e caracterização dos fármacos empregados como substâncias químicas de referência foram utilizadas a espectroscopia no infravermelho e a espectrofotometria no UV.

6.2. Espectroscopia no infravermelho (IV)

As principais bandas de absorção das estatinas (fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina) em estudo podem ser observadas nas Figuras 11, 12 e 13 respectivamente.

Figura 11. Espectro de absorção da fluvastatina no infravermelho (IV).

Figura 12. Espectro de absorção da atorvastatina no infravermelho (IV).

Figura 13. Espectro de absorção da rosuvastatina no infravermelho (IV).

Tabela 25. Bandas de absorção da fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina no espectro na região do infravermelho (pastilha de KBr).

Fluvastatina (cm ⁻¹)	Atorvastatina (cm ⁻¹)	Rosuvastatina (cm ⁻¹)	Estiramento
3440,8	3364,5	3430,3	O-H
2986,8	2971,3	2970,7	C-H
1640,6	1650,3	1604,3	C=O
1565,6	1469,3	1437,8	C=C
1403,7	1381,6	1382,0	C-C
1156,1	1159,6	1154,9	C-C

As bandas nos números de onda em 3430,3 cm⁻¹ (RS), 3364,5 cm⁻¹ (AT) e 3440,8 cm⁻¹ (FL) correspondem ao estiramento O-H; as bandas em 2970,7 cm⁻¹ (RS), 2971,3 cm⁻¹ (AT) e 2986,8 cm⁻¹ (FL) correspondem ao estiramento C-H; as bandas em 1604,3 cm⁻¹ (RS), 1650,3 cm⁻¹ (AT) e 1640,6 cm⁻¹ (FL) correspondem ao estiramento C=O; as bandas em 1437,8 cm⁻¹ (RS), 1469,3 cm⁻¹ (AT) e 1565,6 cm⁻¹ (FL) correspondem ao estiramento C=C; as bandas em 1382,0 cm⁻¹ (RS), 1381,6 cm⁻¹ (AT) e 1403,7 cm⁻¹ (FL) correspondem ao estiramento C-C e as bandas em 1154,9 cm⁻¹ (RS), 1159,6 cm⁻¹ (AT) e 1156,1 cm⁻¹ (FL) correspondem ao estiramento C-C. (CAMPO, V.L; CARVALHO, I. 2007)

6.3. Espectrofotometria no ultravioleta

Os espectros da rosuvastatina (RS), atorvastatina (AT) e fluvastatina (FL), obtidos na região do UV, estão apresentados nas Figuras 14,15 e 16.

Figura 14. Espectro de absorção do padrão de fluvastatina na região do ultravioleta (λ máximo em 302,2 nm), solução padrão de fluvastatina contendo 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M.

Figura 15. Espectro de absorção do padrão de atorvastatina na região do ultravioleta (λ máximo em 240,4 nm), solução padrão de atorvastatina contendo 14,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M.

Figura 16. Espectro de absorção do padrão de rosuvastatina na região do ultravioleta (λ máximo em 241 nm), solução padrão de rosuvastatina contendo 12,0 $\mu\text{g/mL}$ em NaOH 0,1M.

Os espectros no UV das estatinas em estudo (matérias-primas) revelaram os mesmos perfis espectrofotométricos, quando comparados com os das substâncias de referência.

6.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

As validações de métodos analíticos envolvem processos através dos quais, estudos são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas, fornecendo uma evidência documentada de que o método realiza função para a qual é indicado. A validação de um método analítico inclui a validação da exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, resistência e robustez.

6.5. Validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência. (CLAE)

Nas Figuras 17, 18 e 19 podem ser vistos os cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência das soluções padrão de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. Um modificador orgânico utilizado foi trietilamina (TEA) na concentração de 5,0 mmol/L em pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico. Empregado com a mistura do tampão e os solventes para a fase móvel nas proporções de (70:30) para duas primeiras estatinas e (60:40) para a terceira estatina. Conforme a cromatografia apresentando uma diminuição no tempo de retenção de compostos pela

diminuição da interação entre soluto e fase estacionária. Nestas condições foram obtidas maiores áreas, melhores simetrias de picos e menores tempos de retenção.

Figura 17. Cromatograma da solução padrão de fluvastatina. Concentração: 40,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol : água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,6 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 18. Cromatograma da solução padrão de atorvastatina. Concentração: 28,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol:água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 19. Cromatograma da solução padrão de rosuvastatina. Concentração: 28,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125 x 4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

6.5.1. Curvas analíticas obtidas pelo método cromatográfico

6.5.1.1. Fluvastatina

Figura 20. Curva analítica da solução padrão de fluvastatina. Nas faixas de concentração: 24,0; 32,0; 40,0; 48,0 e 56,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,6 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 21. Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica da fluvastatina nas concentrações de 24,0; 32,0; 40,0; 48,0 e 56,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,6 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

6.5.1.2. Atorvastatina

Figura 22. Curva analítica da solução padrão de atorvastatina. Nas faixas de concentração: 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 23. Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica da atorvastatina nas concentrações de 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

6.5.1.3. Rosuvastatina

Figura 24. Curva analítica da solução padrão de rosuvastatina. Nas faixas de concentração: 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

Figura 25. Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica da rosuvastatina nas concentrações de 12,0; 20,0; 28,0; 36,0 e 44,0 µg/mL. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125 x 4 mm, 5 µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão 1,4 mL/minuto, volume de injeção 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm, temperatura do forno 25°C.

6.5.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Tabela 26. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na análise de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina. Método: CLAE.

Parâmetro estatístico	Fluvastatina FS	Atorvastatina ATC	Rosuvastatina RC
Intervalo de concentração (µg/mL)	24,0 – 56,0	12,0 – 44,0	12,0 – 44,0
Equação da reta	$y=17102X-86975$	$y=16223X-834902$	$y=14339X-841656$
Coeficiente de Correlação (r)	0,9915	0,9959	0,9945
Coeficiente de Variação (%)	3,48	0,96	3,37
Limite de detecção (µg/mL)	2,02	0,44	1,55
Limite de quantificação (µg/mL)	6,12	1,34	4,70

O LQ obtido representa a menor concentração em que as estatinas em estudo podem ser determinadas por CLAE com precisão e exatidão aceitáveis e o LD foi calculado como sendo correspondente à concentração de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina que teoricamente produz um valor do sinal medido 3.3 vezes maior do que o nível de ruído médio. Os valores encontrados mostram resultados aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.

