

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

**Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Fármacos Utilizados
no Tratamento da Hipercolesterolemia em Plasma**

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Adriana De Vicente França Marcondes

Dissertação para Obtenção do Título de **Mestre**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Segundo Aurora Prado

São Paulo

2016

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

**Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Fármacos Utilizados
no Tratamento da Hipercolesterolemia
em Plasma**

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Adriana De Vicente França Marcondes

Dissertação para Obtenção do Título de **Mestre**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Segundo Aurora Prado

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

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

Marcondes, Adriana de Vicente França
M321d Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de
fármacos em plasma utilizados no tratamento da hipercolesterolemia
/ Adriana de Vicente França Marcondes. -- São Paulo, 2016.
119 p.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Segundo Prado, Maria Aurora

1. Cromatografia em líquido de alta eficiência : Análise
química : Farmacologia 2. Eletroforese (método de separação)
I. T. II. Segundo Prado, Maria Aurora, orientador.

615.19015

CDD

Adriana De Vicente França Marcondes

**Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Fármacos Utilizados
no Tratamento da Hipercolesterolemia
em Plasma**

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de **MESTRE**

Profa. Dra. Maria Aurora Segundo Prado
Orientadora/Presidente

Profa. Dr.

1° examinador

Profa. Dr.

2° examinador

São Paulo, 30 de novembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao autor da vida, Deus. Obrigada Senhor por essa oportunidade concedida e por mais uma vitória em minha vida.

Agradeço ao apoio do meu filho, Luiz Fernando França Piccinelli Marcondes, o qual participou ativamente de cada etapa do curso de pós-graduação, sofreu, sorriu e festejou comigo e muitas vezes, enxugou minhas lágrimas. Te amo Luiz Fernando pra sempre. Sou sua mãe, mas às vezes pareço mais sua filha!

Aos meus pais Euclides e Luiza, meus irmãos Cibele e Ricardo e à minha cunhada Paula.

Obrigada minha querida família por terem torcido por mim.

Aos seguranças da Farmácia pela amizade e por tudo o que fizeram por mim, me ajudaram muito: João, Januário, Paulo, Fábio, seu Valdial, seu Gilberto, Duacir e seu Eugênio.

Agradeço a equipe de Biologia Molecular (Profa. Rosário Hirata e Cristina) por terem me apoiado e terem tido muita paciência para comigo.

Aos queridos funcionários: David Lima, Irineu, Miriam Wrigg, Sueli Duarte e Eremita..

Aos queridos amigos que fiz ao longo dessa jornada, que me auxiliaram e me ampararam em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis: Juliana Rossato, Marcela Yataco Lazaro, Aline Silva, Andrea Sofo, Tácio Lima, Sheila Fernandes. Que a partir dessa etapa, nossa amizade cresça e fortaleça cada vez mais.

Aos queridos docentes que tanto me auxiliaram: Dr. André Rolim Baby, Dr. Humberto Gomes Ferraz, Dra. Eunice Kazue Kano, Dr. Felipe Lourenço e Dr. Ernani Pinto.

E, mais uma vez agradeço à Deus por ter me permitido encontrar pessoas que se tornaram muito especiais em minha vida. Nos momentos que precisei, estenderam suas mãos para me ajudar e ofereceram seus ombros para chorar, obrigada: Juliana Rossato, Claudia Vilela e Giovanni Scala.

À todos que participaram dessa etapa que foi muito importante pra mim e quero compartilhar com todos àqueles que participaram dela tanto direta quanto indiretamente.

Finalmente, com muito carinho, respeito e muita gratidão por ter me conduzido ao amadurecimento tanto pessoal quanto profissional, por ter me dado essa grande oportunidade e pela confiança a mim depositada, obrigada profa. Dra. Maria Segundo Aurora Prado.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE EQUAÇÕES	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo geral	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Metabolismo da Lipoproteína Plasmática	6
3.2. Ezetimiba (1- (4-Fluorofenil) -3(R) -[3- (4-fluorofenil) -3(S) hidroxipropil] -4-(S) - (4-hidroxifenil) -2-azetidiona)	9
3.2.1. Mecanismo de Ação e Metabolismo Ezetimiba	10
3.2.2. Farmacocinética	12
3.3. Estatinas	15
3.3.1. Sinvastatina.....	16
3.3.2. Propriedades farmacocinéticas da Sinvastatina	16
3.4. Tipos Extração	19
3.4.1. Extração em Fase Sólida	19
3.4.2. Extração em Fase Líquida-Líquida (LLE) com efeito “ Salting-Out ”	19
3.5. Métodos Analíticos para determinação e quantificação de fármacos no tratamento da hipercolesterolemia	20
3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	20
3.5.2. CLAE acoplada ao Detector de Aerossol Carregado.....	21
3.5.3. CLAE acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE- MS)	24
3.6. Métodos Cromatográficos para Ezetimibe e Sinvastatina e seus metabólitos em matrizes biológicas	26
3.7. Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos.....	26
3.7.1. Seletividade /Especificidade.....	27
3.7.2. Efeito Residual.....	27
3.7.3. Efeito Matriz.....	28
3.7.4. Curva Analítica (Linearidade).....	28
3.7.5. Precisão (Repetibilidade) e Exatidão (Recuperação)	29
4. Materiais e Métodos	31
4.1. Reagentes e solventes	31
4.2. Substâncias empregadas como padrão	31
4.3. Amostras de Plasma	31
4.4. Equipamentos	32
4.5. Métodos	33
4.5.1. Caracterização físico-química dos padrões secundários.....	33
4.5.2. Desenvolvimento do método de cromatografia líquida de alta eficiência, para a quantificação do ezetimiba e sinvastatina.....	34
4.5.2.1. CLAE acoplado ao Espectrômetro de Massas (QTOF)	34
4.5.2.2. CLAE acoplado ao Detector de Aerossol Carregado (CAD)	35
4.5.3. Preparo das soluções padrão para a construção da curva analítica, exatidão e amostras de controle de qualidade	35
4.5.3.1. Solução Padrão Ezetimiba e Sinvastatina (Curva Analítica).....	37
4.5.3.2. Solução Padrão Ezetimiba Glucoronídeo e Sinvastatina Hidroxi-Ácida (Sal de Amônio).....	37
4.5.3.3. Solução Padrão Ezetimiba, Ezetimiba Glucoronídeo, Sinvastatina, Sinvastatina Hidroxi-Ácida - Exatidão.....	39
4.5.4. Preparo das amostras	40

5. Resultados e Discussão.....	43
5.1. Caracterização Físico Química dos Padrões.....	43
5.1.1. Ponto de Fusão.....	43
5.1.2. Análise Térmica	43
5.1.3. Espectroscopia de Infravermelho	46
5.1.4. Ressonância Magnética Nuclear.....	49
5.2. Desenvolvimento de Método por CLAE para a identificação e quantificação da ezetimiba e sinvastatina	56
5.2.1. Método CLAE acoplado ao CAD	56
5.2.2. Método CLAE acoplado ao QTOF.....	62
5.3. Validação de Método Cromatográfico para determinação simultânea de Ezetimiba e Sinvastatina	65
5.3.1. Efeito Residual.....	65
5.3.2. Efeito Matriz.....	65
5.3.3. Especificidade/Seletividade.....	66
5.3.4. Curva Analítica (Linearidade).....	71
5.3.5. Precisão e Exatidão	73
5.3.6. Aplicação do Método.....	78
5.3.7. Sensibilidade.....	79
6. Conclusão.....	80
7. Referências Bibliográficas.....	81

ANEXOS

ANEXO I - INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA JULGADORA DE MESTRADO/DOCTORADO

ANEXO II - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA FCF/USP

ANEXO III - FICHA DO ALUNO

ANEXO IV - *Curriculum lattes*

ANEXO V - *Determinação das Condições Ideais de Análise em HPLC DAD e CAD*

ANEXO VI - *Determinação das Condições Ideais de Análise em HPLC acoplado ao espectro de massas (ESI QTOF)*

ANEXO VII - *Comparativo Métodos Cromatográficos utilizando espectrometria de massas para quantificação de Ezetimiba e Sinvastatina e seus metabólitos em matriz biológica.*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Abs	Absorbância
ACAT	Acil-CoA Colesterol Acil Transferase
ACS	Analytical Chemical Standard
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apo	Apolipoproteínas
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATR	Attenuated Total Reflectance
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CAD	Charged Aerosol Detector
CE	Ésteres de Colesterol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por detector aerossol
CLAE-CAD	carregado Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por espectrômetro de
CLAE-MS	massas
cm	Centímetros
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQD	Diluição de Controle de Qualidade
CQM	Controle de Qualidade Médio
CMáx	Concentração Máxima
CV	Coefficiente de variação
CETP	Inibidores da Proteína de Transferência de Éster de Colesterol
DAC	Doença Arterial Coronariana
DA	Doença Arterial
DAD	Diode Arranje Detector
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DCV	Doenças Cardiovasculares

DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DTA	Derivada de Análise Térmica
DTG	Derivada de Análise Termogravimétrica
ESI	Eletrospray Ionization
EZE	Ezetimiba
EZE-G	Ezetimiba Glucoronídeo
EPR	Erro Padrão Relativo
FDA	Food and Drug Administration
FL	Fosfolipídeos
g	Gramas
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril Coenzima A
ICH	International Conference Harmonization
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermediária
IR	Índice de Refração
LDL	Lipídeos de Baixa Densidade
LDL-C	Colesterol Composto por Lipídeos de Baixa Densidade
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
LLE	Liquid Liquid Extraction
LSQ	Limite Superior de Quantificação
mg	Miligramas
min	Minutos
mM	Mili Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MTP	Inibidores da proteína de transferência microssomal
nm	Nanômetro
NPC1L1	Niemann pick C1 like 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDA	Photodiode Detector Array
PI	Padrão Interno
PCSK9	Proteína convertase subtilisina kexin tipo 9
QTOF	Quadrupolo acoplado ao Tempo de Vôo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SALLE	Salting Out Assisted Liquid Liquid Extraction
SIN	Sinvastatina
SPE	Solid Phase Extraction

SSA	Sinvastatina Hidroxi-Ácida
TGA	Análise Termogravimétrica
TG	Triglicérides
T _{máx}	Tempo Máximo
tr	Tempo de Retenção
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization
α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características Físico Químicas e Farmacocinéticas da Ezetimiba	13
Tabela 2. Características Físico Químicas e Farmacocinéticas da Ezetimiba Glucoronídeo	14
Tabela 3. Relação entre Estatinas e Metabólitos	15
Tabela 4. Características Físico Químicas Sinvastatina.....	17
Tabela 5. Características Físico Químicas Sinvastatina Hidroxi-Ácida	17
Tabela 6. Concentrações das soluções padrão de Ezetimiba e Sinvastatina	37
Tabela 7. Concentrações das soluções utilizadas de cada um dos metabólitos para as análises de Ezetimiba Glucoronídeo e Sinvastatina Hidroxi Ácida	38
Tabela 8. Concentrações das soluções padrão utilizadas no teste de exatidão	40
Tabela 9. Picos Característicos encontradas no Espectro IV do Ezetimiba.....	47
Tabela 10. Picos Característicos encontradas no Espectro IV da Sinvastatina.....	48
Tabela 11. Resultados da ressonância magnética nuclear ¹³ C de ezetimiba	50
Tabela 12. Resultados da ressonância magnética nuclear ¹ H de ezetimiba	51
Tabela 13. Resultados da ressonância magnética nuclear ¹³ C de sinvastatina.....	51
Tabela 14. Resultados da ressonância magnética nuclear ¹ H de sinvastatina	52
Tabela 15. Parâmetros relacionados à regressão linear das curvas analíticas obtidas para a quantificação de Ezetimiba e Sinvastatina por CLAE-MS.....	72
Tabela 16. Parâmetros relacionados à regressão linear das curvas analíticas obtidas para a quantificação de Ezetimiba Glucoronídeo e Sinvastatina Hidroxi-Ácida por CLAE-MS	73
Tabela 17. Plasma Contaminado de Sinvastatina Precisão Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9).....	75
Tabela 18. Plasma Contaminado de Ezetimiba Precisão Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9).....	76
Tabela 19. Plasma Contaminado de Ezetimiba Glucoronídeo Precisão Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9).....	75
Tabela 20. Plasma Contaminado de Sinvastatina Hidroxi-Ácida Precisão Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9)	75
Tabela 21. Aplicação do Método Amostras de Plasma conforme estudo clínico	78

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação N° 1 – Relação entre Resposta de Área e Massa do Analito

Equação N° 2 – Relação entre diâmetro da partícula e diâmetro da gota e concentração do analito

Equação N° 3 – Cálculo do Limite de Detecção

Equação N° 4 – Cálculo do Limite de Quantificação

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Metabolismo de lipídios e lipoproteínas (Adaptado de PHAN; DAYSPRING; TOTH, 2012)
- Figura 2 – Internalização do Colesterol vs efeito do ezetimiba (Adaptado de: PHAN; DAYSPRING; TOTH, 2012)
- Figura 3 – Esquema de Biotransformação do ezetimiba (Adaptado de: SUCHY, et al, 2011)
- Figura 4 – Ilustração Detector Ultra Corona (PLANTE, BAILEY, AWORTH, 2009)
- Figura 5 – Fluxograma de Extração da Amostra
- Figura 6 – Gráfico de Calorimetria Exploratória Diferencial do Branco.
- Figura 7 - Termograma do Ezetimiba.
- Figura 8 - Termograma da Sinvastatina.
- Figura 9 – Espectro de Absorção na região do Infravermelho do Padrão de Ezetimiba (Teste feito no laboratório).
- Figura 10 – Espectro de Absorção na região do Infravermelho do Padrão de Sinvastatina (Teste feito no laboratório).
- Figura 11 – Espectro de RMN-13C de ezetimiba (teste feito no laboratório).
- Figura 12 – Espectro de RMN-13C de sinvastatina (teste feito no laboratório).
- Figura 13 – Espectro de RMN-1H de ezetimiba (teste feito no laboratório).
- Figura 14 – Espectro de RMN-1H de sinvastatina (teste feito no laboratório).
- Figura 14 – Solução padrão de ezetimibe. Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: ACN (30:70), fluxo=0,6 mL/min, tempo de corrida 8 minutos, temperatura coluna=30°C. CAD ganho 100 pA e nebulizador temperatura de 35°C.
- Figura 15 - Cromatograma da mistura das soluções dos padrões ezetimiba e sinvastatina 100,0 µg mL⁻¹ em detector PDA.
- Figura 16 - Cromatograma da solução do padrão de ezetimiba em matriz de plasma (à esquerda) e sinvastatina (à direita) na concentração de 50,0 µg mL⁻¹. Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção 1: 1,5(LLE) em detector PDA.
- Figura 17 - Cromatograma da solução do padrão de ezetimiba (à esquerda) e sinvastatina (à direita) na concentração de 50,0 ng mL⁻¹. Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção 1: 1,5(LLE) em detector CAD.
- Figura 18 - Cromatograma da solução do padrão de ezetimiba (à esquerda) e sinvastatina (à direita) na concentração de 1,0 µg mL⁻¹ em metanol: água (50:50 v/v) Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE) em detector CAD. P. 59
- Figura 19 - Cromatograma da solução do diluente extratora (acetonitrila+tampão acetato de amônio) (à esquerda) e acetonitrila (à direita) em detector CAD
- Figura 20 - Cromatogramas da solução padrão de 4-metoxi-cumarina (padrão interno) (à esquerda) e solução padrão de ezetimiba+padrão interno em plasma humano (à direita). Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE) em detector CAD.
- Figura 21 - Cromatograma da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em plasma humano (à direita). Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE) em detector CAD.
- Figura 22 - Cromatogramas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em plasma humano adicionados antes da extração e limpeza do plasma (à esquerda) e adicionados após a extração e limpeza do plasma (direita). Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE) em detector CAD.
- Figura 23 - Cromatograma da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em plasma humano adicionados antes da extração e limpeza do plasma. Método Extração:

Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE) em detector CAD.

Figura 24 – Espectro de massas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em metanol: água (50:50 v/v) modo ESI Positivo.

Figura 25 – Verificação da Distribuição Isotópica da Ezetimiba (à esquerda) e Verificação de formação de adutos e percas de moléculas (à direita). Espectro de massas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina concentração 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em fase móvel modo ESI Positivo.

Figura 26 – Verificação da Distribuição Isotópica da Sinvastatina. Espectro de massas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina concentração 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em fase móvel modo ESI Positivo.

Figura 27 – Espectro de massas da solução padrão da ezetimiba+sinvastatina+padrão interno concentração 100,0 ng/mL^{-1} em fase móvel modo ESI Positivo.

Figura 28 – Espectro de massas da amostra de plasma branco contaminada com uma solução padrão da ezetimiba+sinvastatina+padrão interno concentração 100,0 ng/mL^{-1} em fase móvel modo ESI Positivo.

Figura 29 – Esquema proposto de fragmentação da Sinvastatina m/z 419,27961 > 199,14740 Modo ESI +.

Figura 30 – Esquema proposto de fragmentação da Ezetimiba m/z 407,13722 > 392,14662 Modo ESI +.

Figura 31 – Esquema proposto de fragmentação da 4-methoxy-coumarin m/z 177,06460 > 133,06407 Modo ESI +.

Figura 32 – Espectro de massas da amostra de plasma branco contaminada com uma solução padrão da sinvastatina hidróxi-ácida na concentração 100,0 ng/mL^{-1} em fase móvel Modo ESI – (à esquerda) e Modo ESI + (à direita).

Figura 33 – Esquema proposto de fragmentação Sal de Amônio da Sinvastatina Ácida m/z 339,18648 > 239,04971 Modo ESI -.

Figura 34 – Espectro de massas da amostra de plasma branco contaminada com uma solução padrão da ezetimiba glucoronídeo na concentração 100,0 ng/mL^{-1} em fase móvel Modo ESI – (à esquerda) e Modo ESI + (à direita).

Figura 35 – Estrutura Molecular da Ezetimiba Hidróxi Glucoronídeo m/z 521,08854 > 290,25901 Modo ESI +.

Figura 36 – Espectro de massas da amostra de plasma de paciente em fase móvel Modo ESI – (à esquerda) e Modo ESI + (à direita).

Figura 37 – Curvas analíticas obtidas para (A) Ezetimiba e (B) Sinvastatina.

MARCONDES, A.D.F.M. **Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Fármacos utilizados no tratamento da hipercolesterolemia em plasma.** São Paulo, 2016. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Um dos principais fatores de risco de doenças cardiovasculares, a hipercolesterolemia afeta um quinto da população brasileira, e é atualmente a principal causa de morte no Brasil e segunda maior de internações hospitalares, segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia. São utilizados agentes hipolipemiantes nos pacientes com propensão a doenças cardiovasculares associadas. A sinvastatina pertencente a classe dos inibidores da HMG-CoA redutase (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) e o ezetimiba pertencente a classe dos inibidores da absorção do colesterol são fármacos hipolipemiantes.

Este trabalho possui como objetivo o desenvolvimento e a validação de métodos bioanalíticos através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de espectrometria de massas para a determinação simultânea quantitativa de ezetimiba e sinvastatina e seus metabólitos em plasma humano.

O presente trabalho foi dividido nas seguintes etapas: (i) obtenção das amostras de pacientes provenientes do HU onde foi administrado a associação ezetimiba+sinvastatina, (ii) obtenção dos padrões de ezetimiba, sinvastatina e padrão interno, (iii) caracterização dos fármacos utilizando técnicas de análises térmicas, ressonância magnética nuclear e espectrometria de infra-vermelho, (iv) obtenção dos padrões dos metabólitos de ezetimiba (ezetimiba glucoronideo) e sinvastatina (sinvastatina hydroxy acid ammonium salt), (v) seleção do método analítico, fase móvel e tipo de extração nas amostras de plasma compatível com o detector de espectrometria de massas e (vi) teste no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao detector de espectrômetro de massas.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna Poroshell 50mm x 2,1mm, com partícula de 1,8 μm , eluição isocrática usando ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (50:50, v/v), vazão 0,7 mL/min e volume de injeção de 10 μL . A temperatura da coluna foi de 30°C e a detecção foi realizada em equipamento do tipo QTOF, usando fonte ESI no modo positivo para o ezetimiba e sinvastatina e modo negativo para o ezetimiba glucoronideo e sinvastatttina hidroxí-ácida. A monitoração dos íons produto foram: ezetimiba (m/z 409,1489>392,3123), sinvastatina (m/z 418,2719>419,2892), ezetimiba glucoronídeo (m/z 585,1810>521,0673) e sinvastatina hidroxí-ácida (m/z 453,3090>239,0501). Os métodos analíticos foram validados de acordo com os requerimentos vigentes da ANVISA e Farmacopéia Americana. Portanto, os métodos propostos demonstraram ser lineares, precisos, exatos e adequados para a quantificação simultânea de ezetimbe e sinvastatina e seus metabólitos (ezetimiba glucoronídeo e sinvastatina hidroxí-ácida) em plasma humano.

Palavras-chave: HPLC, hipercolesterolemia, plasma, doença arterial coronariana, cromatografia líquida-espectrometria de massas.

MARCONDES, A.D.F.M. **Analytical Methodology Development for a determination of drugs in human plasma used in hypercholesterolemia.** São Paulo, 2016. [Master's Degree Dissertation]. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo.

ABSTRACT

One of the main risk factor, hypercholesterolemia which affects a fifth of the Brazilian people, particularly in people with more than 45 years old and currently is the main cause of death in Brazil and the second one of hospital admissions, according to the Brazilian Cardiology Society. It must be used lipid-lowering agents in patients with trend to cardiovascular disease associated. Simvastatin belongs to the HMG-CoA Reductase Inhibitors class ((3-hydroxy-3-metilglutaril-coenzyme A) and ezetimiba belongs to cholesterol absorption inhibitors and they are hypolipidemic.

The aim of this work is to develop and validate Bioanalytical methodology using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (QTOF) to determinate simultaneously quantity of ezetimiba and simvastatin and their metabolites in human plasma. This study was divided into the following steps: (i) obtaining samples of patients from HU where ezetimibe+simvastatina were administered, (ii) obtaining of ezetimibe, simvastatin and 4-methoxycoumarin (used as internal standard) standards, (iii) characterization of drugs using techniques of thermal analysis, nuclear magnetic resonance and infra-red spectroscopy, (iv) obtaining of ezetimibe metabolite standard (glucuronide ezetimibe) and simvastatin metabolite standard (simvastatin hydroxy acid ammonium salt), (v) selection of analytical method, mobile phase and type of drugs extraction in human plasma samples to be used mass spectrometry, (vi) tests in the high efficiency liquid chromatography coupled to charged aerosol detector and mass spectrometry detector.

Chromatographic separation was carried out using a Poroshell C18 column 50 mm x 2,1 mm with particle size of 1,8 μm , isocratic elution using 0,1% formic acid: acetonitrile (50:50, v/v), flow rate 0,7 mL/min and injection volume of 10 μL . The column temperature was set at 30°C and detection was performed in one equipment like QTOF, using ESI source, positive mode. Monitoring of the product ions were: ezetimibe (m/z 410,1557), simvastatina (m/z 419,2784), ezetimibe glucoronídeo (m/z 611,5756) and simvastatina hidróxi-ácida (m/z 552,2250). Analytical methods were validated according to the current ANVISA and United States Pharmacopoeia guidelines. Therefore, the proposed methods showed evidence to be linear, accurate and precision, suitable to the simultaneous quantitation of ezetimibe and simvastatin and their metabolites (ezetimibe glucoronídeo e simvastatina hidróxi-ácida) in human plasma.

Keywords: cardiovascular; cholesterol; ezetimiba; simvastatin; charged aerosol detector.

1. INTRODUÇÃO

Os níveis colesterolêmicos plasmáticos são controlados principalmente por meio de receptores de LDL. As estatinas inibem competitivamente com a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima-A (HMG-CoA) redutase, e esta etapa é limitante da velocidade da biossíntese do colesterol, o que resulta em redução da síntese “do novo” e maior expressão de receptores de LDL. O incremento do número destes receptores na superfície dos hepatócitos resulta em aumento da remoção desta lipoproteína do sangue e sua redução plasmática. O colesterol é então excretado para o intestino tanto na sua forma livre ou como integrante dos ácidos biliares (BAYS, H; STEIN, E.A., 2003).

As estatinas pertencem a uma classe de fármacos classificada como inibidores de 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, e são largamente utilizadas na terapia para redução de lipídeos plasmáticos (BRUNTON, et al, 2007).

O colesterol proveniente tanto da dieta como dos ácidos biliares, antes de entrar nas células entéricas, são esterificados pela enzima Acyl-CoA: Colesterol Acyl Transferase (ACAT) e, juntamente com os triglicerídeos são absorvidos e pertencem aos quilomícrons que entram em circulação através do sistema linfático. Apesar de vários compostos químicos serem potentes inibidores da ACAT in vitro, esta atividade não era observada em modelos animais. Burnett et al (1994) conseguiram obter relativo sucesso com a utilização de um destes compostos, a azetidinone, porém somente estudos posteriores em modelo animal levaram Van Heek et al (1997) a descobrirem que na realidade um dos metabólitos da azetidinone é quem possuía o poder inibitório da ACAT, originando-se então o fármaco Ezetimiba (BAYS, H; STEIN, E.A., 2003).

Ezetimiba ou 1- (4-fluorofenil) - (3R) - [3- {4-fluorofenil} - {3S} -hidroxipropil] - (4S) - (4-hidroxifenil) - (2-azetidinona), inibe a absorção do colesterol intestinal por bloqueio seletivo da proteína NPC1L1 na borda em escova da célula jejunal, responsável pela captação de micelas do lúmen intestinal para o enterócito (PHAN, B.A.; DAYSPRING, T.D.; TOTH, P.P., 2012).

Depois de ser metabolizado através da glucoronidação no intestino delgado e no fígado, a ezetimiba passa pelo circuito enterohepático permitindo que sua meia-vida seja de aproximadamente 22 horas. A ezetimiba não sofre metabolismo através da via do citocromo P450 e, portanto, não tem interações significativas com outros

medicamentos metabolizados pela via do citocromo P450, como estatinas, fibratos, amiodarona e amlodipina. Além da inibição da absorção intestinal de colesterol, a ezetimiba também interage com a NPC1L1 hepática, através da qual pode reduzir a absorção do colesterol biliar e reduzir ainda mais os níveis séricos de colesterol. (PHAN, B.A.; DAYSPRING, T.D.; TOTH, P.P., 2012).

Após administração oral, a ezetimiba é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e extensivamente conjugado para o metabólito glucoronidado farmacologicamente ativo, resultando em uma concentração no plasma de ezetimiba não conjugado de aproximadamente 10% do total no plasma e 90% de ezetimiba conjugado (glucoronidado) (GUO *et al*, 2015).

Após a administração oral, a sinvastatina é rapidamente hidrolisada em sinvastatina ácida, devido ao metabolismo de primeira passagem hepática. Conseqüentemente as concentrações de sinvastatina e sinvastatina ácida, pertencem a faixas muito baixas que variam de 0.10 ng. mL⁻¹ a 50 ng. mL⁻¹ (ZHANG *et al*, 2010).

Na literatura existem diversos trabalhos sobre a quantificação da ezetimiba em fluidos biológicos, com a finalidade de estudos farmacocinéticos e elucidação de mecanismos de absorção utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. Entre os trabalhos apresentam-se também diversos tipos de extração para os diferentes tipos de matriz (NIROGI, 2007; BASHA, 2007, BAE, 2012; BAGARI, 2013; DANAFAR, 2013, GUO, 2015). Em um dos trabalhos foi feita a quantificação da associação de Ezetimiba e Sinvastatina em plasma de ratos utilizando a técnica de espectrometria de massas “in tandem” (KARANAM, 2014).

Sobre a sinvastatina, a grande maioria da quantidade de trabalhos apresenta a quantificação utilizando a cromatografia líquida acoplada a um detector UV-VIS, onde em alguns casos é feita uma derivatização química para detecção do grupamento químico cromóforo (NAJIB, 2003; GONZALEZ, 2010).

Verificamos a publicação de um trabalho quantificando a ezetimiba e sinvastatina em plasma humano com a utilização de extração em fase sólida da matriz e espectrometria de massas “in tandem” (MRM) (MUNAGA, 2016), o que difere da proposta que apresentamos devido a não detecção e quantificação dos metabólitos ativos com a utilização de um espectrômetro de massas em série (“in tandem”) quadrupolo acoplado a tempo de voo (QTOF) e extração em fase líquida-líquida.

Dados obtidos por métodos analíticos não confiáveis podem comprometer grandes estudos, levando a irreparáveis prejuízos, por isso a validação de método

analíticos vem sendo cada vez mais exigida (CASSIANO, BARREIRO, MARTINS, et AL, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método analítico para determinação simultânea quantitativa de fármacos utilizados para o tratamento da hipercolesterolemia (ezetimiba e sinvastatina) em plasma humano.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de método bioanalítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em série quadrupolo e tempo de voo (QTOF) para a determinação simultânea e quantitativa de ezetimiba e sinvastatina em plasma humano;
- Validação do método desenvolvido segundo os parâmetros exigidos pelas diretrizes da ICH, da Farmacopeia Americana (USP) e ANVISA para validação de metodologia bioanalítica, tais como: especificidade (efeito matriz), linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão;
- Aplicação dos métodos para quantificação dos fármacos em amostras biológicas (plasma) e identificação de seus possíveis metabólitos por espectrometria de massas;

3. REVISÃO DA LITERATURA

O número de indivíduos com mais de 60 anos de idade vem aumentando acentuadamente nas últimas décadas em todo o mundo, com projeções indicando que em 2050 esse grupo contará com cerca de 1.900 milhões de pessoas. No Brasil, essa faixa da população apresentou um crescimento de 33,65% no período de 2000 a 2009, e com isso as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) passaram a ser predominantes, com destaque para as Doenças Cardiovasculares (DCV), que se tornaram a principal causa de óbitos em ambos os sexos no Brasil. Dentro do grupo das DCV, o Acidente Vascular Cerebral (AVC) tornou-se uma das principais causas de morte e incapacidade, já sendo considerado a segunda maior causa de mortes no mundo. Entre todos os países da América Latina, o Brasil é o que apresenta as maiores taxas de mortalidade por AVC, sendo entre as mulheres a principal causa de óbitos. Mesmo sendo referida uma redução dos índices de mortalidade nas últimas décadas, os valores continuam muito elevados (GARRITANO et al, 2011).

O acúmulo de lipoproteínas ricas em colesterol como a LDL no compartimento plasmático resulta em hipercolesterolemia. Este acúmulo pode ocorrer por doenças monogênicas, ou de mutações em múltiplos genes envolvidos no metabolismo lipídico. A terapêutica das dislipidemias de comprovada eficiência, tem por finalidade fundamental a prevenção primária e secundária da Doença Arterial Coronariana (DAC) e da Doença Arterial (DA) cerebrovascular e periférica (V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2013).

O ezetimiba pode efetivamente ser co-administrado com qualquer dose de estatina, além dos benefícios consistentes entre as marcas de estatinas e subgrupos de dosagens e comparados com a inibição única da produção de colesterol, proporcionado pelas estatinas só fornece consistente aumento na redução do LDL-C através da inibição dupla de tanto a produção quanto a absorção de colesterol. A dose única de ezetimiba/ sinvastatina possui superior eficácia da redução LDL-C (GRIGORE; NORATA; CATAPANO, 2008).

Além desta classificação, novas classes têm sido investigadas para a redução do colesterol, entre elas: Inibidores da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), Inibidores da proteína de transferência microsossomal (MTP), Inibidores da Proteína convertase subtilisina kexin tipo 9 (PCSK9) e Inibidores da síntese da apolipoproteína B. (BRUNTON, CHABNER & KNOLMANN, 2012).

3.1 METABOLISMO DAS LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

As lipoproteínas são compostas de lipídeos neutros, polares e proteínas especializadas chamadas apolipoproteínas (Apo). A maioria dos lipídeos neutros são ésteres de colesterol (CE) e triglicérides (TG); os lipídeos polares são fosfatidilcolina, esfingomielina e colesterol livre, com pequenas quantidades de fosfatidiletanolamina e traços de outros fosfolípidos (FL) (BALLANTYNE, 2015).

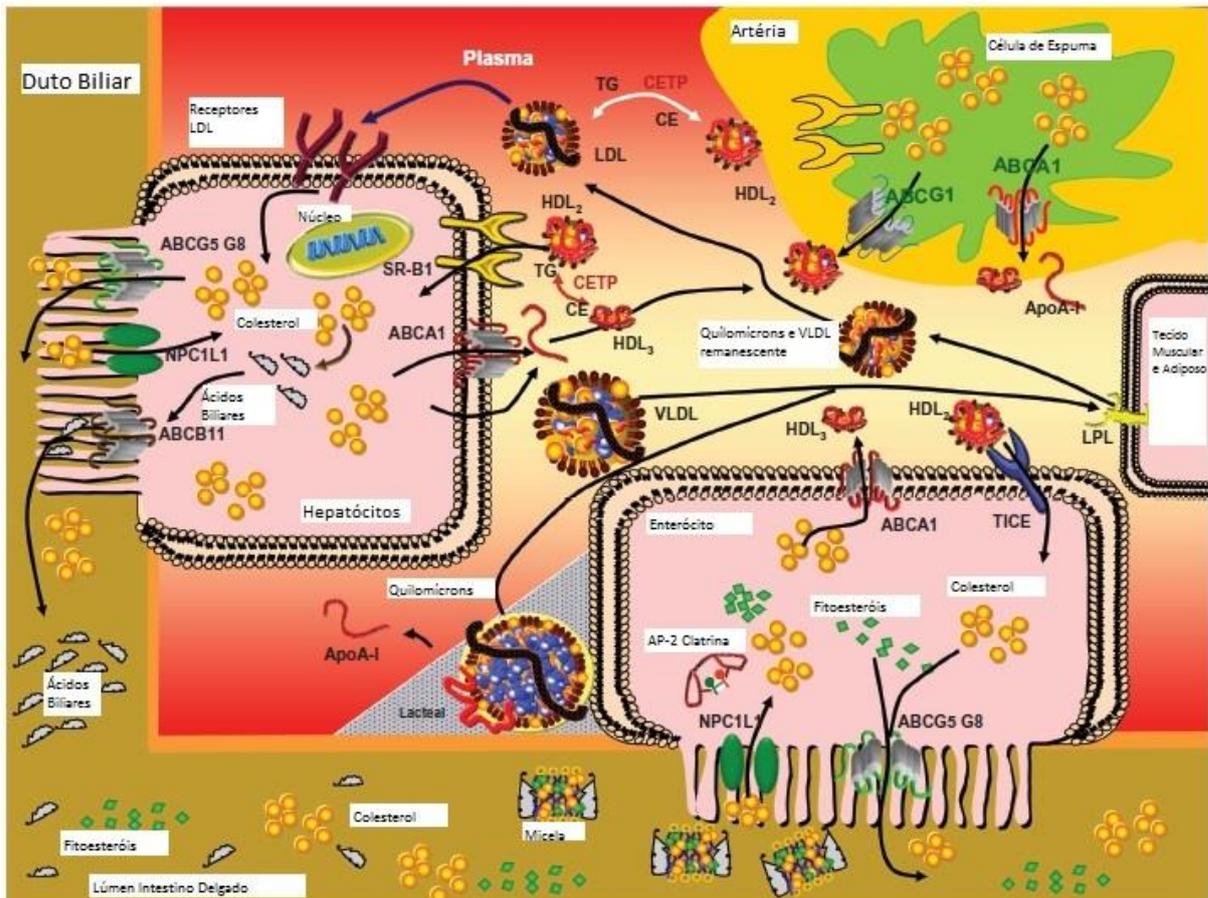


Figura 1 – Metabolismo de lipídeos e lipoproteínas. Adaptado de PHAN; DAYSFRING; TOTH, 2012

Notas: Colesterol, fitosteróis e outros lipídeos entram nas micelas biliares e são internalizadas via proteína NPC1L1 e complexo AP2/ clatrina. Colesterol também pode reentrar nos hepatócitos pela bile via canalicular NPC1L1. Próximo todos os fitosteróis e algum colesterol são retornados ao lúmen intestinal ou para a bile dos hepatócitos via ABCG5 e ABCG8. Colesterol pode ser convertido em hepatócitos a ácidos biliares primários, que são efluxados para a bile via ABCB11. Apo-A-I é secretado pelo fígado ou enterócito ou entra no plasma em um quilomícron. VLDLs e quilomícrons transportam triglicérides para o tecido muscular e adipócitos. Durante a lipólise, os fosfolípidos de superfície assim como os ácidos graxos também são liberados: o quilomícron resultante remanescente é eliminado pelo fígado o VLDL é convertido em IDL, a maioria dos quais são limpos pelos receptores de LDL no fígado, mas alguns sofrem lipólise adicional e formam LDLs. Durante o tempo de residência plasmática as partículas ApoB utilizando CETP troca TG para CE com partículas de HDL. HDLs menores são transformadas em ABCA1, e maiores HDLs em ABCG1 ou SR B1. Os HDLs maiores podem ser delipidados pelo SR B1 no fígado, nos adipócitos ou nos tecidos esteroideogênicos

Abreviaturas: ABCA1: Transportador de ligação de ATP A1 (efluxo de colesterol); ABCG5, ABCG8: transportadores de ligação ATP G5 e G8 (efluxo de estero); ABCB11: transportador de ligação a ATP B11 (bomba de exportação de bile); AP2: proteína adaptadora 2; ApA: apolipoproteína A; CE: éster de

colesteril; CETP: proteína de transferência de éster de colesterilo; HDL2: espécies maiores de HDL; HDL3: espécies de HDL mais pequenas; IDL: lipoproteína de densidade intermédia; LPL: lipoproteína lipase; NPC1L1: proteína Niemann-Pick C1-like 1; SR B1: receptor de B1; TG: triglicérido; TICE: efluxo de colesterol transintestinal (receptor putativo); VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade.

O colesterol sintetizado por hepatócitos passa por esterificação pela acil-CoA acil transferase (ACAT) e é incorporado a apolipoproteínas B (Apo B) contendo lipoproteínas tais como lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) via proteína de transferência microssomal. A subsequente modificação do VLDL com a hidrólise das triglicérides por enzimas lipoproteína lipase e lipase hepática produz a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e LDL. A transferência do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é mediada por HDL. As partículas nascentes de pre- β HDL aceitam colesterol livre de tecidos periféricos via ATP- transportador de cassette transporter A1 (ABCA1). O colesterol sofre subsequente esterificação pela lecitina-colesterol acetiltransferase. O colesterol esterificado move-se para o coração hidrofóbico da partícula HDL e assim como as partículas se tornam progressivamente mais lipidadas elas amadurecem e se tornam progressivamente maiores e mais esféricas. Os ésteres de colesteril nestas partículas maduras de HDL podem ser removidas da circulação por receptor de limpeza hepático BI ou passar por transferir o colesterol para a apolipoproteínas B-contendo lipoproteínas tais como LDL e IDL via atividade da proteína de transferência do colesteril éter. O fígado limpa as partículas LDL da circulação do receptor LDL e a proteína LDL-receptor relacionado (IKONEN, 2006).