6.5.3. Precisão

Tabela 27. Resultados estatísticos da precisão dos dados obtidos na determinação de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina em comprimidos. Método: CLAE

	Fluvastatina		Atorvastatina		Rosuvastatina	
Intra-dia*	Amostra A µg/mL	Amostra B µg/mL	Amostra C µg/mL	Amostra D µg/mL	Amostra E µg/mL	Amostra F µg/mL
Dia 1	23,62 ± 0,23	46,87 ± 0,64	9,72 ± 0,10	19,72 ± 0,24	8,92 ± 0,24	19,74 ± 0,18
CV (%)	1,39	1,92	1,44	1,72	1,73	1,33
Dia 2	24,70 ± 0,17	47,62 ± 0,11	10,33 ± 0,14	20,38 ± 0,20	9,99 ± 0,01	18,47 ± 0,14
CV (%)	1,01	0,33	1,93	1,37	0,12	1,13
Dia 3	20,60 ± 0,18	48,31 ± 0,26	9,95 ± 0,13	21,31 ± 0,26	9,99 ± 0,01	23,45 ± 0,18
CV (%)	1,26	0,76	1,90	1,73	0,12	1,13
Inter-dia**	22,97 ± 0,02	47,60 ± 0,02	10,00 ± 0,04	20,50 ± 0,08	9,64 ± 0,04	20,56 ± 0,13
DP	0,07	0,08	0,12	0,24	0,12	0,35
CV (%)	0,33	0,18	1,25	1,18	1,24	1,71

*Média aritmética (n = 10)

**Valor da média depois do tratamento estatístico com ANOVA (n = 30)

Os resultados encontrados mostram que o método de CLAE é preciso. Os valores dos desvios padrão (DP) e coeficientes de variação (CV) obtidos variam entre 0,07 e 1,92 e estão abaixo do valor máximo permitido que é de 5,00%. Foi assim comprovada a baixa variabilidade do método e estabilidade das soluções dos fármacos.

6.5.4. Resultados do teste de recuperação

Tabela 28. Resultados estatísticos da precisão dos dados obtidos na determinação de fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina em comprimidos. Método: CLAE

Fluvastatina				Atorvastatina				Rosuvastatina			
*A	**QA	***QE	****R	*A	**QA	***QE	****R	*A	**QA	***QE	****R
	(µg /mL)	(µg /mL)	(%)		(µg /mL)	(µg /mL)	(%)		(µg /mL)	(µg / m ¹)	(%)
1	12,00	11,70	98,12	1	5,00	5,11	101,10	1	5,00	4,91	99,10
2	16,00	15,77	98,85	2	9,00	9,05	100,37	2	9,00	9,16	101,1
3	20,00	19,55	98,12	3	13,00	12,78	98,77	3	13,00	12,91	4
											99,50
1	12,00	11,72	98,25	1	5,00	4,81	98,11	1	5,00	4,78	97,80
2	16,00	16,45	102,25	2	9,00	9,28	102,00	2	9,00	8,86	99,00
3	20,00	20,47	101,95	3	13,00	13,20	101,11	3	13,00	12,76	98,66

*A = amostra

**QA = quantidade adicionada

***QE = quantidade encontrada

****R = recuperação

6.5.5. Teste de estresse

6.5.5.1. Hidrólise em médio neutro

Conforme apresentado nas Figuras 26, 27 e 28, após reação em médio neutro, empregando-se o método por cromatografia líquida de alta eficiência, não foi observada a degradação das estatinas em estudo. Não houve mudança no tempo de retenção, e somente diminuição do pico após 2h sob aquecimento a 80°C.

Figura 26. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio neutro de 2h. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 27. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após reação em meio neutro. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 28. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após reação em meio neutro. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

6.5.5.2. Hidrólise em médio oxidativo

Nas Figuras 29, 30 e 31, pode-se observar o aparecimento de picos desconhecidos, com intensidade maior que das amostras, não provocarem mudança no tempo de retenção das amostras, após a oxidação química com H₂O₂ 3%.

Figura 29. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio oxidante com H₂O₂ 3%. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 30. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após reação em meio oxidante com H_2O_2 3%. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 31. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após oxidante com H_2O_2 3%. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

6.5.5.3. Hidrólise em médio ácido

Na reação em médio ácido com HCl 0,1 M, apresentada na Figura 32, apareceram picos desconhecidos, além dos das estatinas, com respostas instrumentais não significativa para nosso estudo. Nas Figuras 33 e 34, os cromatogramas da solução de atorvastatina e rosuvastatina só representam uma ligeira diminuição dos picos, após 2 h sob aquecimento a 80°C.

Figura 32. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio ácido com HCl 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 33. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após reação em meio ácido com HCl 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 34. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após reação em meio ácido com HCl 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

6.5.5.4. Hidrólise em médio básico

As Figuras 35, 36 e 37, mostram os picos das estatinas em estudo sem mudança no tempo de retenção. Nos cromatogramas obtidos podem ser observados picos largos, ou seja, de alta assimetria, após 2h sob aquecimento a 80°C.

Figura 35. Cromatograma da solução de fluvastatina (40,0 µg/mL) após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher® C18 (125x4 mm, 5µm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,6 mL/min, volume injetado 10,0 µL, detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 36. Cromatograma da solução de atorvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (70:30 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

Figura 37. Cromatograma da solução de rosuvastatina (28,0 $\mu\text{g/mL}$) após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. Condições cromatográficas: Coluna: LiChrospher[®] C18 (125x4 mm, 5 μm), fase móvel: metanol: água adicionada de 5mM de TEA (60:40 v/v), pH 3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, vazão de 1,4 mL/min, volume injetado 10,0 μL , detecção no ultravioleta a 238 nm a temperatura do forno 25°C.

6.5.6. Resultados de adequabilidade do sistema

Os resultados obtidos para a análise de adequabilidade do sistema, empregando-se o método por cromatografia líquida de alta eficiência, podem ser observados na

Tabela 26

Tabela 29. Resultados obtidos na adequabilidade do sistema.

	fluvastatina	atorvastatina	rosuvastatina
Parâmetros	FS	ATC	RC
	DPR (%)	DPR (%)	DPR (%)
Fator de capacidade	0,00	0,00	0,25
Largura	0,08	0,11	1,20
Altura	1,72	1,84	0,17
Assimetria	0,27	0,23	0,35
Pratos teóricos	0,51	0,48	0,91
Área	1,17	1,15	0,92
Tempo de retenção	0,01	0,09	0,25

DPR = Desvio padrão relativo

6.6. Validação do método por (MEKC)

Para validação do método foi escolhido o sistema 8, MEKC constituído de: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato 20 mM: SDS 30 mM: metanol 10% v/v pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; temperatura do capilar 22°C. Este sistema apresentou boa seletividade e resolução.

6.6.1. Precisão do sistema

Um total de 27 injeções da mistura-teste dos padrões das estatinas (rosuvastatina, atorvastatina, fluvastatina) e padrões internos foram realizados para demonstrar a precisão do sistema. Foram calculadas as razões das áreas dos picos (PAR) e os tempos de migração relativos (RMT) em relação ao padrão interno.

A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos para a precisão do sistema. Pode-se observar que os desvios padrão relativos (%RSD) para PAR (razão das áreas dos picos, estatina/ p.i) foi de 1,5%, obtendo-se boa seletividade e mantendo-se aceitável resolução com precisão do tempo de migração relativo (RMT) menor do que 1,0%. Portanto, a precisão da injeção foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação (ANSEL, H.; PRINCE, S. 2005)

Tabela 30. Precisão do sistema. Método MEKC, com detecção UV a 240 nm.

Estatina	Desvio padrão relativo (%RSD)*	
	RMT	PAR
Atorvastatina cálcica	0,34	1,42
Fluvastatina sódica	0,30	1,09

* Média de 27 determinações.