A absorção de colesterol intestinal ocorre primariamente no duodeno e jejuno proximal e pode também contribuir para os níveis de colesterol sérico. A ingestão da dieta fornece cerca de um quarto do colesterol que entra no lúmen intestinal, enquanto os restantes três quartos são derivados de excreção de colesterol biliar do fígado. Deve-se fazer uma distinção entre a entrada de colesterol em enterócitos e a absorção sistêmica de colesterol, que se refere ao aparecimento de colesterol dentro dos vasos linfáticos, uma vez que nem todo o colesterol que entra nos enterócitos será absorvido no plasma. A absorção de colesterol intestinal é um processo complexo que envolve a incorporação de colesterol livre, a maioria dos quais de origem biliar, em micelas biliares misturadas e a subsequente deslipidação de micelas através de transportadores de influxo de esterol de membrana de enterócito intestinal. Uma vez no enterócito, o colesterol livre pode ser transferido para ApoA-1, pré-beta HDL ou ApoE, esterificado por ACAT em éster de colesteril para incorporação em quilomícrons

contendo ApoB48 ou transferido para o lúmen do intestino por transportadores ABCG5 e G8. As mutações genéticas nas proteínas ABCG5 e ABCG8 resultam em sitosterolemia, o que está associado a um aumento na acumulação de fitosterol e à absorção intestinal de colesterol resultando em níveis significativamente elevados de colesterol plasmático e esterol vegetal e desenvolvimento clínico de doença cardíaca aterosclerótica precoce (YU et al, 2002).

Após secreção no sistema linfático e drenagem via duto torácico, os quilomícrons e seus remanescentes são limpos da circulação através do fígado. OS triglicérides e ésteres de colesterol derivados dos quilomícrons podem ser retransformados em VLDL e secretados. Em 2004, Altmann et al reportaram o descobrimento da proteína Niemann–Pick C1-like 1 protein (NPC1L1) como uma proteína transportadora do esterol humano que foi expressa no lúmen do intestino/ enterócito (apical) assim como na interface hepatobiliar (canalicular) (ALTMANN et al, 2004).

Os níveis de colesterol sérico são regulados baseados em uma relação interativa entre a produção de colesterol hepático e a absorção de colesterol intestinal. A terapia com estatina reduz o LDL-C sérico por inibição da produção de colesterol hepático através da inibição da etapa limitante na síntese do colesterol catalisada pela enzima HMG-CoA redutase. Em resposta ao decréscimo na produção do colesterol hepático, o fígado se auto regula os receptores de LDL hepático, levando a um aumento do LDL-C removido do sangue. Adicionalmente, estudos têm demonstrado que em resposta ao tratamento com estatina, há um aumento compensatório da absorção do colesterol intestinal, possivelmente através da indução da expressão do gene de tais proteínas como NPC1L1. Como uma coroação, o aumento da absorção intestinal pode levar a uma baixa regulação da produção de colesterol intrínseco hepático (PHAN, DAYSPRING, TOTH, 2012).

3.2. Ezetimiba: (1- (4-Fluorofenil) -3(R) -[3- (4-fluorofenil) -3(S) hidroxipropil]-4-(S) - (4-hidroxifenil) -2-azetidiona)

Ezetimiba inibe a absorção de colesterol no nível das células em escova do intestino, reduz a quantidade de lipoproteína de colesterol circulante no fígado. Em resposta a entrega reduzida de colesterol, o fígado reage regulando os receptores LDL-C que leva ao aumento do clearance do colesterol do sangue. Altmann encontrou um mecanismo do ezetimiba de bloquear a captação de LDL oxidado por macrófagos humanos através da inibição de NPC1L1 (proteína Niemann-Pick C1 Lilke 1) e ANX2/

CAV1 (proteína ANX2/ caveolina), sugerindo a ação deste agente ser além do epitélio intestinal. Os resultados para valores de constante de dissociação do ezetimiba glucoronídeo para NPC1L1 estabeleceram NPC1L1 como principal alvo para ação da ezetimiba (DAVIS; JUNIOR; ALTMANN, 2009).

A ezetimiba foi desenvolvida através de uma modificação estrutural do SCH 53695, o metabólito da SCH 48461 2-azetidionona, e tem uma potência de 400 vezes maior em inibir a absorção do colesterol que o SCH 48461. Essa potência aumentada do ezetimiba tem sido atribuída a adição dos átomos de flúor, que desativam os anéis aromáticos e reduzem o potencial para metabolismo pelo citocromo P-450 e/ou interações farmacocinéticas. (GAIKWAD; BHAGWAT; BHOIR, 2013).

A ezetimiba é rapidamente metabolizada no intestino para o seu glucoronídeo fenólico, uma vez glucoronidado é excretado na bile, devolvendo o ativo de volta para o sítio de ação. Os estudos de absorção do colesterol indicam que o glucoronídeo parece ser mais potente que a ezetimiba devido à localização da ezetimiba glucoronidado no intestino. O reconhecimento de picos plasmáticos sucessivos do fármaco, sugerem fortemente a possibilidade haver uma recirculação enterohepática, o que dificulta uma determinação precisa de sua meia-vida, sendo estimada entre 28-30 horas (GRIGORE, NORATA, CATAPANO, 2008).

A meia vida plasmática da ezetimiba apresenta uma variabilidade de duração efetiva idade-dependente, alcançando maior permanência plasmática nos indivíduos mais idosos.

Após administração oral, a ezetimiba é absorvida e extensivamente conjugada ao seu glucoronídeo fenólico farmacologicamente ativo (ezetimiba glucoronídeo). Quando uma dose de 10mg é dada para um indivíduo do sexo masculino, adulto, e alimentado, os parâmetros farmacocinéticos são os seguintes: $CM_{\text{máx}} = 3.5 - 5.5$ ng/mL; $T_{\text{máx}} = 4- 12$ hours. Os parâmetros farmacocinéticos para ezetimiba-glucoronídeo são os seguintes: $CM_{\text{máx}} = 45 - 71$ ng/mL; $T_{\text{máx}} = 1-2$ hours. A alimentação não possui impacto na extensão da absorção da ezetimiba. Entretanto, $CM_{\text{máx}}$ aumenta em 38% com uma refeição com alta taxa de gordura. A eliminação da ezetimiba é de 78% da dose excretada nas fezes e 11% da dose excretada na urina. Ezetimiba foi o maior componente das fezes e registrado em 69% da dose administrada, enquanto a ezetimiba-glucoronídeo foi o maior componente da urina registrado em 9% da dose administrada.

Uma vez que a ezetimiba não influencia as atividades das enzimas do citocromo P 450, interações farmacocinéticas significantes com fármacos não têm sido verificadas. Estudos farmacocinéticos do ezetimiba não encontraram mudanças significativas nos níveis plasmáticos de outras medicações, incluindo estatinas (atorvastatina, sinvastatina pravastatina, lovastatina e fluvastatina), fibratos (genfibrozil e fenofibrato), digoxina, glipizida warfarina e contraceptivos orais (etinil estradiol e levonorgestrel)

3.2.1. Mecanismo de Ação e Metabolismo Ezetimiba

Os níveis de colesterol são regulados na relação interativa entre a produção de colesterol hepático e a absorção de colesterol intestinal.

A ezetimiba inibe a absorção do colesterol intestinal por bloqueio seletivo da proteína NPC1L1 na borda da célula em escova jejuna para captar micelas do lúmen intestinal para os enterócitos. O mecanismo exato não é bem compreendido. Em 2004, Altmann reportou a descoberta da proteína Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) como a proteína transportadora humana de esteróis que foi expressa nos enterócitos/ lúmen intestinal (apical) assim como na interface hepatobiliar (canalicular). NPC1L1 possui um sítio sensível ao esterol que é uma região consistente de cerca de 180 aminoácidos que formam 5 hélices e atravessam a membrana com pequenos loops.

A Figura 2, ilustra a internalização do colesterol e a ação do ezetimiba se ligando a proteína da parede intestinal (PHAN; DAYSPRING; TOTH, 2012.)

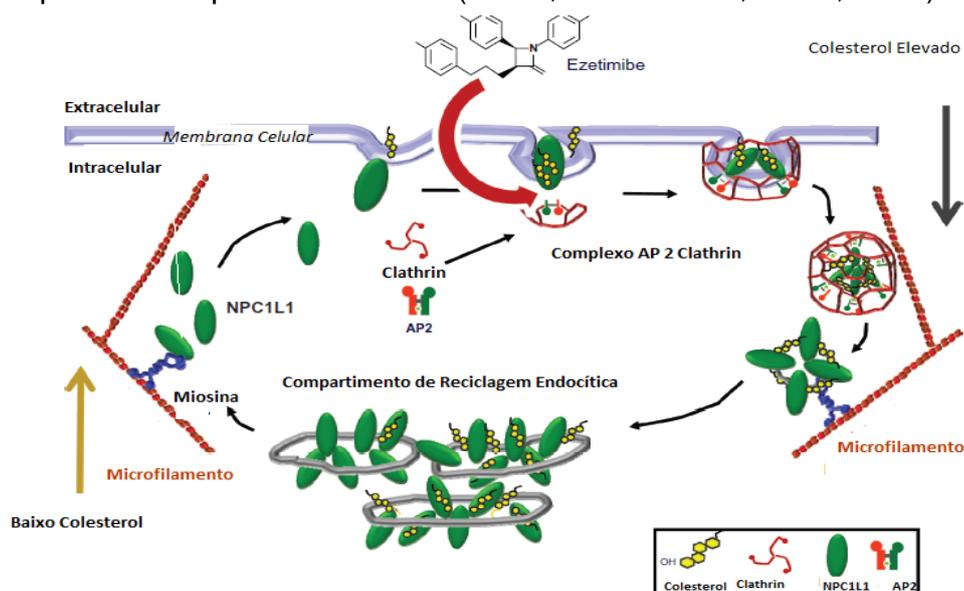


Figura 2 – Internalização do Colesterol vs efeito do ezetimiba. Adaptado de: PHAN; DAYSPRING; TOTH, 2012.

Quando a concentração de colesterol extracelular é alta o colesterol é incorporado a membrana celular e é sentido pela superfície celular localizado no NPC1L2. NPC1L1 e o colesterol são internalizados juntos com a clathrin/ AP2 mediada por endocitose e transportado ao longo dos microfilamentos para as vesículas de Compartimento de Reciclagem Endocítico (ERC). O ERC é onde o colesterol e a NPC1L1 são armazenados. Quando o nível de colesterol intracelular é baixo, ERC localizado no NPC1L1 move-se para baixo dos microfilamentos da membrana plasmática para absorver colesterol. A Ezetimiba dificulta a interação do complexo NPC1L1- colesterol com o complexo AP2-clathrin.

Após ser metabolizado através da glucoronidação no intestino delgado e fígado, a ezetimiba é excretada na bile e volta ao lúmen intestinal onde será novamente inibidor da proteína NPC1L1 (PHAN, DAYSPRING, TOTH, 2012).

Embora muitas isoformas da UGT tenham sido demonstradas para catalisar a reação de conjugação de fase II de ezetimiba (UGT 1A1, 1A3e 2B15), UGT 1A1 é a isoforma mais ativa. A ezetimiba têm demonstrado linearidade e proporcionalidade da dose na área sob a curva de concentração plasmática-tempo (AUC) em seres humanos recebendo doses orais únicas de 5, 10 e 20 mg (BASHA *et al*, 2007).

A ezetimiba e seu glucoronídeo são os maiores compostos detectados no plasma constituindo aproximadamente 10-20% e 80-90% do fármaco total no plasma, respectivamente (LI, *et al.*, 2005).

A biodisponibilidade da ezetimiba ainda não foi determinada porque o composto é virtualmente insolúvel em meio aquoso adequado para injeção intravenosa (DAVIS; ALTMANN, 2009).

3.2.2. Farmacocinética

A ezetimiba é praticamente insolúvel em solventes aquosos adequados para administração intravenosa. É rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e eficientemente biotransformado em glucoronídeo. A absorção da substância pelo intestino foi demonstrada ser de 1ª ordem, a absorção possui meia vida de 0,5 a 0,8 horas. A alimentação demonstrou não ter impacto sobre a absorção da ezetimiba (SUCHY, *et al*, 2011).

O principal metabólito circulante no plasma humano é o glucoronídeo fenólico formado pela glucoronidação do grupo 4-hidroxifenil enquanto o segundo conjugado glucoronídeo benzílico, é apenas um metabólito de traços.

O glucoronídeo fenólico representa cerca de 90% do ezetimiba total. A quantidade de conjugado benzílico é pequena, atingindo cerca de 1%. Outros metabólitos menores como derivados de cetona, produto oxidativo da biotransformação de 1^a. Fase e o glucoronídeo 4-hidroxifenil, correspondem a um total de 4.1% da dose administrada. O glucoronídeo cetônico da ezetimiba corresponde a cerca de 0.9% da dose (JEU; CHENG, 2003)

O modelo farmacocinético é descrito como modelo bi-compartimental da vesícula biliar. A ezetimiba e seu glucoronídeo são liberados pela vesícula biliar durante as refeições. Os picos correspondem a recirculação hepática de aproximadamente 4 a 6 horas e 10 a 12 horas conforme a correlação com os tempos de refeição (SUCHY, et al 2011).

Abaixo na Figura 3, observamos as fórmulas estruturais dos metabólitos da ezetimiba:

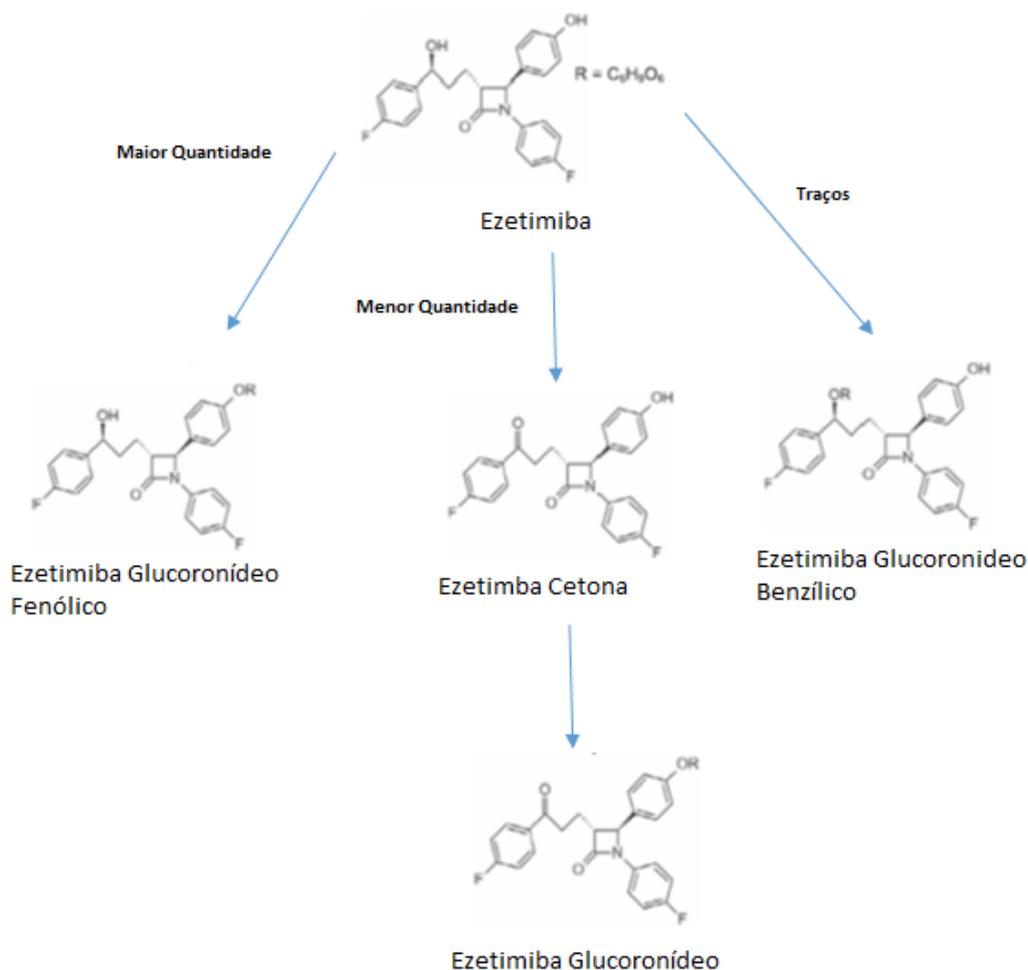
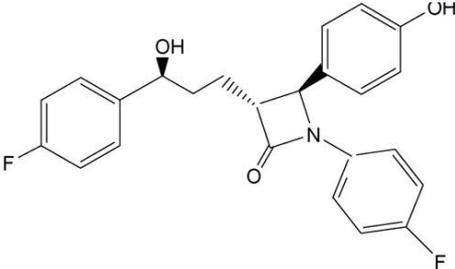


Figura 3 – Esquema de Biotransformação da ezetimiba. Adaptado de: SUCHY, et al, 2011.

Seguindo a ingestão e absorção intestinal, a ezetimiba é glucoronidada e entra no plasma portal, passa através do fígado e volta para o lúmen do intestino com bile. Neste ponto, a ezetimiba glucoronidada se liga a parede intestinal com o acúmulo de mais de 95% do fármaco total neste local. Foi observado um alto nível de ligação às proteínas plasmáticas humanas do ezetimiba e seu metabolito glucoronidado. Experimentos in vitro, a média de ligação de proteína foi de 99,5-99,8% e 87,8%-92,0% para ezetimiba e glucoronídeo ezetimiba, respectivamente (SUCHY, *et al*, 2011).

Nas tabelas abaixo, são apresentadas algumas características físico químicas da Ezetimiba e seu glucoronídeo:

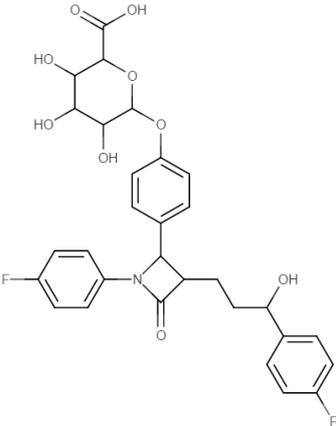
Tabela 1. Características Físico Químicas e Farmacocinéticas da Ezetimiba

Fórmula Molecular	C ₂₄ H ₂₁ F ₂ NO ₃
Nome Químico	1- (4-fluorofenil) -3(R) - [3- (4-fluorofenil) -3(S) -hidroxipropil] -4(S) - (4-hidroxifenil) -2-azetidinona.
Fórmula Estrutural	
Ponto Fusão	163°C (Anidro)
Densidade	1,334 g/ cm ³
Pressão de Vapor	4,38.10 ⁻¹⁸ mmHg a 25°C.
Log P	4,56
pKa	9,75
Solubilidade	Baixa solubilidade em água e compostos polares e alta solubilidade em compostos orgânicos e apolares.
	Etanol - 168 mg mL ⁻¹
	Água 0.012 mg mL ⁻¹
Massa Aproximada	409,42
CMáx	45 - 71ng.mL ⁻¹
TMáx	4 - 12 horas
Fórmula Percentual	C (70,41%), H (5,17%), F (9,28%), N (3,42%), O(11,72%).

(BASHA *et al*, 2007).

A concentração máxima plasmática (CM_{áx}) do ezetimiba total corresponde a 81,56±26,62 ng.mL⁻¹, sendo a concentração de 9,40 ±6,17 ng.mL⁻¹ a quantidade de ezetimiba livre. (BASHA *et al.*, 2007).

Tabela 2. Características Físico Químicas e Farmacocinéticas Ezetimiba Glucoronídeo

Fórmula Molecular	C ₃₀ H ₂₉ F ₂ NO ₉
Nome Químico	6-{4-[1-(4-fluorofenil)-3-[3-(4-fluorofenil)-3-hidroxiopropil]-4-oxoazetidín-2-yl]phenoxy}-3,4,5-trihidroxioxane-2-carboxílico ácido
Fórmula Estrutural	
Log P	2,61
pKa	3,23
CM _{áx}	3,5-5,5 ng.mL ⁻¹
TM _{áx}	1-2 horas
Massa Aproximada	585,1810
Fórmula Percentual	C (61,54%), H (4,99%), F (6,49%), N (2,39%), O (24,59%)

(Fonte: www.chemicalize.org e www.drugbank.ca Acessado em 20/08/16).

3.3. Estatinas

Mevastatina (ou compactina) foi o primeiro inibidor de HMG-CoA redutase descoberto em 1976, originalmente isolado como produto metabólico de culturas de *Penicillium citrinum*, sendo sua afinidade pelo sítio enzimático cerca de 10.000 vezes superior ao substrato HMG-CoA. Por outro lado, lovastatina (ou mevinolina) foi isolada posteriormente de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* com estrutura semelhante a mevastatina (grupo 6' - metílico adicional), mas com potência superior. Em 1987 lovastatina foi aprovada pelo FDA para uso terapêutico, enquanto

mevastatina foi abandonada devido a problemas na morfologia intestinal de cachorros e toxicidade hepatocelular verificada em ratos.

Lovastatina e sinvastatina são profármacos e convertidos em suas formas ativas (β -hidroxi ácidos) no fígado, onde as outras estatinas são ativas nas suas formas parentes. Diferenças estruturais em estatinas podem originar diferenças no potencial da inibição da enzima (NIROGI, *et al*, 2007).

Todas as estatinas são rapidamente absorvidas após administração oral, com o $T_{m\acute{a}x}$ geralmente alcançado em 3-4h, embora a absorção possa variar consideravelmente de 30% a 98%. O efeito da alimentação sobre a absorção varia de um pequeno aumento (lovastatina), uma diminuição (pravastatina), pouco ou nenhuma alteração (sinvastatina). Uma característica comum às estatinas é a via primária de eliminação biliar, com uma pequena porcentagem de eliminação renal (FONSECA, 2005).

Segue abaixo um comparativo entre os diferentes tipos de estatinas e seus metabólitos.

Tabela 3 – Relação entre Estatinas e Metabólitos ($C_{m\acute{a}x}$ e $T_{1/2}$) (FONSECA, 2005).

Fármaco	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$C_{m\acute{a}x}$ (mg/ mL)	$T_{1/2}$ (h)	Biodisponibilidade (%)	Metabolismo (CYP)	Metabólitos
Rosuvastatina	3	37	20,8	20	2C9, 2C19	Ativos
Atorvastatina	2-3	27-66	15-30	12	3A4	Ativos
Lovastatina	2-4	10-20	2,9	5	3A4	Ativos
Sinvastatina	1,3-2,4	1034	2-3	5	3A4	Ativos
Fluvastatina XL	4	55	4,7	6	2C9	Inativos
Pravastatina	0,9-1,6	45-55	1,3-2,8	18	não	Inativos

3.3.1. Sinvastatina

A sinvastatina é um antilipidêmico análogo da mevastatina (fármaco isolado em cultura de *Penicillium citrinium*). Inibe competitiva e reversivelmente a 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA-redutase) (NIROGI, *et al*, 2007).

3.3.1.1. Propriedades farmacocinéticas da Sinvastatina

A sinvastatina é administrada como pro-fármaco na forma lactona e deve ser hidrolisado ao seu correspondente hidroxiácido para ter atividade farmacológica. O seu β -hidroxiácido é um potente inibidor da β -hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA-redutase). Após a absorção, a biotransformação no fígado causa uma baixa biodisponibilidade sistêmica. O clearance total aparente é muito alto devido a um importante efeito de 1ª. passagem hepático. O sistema enzimático do citocromo P 450 é responsável pelo metabolismo e eliminação das estatinas (NIROGI, et al, 2007). Em termos de absorção, em animais, aproximadamente, 85% de uma dose oral de sinvastatina é absorvida; uma absorção similar ocorre provavelmente em seres humanos. Após uma dose oral, os picos de concentração plasmática podem ser observados em 1 a 2 horas.

A biodisponibilidade oral é de 5%; devido a um extenso metabolismo de 1ª passagem, cerca de 5% de uma dose oral atinge a circulação geral, sob a forma de inibidores ativos.

Os locais de distribuição da sinvastatina são: Proteínas totais-95% de ligação. Fígado é o local primário de ação e possui as mais altas concentrações; sendo considerado o órgão alvo.

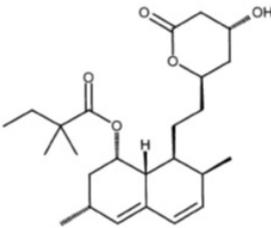
Os principais metabolitos da sinvastatina são:

- ✓ A forma β -hidroxiácido (principal metabólito ativo)
- ✓ 6-Hidroxi, 3-hidroxi e 6-exo-metileno
- ✓ Metabolitos não identificados, encontrados na biliar.

A excreção biliar representa a principal via de eliminação da sinvastatina e seus metabólitos. O perfil plasmático dos inibidores não foi afetado, quando a sinvastatina foi administrada imediatamente antes de uma refeição, em relação ao jejum (FONSECA, 2005).

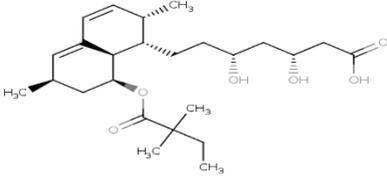
Nas tabelas 4 e 5, abaixo, são demonstradas as características físico químicas da sinvastatina e sinvastatina-hidroxi ácida, respectivamente:

Tabela 4. Características Físico Químicas Sinvastatina

Fórmula Molecular	$C_{25}H_{28}O_5$
Nome Químico	2,2-ácido dimetilbutírico, 8-éster com (4R, 6R)-6[2-[(1S, 2S, 6R, 8S, 8aR)-1,2,6,7,8,8a-hexaidro-8-hidroxi-2,6-dimetil-1-naftil]etil]tetraido-4-hidroxi-2H-piran-2-ona. (Sinvastatina)
Fórmula Estrutural	
Ponto Fusão	139°C
Ponto Ebulição	564,9°C em 760 mmHg.
Log P	4,46
pKa	12.2
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água, livremente solúvel em álcool e em clorofórmio.
Massa Aproximada	418,56
TMáx	1.3 - 2.4horas
Fórmula Percentual	C (71.74%), H (9,15%), O (19,11%)

(JEMAL; OUYANG; POWELL, 2000).

Tabela 5. Características Físico Químicas Sinvastatina Hidroxi-Ácida

Fórmula Molecular	$C_{25}H_{40}O_6$
Nome Químico	(3R,5R)-7-[(1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-dimethylbutanoyl)oxy]-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoic acid (Sinvastatina Hidroxi Ácida)
Fórmula Estrutural	
Log P	4.22
pKa	4.21

(Fonte: www.chemicalize.org Acessado em 20/08/16).

3.4. Tipos de Extração Plasma:

3.4.1. Extração Fase Sólida (SPE)

Extração líquido-sólida ou como é frequentemente chamada extração de fase sólida (SPE) é um método usado para concentração e isolamento de analitos alvos usando um suporte sólido. SPE é hoje o método mais comum usado de preparação de amostras em várias áreas de química, incluindo aplicações clínicas, de meio ambiente e farmacêuticas (ORLANDO et al, 2009).

Uma extração de fase sólida típica, envolve quatro etapas de processamento. No primeira etapa, o sorvente é condicionado com 3-5 volumes do solvente para remover impurezas e assegurar reprodutibilidade da retenção dos analitos. A segunda etapa, é aplicação da solução amostra através do instrumento de extração. Esta etapa é seguida da lavagem e limpeza do sorvente de interferências sem perda dos analitos. Finalmente, os analitos de interesse são eluídos do sorvente usando um solvente forte (ORLANDO et al, 2009).

3.4.2. Extração Fase Líquida Líquida (LLE) com efeito “Salting Out”

A extração líquido-líquido também conhecida como extração por solventes, tem sido um método efetivo de separação de compostos que possuem diferentes solubilidades em dois líquidos imiscíveis.

Os dois líquidos são tipicamente água, talvez com alguns aditivos, e um solvente orgânico não polar tal como o isooctano. Tipicamente, compostos polares preferem a camada aquosa, enquanto compostos não polares são extraídos na camada orgânica. A desvantagem de usar solvente não polar, solventes orgânicos imiscíveis com água é devido a sua baixa constante dielétrica que é relativamente pobre na extração de solutos altamente polares ou muito carregados., particularmente para altamente solúveis em água, eles podem requerer uma extração em valores de pH muito altos ou baixos. Solventes mais polares, que fornecem solubilidade para estes mais polares (MAJORS, 2009).

A adição de um sal inorgânico na mistura de água ou solventes orgânicos miscíveis a água causa uma separação dos solventes da mistura e a formação de um sistema de duas fases. Algumas vezes este fenômeno é referido

como “separação de fase sal induzida”. Observações para estes fenômenos de “**salting out**” foram feitas para um número de orgânicos miscíveis com água tais como acetona, metanol, etanol e acetonitrila. Diferentes sais, e diferentes concentrações podem causar diferentes graus de separação de fases. A alta polaridade dos solventes miscíveis com água usados nos sistemas de **salting out** têm sido investigados para extração ou concentração de muitos analitos que não podem ser extraídos pelo método convencional LLE (MAJORS, 2009).

A extração por **salting-out** tem sido usada para preconcentração de orgânicos polares neutros da água. Leggett e colaboradores demonstraram que obtiveram alta recuperação de traços de compostos explosivos em água utilizando acetonitrila-cloreto sódio na extração salting out (MAJORS, 2009).

Extração líquida-líquida auxiliada pelo efeito **salting-out** (SALLE) aplica o efeito **salting-out** para separar solvente orgânico miscível da água tal como acetonitrila do plasma ou outros fluidos biológicos, e pode extrair uma larga variedade de fármacos e metabólitos, incluindo muitos compostos hidrofílicos. Na maioria dos casos, a fase orgânica separada pode ser diretamente injetada para bioanálise ou com uma diluição simples. SALLE fornece simplicidade similar a precipitação de proteínas, mas extratos mais limpos devido a verdadeira separação de fases. SALLE também é mais rápido, mais eficiente e possui menor custo que a extração líquida líquida ou SPE (TANG, et al 2013).

3.5. Métodos analíticos para determinação e quantificação de fármacos no tratamento da hipercolesterolemia

3.5.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

A Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que se consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Conhecer suas vantagens, limitações, componentes e os critérios de escolha entre as opções de equipamentos e acessórios disponíveis é uma obrigação dos profissionais de laboratórios químicos, farmacêuticos, bioquímicos e outros (COLLINS *et al.*, 2007).

É o método físico de separação no qual os componentes a serem separados estão distribuídos entre duas fases, uma estacionária (fase estacionária) e outra que se move em uma direção definida (fase móvel) (Gold Book, versão 2.3.2, IUPAC).

Em CLAE a fase móvel desempenha duas funções, arrasta os componentes da amostra através do sistema cromatográfico e participa do processo de separação.

Entre as características físico-químicas da fase móvel é desejável que seja de alto grau de pureza ou de fácil purificação, dissolva a amostra sem decompor seus componentes, não decomponha ou dissolva a fase estacionária, ter baixa viscosidade e ponto de ebulição, ser compatível com o tipo de detector utilizado, em misturas – ter miscibilidade completa (COLLINS, et al, 2007).

A retenção de um componente é controlada pela força do solvente que depende da polaridade do solvente. Solventes fortes diminuem a retenção e solventes fracos aumentam a retenção.

Em cromatografia líquida de alta eficiência existem diferentes tipos de detectores, entre eles, o detector aerossol carregado (CAD), o fotoarranjo de diodos (PDA), índice de refração (IR), Evaporative Light Scattering (ELSD), entre outros. Os detectores são selecionados em função das características que cada composto possui, entre os compostos que apresentam grupamento cromóforo, utiliza-se geralmente o fotoarranjo de diodos, para os demais compostos é utilizada alguma característica para definir sua detecção no equipamento. Nos casos onde há necessidade da detecção e caracterização dos compostos são utilizados detectores com alta sensibilidade e poder de resolução a fim de detectar e caracterizar os componentes desejados, tais como os detectores de espectrometria de massas.

3.5.2. CLAE acoplada ao Detector de Aerossol Carregado:

O detector de aerossol carregado (CAD) possui como premissa o eluente da coluna do CLAE é primeiramente nebulizado com nitrogênio para formar gotas que são secas, produzindo partículas dos analitos. O vapor primário das partículas dos analitos se encontra com uma corrente de vapor secundário que é positivamente carregada resultante de ter passado pela agulha de platina corona de alta voltagem. A carga é transferida difusionalmente para o fluxo de partículas de analitos oposta, e é posteriormente transferida para um coletor onde é medido por um eletrômetro,

altamente sensível, a geração de um sinal em proporção direta com a quantidade de analito presente (AWAD, *et al*, 2009).

Comparado a outros métodos de detecção a resposta deste tipo de detector (CAD) não é dependente dos grupos funcionais dos compostos de interesse, mas da concentração inicial de analito nas gotículas formadas mediante nebulização, proporcionando uma resposta muito mais uniforme em contrapartida ao sinal de cromóforos no detector ultravioleta onde as respostas podem variar de acordo com o comprimento de onda utilizado e do coeficiente de extinção. Isto é uma vantagem considerável quando se fala em impurezas onde nenhuma informação estrutural é disponível ou a resposta do detector é ainda desconhecida (ALMELING, ILKO e HOLZGRABE, 2012).

Na figura 4 é demonstrado o esquema do funcionamento do detector CAD:

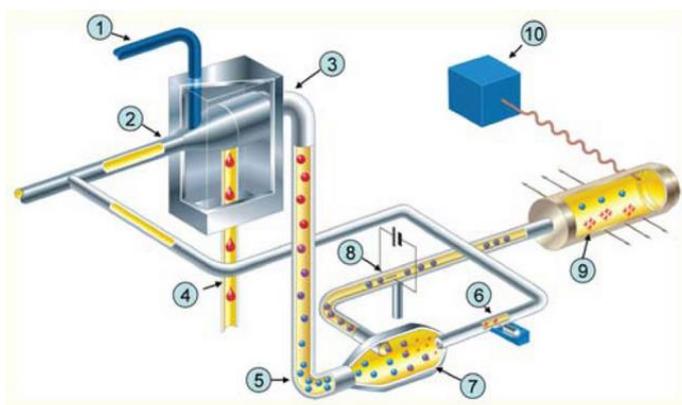


Figura 4 – Ilustração Detector Aerossol Carregado

Modo de Operação: O líquido eluente da coluna de hplc entra no detector (1), onde passa por uma nebulização pneumática (2), pequenas gotículas entram em um tubo seco e (3) formam partículas, enquanto gotas grandes saem do dreno para o lixo (4). As partículas secas entram na câmara de mistura (5). Outra corrente de gás passa sobre uma agulha coronada carregada (6). O gás carregado então mistura-se com partículas secas, formando partículas carregadas (7). Espécies de alta mobilidade são removidas por uma armadilha de íons (8) enquanto as partículas carregadas remanescentes passam por um coletor onde a carga é medida com um eletrômetro altamente sensível (9). O sinal é transferido para o software (10) (PLANTE, BAILEY, AWORTH, 2009).

O detector CAD certamente tem vantagens para a detecção de compostos que não têm cromóforos UV, proporcionando as vantagens destas respostas relativas equivalentes independentes do coeficiente de extinção mesmo para os compostos que possuem um cromóforo devido à sua resposta quase universal. Porém existe apenas um importante critério para a determinação da resposta do analito, que é a

sua volatilidade - compostos de interesse não devem ser voláteis (HARTLEY *et al.*, 2009).

A resposta do detector CAD depende muito da quantidade de modificador orgânico presente na fase móvel. Baseado na experiência de Almeling, et al, 2012, um aumento no sinal do detector de uma escala de 5-10 pode ser atingido quando se modifica de 100% aquoso para 100% orgânico. Infelizmente a forte dependência da resposta do detector em função da composição do eluente resulta em algumas limitações.

O detector CAD tem sido usado para análise de controle de impurezas, aminoglicosídeos, reação de Maillard em impurezas de comprimidos de Memantina, aminoácidos, e inclusive para análises de teor – por exemplo: estatinas, anti-diabéticos, vitaminas, gabapentina, e outras aplicações (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012).

O detector CAD é massa dependente e a resposta gerada não depende de propriedades espectrais ou físico-químicas do analito em um detector específico UV, que é um detector concentração-dependente. Por exemplo, apenas uma leve variação da resposta para quantidades iguais de compostos analisados foi observada por Gamache et al, em uma série de teste de 17 diferentes compostos químicos em condições de eluição isocrática. Entretanto essa variação foi de cerca de 7% de desvio padrão relativo entre todas as respostas dos 17 compostos químicos diferentes, o que indica que a resposta CAD também é dependente da volatilidade do analito. A relação entre o sinal e quantidade de analito não é linear no CAD e a relação entre a área resposta e a massa do analito pode ser descrita como:

$$A = aM^b$$

Equação Nº 1 – Relação entre Resposta de Área e Massa do Analito

Onde:

A – Resposta da área do detector

M – Massa do analito

a e b são valores que dependem do analito e condições cromatográficas.

A resposta do sistema CAD é influenciada pelo diâmetro das partículas geradas, que é dada pela equação:

$$d_p = d_d \left(\frac{C}{\rho_p} \right)^{1/3}$$

Equação Nº 2 – Relação entre diâmetro da partícula e diâmetro da gota e concentração do analito.

Onde:

ρ_p é a densidade da partícula (dada pela densidade do analito),

C é a concentração, d_p é o diâmetro da partícula e d_d é o diâmetro da gota.

Uma vez que o diâmetro da gota é relacionado a diversos outros fatores, incluindo densidade e viscosidade da fase móvel, é também dependente da composição da fase móvel. O maior conteúdo de fase móvel leva ao aumento da eficiência de transporte do nebulizador, que resulta em um grande número de partículas atingindo a câmara do detector e um alto sinal (VEHOBEC; OBREZA, 2010).

3.5.3. Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas:

A espectrometria de massas é o estudo da matéria baseado nas massas das moléculas e de seus fragmentos (WATSON; SPARKMAN, 2007). Um analisador de massas mede os íons na fase gasosa com respeito a sua razão massa/carga (m/z), onde a carga é produzida pela adição ou perda de um próton, cátion, ânion ou elétron. A adição de carga permite que a molécula seja afetada por campos elétricos permitindo assim a medida de massa.

Entre os componentes primários de um espectrômetro de massas temos: a entrada da amostra, fonte de ionização, analisador de massa e detector. No espectrômetro de massas as moléculas neutras são transferidas para fase gasosa, ionizadas, submetidas a um campo eletromagnético para separação dos íons de acordo com a sua relação massa/carga, e detectadas gerando um espectro de massas.

Um QTOF (Quadrupolo acoplado ao Tempo de Vôo), possui dois analisadores de massas: um quadrupolo e um tempo de vôo. O Tempo de Vôo (TOF) serve para analisar os íons fragmentados gerados na célula de colisão.

O poder de resolução é a habilidade de um espectrômetro de massas em distinguir entre íons de diferentes razões massa/carga. Uma resolução elevada corresponde diretamente ao aumento da habilidade de diferenciar os íons. A saturação do detector pode impactar negativamente na exatidão da massa. Isso está diretamente relacionada a quantidade de amostra que é carregada para dentro do detector.

O quadrupolo é usado para escanear através de uma faixa pré-selecionada m/z ou uma determinada m/z . A célula de colisão (hexapolo) foca e transmite os íons enquanto introduzidos um gás de colisão tal como nitrogênio para o caminho do vôo do íon selecionado.

Abundância isotópica: relação entre o número de átomos de um isótopo existente numa mistura de isótopos e o número total de átomos presentes. Exprime-se em percentagem.

Existem diferentes tipos de fontes, por exemplo, ionização por elétrons, ionização química, MALDI, ionização à pressão atmosférica (APCI), por eletrospray (ESI). O tipo de fonte de ionização é dependente do tamanho e a polaridade da molécula a ser analisada.