RMT: Tempo de migração relativo (tempo do composto/tempo do padrão interno)

PAR: Razão das áreas dos picos (área do composto/ área padrão interno)

6.6.2. Curva analítica (linearidade)

Foram construídas as curvas analíticas num intervalo de concentrações de 128,0 a 192,0 µg/mL para a atorvastatina e para a fluvastatina (Figuras 38, 39 e Tabela 31). Obteve-se boa linearidade com coeficientes de correlação superiores a 0,999.

Figura 38. Curva analítica da fluvastatina (FS) na faixa de concentrações de 128,0 a 192,0 µg/mL. Padrão interno (p.i), diclofenaco de sódio (200,0 µg/mL).

Figura 39. Curva analítica da atorvastatina (ATC) na faixa de concentrações de 128,0 a 192,0 µg/mL. Padrão interno (p.i), diclofenaco de sódio (200,0 µg/mL).

Tabela 31. Resultados experimentais obtidos na determinação das curvas analíticas das estatinas. Método MEKC.

Estati- nas	Faixa de conc. µg/mL	Intercepto (a)	Inclinação (b)	DP de (a)	DP de (b)	Desvio padrão residual	R
ATC	128,0 – 192,0	0, 19395	0, 00716	0, 01642	$1,0 \times 10^{-4}$	0, 00514	0,9997
FS	128,0 – 192,0	-0, 19372	0, 01012	0, 00924	$5,7 \times 10^{-5}$	0, 00289	0,9999

ATC: atorvastatina FS: fluvastatina

R: coeficiente de correlação.

6.6.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A Tabela 32 mostra os resultados relativos aos limites de detecção e de quantificação da fluvastatina e atorvastatina (Método MEKC).

Tabela 32. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e de quantificação da rosuvastatina, atorvastatina e fluvastatina. Método MEKC.

Parâmetro	ATC	FS
Limite de detecção (µg/mL)	2, 3689	0, 9423
Limite de quantificação (µg/mL)	7, 1787	2, 8557

ATC: atorvastatina FS: fluvastatina

6.6.4. Precisão do método

A repetibilidade do método foi obtida realizando-se nove determinações, isto é, com três concentrações e três replicatas de cada concentração (80%, 100% e 120% da concentração nominal para cada estatina). Da mesma forma foi determinada para a precisão intermediária, mas em três dias diferentes. Foram calculados, para cada concentração, os desvios padrão relativos (%RSD) para PAR. Os resultados estão

apresentados na Tabela 33 e estão de acordo com os critérios estabelecidos para a determinação da precisão de um método analítico, ou seja, a %RSD deve ser menor do que 2,0% (ANSEL, H.; PRINCE, S. 2005)

Tabela 33. Resultados obtidos na determinação da precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária) para a atorvastatina e fluvastatina. Método MEKC.

Estatinas (µg/mL)	Desvio padrão relativo (RSD) relação a PAR ^b	
Atorvastatina	^a <i>Intra-dia</i>	^c <i>Inter-dia</i>
128,0	0,61	0,62
160,0	0,88	0,89
192,0	0,88	0,55
%RSD ^d	0,79	0,69
Fluvastatina		
128,0	0,85	0,49
160,0	0,13	0,25
192,0	0,59	0,35
%RSD ^d	0,52	0,36

a. três determinações para cada concentração.

b. PAR: razão das áreas dos picos (amostra/padrão interno).

c. três determinações para cada concentração em três dias diferentes.

d. média do %RSD (nove determinações).

6.6.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO PADRONIZADO ÀS AMOSTRAS COMERCIAIS

6.6.5.1. Pesquisa de interferentes

As Figuras 40 e 41 apresentam os eletroferogramas referentes à pesquisa de interferentes, por parte dos excipientes das amostras comerciais de fluvastatina e atorvastatina.

Figura 40. Eletroferogramas referentes às soluções do placebo, com p.i da amostra comercial de fluvastatina (A), padrão fluvastatina (160,0 $\mu\text{g/mL}$) (B) e da amostra comercial (160,0 $\mu\text{g/mL}$) (C). Picos: FL: fluvastatina, p.i: padrão interno diclofenaco de sódio (200,0 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 41. Eletroferogramas referentes às soluções do placebo, com p.i da amostra comercial de atorvastatina (A), padrão atorvastatina (160,0 $\mu\text{g/mL}$) (B) e da amostra comercial (160,0 $\mu\text{g/mL}$) (C). Picos: ATC: atorvastatina, p.i: padrão interno diclofenaco de sódio (200,0 $\mu\text{g/mL}$).

Os excipientes presentes nas amostras não interferiram com o método MEKC.

6.6.5.2. Determinação do teor das estatinas nas amostras comerciais

A Tabela 34 apresenta os resultados obtidos na determinação do teor das estatinas nas amostras comerciais.

Tabela 34. Resultados obtidos na determinação do teor de atorvastatina e fluvastatina nas amostras comerciais. Método: MEKC.

Amostra		Atorvastatina	Fluvastatina
Valor rotulado	(mg/comprimido)	20,00	40,00
Valor encontrado*	(mg/ comprimido)	20,79	41,84
Teor porcentual	(%)	103,96	104,61

* Média de três determinações

A análise foi satisfatória; o teor de pureza das amostras analisadas encontra-se dentro dos limites de tolerância (90%-110%), isto é, a porcentagem do fármaco está de acordo com o valor rotulado.

6.6.5.3. Teste de recuperação

A Tabela 35 apresenta os resultados obtidos no teste de recuperação efetuado nas amostras comerciais de atorvastatina e fluvastatina. Estes resultados estão na faixa de 97,41% a 102,20%.

Tabela 35. Teste de recuperação das soluções padrão de atorvastatina e fluvastatina adicionadas à amostra e analisadas pelo método por MEKC.

Estatinas	Quantidade de padrão adicionado* (µg/mL)	Quantidade de padrão-recuperado* (µg/mL)	Recuperação (%)
AT	64,00	64,40	100,64
	80,00	77,90	97,41
	96,00	97,40	101,46
FL	64,00	65,40	102,20
	80,00	79,00	98,74
	96,00	94,20	98,09

Para adequar estes métodos ao equipamento do laboratório e a mistura de amostras de estatinas foram realizados muitos testes com os métodos CZE e MEKC de eletroforese capilar, mas se apresentavam problemas de separação entre as estatinas, como, baixa assimetria entre os picos, e tempos de retenção altos. Portanto, realizou-se uma alteração no método e condições de análise para a rosuvastatina RC. Esta estatina foi analisada empregando-se um método de eletroforese capilar de zona CZE

6.6.5.4. Desenvolvimento do método

Após a revisão da literatura foi considerado o desenvolvimento de oito sistemas, dos quais seis são os mais representativos na separação de várias estatinas simultaneamente utilizando a eletroforese capilar.

Figura 42. Sistema 1, Eletroforese Capilar de Zona (CZE). Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 μm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato 10 mM pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 43. Sistema 2, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 μm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 10 mM SDS 50 mM, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 44. Sistema 3, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (rosuvastatina, fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 μm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS 50 mM, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 45. Sistema 4, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (fluvastatina e atorvastatina) e dos padrões internos (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 57 cm x 75 μm d. i. (50 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 10 mM SDS 30 mM, 10% v/v metanol, pH 9,24; voltagem aplicada: +30 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 46. Sistema 5, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida de 57 cm x 75 μm d. i. (50 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 10 mM SDS 30 mM, 15% v/v metanol, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Figura 47. Sistema 6, MEKC. Eletroferograma da mistura teste dos padrões das estatinas (fluvastatina e atorvastatina) e do padrão interno (diclofenaco de sódio); concentração de todos os analitos 100,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 50,2 cm x 75 µm d. i. (40 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS 30 mM, 10% v/v acetonitrila, pH 9,24; voltagem aplicada: +25 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/5s na direção do cátodo. Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1 °C.

Na Figura 42 pode-se observar que os picos 1, 2 e 3 e também os picos 5 e 6, migram juntos, quando utilizado o sistema 1, com tampão borato 10 mM. Com o intuito de melhorar a seletividade foi adicionado ao eletrólito o tensoativo SDS. Pelo uso deste tensoativo a CE toma o nome de cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC).

Esta técnica é utilizada para separar, tanto compostos eletricamente carregados, quanto compostos neutros. Em MEKC duas fases distintas são usadas, uma fase aquosa e uma fase micelar ou pseudo-fase estacionária. A partição dos solutos ocorre entre a fase micelar e a fase aquosa. Os tensoativos têm a cabeça hidrofílica e a cauda hidrofóbica. Quando um soluto hidrofóbico insolúvel em água é adicionado à solução aquosa que contém micelas, este particiona dentro da porção hidrofóbica da micela e é por elas solubilizado. Inversamente, se um composto hidrofílico é adicionado à solução, este não se distribuirá dentro da micela, uma vez que não é solúvel. Um composto de solubilidade aquosa intermediária particionará entre a solução aquosa e as micelas, dependendo da hidrofobicidade do composto.

Nas Figuras 43 e 44 pode-se observar uma melhora na seletividade, mas ainda os picos 1 e 2, 4 e 5 migram juntos. Continuou-se a adicionar ao eletrólito, os aditivos orgânicos, metanol (sistemas 4 e 5, Figuras 45 e 46) e acetonitrila (Figura 47, sistema 6) para auxiliar na solubilização e na solvatação dos analitos. Pode-se observar que, com o sistema 5, quase que houve a completa separação dos analitos. Para resolver este problema e obter-se total separação e aumento da resolução dos analitos, aumentou-se a força iônica do tampão a 20 mM. O padrão interno (diclofenaco de sódio) foi utilizado para diminuir a flutuação do volume de injeção da amostra e evitar mudanças nas alturas ou áreas dos picos durante as corridas, obtendo-se assim uma melhor precisão.

Até o presente, pela revisão da literatura, não foram encontrados trabalhos que relatem a separação de várias estatinas simultaneamente utilizando a eletroforese capilar. KIRCALI e KOCIJAN determinaram a pravastatina em comprimidos. DOGRUKOL-AK e colaboradores determinaram a fluvastatina em cápsulas e em fluídos biológicos (soro).

6.6.5.5. Teste de estresse

6.6.5.5.1. Hidrólise em médio neutro

Conforme apresentado nas Figuras. 48 e 49 após reação em médio neutro, empregando-se o método por cromatografia capilar eletrocinética micelar (MEKC), não foi observada a degradação das estatinas em estudo. Não houve mudança no tempo de retenção. Foi observada diminuição da intensidade do sinal após 2h sob aquecimento a 80°C.

Figura 48. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio); após reação em meio neutro durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da atorvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 49. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio neutro durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da fluvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

6.6.5.5.2. Hidrólise em médio oxidativo

Nas Figuras 50 e 51 pode-se observar como consequência da oxidação química com H₂O₂ 3%, durante 2h sob aquecimento a 80°C, o aparecimento de picos desconhecidos. A maioria deles com baixa intensidade ao longo da corrida.

Figura 50. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio oxidante com H₂O₂ 3%, durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da atorvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 51. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio oxidante com H₂O₂ 3%, durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da fluvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

6.6.5.5.3. Hidrólise em médio ácido

Na Figura 52 apresenta-se o eletroferograma sem degradação aparente da atorvastatina, com ligeira modificação no tempo de retenção e incremento da intensidade do sinal após de 2h sob aquecimento a 80°C com HCl 0,1M. Já na Figura 53 apareceram picos desconhecidos com respostas instrumentais de baixa detecção.

Figura 52. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio ácido com HCl 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da atorvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 53. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio ácido com HCl 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da fluvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

6.6.5.5.4. Hidrólise em médio básico

As Figuras 54 e 55 apresentam eletroferogramas em meio alcalino com NaOH 0,1M, onde pode ser observado que não houve degradação significativa, uma ligeira modificação no tempo de retenção e diminuição da intensidade do sinal após 2 h sob aquecimento a 80°C.

Figura 54. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da atorvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da atorvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

Figura 55. Sistema 8, MEKC. Eletroferograma do padrão da fluvastatina e do p.i. (diclofenaco de sódio), após reação em meio alcalino com NaOH 0,1M. durante 2h sob aquecimento a 80°C. Concentração final da fluvastatina 160,0 µg/mL e do p.i. 200,0 µg/mL. Condições: capilar de sílica fundida de 40,2 cm x 75 µm d. i. (30 cm até detector); eletrólito: tampão borato: 20 mM SDS: 30 mM e metanol 10% v/v, pH 9,24; voltagem aplicada: +22 kV; injeção: hidrodinâmica 0,5 psi/3s na direção do cátodo; Detecção UV 240 nm. Temperatura: 25 ± 1°C.

6.7. Validação do método por (CZE)

6.7.1. Linearidade

Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (rosuvastatina) foi gerada uma curva analítica com cinco soluções padrão nas seguintes concentrações 200,0; 225,0; 250,0; 275,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ adicionadas de PI. (ibuprofeno). A sobreposição dos picos está apresentada na Figura 56. A representação gráfica da curva analítica e equação da reta estão ilustradas na Figura 57 e os dados estatísticos estão indicados na Tabela 36. Foi assim comprovada a boa linearidade do método ($r = 0,9989$).

Figura 56. Sobreposição dos eletroferogramas da curva analítica da rosuvastatina nas concentrações de 200,0; 225,0; 250,0; 275,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$ com adição de padrão interno PI. concentração 200,0 $\mu\text{g/mL}$. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

Figura 57. Curva de calibração da rosuvastatina na faixa de concentrações de 200,0 a 300,0 µg/mL. Padrão interno: ibuprofeno (200,0 µg/mL).

Tabela 36. Resultados experimentais na determinação da curva analítica da rosuvastatina. Método: CZE

Concentração de leitura (µg/mL)	Resposta $^*(A/A)^{**}$
200,0	0,694613
225,0	0,798642
250,0	0,901245
275,0	0,988976
300,0	1,101206
Inclinação (b)	0,00401
Desvio padrão da inclinação (Sb)	7,5624 e-5
Intercepto (a)	-0,10658
Desvio padrão do intercepto (Sa)	0,00598
Erro padrão da estimativa (Se)	0,01909
Coeficiente de correlação (r)	0,9989

*Média de três leituras.