Seguem as informações que podemos obter a partir do espectro de massas temos a massa molar (peso molecular); a presença de determinados isótopos; a composição elementar (massa exata + padrão isotópico); a estrutura: vias de fragmentação (dissociação) e também resposta quantitativa (SPARKMAN, 2007).

3.6. *Métodos Cromatográficos utilizados para a quantificação de Ezetimiba e Sinvastatina e seus metabólitos em matrizes biológicas:*

Foi efetuada a revisão da literatura com a constatação de existência de diversos métodos cromatográficos, considerando matrizes biológicas, com diferentes métodos de extração e diferentes tipos de detecção para a ezetimiba e sinvastatina.

Não foi localizado na literatura uma metodologia para a determinação simultânea da ezetimiba e sinvastatina e seus metabólitos utilizando o método de extração líquido-líquido e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectro

de massas (quadrupolo tempo de voo), utilizando como fonte eletrospray ionization (ESI) em modo positivo e negativo.

Entretanto, vários trabalhos com a quantificação de sinvastatina e seu metabólito ativo em plasma humano, utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com MRM (multiple reaction monitoring). Porém todos utilizaram solventes orgânicos fortes para extração e posterior concentração em evaporadores de nitrogênio ou utilização de extração em fase sólida (cartucho de SPE) (NIROGI et al,2007; NAJIB et al, 2003).

Também foi localizado na literatura um trabalho de quantificação de sinvastatina e sinvastatina hidroxí-ácida em plasma humano, com a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fotoarranjo de diodos. (DAD). Porém para a utilização deste tipo de detector foi utilizada uma reação de derivatização com 1-bromacetilpireno (NOVAKOVA et al, 2008).

Foram localizados vários trabalhos recentes sobre ezetimiba e seu metabólito glucoronídeo com a utilização de concentradores com evaporação de corrente forçada de nitrogênio e posterior injeção em equipamentos acoplados a espectrômetro de massas. Há alguns trabalhos que referem a utilização de cartuchos combinados com solventes orgânicos para a extração da ezetimiba e seu metabólito glucoronídeo (GONZALEZ et al, 2010; BAE et al, 2012; DANAFAR et al, 2013; KARANAM et al, 2014; GUO et al, 2015; MUNAGA et al, 2016).

3.7. Parâmetros de Validação de Métodos Analíticos

A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Considerando que o método a ser validada é bioanalítico, a validação de métodos se propõe a “confirmação por ensaio e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”, sendo fundamental a construção da confiabilidade do resultado apresentado (ANVISA, 2012).

A validação de métodos bioanalíticos deve conter ensaios de precisão, exatidão, curva de calibração, efeito residual, efeito matriz, seletividade e estabilidade, conforme as especificações de cada ensaio.

3.7.1. Seletividade /Especificidade

FDA e EMA definem seletividade como a habilidade do método bioanalítico para medir e diferenciar o analito de interesse e padrão interno na presença de componentes que podem ser esperados estar presentes na amostra. Por outro lado, EMA define especificidade como a habilidade em medir o analito inequivocamente na presença de outros compostos, tanto exógeno quanto endógeno na matriz. O potencial de substâncias interferentes em uma matriz biológica inclui componentes endógenos da matriz, produtos de decomposição, metabólitos e no estudo atual, medicação concomitante e outros xenobióticos. Se a pretensão do método é para quantificar mais de um analito cada analito deve ser testado e assegurado que não há interferência (Draft FDA Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation, 2013).

3.7.2. Efeito Residual

Devem ser realizadas, no mínimo, 3 (três) injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas de maior concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos de amostras processadas de menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz. (ANVISA, 2012). As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% (vinte por cento) da resposta do analito nas amostras processadas de menor concentração do analito na curva de calibração preparada na matriz.

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno devem ser inferiores a 5% (cinco por cento) da resposta do padrão interno.

Se o efeito residual for inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas (ANVISA, 2012).

3.7.3. Efeito Matriz

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e Padrão Interno, e soluções, nas mesmas concentrações das amostras de Controle de Qualidade. No caso de plasma, devem

ser analisadas 8 (oito) amostras de fontes distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas.

Em estudos conduzidos em pacientes, que apresentem alguma alteração nas características da matriz biológica, deve-se empregar esta matriz específica neste ensaio. Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por Padrão Interno (FMN), conforme a fórmula a seguir:(ANVISA, 2012).

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}}$$

O Coeficiente de variação (CV) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15% (quinze por cento). Caso o CV dos FMNs relativos a todas as amostras de plasma seja superior a 15% (quinze por cento) devido ao resultado discrepante das amostras hemolisadas, novo CV dos FMNs sem estas amostras pode ser calculado e as amostras em estudo hemolisadas não poderão ser analisadas.

3.7.4. Curva Analítica (Linearidade)

Devem ser construídas e avaliadas, no mínimo, três curvas analíticas que incluam a análise da amostra branco, da amostra zero e de, no mínimo, 6 (seis) amostras de diferentes concentrações do padrão do analito adicionadas de padrão interno. As amostras da curva de calibração devem ser inicialmente adicionadas do padrão do analito e do padrão interno e depois submetidas ao mesmo procedimento de preparação a que serão submetidas as amostras em estudo. Deve ser apresentada justificativa científica para a faixa de concentração contemplada pela curva de calibração. E também deve ser apresentada a equação que representa a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito.

As respostas das amostras branco e zero não devem ser utilizadas na construção da equação.

Os padrões de calibração estão aprovados quando atenderem aos seguintes critérios:

I - Desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação à concentração nominal para os padrões do Limite Inferior de Quantificação; e

II - Desvio menor ou igual a 15% (quinze por cento) em relação à concentração nominal para os outros padrões de calibração.

A curva analítica deve atender aos seguintes critérios para ser aprovada:

I - No mínimo 75% (setenta e cinco por cento) dos padrões de calibração aprovados conforme os critérios anteriores; e

II - no mínimo 6 (seis) padrões de calibração de concentrações diferentes, incluindo o Limite Inferior de Quantificação e o Limite Superior de Quantificação, aprovados conforme os critérios anteriores (ANVISA, 2012).

3.7.5. Precisão (Repetibilidade) e Exatidão (Recuperação)

A exatidão de um método descreve sua proximidade da média dos resultados obtidos pelo método para o valor atual (concentração) do analito. É determinada pela análise replicata de amostras contendo quantidades conhecidas de analito. Deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intracorrída) e em no mínimo, três corridas diferentes (exatidão intercorridas). Em cada corrida devem ser realizadas no mínimo 5 (cinco) replicatas em pelo menos cinco concentrações: limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD).

A exatidão é expressa pelo erro padrão relativo (EPR), não se admitindo valores fora da faixa entre 15% do valor nominal exceto o limite inferior de quantificação (LIQ) onde não se admitem valores fora de faixa de mais ou menos de 20% do valor nominal, segundo a fórmula a seguir:

$$\text{EPR} = \frac{\text{Concentração média experimental} - \text{Valor nominal}}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

A precisão de um método analítico descreve a proximidade das medidas individuais de um analito quando o procedimento é aplicado repetidamente para alíquotas múltiplas de um volume único homogêneo de amostra de matriz biológica. Deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intracorrída), usando um mínimo de cinco determinações por concentração, limite inferior de quantificação (LIQ), controle de qualidade de baixa concentração (CQB), controle de qualidade de

média concentração (CQM), controle de qualidade de alta concentração (CQA) e controle de qualidade de diluição (CQD).

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para limite inferior de quantificação (LIQ) para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segundo a fórmula a seguir:

$$CV = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100$$

4.1-Reagentes e solventes

- Acetonitrila grau CLAE (MERCK)
- Metanol grau CLAE (MERCK)
- Ácido Fórmico grau PA, ACS
- Acetato de Amônio grau PA, ACS
- Ácido acético glacial grau PA, ACS
- Isopropranol grau CLAE (MERCK)
- Dimetilsulfóxido deuterado ACS
- ESI Tuning Mix Solution Agilent
- Água Ultra purificada usando sistema Millipore O Plus®

4.2. Substâncias empregadas como padrão

- Ezetimiba – Pureza: 99,8% base anidra – Origem: Merck – Lote: L-000829161-000D014.
- Sinvastatina – Potência: 99,0% tal qual – Origem: Merck – Lote: L-000644128-000U261.
- Simvastatin Hydroxy Acid, Ammonium salt – Lote: #F0115 – Santa Cruz Biotechnology
- Ezetimiba Hydroxy beta – D -Glucuronide – Lote: 19-MJC-161-3 – Toronto Research Chemicals Inc.
- Metoxi-cumarina – Pureza 98% - Origem: Sigma Aldrich
- Naproxeno – Pureza 99,8% - Origem: Astrazeneca

4.3. Amostras de Plasma:

Foram selecionados no ambulatório do Hospital da Universidade de São Paulo, 38 pacientes hipercolesterolêmicos com LDL colesterol maior que 160 mg/dL e estudadas segundos critérios abaixo:

Indivíduos com diabetes mellitus, hipertrigliceridemia, problemas no fígado, rim ou tireóide, mulheres grávidas ou sob tratamento de contraceptivos orais e outras causas secundárias de dislipidemia não foram incluídos no estudo.

O protocolo de estudo sobre análise de medicamentos foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, como um adendo de um projeto anterior ao grupo de pesquisa da Profa. Rosário D. C. Hirata e foi utilizado um termo de consentimento livre e esclarecido com os voluntários que utilizaram a medicação (Anexo XX).

As amostras disponíveis são de pacientes hipercolesterêmicos (n=38) que foram submetidos a tratamento em duas etapas, após quatro semanas de um período de wash-out incluindo uma dieta com baixo conteúdo de gorduras saturadas e carboidratos e os pacientes foram tratados inicialmente com ezetimiba (10 mg/ dia durante 4 semanas) e seguidos de sinvastatina (10 mg/ dia durante 8 semanas) e sinvastatina e ezetimiba (10 mg/dia cada durante 4 semanas). Foi realizada coleta de sangue para os pacientes que utilizaram a medicação por 4 semanas, e esta foi considerada a fase basal de tratamento, para comparar com as fases seguintes no estudo.

Os comprimidos foram administrados no período noturno (às 22 horas) e as amostras foram coletadas no período da manhã (8 hs).

As amostras foram armazenadas em ultra freezer, na temperatura de -80°C.

O plasma branco foi retirado de voluntários e utilizado o EDTA como conservante.

4.4. Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Dionex Ultimate com detector CAD e PDA - Thermo,
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao detector de massas QTOF - Agilent,
- Colunas Zorbax C18 de 50mm x 4,6mm, 5 µm e Poroshell EC C18 de 50mmx4,6mm, 2,1 µm da Agilent,
- Centrífuga,
- Refrigerador,
- Vórtex,

- Micropipetador automático,
- Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC7020 SII EXTAR)
- Espectrofotômetro de RMN Bruker DPX-300, operando a 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C.
- e Infravermelho por Transformada de Fourier Shimadzu Modelo IRAffinity-1.

4.5. Métodos

4.5.1. Caracterização físico-química dos padrões secundários

A caracterização físico química dos padrões secundários foi feita através de ponto de fusão, calorimetria exploratória diferencial, espectrometria na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e ressonância magnética nuclear.

-Espectrometria na região do infravermelho (FTIR)

Para a ezetimiba foi efetuada apenas uma leitura do espectro de absorção no infravermelho. Como não existe literatura sobre referência farmacopeica para que possa ser comparado, foram considerados os dados constantes do certificado de análise do fornecedor (Merck Sharp Dohme).

Para a Sinvastatina, como existem alguns testes que constam na monografia constante da Farmacopeia Européia, foi efetuada uma leitura do espectro de absorção no infravermelho, com ATR e a comparação.

- Análise Térmica (Análise Termogravimétrica e Calorimetria exploratória diferencial)

Para ambas as amostras foi feita a análise de calorimetria exploratória diferencial e análise térmica diferencial a fim de determinar a natureza das amostras que estão sendo testadas, através de DSC e DTA (análise térmica diferencial por varredura e por termogravimetria).

- Ressonância magnética nuclear:

¹³C e ¹H (RMN-¹³C e ¹H) tanto para a ezetimiba e a sinvastatina, pesou-se 0,5 g de cada substância e transferiu-se para tubos de RMN, logo depois, adicionou-se 0,5 mL de dimetilsulfóxido deuterado e procedeu-se a realizar a leitura no equipamento de RMN Bruker DPX-300, operando a 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C. Realizou-se uma leitura para cada uma das substancias.

4.5.2. Desenvolvimento do método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência, para a quantificação da ezetimiba e sinvastatina.

Foram realizados alguns testes a fim de verificar qual a melhor performance do método, considerando o tipo, o tamanho em comprimento e em diâmetro e a micragem das partículas da coluna, a resolução entre picos, a simetria dos picos, o fator de retenção (k), a faixa de concentração em que os analitos estarão presentes no plasma vs altura do pico em mAU, ou pA ou intensidade de abundância e o limite de quantificação e detecção para cada analito e a energia necessária para fragmentação dos analitos em fragmentos possivelmente conhecidos.

Foram efetuados testes no cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplados ao detector ultravioleta, ao detector CAD da ThermoFisher e ao detector de espectro de massas. (QTOF) da Agilent.

4.5.2.1 CLAE acoplado ao Espectrômetro de Massas (QTOF)

Para a quantificação do Ezetimiba e Sinvastatina e seus metabólitos em plasma humano foi desenvolvido o método de CLAE, cujo equipamento é caracterizado por possuir bomba, detector de espectrometria de massas e um sistema de amostragem automático (auto sampler), acoplado ao detector de espectro de massas QTOF. Para as análises de EZE (Ezetimiba) e SINVA (Sinvastatina), EZE-G (Ezetimiba Glucoronídeo) e SINVA HA (Sinvastatina Hidroxi Ácida) empregou-se coluna cromatográfica da marca Agilent®, modelo Poroshell EC C18 50mm de comprimento e 2,1 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 7,0 µm. Cabe mencionar que, todos os parâmetros de CLAE foram monitorados por softwares Mass Hunter módulo Data Acquisition e reprocessados pelo Mass Hunter módulos qualitativo e quantitativo.

A fase móvel foi composta por acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (50:50). A fase móvel foi filtrada em membrana de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm e, posteriormente foi sonicada por 15 minutos antes de se proceder com as análises. As condições cromatográficas adotadas foram: fluxo da fase móvel de 0,7

mL/min; temperatura do forno de 30 °C e injeção de 1 µL de cada amostra a ser quantificada. Tempo de Corrida de 8 minutos mais 3 minutos de post run.

Foi utilizado um espectrofotômetro do tipo quadrupolo acoplado a tempo de voo. A fonte de ionização utilizada foi ESI no modo positivo e negativo, e auto ms/ms – os parâmetros para fragmentação foram utilizados default do equipamento) para determinação e caracterização dos fragmentos de ezetimiba modo positivo (m/z 392,1557), sinvastatina modo positivo (m/z 419.2784), ezetimiba glucoronídeo modo negativo (m/z 573,4337), sinvastatina hidroxí-ácida modo negativo (m/z 283,2540) e padrão interno 4-metoxicumarina modo positivo (m/z 177,0543) e modo negativo (m/z 212,1745).

4.5.2.2 CLAE acoplado ao Detector de Aerossol Carregado (CAD)

Foi desenvolvido o método de CLAE-CAD, cujo equipamento é caracterizado por possuir bomba, detector de aerossol carregado e um sistema de amostragem automático (auto sampler). Foi utilizada uma coluna cromatográfica da marca Agilent®, modelo Zorbax SB 50mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, contendo partículas do tamanho de 5,0 µm. Cabe mencionar que, todos os parâmetros de CLAE foram monitorados por software Chromeleon.

A fase móvel foi composta por Isopropranol, acetonitrila e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (Gradiente). Somente o tampão da fase móvel foi filtrado em membrana de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e poro de 0,45 µm. As condições cromatográficas adotadas foram: fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min; temperatura do forno de 30 °C e injeção de 40 µL de cada amostra a ser quantificada. Tempo de Corrida de 10 minutos.

4.5.3. Preparo das soluções padrão para a construção da curva analítica, exatidão e amostras de controle de qualidade

4.5.3.1. Solução Padrão de Ezetimiba e Sinvastatina -Curva Calibração

Preparo da solução padrão estoque de Ezetimiba, foi pesado analiticamente em uma balança analítica da marca Mettler modelo XS205, 5 mg de Ezetimiba (padrão secundário 99,8%) em um balão volumétrico de capacidade de 50 mL. Utilizou-se

cerca de 25 mL de metanol grau HPLC para a solubilização do ezetimiba, onde houve agitação no banho ultrassônico para facilitar a completa dissolução do ezetimiba e a solução final foi avolumada até o menisco com o uso de água ultrapura (Concentração de Ezetimiba = $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$)

Preparo da solução padrão estoque de Sinvastatina, foi pesado analiticamente em uma balança analítica da marca Mettler modelo XS205, 5 mg de Sinvastatina (padrão secundário 99,0%) em um balão volumétrico de capacidade de 50 mL. Utilizou-se cerca de 25 mL de metanol grau HPLC para a solubilização da sinvastatina, onde houve agitação no banho ultrassônico para facilitar a completa dissolução da sinvastatina e a solução final foi avolumada até o menisco com o uso de água ultrapura. (Concentração de Sinvastatina = $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$).

Preparo da solução padrão interno estoque de 4-methoxy coumarin, foi pesado analiticamente em uma balança analítica da marca Mettler modelo XS 205, 5 mg de 4-methoxy coumarin, em um balão volumétrico de capacidade de 50 mL. Utilizou-se cerca de 25 mL de metanol grau HPLC para a solubilização da 4-metoxi-cumarina, onde houve agitação no banho ultrassônico para facilitar a completa dissolução e a solução final foi avolumada até o menisco com o uso de água ultrapura (Concentração = $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$). Esta solução de padrão interno foi utilizada para a análise com detector de espectrômetro de massas e detector de aerossol carregado.

Foram transferidos volumetricamente 10 mL da solução padrão estoque de ezetimiba para um balão volumétrico de capacidade de 100 mL. A esta solução, foram adicionados volumetricamente 5 mL da solução padrão estoque de sinvastatina e 0,5 mL da solução de padrão interno. Esta solução foi completada o volume até o menisco com o uso de uma solução metanol e água na proporção de 50:50 (v/v). (Concentração de Ezetimiba = $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, Concentração de Sinvastatina = $5.\mu\text{g.mL}^{-1}$ e Concentração de Padrão Interno = $0,5 \text{ }\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Para o preparo das concentrações da curva analítica, foram utilizados valores de concentrações para a Ezetimiba que estiveram dentro do intervalo de 15,00 a 100,00 ng.mL^{-1} e para a Sinvastatina foram utilizados valores de concentração que estiveram dentro do intervalo de 15,00 a 50,00 ng.mL^{-1} . Para isso, oito balões volumétricos de 100 mL foram separados e em cada um deles transferiu-se volumetricamente as soluções padrão estoque de Ezetimiba, Sinvastatina, Padrão Interno e Solução 5 mL de Tampão Acetato de Amônio 100 mM. E posteriormente, cada balão volumétrico foi avolumado até o menisco com uma solução metanol e água

na proporção de 50:50 (v/v), respectivamente (conforme detalhado na **Tabela 6**). Cada concentração foi injetada em triplicata.

Tabela 6 - Concentrações das soluções padrão de Ezetimiba e Sinvastatina.