**Razão das áreas dos picos (rosuvastatina/ibuprofeno)

6.7.2. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A avaliação do LQ e do LD é de extrema importância para o controle de qualidade, visando o uso futuro do método. Foi determinado o menor valor em que o analito pode ser detectado e o menor valor quantificável com precisão e exatidão. Como esperado, os valores encontrados para o método eletroforético, apresentados na Tabela 37 foram maiores do que os encontrados para o método cromatográfico.

Tabela 37. Resultados obtidos na determinação dos limites de detecção e quantificação da rosuvastatina. Método: CZE.

Parâmetro	Rosuvastatina (µg/mL)
Limite de detecção	4, 921197
Limite de quantificação	14, 91272

6.7.3. Precisão

Os resultados de repetibilidade da precisão podem ser vistos na Tabela 38. Estes valores foram calculados com base na razão das áreas dos picos de rosuvastatina e do p.i. Na precisão intermediária não foi verificada nenhuma mudança significativa no sinal, indicando estabilidade instrumental e boa estabilidade das soluções.

Tabela 38. Resultados obtidos na determinação da repetibilidade da precisão. Método: CZE.

Concen tração Padrão (µg/mL)	Resposta rosuvas tatina RC	Resposta ibuprofeno p.i.	(A/A)*	Média	Desvio padrão	Desvio padrão relativo
200,00	104118	178250	0, 752475	0, 763783	0, 013448	1, 760765
	64538	102745	0, 735846			
	83508	133734	0, 765297			
	86162	110701	0, 778331			
	79674	103812	0, 767484			
	82252	106781	0, 770287			
	95518	133498	0, 768954			
	73216	128091	0, 771594			
	132977	153905	0, 911423			
	147958	169550	0, 925514			
250,00	145963	165817	0, 915524	0, 921523	0, 009592	1, 040939
	90250	99427	0, 907701			
	90013	97712	0, 921207			
	86735	92637	0, 936289			
	102822	119342	0, 930012			
	97885	122406	0, 924513			
	208993	261705	1, 138897			
	217501	276018	1, 140125			
	206568	215682	1, 137866			
	120727	104738	1, 152657			
300,00	116576	102053	1, 142308	1, 143678	0, 006237	0, 545333
	131877	152062	1, 150214			

*Razão das áreas dos picos (rosuvastatina/ibuprofeno)

Resultados menores a 2%.

Para definir a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (rosuvastatina) foram gerados eletroferogramas com três soluções injetadas em triplicata, no total 27 corridas, nos intervalos de concentração 200,0; 250,0 e 300,0 $\mu\text{g/mL}$, adicionadas de p.i., com concentrações finais de 400,0; 500,0 e 600,0 μL respectivamente. A sobreposição das medidas dos picos esta apresentada na Figura 58.

Figura 58. Sobreposição dos eletroferogramas da precisão nas concentrações de 200,0; 250,0; 300,0 $\mu\text{g/mL}$ com adição de PI. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV em 220 nm.

*Tempo de detecção do analito RC = 1, 679 minutos.

**Tempo de detecção do ibuprofeno PI = 1, 908 minutos.

6.7.4. Teste de estresse

6.7.4.1. Reação em meio neutro

O eletroferograma apresentado na Figura 59 indica que a reação em meio neutro não apresentou degradação da rosuvastatina, com relação ao tempo de retenção. Houve apenas a diminuição da intensidade do sinal, após 2 h sob aquecimento a 80°C.

Figura 59. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250,0 µg/mL após 2 h de reação em meio neutro. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 µm (d.i.) x 375 µm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

6.7.4.2. Reação em meio oxidante

Na Figura 60 pode-se observar o aparecimento de picos desconhecidos, após a oxidação química com H₂O₂ 3%, a maioria com baixa intensidade ao longo da corrida.

Figura 60. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250,0 µg/mL após 2 h de reação em meio oxidante. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 µm (d.i.) x 375 µm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

6.7.4.3. Reação em meio ácido

Após a hidrólise em médio ácido com HCl 0,1 M, foram observados com mesmo tempo de retenção da rosuvastatina, picos desconhecidos com respostas instrumentais de baixa detecção, o que pode ser observado no Eletroferograma da Figura 61..

Figura 61. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250 µg/mL após 2 h de reação em meio ácido. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 µm (d.i.) x 375 µm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

6.7.4.4. Reação em meio básico

A Figura 62 apresenta o eletroferograma com picos desconhecidos com baixa detecção em relação à rosuvastatina.

Figura 62. Eletroferograma da solução de rosuvastatina 250 $\mu\text{g/mL}$ após 2 h de reação em meio alcalino. Condições: capilar de sílica fundida com 40,2 cm (30 cm até o detector) x 75 μm (d.i.) x 375 μm (d.e.); eletrólito: tampão tetraborato de sódio 20 mM (pH 9,2); voltagem de +25 kV; temperatura de 25°C; introdução hidrodinâmica da amostra por 5 s a 0,5 psi e detecção no UV 220 nm.

6.7.5. Pesquisa de interferentes

A Figura 55 apresenta os eletroferogramas referentes à pesquisa de interferentes, por parte dos excipientes das amostras comerciais de rosuvastatina.

Figura 63. Eletroferogramas referentes às soluções do placebo, com p.i. da amostra comercial de rosuvastatina (A), padrão rosuvastatina (250,0 $\mu\text{g/mL}$) (B) e da amostra comercial (250,0 $\mu\text{g/mL}$) (C). Picos: RC: rosuvastatina, p.i.: padrão interno ibuprofeno (200,0 $\mu\text{g/mL}$).

6.7.6. Exatidão

A Tabela 39 apresenta os resultados obtidos na análise da exatidão através do teste de recuperação. Para as três diferentes concentrações de padrão adicionadas a amostra, foi obtida a recuperação com resultados aceitáveis por estarem próximos ao valor real. O método pode ser considerado como exato. Foi observado que os DPR encontrados não ultrapassam 2.0%, indicando baixa variabilidade instrumental.

Tabela 39. Resultados obtidos no teste de recuperação da rosuvastatina. Método: CZE.

Resposta padrão	Padrão adicionado (µg/mL)	Resposta (A/A)**	Recuperação (%)	Média da recuperação ± DPR
2,8369	5,00	3,3045	99,70	100,66±1,2
	10,00	3,6478	100,60	
	15,00	3,8674	101,70	

- *Média de quatro leituras
- **Razão das áreas dos picos (rosuvastatina/ ibuprofeno).

7. CONCLUSÕES

Pelos dados experimentais obtidos pode-se concluir que:

- Visando a aplicação em análise de rotina de laboratórios de Controle Físico Químico de Qualidade, os métodos propostos para a determinação quantitativa de estatinas em comprimidos, são simples e deram origem a resultados confiáveis.
- O método da eletroforese capilar de zona (CZE) pode ser aplicado para a separação e determinação quantitativa da rosuvastatina;
- A rosuvastatina pode ser determinada quantitativamente por CZE na presença do eletrólito: 20 mM tetraborato: pH 9,240 utilizando o ibuprofeno como padrão interno;
- O método da cromatografia capilar eletrocínica micelar (MEKC) pode ser aplicado para a separação das estatinas estudadas (atorvastatina, fluvastatina);
- A atorvastatina e fluvastatina podem ser determinadas quantitativamente por MEKC na presença do eletrólito: 20 mM borato: 30 mM SDS: 10% v/v metanol, pH 9,24 utilizando o diclofenaco de sódio como padrão interno;
- Os excipientes presentes nas amostras não interferem com os métodos propostos.
- Os métodos são altamente reprodutíveis em termos de repetibilidade dos tempos de migração;
- Este estudo mostra que o método MEKC pode ser diretamente aplicado na análise de rotina nos laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos;
- O método por CLAE proposto para determinação quantitativa das estatinas (fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina) é simples, rápido e eficiente. Quando aplicado nas amostra de comprimidos, o método conduziu à obtenção de resultados satisfatórios e confiáveis;
- Os métodos propostos por CLAE se diferenciam das poucas metodologias existentes, pela simplicidade em relação à fase móvel ao tempo de retenção. Por sua vez a CZE se destaca pela simplicidade do eletrólito de corrida, sem a necessidade do uso de soluções tampão muito elaboradas. Os resultados obtidos foram precisos e exatos. Além disso, ambas as metodologias utilizam

água purificada para o preparo da amostra. Assim sendo, a preparação das amostras simples e econômica;

- Os métodos se mostraram lineares e sensíveis. Não houve interferência dos excipientes. Assim sendo métodos que podem ser considerados seletivos. O teste de estresse indicou que podem ser utilizados como métodos indicativos de estabilidade, visto que são capazes de detectar vários produtos provenientes das diferentes condições de estresse físico e químico;
- As análises dos comprimidos revestidos das estatinas em estudo (fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina) disponíveis comercialmente mostraram que os métodos possuem recuperação/exatidão de aproximadamente 100.0%. Os métodos propostos empregando cada técnica analítica são estatisticamente equivalentes quanto à precisão, com um nível de confiança maior de 95.0%;
- A técnica cromatográfica é considerada clássica e a técnica eletroforética é relativamente nova e ainda não utilizada em análises de rotina no setor farmacêutico, contudo, as técnicas desenvolvidas se mostraram eficientes para análise de fármacos estruturalmente complexos, como as estatinas. Por diferenças instrumentais, a CLAE mostrou ser uma técnica com maior sensibilidade do que as CZE e MEKC. Este fato era esperado, e foi demonstrado, pelos resultados obtidos na determinação dos valores de LD e LQ. Por outro lado, o método eletroforético consome menor quantidade de reagentes, solventes e soluções, tornando a técnica ecologicamente correta e economicamente viável a longo prazo;
- Os testes realizados durante a validação foram: especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, exatidão, precisão (repetibilidade do sistema, repetibilidade do método e precisão intermediária), intervalo e robustez (estabilidade das soluções e planejamento fatorial para variações na fase móvel e no sistema). Os resultados demonstraram que os métodos são confiáveis e reprodutíveis para quantificação das estatinas (fluvastatina, atorvastatina e rosuvastatina) em produtos farmacêuticos, sob a forma de comprimidos;
- Os métodos podem ser utilizados em qualquer laboratório de controle de qualidade para análise de rotina de fluvastatina sódica, atorvastatina cálcica e rosuvastatina cálcica em comprimidos comercializados no Brasil.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBRAHAM, D.J., ed. **Burger's chemistry and drug discovery**. 6.ed. Hoboken: Wiley-Interscience, 2003. v.3, p.339.

AGUILAR-SALINAS, C.A.; BARRET, H.; SCHONFELD, G. Metabolic modes of action of the statins in the hypolipoproteinemias. **Atherosclerosis**, v.141, p.203-207, 1998.

ALBERTS, A.W.; MACDONALD, J.S.; TILL, A.E.; TOBERT, J.A. Lovastatin. **Cardiovascular Drug Reviews**, v.7, p.89-109, 1989.

AL-RAWITHI, S.; HUSSEIN, R.F.; ALZAHRANI, A. Sensitive assay for the determination of fluvastatin in plasma utilizing high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 25, p.88-92, 2003.

ALTRIA, K.D., ed. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications**. Totowa: Humana Press, 1996. 349p. (Methods in Molecular Biology, v.52).

ANSEL, H., PRINCE, S. **Manual de cálculos farmacéuticos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 300p.

ARAUJO P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography, B: Analytical in the Biomedical and Life Sciences**, v.877, n.23, p.2224-2234, 2009.

ANVISA, Resolução – RE nº 899, **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**, de 29 de maio de 2003.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B.; MIRZAEI, S.; KIANI, A. Determination of atorvastatin in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 826, p. 41-45, 2005.

BAUER, S.; MWINYI, J.; STOECKLE, A.; GERLOFF, T.; ROOTS, I. Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.818, n.2, p.257-262, 2005.

BELLOSTA, S.; PAOLETTI, R.; CORSINI, A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Circulation**, v.109, n.23, suppl.1, p.III50-III577, 2004.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 6.ed. New York: W.H. Freeman, 2007. 1021p.

BERZEAS, J.J.; RODRIGUÉZ, J.; CASTAÑEDA, G. Simultaneous determination of ethinylestradiol and levonorgesterol in oral contraceptives by derivative spectrophotometry. **Analyst**, v.122, n.1, p.41-44, 1997.

BILHEIMER, D.W.; GRUNDY, S.M.; BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.80, n.13, p.4124-4128, 1983.

BOLTON, S. **Pharmaceutical statistics**: practical and clinical applications. 2.ed. New York: Dekker, 1990. 117p. (Drugs and the pharmaceutical sciences, v.44).

BOREK-DOHALSKY, V.; HUCLOVA, J.; BARRETT, B.; NEMEC, B.; ULC, I.; JELINEK, I. Validated HPLC-MS-MS method for simultaneous determination of atorvastatin and 2-hydroxyatorvastatin in human plasma-pharmacokinetic study. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 275-285, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. LeisLegis. **Resolução RDC n. 17, de 16 de abril de 2010**. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução. Disponível em: <http://WWW.anvisa.gov.br/legis> Acesso em: 01 jul 2010.

BRITTAIN, H.G. Validação de métodos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p.4-9, 1998.

BROWN, M.S.; FAUST, J.R.; GOLDSTEIN, J.L. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v.253, p.1121-1128, 1978.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.-L. Practical method validation: sufficient for an analysis method. **Mikrochimica Acta**, v.128, p. 93-106, 1998.

BRUNTON, L.L.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A., LAZO, J.S., eds. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana, 2006. p.837-894.

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

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p. (Apontamentos).

CAULCUTT, R.; BODDY, R. **Statistics for analytical chemists**. London, New York: Chapman & Hall, 1983. p.126-144.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia à líquido de alto desempenho HPLC**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000. p.28-41, p.126-153.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETA, R. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, p. 413-428, 1999.