Substâncias	Concentrações utilizadas (ng. mL ⁻¹)
Sinvastatina	15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50
Ezetimiba	15; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100
Padrão Interno	500

4.5.3.2 Solução Padrão de Ezetimiba Glucoronídeo e Sinvastatina Hidroxi-Ácida (Sal de Amônio) – Curva Analítica

Preparo da solução padrão estoque de Ezetimiba Glucoronídeo, utilizou-se a quantidade total contida no frasco fornecido pelo fabricante do padrão equivalente a 1 mg de Ezetimiba Glucoronídeo em um balão volumétrico de capacidade de 200 mL. Utilizou-se cerca de 100 mL de metanol HPLC. para a solubilização do ezetimiba glucoronídeo, onde houve agitação no banho ultrassônico para facilitar a completa dissolução do ezetimiba glucoronídeo e a solução final foi avolumada até o menisco com o uso de água ultrapura. (Concentração de Ezetimiba = 5,0 µg.mL⁻¹)

Preparo da solução padrão estoque de Sinvastatina Hidroxi-Ácida, utilizou-se a quantidade total contida no frasco fornecido pelo fabricante do padrão equivalente a 10 mg de Sal de Amônio Sinvastatina Hidroxi-Ácida em um balão volumétrico de capacidade de 200 mL. Utilizou-se cerca de 100 mL de metanol grau HPLC para a solubilização da sinvastatina hidroxi-ácida, onde houve agitação no banho ultrassônico para facilitar a completa dissolução da sinvastatina-hidroxi-ácida e a solução final foi avolumada até o menisco com o uso de água ultrapura. (Concentração de Sinvastatina = 50,0 µg. mL⁻¹). Foi diluído volumetricamente 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL. Completado com uma solução metanol e água na proporção de 50:50 (v/v) (Concentração de 500,0 ng. mL⁻¹).

Preparo da solução padrão interno, foi transferido volumetricamente 250 µL da solução padrao interno estoque (Concentração = 0,1 mg. mL⁻¹), para um balão

volumétrico de 100 mL. Completado com uma solução metanol e água na proporção de 50:50 (v/v) (Concentração de 250,0 ng. mL⁻¹).

Preparo das concentrações da curva analítica, foram utilizados valores de concentrações para o Ezetimiba Glucoronídeo de 0,5 a 200,0 ng.mL⁻¹ e para a Sinvastatina Hidroxi Ácida de 0,1 a 60,0 ng.mL⁻¹. Para isso, quatro balões volumétricos de 100 mL foram separados e quatro balões volumétricos de 10 mL, em cada um deles transferiu-se volumetricamente as soluções padrão estoque de Ezetimiba Glucoronídeo (5000,0 ng mL⁻¹), Sinvastatina Hidroxi Ácida (500,0 ng. mL⁻¹), Padrão Interno (250 ng mL⁻¹), nas quantidades que constam na tabela 7, e posteriormente, cada balão volumétrico foi avolumado até o menisco com uma solução de metanol e água (50:50), respectivamente (conforme detalhado na **Tabela 7**). Cada concentração foi injetada em triplicata.

Tabela 7 - Concentrações das soluções padrão de Ezetimiba Glucoronídeo e Sinvastatina Hidroxi Ácida

Substâncias	Concentrações utilizadas (ng.mL ⁻¹)
Sal de Amônio da Sinvastatina Hidroxi Ácida	0,2; 0,5; 2,5; 10; 30; 50; 60
Ezetimiba Glucoronídeo	0,5; 1,5; 5,0; 20; 50; 100; 200
Padrão Interno (4-metoxi-cumarina)	250

Barret et al, 2006, reportou um método sensível e linear para determinação simultânea de sinvastatina e sinvastatina hidroxi-ácida através de ionização por eletrospray e um espectrômetro de massa triplo quadrupolo equipado com uma interface de ESI, onde rodou no modo positivo e modo negativo, com um intervalo de 0,1-16ng.mL⁻¹. Em Munaga et al, 2016, o método foi validado em uma faixa de concentração de sinvastatina de 0,2-80 ng.mL⁻¹, sinvastatina hidroxi-ácida de 0,1-60 ng.mL⁻¹ e 0.05-15 ng.mL⁻¹ para ezetimiba.

Nirogi et al, 2007 cita o comparativo de alguns métodos para determinação de sinvastatina e sinvastatina hidroxi-ácida onde o limite de quantificação fica em torno de 0.05-0.1 ng. mL⁻¹, tanto para sinvastatina quanto para sinvastatina hidroxi-ácida.

Desta forma, adotamos a faixa de linearidade para sinvastatina hidróxi-ácida de 0,2-60 ng. mL⁻¹ considerando que a sinvastatina sofre hidrólise tanto em condições ácidas quanto básicas enquanto a sinvastatina ácida está sujeita a lactonização em pHs baixos.(NIROGI, et al, 2007).

Basha et al, 2007 obtém um limite de quantificação para a ezetimiba e a ezetimiba glucoronídeo de 0,02 µg. mL⁻¹. Já Bae et al, 2012 obtém uma curva de calibração na faixa de 0,075-20 ng. mL⁻¹ para a ezetimiba modificada e de 1-200 ng. mL⁻¹ para a ezetimiba total.

Guo et al, 2015 obtém uma curva de calibração na faixa de 0,1-20 ng. mL⁻¹ para a ezetimiba e de 0,5-200 ng. mL⁻¹ para ezetimiba glucoronídeo.

Considerando que durante a etapa de extração leva-se um tempo considerável para a preparação de amostra e corrida, podendo apresentar dificuldade de recuperação e estabilidade devido às diferenças de polaridades entre os dois analitos e seus respectivos metabólitos, estabelecemos os intervalos de 15-100 ng. mL⁻¹ para a ezetimiba e de 0,5-200 ng. mL⁻¹ para ezetimiba glucoronídeo.

As curvas analíticas foram preparadas com a contaminação da amostra de plasma (branco) com as concentrações de padrão acima descritas. Após a adição das soluções padrão, estas amostras foram submetidas ao procedimento de extração que está descrito no item **4.5.4**.

4.5.3.3 Solução Padrão de Ezetimiba, Ezetimiba Glucoronídeo, Sinvastatina e Sinvastatina Hidróxi-Ácida (Sal de Amônio) – Exatidão

Para o teste de exatidão, as amostras deverão ser preparadas utilizando-se o branco (plasma) com a adição dos padrões nas concentrações descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações das soluções padrão utilizadas no teste de Exatidão

Substâncias	Concentrações utilizadas (ng.mL ⁻¹)				
	LIQ	CQB	CQM	CQA	CQD
Sal de Amônio da Sinvastatina Hidroxi Ácida	0,2	0,5	30	50	60
Ezetimiba Gluconideo	0,5	1,5	50	150	200
Sinvastatina	15	20	35	45	50
Ezetimiba	15	30	50	80	100
Padrão Interno (4-metoxi-cumarina)	250				

4.5.4. Preparo das Amostras:

Após pesquisa na literatura, foram testados os métodos abaixo para extração dos fármacos e seus metabólitos em plasma:

- Extração com contaminação do plasma (branco) foi utilizado acetato de etila e logo após a extração líquido-líquido, o resíduo foi evaporado em estufa e ressuspendido em metanol e água (50:50), com ajustes de volumes utilizados;

- Extração líquido-líquido com contaminação do plasma (branco), foi utilizado acetonitrila e metanol em temperatura ambiente, com ajustes de volumes foi utilizados;

- Extração líquido-líquido com contaminação do plasma (branco), foi utilizado acetonitrila refrigerada e logo após centrifugação na velocidade máxima, com ajustes de volumes utilizados;

- Extração líquido-líquido com efeito **“salting out”** com contaminação do plasma (branco), utilizou-se acetonitrila refrigerada e solução tampão de acetato de amônio 100mM e logo após centrifugação na velocidade máxima e posterior resfriamento da amostra, com diferentes ajustes de volumes.

Após o descongelamento das amostras em temperatura ambiente, as amostras de plasma (branco) e plasma provenientes do estudo de pacientes hipercolesterolêmicos foram preparadas de acordo com os seguintes procedimentos:

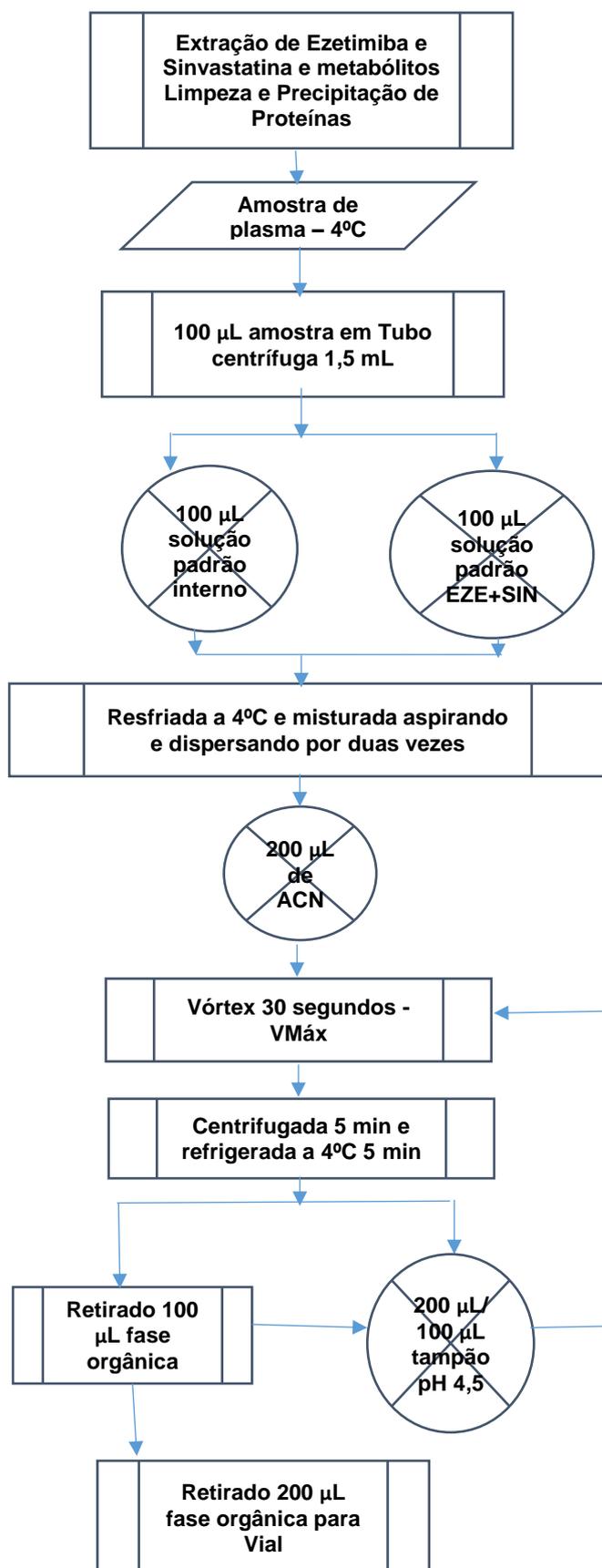


Figura 5 - Fluxograma de Extração das Amostras

Todas as amostras preparadas foram agitadas em agitador tipo *vórtex* e então, transferidas para recipientes adequados (*vials*) para posterior análise através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química dos padrões

5.1.1. Ponto de fusão:

Foi efetuado o teste de ponto de fusão, sendo encontrados os valores para o ezetimiba, em uma média de 164°C. Os valores que constam em The Merck Index, são de 164-166°C. Para a Sinvastatina, obtivemos os resultados em uma média de 136°C. De acordo no Merck Index, os valores de ponto de fusão são de 135 a 138°C. Foram realizadas 3 leituras de cada. Todos os resultados obtidos concordam com os encontrados na literatura para os compostos ezetimiba e sinvastatina, respectivamente (THE MERCK INDEX, 2006).

5.1.2. Análise Térmica:

Foram efetuados testes de calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria nas amostras de ezetimiba e sinvastatina, na condição de atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min e razão de aquecimento de 10°C/ min de 25 até 350°C para avaliação das diferenças de entalpias que possam caracterizar as alterações dos padrões.

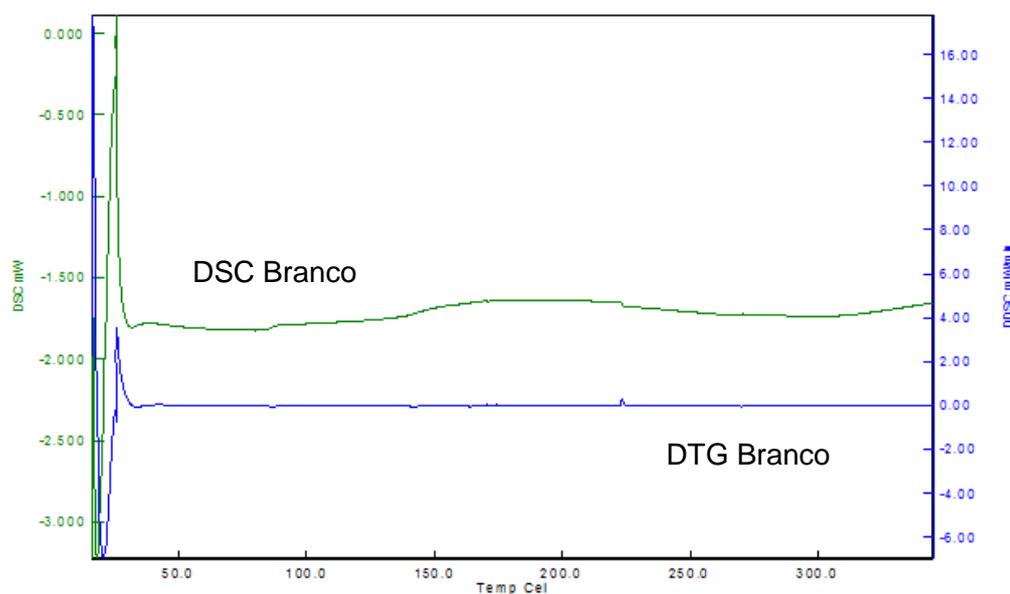


Figura 6 - Gráfico de Calorimetria Exploratória Diferencial do Branco.

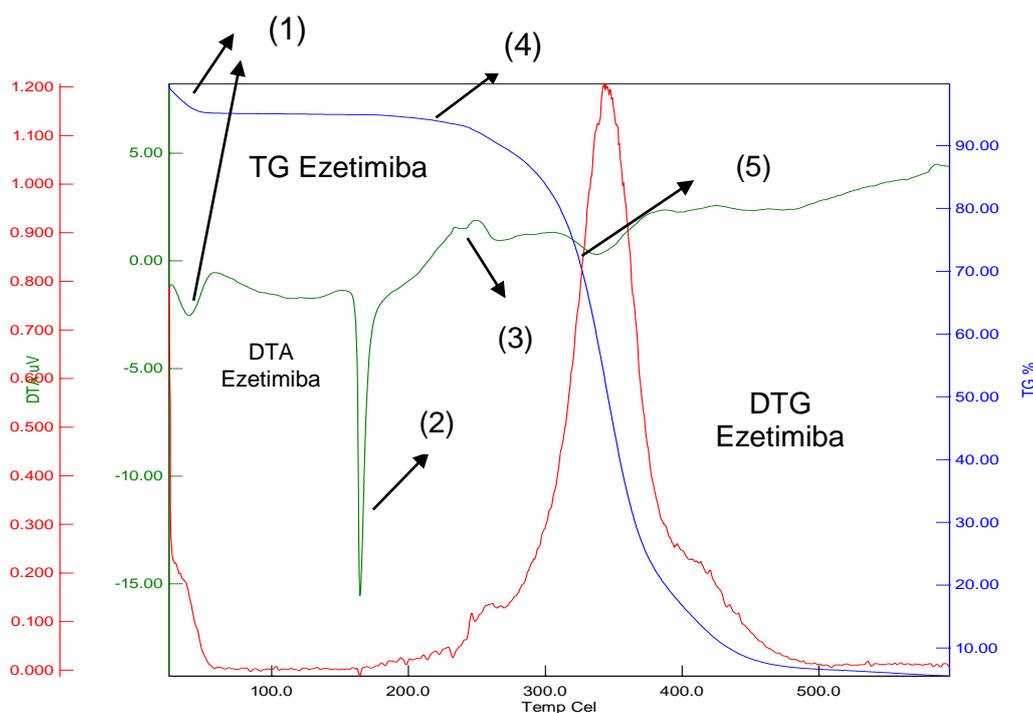


Figura 7 - Termograma da Ezetimiba.

A Figura 7 apresenta os termogramas de análise térmica diferencial do Ezetimiba nas taxas de aquecimento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para a realização dos experimentos de termogravimetria, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás $50\text{ mL}/\text{min}$.

Analisando as curvas apresentadas na Figura 6 observa-se que na curva TG a ezetimiba apresenta estabilidade térmica até temperatura de 250°C , embora observe-se uma pequena perda de massa de 5% em 90°C (1), devido à desidratação da amostra. Comprova-se este evento ao se observar a curva de derivada termogravimétrica DTA pelo pico correspondente a 50°C (1). Entre 90°C e 290°C a curva TG não evidencia perda de massa significativa, porém na curva derivada termogravimétrica DTA, observa-se um evento endotérmico com temperatura aproximada de 165°C (2), correspondendo ao ponto de fusão do ezetimiba, pois de acordo com o Merck Index, 2011, a faixa de fusão deste composto está entre $164 - 166^{\circ}\text{C}$. Após, este evento temos um evento exotérmico com temperatura aproximada de 250°C (3), devido a cristalização da ezetimiba e após a cristalização, inicia-se o processo de perda de massa (90%) em torno de 260°C (4). Em 350°C inicia-se a decomposição da ezetimiba (5), onde verifica-se novo evento endotérmico e crescente redução da massa até 0% na temperatura final de 500°C .

A avaliação da pureza por DSC pode ser realizada pelo acompanhamento da curva DSC, observando a presença dos eventos térmicos característicos do fármaco, ou determinar a pureza a partir do pico de fusão do analito (OLIVEIRA, et al, 2011). Ainda segundo Oliveira et al, quanto maior a concentração de impurezas na amostra, menor é o ponto de fusão e mais larga a faixa de fusão. Esta informação corrobora para os dados experimentais obtidos com a Ezetimiba, onde a substância de referência apresentou o ponto de fusão dentro da faixa descrita em compêndio oficial e o pico não apresentou um grande alargamento. Portanto, infere-se que a substância em análise tenha alto grau de pureza.

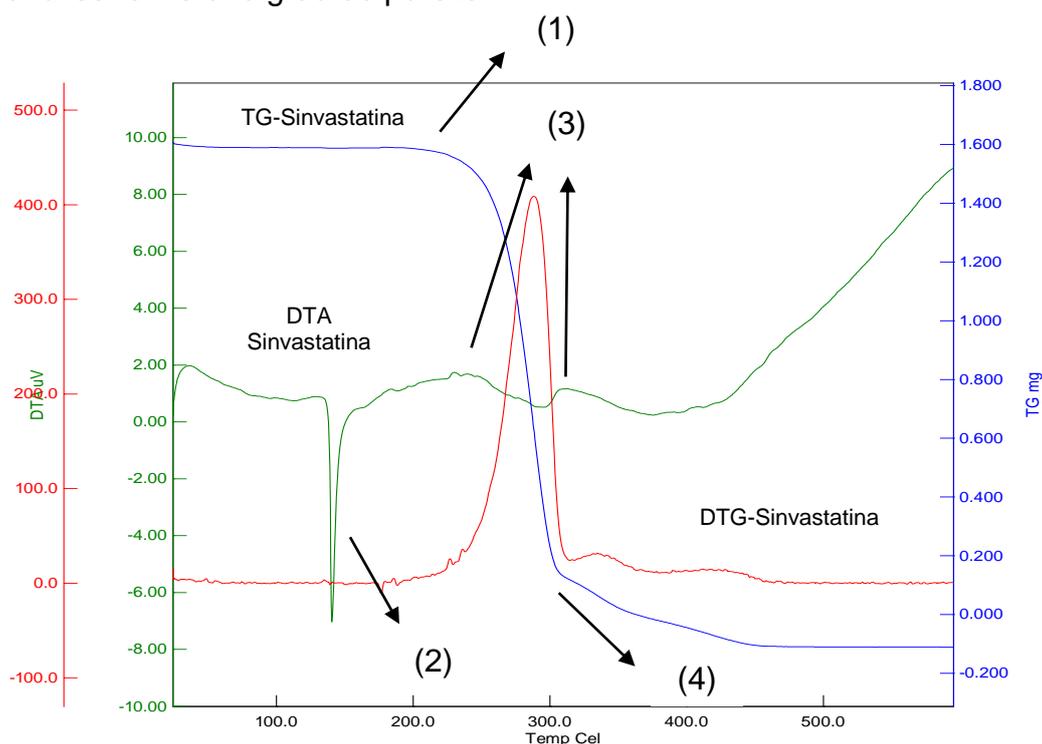


Figura 8 - Termograma da Sinvastatina.