DEEPAK, S.J.; SUBBIAH, G.; SANYAL, M.; JAIN, V.K.; SHRIVASTAV, P. A rapid and specific approach for direct measurement of pravastatin concentration in plasma by LC-MS/MS employing solid-phase extraction. **Biomedical Chromatography**, v.21, p.67-78, 2007.

DENG, M.; LIU, H.; XUE, H.; LIU, J. Simultaneous determination of pravastatin and its main metabolite, 3'-isopravastatin in plasma by HPLC-MS. **Yaowu Fenxi Zazhi**, v.25, p.160-164, 2005.

DOGRUKOL-AK, D.; KIRCALI, K.; TUNCEL, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Validated analysis of fluvastatin in a pharmaceutical capsule formulation and serum by capillary electrophoresis. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 15, p. 389-392, 2001.

DUMOUSSEAUX, C.; MURAMATSU, S.; TAKASAKI, W.; TAKAHAGI H. Highly sensitive and specific determination of pravastatin sodium in plasma by high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection after immobilized antibody extraction. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.83, p.1630-1636, 1994.

ENDO, A. The origin of the statins. In: MATSUZAWA, Y., ed. **Atherosclerosis XIII: proceedings of the XIII International Symposium on Atherosclerosis**, Kyoto, Japan, 2003. Amsterdam, Oxford: Elsevier, 2004. p.3-8. (International Congress Series, v.1262).

EWING, G.W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blücher, EDUSP, 1972. v.1, p.48-64.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, pt.1 e pt.2, 1996.

FARNIER, M.; DAVIGNON, J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. **American Journal of Cardiology**, p.82, n.4B, p.3J-10J, 1998.

FENG, Y.; LIU, Z.; WU, X.; JIANG, W.; ZOU, D. Determination of atorvastatin calcium and its related substances by CZE. **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v. 38, p. 456-458, 2003.

FUNKE, P.T.; IVASHKIV, E.; ARNOLD, M.E.; COHEN, A.I. Determination of pravastatin sodium and its major metabolites in human serum/plasma by capillary gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. **Biomedical & Environmental Mass Spectrometry**, v.18, p.904-909, 1989.

GAO, J.; ZHONG, D.; DUAN, X.; CHEN, X. Liquid chromatography/negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of rosuvastatin in human plasma: application to a pharmacokinetic study. **Journal of chromatography, B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 856, p. 35-40, 2007.

GINSBERG, H.N. Effects of statins on triglyceride metabolism. **American Journal of Cardiology**, v.81, p.32B-35B, 1998.

GONÇALVES, M.L.S.S. **Métodos instrumentais para análise de soluções: análise quantitativa**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990. p.13-82, 609-640.

HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos, **Revista Portuguesa de Farmácia**, v.41, n.1, p.7-13, 1991.

HERMANN, M.; CHRISTENSEN, H.; REUBSAET, J.L.E. Determination of atorvastatin and metabolites in human plasma with solid-phase extraction followed by LC-tandem MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1242-1249, 2005.

HSING, B.; ZHU, Y.; WANG, Z. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. **Journal of Biological Chemistry**, v.274, p.37161-37168, 1999.

JARDIM, I.C.S.F. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S., orgs. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. p.273-398.

KAJINAMI, K.; TAKEKOSHI N.; SAITO, Y. Pitavastatin: efficacy and safety profiles of a novel synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. **Cardiovascular Drug Review**, v. 21, p. 199-215, 2003.

KARPINSKA, J. Derivative spectrophotometry: recent applications and directions of developments. **Talanta**, v.64, n.4, p.801-822, 2004.

KAWABATA, K.; SAMATA, N.; URASAKI, Y. Quantitative determination of pravastatin and R-416, its main metabolite in human plasma, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.816, n.1/2, p.73-79, 2005.

KAWABATA, K.; MATSUSHIMA, N.; SASAHARA, K. An automated method for the simultaneous determination of pravastatin and its main metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v.12, n.5, p.271-275, 1998.

KHAN, M.R.; JAIN, D. Simultaneous spectrophotometric determination of atorvastatin calcium and amlodipine besylate in tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 546-548, 2006.

KIRCALI, K.; TUNCEL, M.; ABOUL-ENEIN, Y.H. Determination of pravastatin in tablets by capillary electrophoresis. **Farmaco**, v.59, p.241-244, 2004.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.V.D.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, p.48-66, fev. 2005.

KOCIJAN, A.; GRAHEK, R.; BASTARDA, A.; ZUPANCIC-KRALJ, L. Fast analysis of pravastatin in production media. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.822, n.1/2, p.311-315, 2005.

KUIHUA, C.; BINGYAN, T.; ZHIYING, F.; ZHANGWANG, L.; MIN, H.; XIAGLAN, Z. Quantitative method of determination of pravastatin in plasma by gas chromatography/mass spectrometry. **Sepu**, v.14, p.121-123, 1996.

KUMAR, T.R.; SHITUT, N.R.; KUMAR, P.K.; VINU, M.C.A.; KUMAR, V.V.P.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N.R. Determination of rosuvastatin in rat plasma by HPLC: validation and its application to pharmacokinetic studies. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 20, p. 881-887, 2006.

LAN, K.; JIANG, X.; LI, Y.; WANG, L.; ZHOU, J.; JIANG, Q.; YE, L. Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by ion pair liquid-liquid extraction using liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 540-546, 2007.

LEIS, H.J.; WINDISCHHOFFER, W. Quantitative determination of fluvastatin in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry using [18O₂]-fluvastatin as an internal standard. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 128-132, 2005.

LESCOL: fluvastatina. Responsável técnico Marco A. J. Siqueira. São Paulo: Novartis Pharma A.G., 2006. [Bula de Medicamento].

LEVILLAIN, P.; FOMPEYDIE, D. Spectrophotométrie dérivé: intérêt, limites et applications. **Analysis**, v.14, n.1, p.1-20, 1986.

LÍPTOR: atorvastatina. Responsável técnico José Francisco Bomfim. São Paulo: Laboratórios Pfizer Ltda, 2006. [Bula de Medicamento].

MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 18. ed. Withouse Station: Merck, 2010.

MATSUSHIMA, N.; KAWBATA, K.; NITANI, T.; SASAHARA, K. Automated and simultaneous determination of pravastatin and its main metabolite in human plasma by LC/APCI-MS and application to pharmacokinetic studies in volunteers and patients. **Nippon Iyo Masu Supekutoru Gakkai Koenshu**, v.18, p.169-172, 1993.

MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Withehouse Station: Merck, 2006. p.1325.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N.; IZQUIERDO, H.R.; MATE, J.C. **Estatística para química analítica**. 2.ed. Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana, 1993. p.20-63.

MOHAMMADI, A.; REZANOUR, N.; ANSARI DOGAHEH, M.; GHORBANI BIDKORBEH, F.; HASHEM, M.; WALKER, R. B. A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 846, p. 215-221, 2007.

MORHY, L. Cromatografia (I): evolução histórica: a fase antiga. **Ciência e Cultura**, v.28, n.10, p.1185-1189, 1976.

MULVANA, D.; JEMAL, M.B. Quantitative determination of pravastatin and its biotransformation products in human serum by turbo ion spray LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23 p.851-866, 2000.

MUKHTAR, R.Y.A.; REID, J.; RECKLESS, J.P.D. Pitavastatin. **International Journal of Clinical Practice**, v. 59, p. 239-252, 2005.

NIGOVIÉ, B. Eletrochemical properties and square-wave voltametric determination of pravastatin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.384, p.431-437, 2006.

ONAL, A.; SARGIRLI, O. Development of a selective LC method for the determination of pravastatin sodium. **Chromatographia**, v.64, p.157-162, 2006.

OTTER, K.; MIGNAT, C. Determination of pravastatin in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications**, v.708, n.1/2, p.235-241, 1998.

PERKAMPUS, H.H. **UV-VIS spectroscopy and its applications**. Berlin, London: Springer-Verlag, 1992. 244p. (Springer laboratory).

PRABHAKAR, B.K.; MANJUNATH, S.; RAJU, S.A. Spectrophotometric determination of atorvastatin in pharmaceutical formulations. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 3, p. 37-40, 2005.

PRAVACOL: pravastatina. Responsável técnico Osvaldo Orellana Sanchez. São Paulo: Bristol-Myers Squibb Farmacêutica, 2006. [Bula de Medicamento].

PURATCHIKODY, A.; VALARMATHY, R.; VARGHESE, SHIJU, P.; JOHN, J.; RUKUMANI, K. Reverse phase - high performance liquid chromatographic determination of atorvastatin calcium in solid dosage forms. **Pharma Review**, v. 1, p. 79-80. 2003.

FAVIO REIS, col.; Portal Farmacêutico, WWW.pfarma.com.br; 19 julho, 2009

RAJESWARI, K.R.; SANKAR, G.G.; RAO, A.L.; SESHAGIRIRAO, J.V.L.N. RP-HPLC method for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in tablet dosage form. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 275-277, 2006.

RAJKONDAWAR, V.V. Simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine by reverse phase high performance liquid chromatography. **Asian Journal of Chemistry**, v. 18, p. 3227-3229, 2006.

RAO, Y.S.; HARITHA, G.; TARA, P.N.; CHOWDARY, K.P.R.; RAO, J.V.L.N.S. Estimation of pravastatin sodium by spectrophotometric method. **International Journal of Chemistry**, v.1, p.368-370, 2003.

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

ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v.27, p.807-812, 2004.

RODENAS, V.; GARCÍA, M.S.; SÁNCHEZ-PEDREÑO, C.; ALBERO, M.I. Simultaneous determination of propacetamol and acetamol by derivative spectrophotometry. **Talanta**, v.52, n.3, p.517-523, 2000.

SANTORO, M.I.R.M. **Introdução ao controle de qualidade de medicamentos**. São Paulo: Atheneu, USP, 1988. 119p.

SHAH, D.A.; BHATT, K.K.; SHANKAR, M.B.; MEHTA, R.S.; GANDHI, T.R.; BALDANIA, S.L. RP-HPLC determination of atorvastatin calcium and amlodipine besylate combination in tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 796-799, 2006.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography, A**, v.987, n.1/2, p.57-66, 2003.

SCHNECK, D.W.; BIRMINGHAM, B.K.; ZAIKOWSKI, J.A. The effect of gemfibrozil on the pharmacokinetics of rosuvastatin. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.75, p.455-463, 2004.

SHEN, H.; LI, Z.; SHI, X.; ZHONG, M. Determination of atorvastatin calcium self-microemulsion by HPLC. **Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi**, v. 36, p. 223-225, 2005.

SHEN, H.; LI, Z.; ZHONG, M. HPLC assay and pharmacokinetic study of atorvastatin in beagle dogs after oral administration of atorvastatin self-microemulsifying drug delivery system. **Die Pharmazie**, v. 61, p. 18-20, 2006.

SIEKMEIER, R.; GROSS, W.; MARZ, W. Determination of pravastatin by high performance liquid chromatography. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.38, p.419-425, 2000.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. p.67-101.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Boockman, 2006. p.597-619, 640-661.

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

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

THOMAS, M.J.K. **Ultraviolet and visible spectroscopy**. 2.ed. Chichester: Wiley, 1996. 229p. (Analytical chemistry by open learning).

THOMPSON, G.R.; NAUUMOVA, R.P.; WATTS, G.F. Role of cholesterol in regulation apolipoprotein D secretion by the liver. **Journal of Lipid Research**, v.37, p.439-447, 1996.

TRIVEDI, R.K.; KALLEM, R.R.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N.R. Simultaneous determination of rosuvastatin and fenofibric acid in human plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: Assay development, validation and application to a clinical study. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 39, p. 661-669, 2005.

UNITED States Pharmacopeia. 31.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008. p. 241-242, 2223-2225.

UYAR, B.; CELEBIER, M.; ALTINOZ, S. Spectrophotometric determination of rosuvastatin calcium in tablets. **Pharmazie**, v. 62, p. 411-413, 2007.

VITTAL, S.; SHITUT, N.R.; KUMAR, T.R.; VINU, MENON, C.A.; MULLANGI, R.; SRINIVAS, N.R. Simultaneous quantitation of rosuvastatin and gemfibrozil in human plasma by high-performance liquid chromatography and its application to a pharmacokinetic study. **Biomedical chromatography : BMC**, v. 20, p. 1252-1259, 2006.

XU, D.; RUAN, Z.; ZHOU, Q.; YUAN, H.; JIANG, B. Quantitative determination of rosuvastatin in human plasma by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2369-2375, 2006.

WEN, A.; BI, L.; LUO, X.; JIA, Y.; CHEN, X.; ZHANG, Y. Determination of rosuvastatin in human plasma by LC/MS/MS and study on pharmacokinetics. **Jiefangjun Yaoxue Xuebao**, v. 23, p. 110-113, 2007.

WERMUTH, C.G. Primary Exploration of Structure-Activity Relationships. In: WERMUTH, C.G., ed. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Academic Press: San Diego, 1996, p. 243-295.

WESTON, A.; BROWN, P.R., eds. **HPLC and CG: principles and practice**. San Diego: Academic Press, 1997. 280p.

WHIGAN, D.B.; IVASHKIV, E.; COHEN, A.I. Determination of pravastatin sodium and its isomeric metabolite in human urine by HPLC with UV detection. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.7, p.907-912, 1989.

WITZTUM, J.L. Fármacos usados no tratamento das hiperliproteínas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana, 1997. p.643.

YAMAMOTO, A.; MATSUZAWA, Y.; YOKOYAMA, S.; FUNAHASHI, T.; YAMAMURA, T.; KISHINO, B.I. Effects of probucol on xanthomata regression in familialhypercholesterolemia. **American Journal of Cardiology**, v.57, p.29H-35H, 1986.

ZARGHI, A.; SHAFATI, A.; FOROUTAN, S.M.; KHODDAM, A. A simple and rapid HPLC method for the determination of atorvastatin in human plasma with UV detection and its application to pharmacokinetic studies. **Arzneimittel Forschung**, v. 55, p. 451-454, 2005.