A Figura 8 apresenta os termogramas de análise térmica da Sinvastatina nas taxas de aquecimento de 10°C/min para a realização dos experimentos de termogravimetria, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de gás 50 mL/min.

Analisando as curvas apresentadas na Figura 7 observa-se que na curva TG que a sinvastatina é termicamente estável até temperatura de 200°C (1).

Na curva DTA, observa-se um evento endotérmico com temperatura aproximada de 140°C (2), correspondendo ao ponto de fusão do ezetimiba, pois de acordo com o Merck Index, 2011, a faixa de fusão deste composto está entre 135 – 138°C. Rao e colaboradores, 2010 também efetuaram a análise térmica diferencial,

encontrando valores próximos ao obtido no experimento. Após, este evento temos um evento exotérmico com temperatura aproximada de 250°C e 310°C (3), devido a produtos de degradação da sinvastatina. Em 250°C inicia-se a decomposição da sinvastatina, onde verifica-se novo evento endotérmico e crescente redução da massa até 0% (4) na temperatura final de 350°C.

Desta forma, a partir dos dados experimentais obtidos com a Sinvastatina, onde a substância de referência apresentou o ponto de fusão dentro da faixa descrita em compêndio oficial e colaboradores e não muito alargada. Portanto, infere-se que a substância em análise tenha alto grau de pureza.

5.1.3. Espectroscopia de Infravermelho

Foram registrados os espectros de absorção infravermelho da ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, conforme seguem abaixo.

A molécula da ezetimiba possui dois grupamentos hidroxila (OH), um metileno (CH₂), um anel fluorofenil (anel em R1), azetidionona (anel em R2), anel hidroxifenil (R3) fluorofenil (R4), que caracterizam a substância e estão de acordo com a referência apresentada.

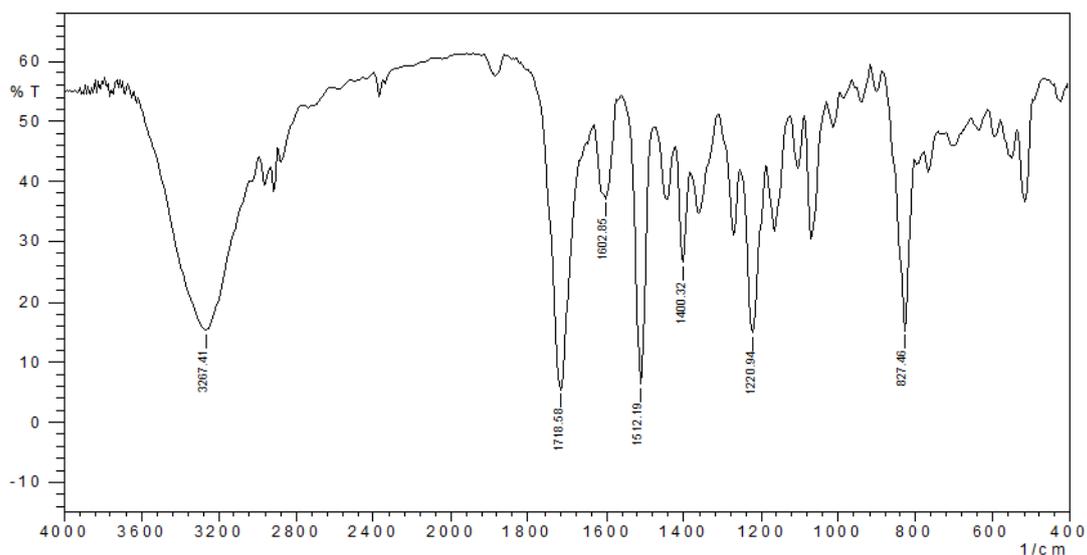


Figura 9 – Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão de ezetimiba (Equipamento Shimadzu FT-IR Modelo IRAffinity).

De acordo com a característica específica da molécula, para que ela demonstre absorção no infravermelho deve possuir momento dipolar elétrico que seja alterado durante a vibração. Desta forma, a espectroscopia de infravermelho se torna uma importante ferramenta para identificação e comparação entre substâncias que possuem os mesmos grupamentos orgânicos que são convertidos em energia de vibração molecular, tanto de alongamento como deflexão.

Os espectros de absorção na região do infravermelho do ezetimiba apresentam picos característicos conforme descritos em KUMARI et al, 2013: (Tabela 9).

Tabela 9 - Picos Característicos encontrados no Espectro de Absorção na região do infravermelho Espectro da Ezetimiba

Comprimento de Onda (cm-1)	Designação	Modo de Vibração
3435.5	O-H	Alongamento
2927.4	C-H Aromático	Alongamento
1729.1	-C=O	Alongamento
1511.9	C-C Aromático	Alongamento
1222.9	C-O	Alongamento
1101.9	C-F	Alongamento
832.3	C-H Aromático	Deflexão
1357.9	C-N	Alongamento

(KUMARI et al, 2013)

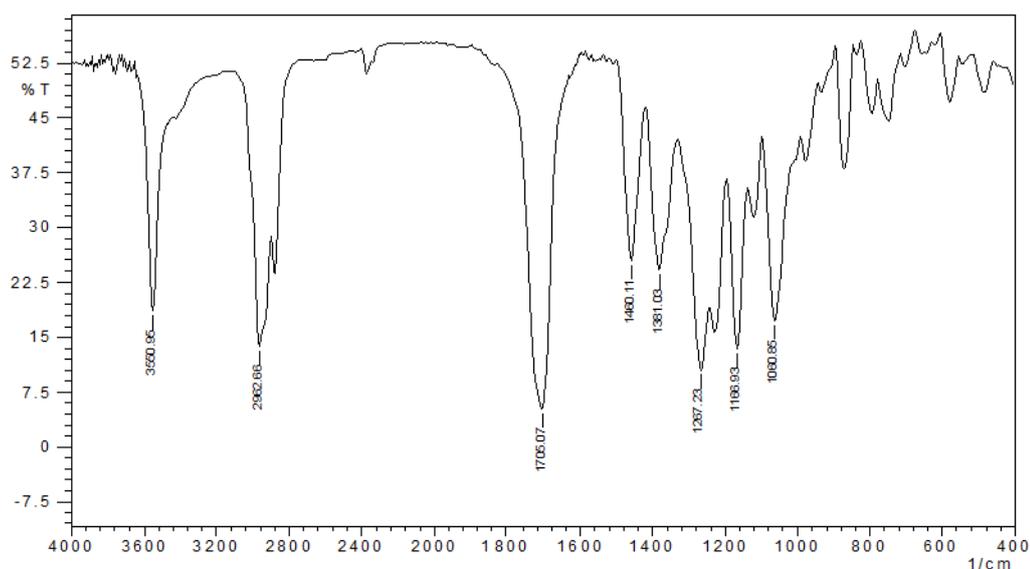


Figura 10 – Espectro de absorção na região do infravermelho do padrão de simvastatina (Equipamento Shimadzu FT-IR Modelo IRAffinity).

Tabela 10 - Picos Característicos encontradas no Espectro de Absorção na região do infravermelho Espectro da Simvastatina

Comprimento de Onda (cm-1)	Designação	Modo de Vibração
3547	O-H	Alongamento
2969	C-H	Alongamento
2959	C-H	Alongamento
2871	C-H Aromático	Alongamento
1724	C=O	Alongamento
1698	C=C Aromático	Alongamento
1459	C-H	Deflexão
1389	C-H	Deflexão
1267	-O-	Alongamento

(KUMARI et al, 2013).

Os picos de transmitância demonstrados no espectro de absorção na região do infravermelho da simvastatina experimental foram comparados com os picos apresentados

na Tabela e apresentaram similaridade, caracterizando a substância Sinvastatina. (Figura 10 e Tabela 10).

5.1.4. Ressonância Magnética Nuclear:

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear é empregada no estudo de estrutura de moléculas, da interação entre várias moléculas, da cinética ou dinâmica de moléculas e da composição de misturas ou compostos biológicos ou sintéticos.

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido deuterado e colocado no campo magnético do RMN. A amostra foi bombardeada com uma série de pulsos de radiofrequência e a absorção das ondas foi monitorada, os dados coletados e transformados em um espectro de RMN.

A escala σ fornece o deslocamento químico de dado núcleo e é independente da frequência operacional do espectrômetro de RMN. Existem valores aproximados de deslocamentos químicos para o RMN H1 e RMN C13.

Foi verificado em BRUS; JEGOROV, 2004 os deslocamentos químicos, que originam os picos pertencentes a estrutura da ezetimiba e sinvastatina tanto para RMN C13 quanto RMN H1. Estes dados foram comparados com os dados de deslocamentos obtidos experimentalmente conforme Figura 8 e 9 para Ezetimiba e 10 e 11 para Sinvastatina. Através desta comparação, podemos inferir que estamos trabalhando com as mesmas estruturas químicas citadas em BRUS; JEGOROV, 2004.

Tabela 11. Resultados da ressonância magnética nuclear ^{13}C de ezetimiba

Posição	Valores de ppm
1, 1'	127,4291 – 127,5330
2, 2'	115,5908 – 115,8916
3	71,0479
5	36,3294
6	24,4777
7	59,4122
8	59,6303
9, 9'	127,5330
10, 10'	115,5908 – 115,8916
12, 12'	118,1690 – 118,2734
13, 13'	114,4555 – 114,7349
14	156,4183 – 162,6245
15	134,0029
16	127,8810
17	157,4003
18	142,0756 – 142,1125
19	156,4183
20	167,3129

(BRUS; JEGOROV, 2004).

Tabela 12. Resultados da ressonância magnética nuclear ¹H de ezetimiba

Posição	Valores de ppm	Número de hidrogênios
1, 1'	7,2843 – 7,3034	2H
2, 2'	7,0799 – 7,0885	2H
3	4,3250 – 4,3588	1H
4	5,2525 – 5,2676	1H(OH)
5	1,7360	2H
6	1,0429 – 1,0895	2H
7	3,1740 – 3,1914	1H
8	4,8013	1H
9, 9'	7,199 – 7,2285	2H
10, 10'	6,7484 – 6,7765	2H
11	9,4945	1H(Ar-OH)
12, 12'	7,1392 – 7,1480	2H
13, 13'	7,0799 – 7,1185	2H

(BRUS; JEGOROV, 2004).

Tabela 13. Resultados da ressonância magnética nuclear ¹³C de sinvastatina

Posição	Valores de ppm	Posição	Valores de ppm
1	170,5829	13	37,0986
2	38,9914 – 40,8369	14	68,0578
3	61,7240	15	32,5750 – 32,9235
4	37,0986	16	27,1691
5	76,2782	17	128,6698
6	35,8190	18	177,0404
7	24,1283 – 24,8848	19	49,0438
8	37,0986	20	30,5705
9	28,9805	21	9,9045
10	133,4131	22/23	24,1283 – 24,8848
11	129,6025	24	23,2208
12	131,9467	25	14,3566

(BRUS; JEGOROV, 2004).

Tabela 14. Resultados da ressonância magnética nuclear 1H de sinvastatina

Posição	Valores de ppm	Número de hidrogênios
2	3,4096 – 3,4963	2H
2'	1,8041	1H(OH)
3	4,3346	1H
4	1,7603	2H
4'	0,8328	1H(OH)
5	4,1041	1H
6	0,7819	2H
7	1,4788	2H
8	1,6317	1H
9	3,1729 – 3,1904	2H
10	5,9886	1H
11	6,9566	1H
13	1,6317	1H
14	5,1593 – 5,1697	1H
15	2,3321	1H
16	2,3666	1H
17	5,5073	1H
20	1,2501	1H
21	0,7569	1H
22, 23	0,8065	2H, 3H

(BRUS & JEGOROV, 2004).

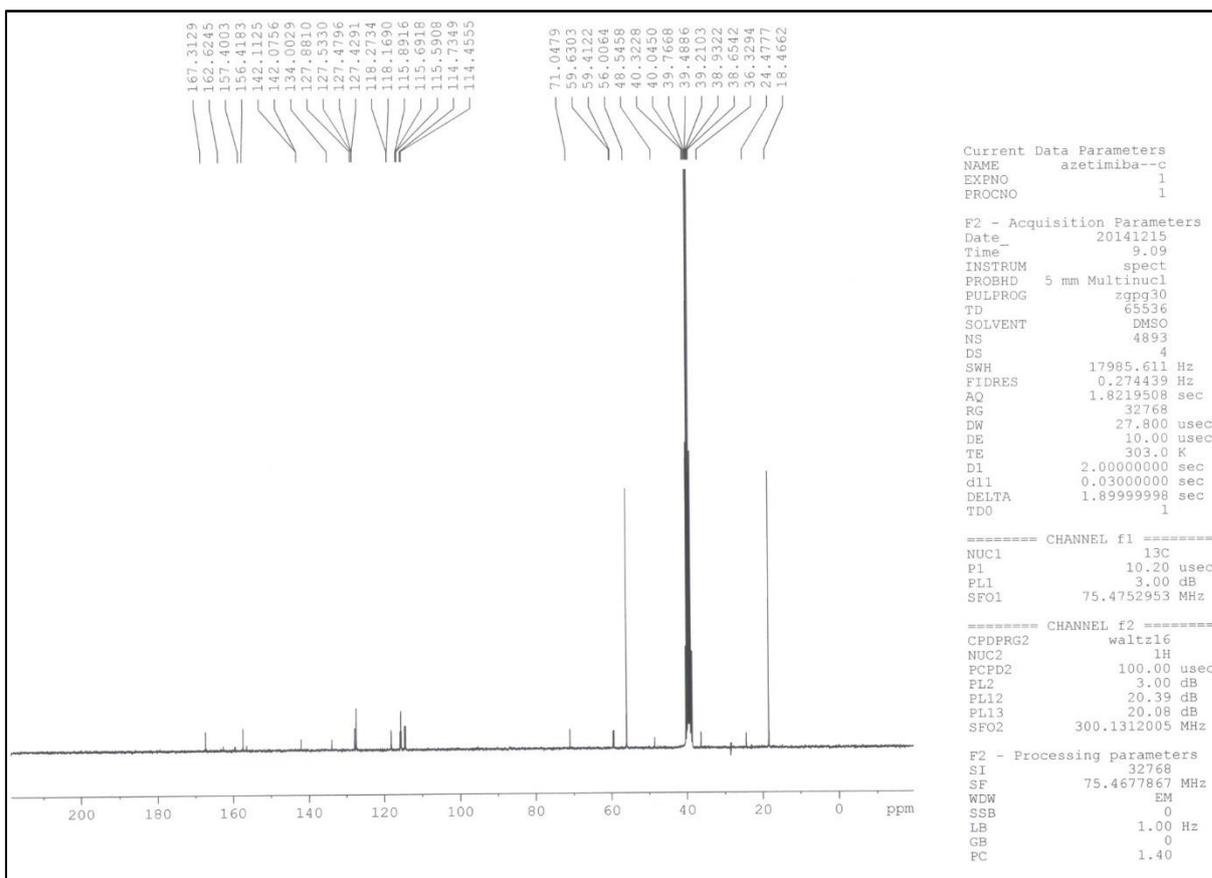


Figura 11. Espectro de RMN-13C de ezetimiba (RMN Bruker DPX-300, operando a 75 MHz para 13C).

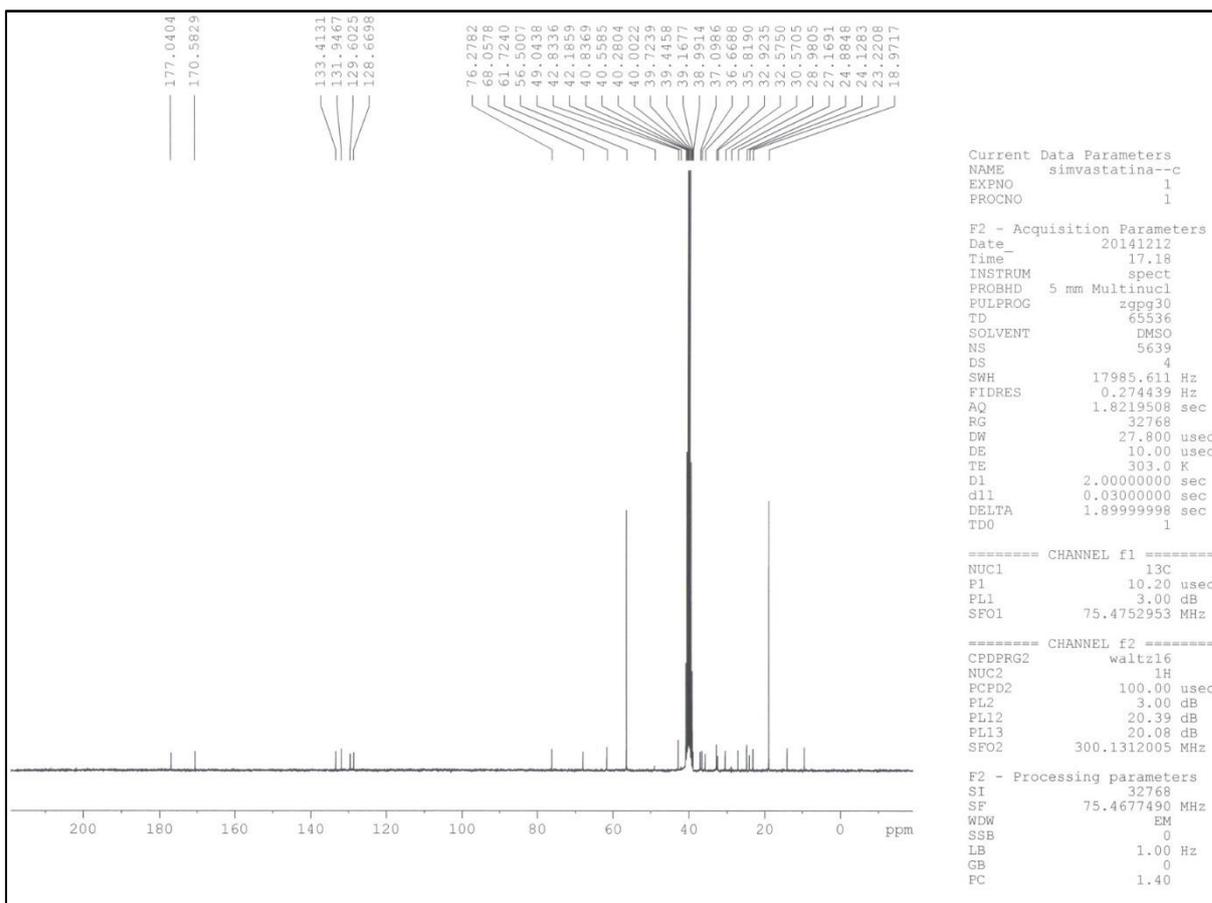


Figura 12. Espectro de RMN-13C de simvastatina (RMN Bruker DPX-300, operando a 75 MHz para 13C).

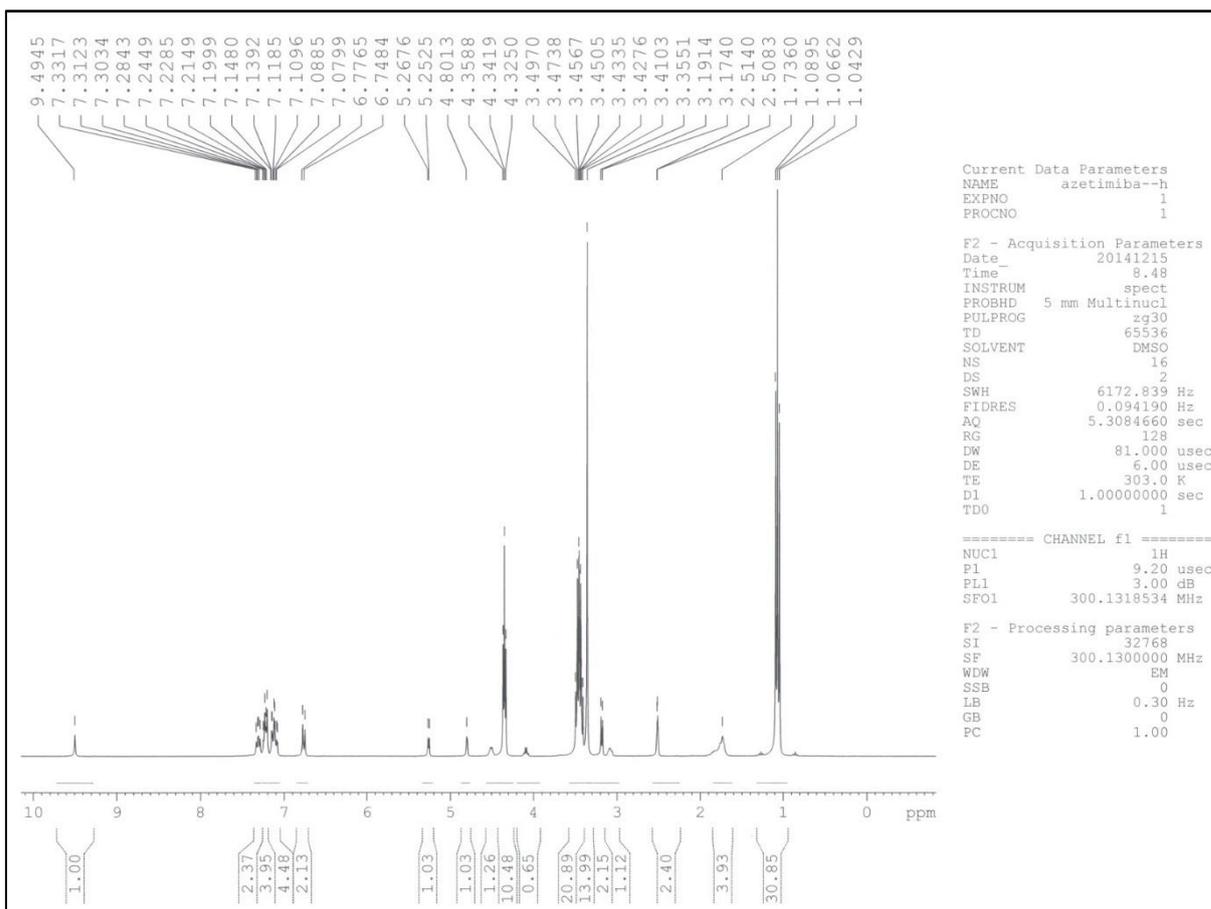


Figura 13. Espectro de RMN-1H de ezetimiba (RMN Bruker DPX-300, operando a 300 MHz para 1H).

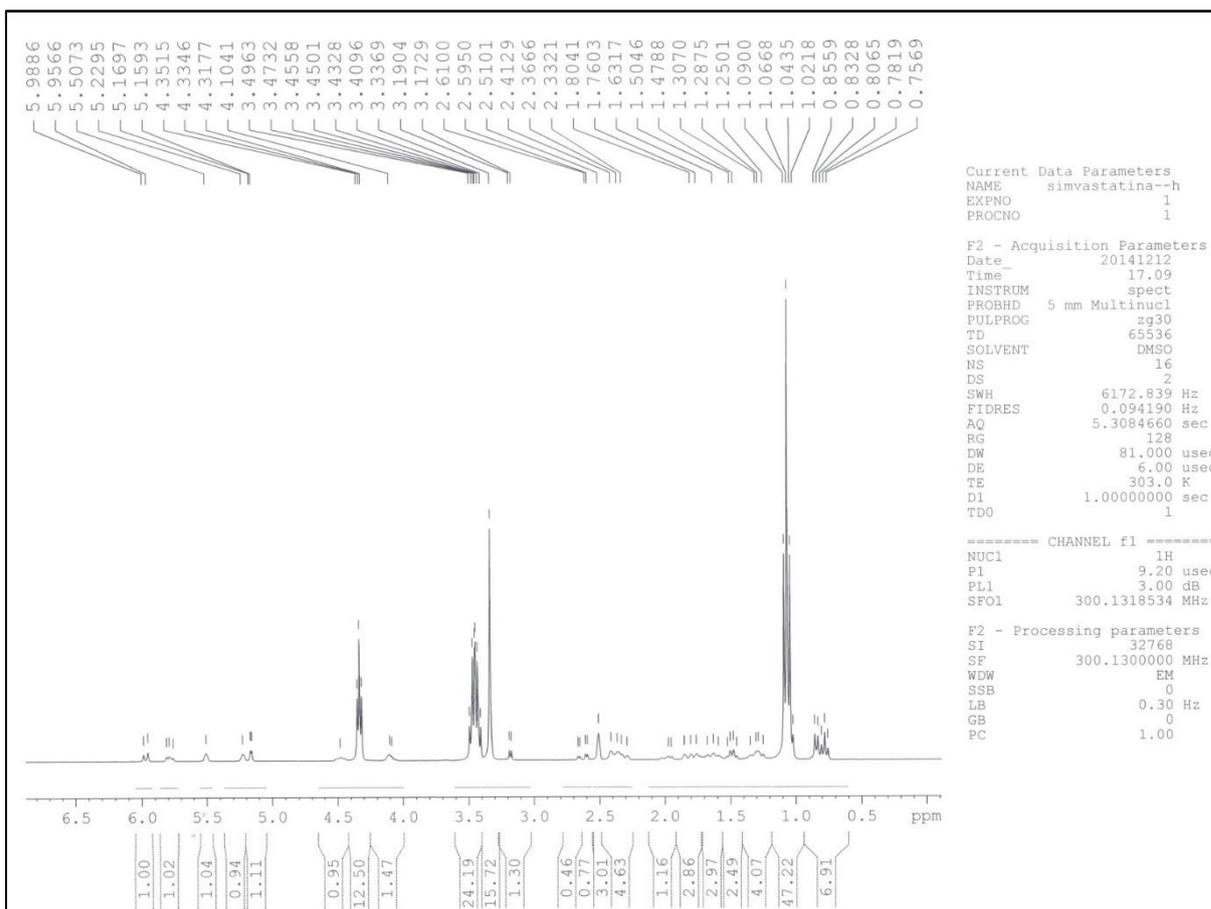


Figura 14. Espectro de RMN-1H de sinvastatina ((RMN Bruker DPX-300, operando a 300 MHz para 1H).

A comparação dos espectros obtidos com a referência citada, demonstram similaridade nos espectros de ressonância magnética nuclear caracterizando estruturalmente as substâncias analisadas ezetimiba e sinvastatina.

5.2. Desenvolvimento do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a identificação e quantificação da ezetimiba e sinvastatina.

5.2.1. Método por CLAE – acoplado ao detector de aerossol carregado

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de aerossol carregado não demonstrou resultados favoráveis devido às limitações que o método de extração apresentou face a polaridade dos ativos e a matriz biológica de plasma humano e à fase móvel que deve ser isenta de sal ou se

algum sal for utilizado, deverá ser dada preferencial para sais voláteis uma vez que a fase móvel entra na célula de aerossol e é vaporizada juntamente com a amostra.

Na figura 15 observa-se a fase inicial do desenvolvimento da metodologia utilizando-se fase estacionária, e fase móvel, próprias para fase reversa; e efetuando a análise em detector de fotoarranjo de diodos para verificação das condições de tempo de retenção de cada analito e amplitude de resposta.

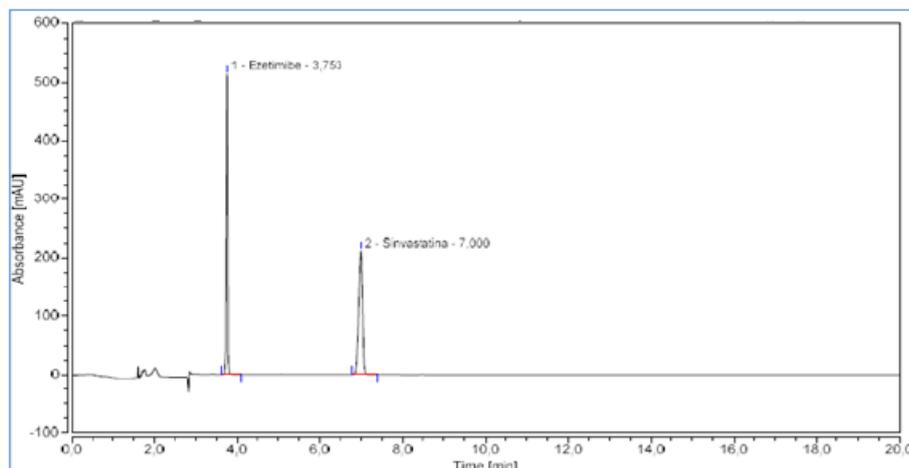


Figura 15 - Cromatograma da mistura das soluções dos padrões ezetimiba e sinvastatina 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 1. Condições: Fase Móvel: acetonitrila e água (60:40, v/v) – Isocrática. Coluna: Kinetex 2.6C 18 100A 100x4.6mm. Temperatura Coluna: 30°C. Volume Injeção: 20 μL . Temperatura do Amostrador: 5°C. Fluxo: 1,0 mL. min^{-1} . Detecção PDA $\lambda = 238 \text{ nm}$ (Sinvastatina) e $\lambda = 280 \text{ nm}$ (Ezetimiba).

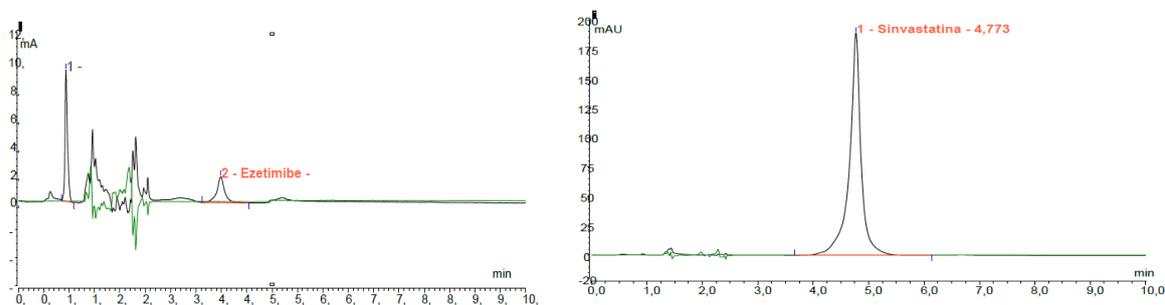


Figura 16 - Cromatograma da solução do padrão de ezetimiba em matriz de plasma (à esquerda) e sinvastatina (à direita) na concentração de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção 1: 1,5(LLE). Condições: Fase Móvel: acetonitrila e água (60:40, v/v) – Isocrática. Coluna: Kinetex 2.6C 18 100A 100x4.6mm. Temperatura Coluna: 30°C. Volume Injeção: 20 μL . Temperatura do Amostrador: 5°C. Fluxo: 1,0 mL. min^{-1} . Detecção PDA $\lambda = 238 \text{ nm}$ (Sinvastatina) e $\lambda = 280 \text{ nm}$ (Ezetimiba).

Na figura 16, observa-se que houve a seleção da fase estacionária e fase móvel, e, foi efetuado um teste da solução padrão de cada analito de interesse em plasma

humano utilizando o detector DAD. Porém, observamos que a ezetimiba apresentou uma resposta muito inferior em amplitude em relação a sinvastatina.

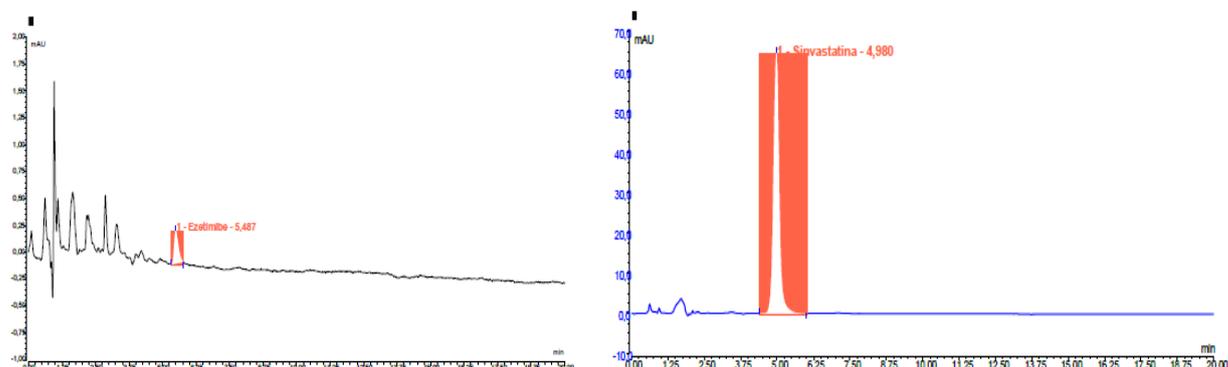


Figura 17 - Cromatograma da solução do padrão de ezetimiba (à esquerda) e sinvastatina (à direita) na concentração de 50,0 ng mL⁻¹. Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção 1: 1,5(LLE). Condições: Fase Móvel: acetonitrila e água (60:40, v/v) – Isocrática. Coluna: Kinetex 2.6C 18 100A 100x4.6mm. Temperatura Coluna: 30°C. Volume Injeção: 20µL. Temperatura do Amostrador: 5°C. Fluxo: 1,0 mL. min⁻¹. Detecção CAD. Temperatura do Nebulizador CAD: 30°C. Ganho CAD: 50 pA.

Após a seleção da fase estacionária e fase móvel, foi efetuado um teste da solução padrão de cada analito de interesse em plasma humano para verificação da sensibilidade do método utilizando o detector CAD. Acima, observamos que as respostas em detector CAD apresentaram amplitude reduzida, demonstrando dificuldade nesta faixa de concentração a ser trabalhada. Esta resposta reduzida deve-se a dificuldade de limpeza da amostra, uma vez que foi escolhido o método de extração líquido-líquido com acetonitrila refrigerada na proporção de 1,5 para 1,0 de plasma humano. Pode ser observada a amplitude dos sinais em CAD (figura 16) reproduziram a amplitude apresentada dos sinais em DAD (figura 15), comprovando a dificuldade de extração dos analitos e limpeza da matriz.

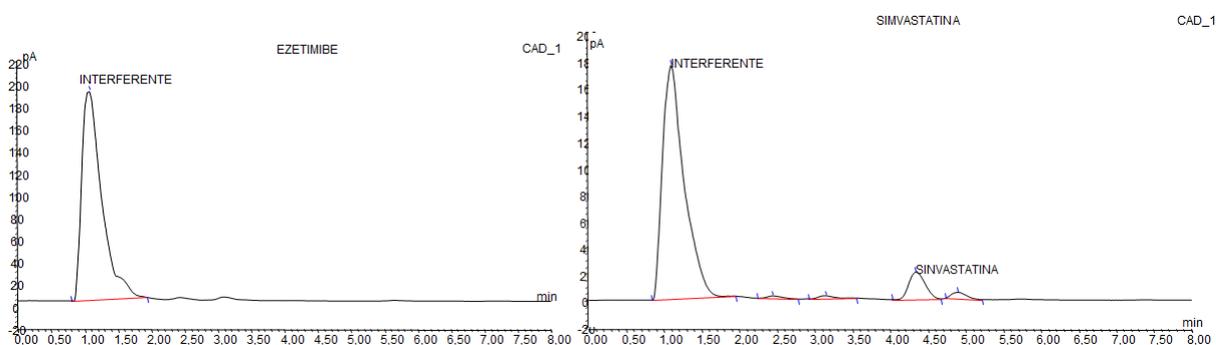


Figura 18 - Cromatograma da solução do padrão de ezetimiba (à esquerda) e sinvastatina (à direita) na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol: água (50:50 v/v) Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE). Condições: Fase Móvel: acetonitrila e ácido fórmico 0,1% em água (70:30, v/v) – Isocrática. Coluna: Zorbax XDB C 18 $5\mu\text{m}$ $50 \times 4.6\text{mm}$. Temperatura Coluna: 30°C . Volume Injeção: $40\mu\text{L}$. Temperatura do Amostrador: 5°C . Fluxo: $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Detecção CAD. Temperatura do Nebulizador CAD: 35°C . Ganho CAD: 100 pA.

Na figura 17, obteve-se uma baixa recuperação dos analitos, devido a este fato, verificou-se que o preparo das amostras focado no isolamento e limpeza e/ou preconcentração dos analitos de interesse das matrizes complexas biológicas são de extrema importância. Novakova et al 2013, cita que além de fosfolípidios, vários sais não voláteis ocasionam sérios efeitos matriz levando a resultados não exatos. Estes compostos interferentes são removidos em uma extensão maior ou menor durante a etapa de preparação de amostra para fazer com que os analitos estejam mais adequados para separação e detecção. Desta forma, a escolha da técnica de preparação da amostra, ou seja, a técnica de extração é crucial para precisão e exatidão dos dados obtidos, como os analitos estão sempre presentes em concentrações muito baixas, enquanto os compostos interferentes prevalecem. Desta forma, foi otimizado o método de extração dos analitos no plasma, utilizando o efeito **“salting out”** do tampão de acetato de amônio.

Na figura 18, observa-se que a sinvastatina apresenta uma resposta baixa no detector CAD e a ezetimiba não é detectada no CAD.

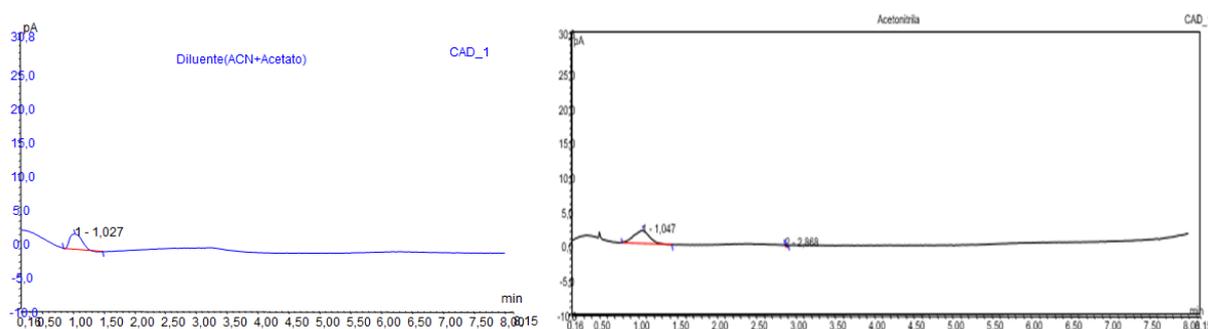


Figura 19 - Cromatograma da solução do diluente extratora (acetonitrila+tampão acetato de amônio) (à esquerda) e acetonitrila (à direita). Condições: Fase Móvel: acetonitrila e ácido fórmico 0,1% em água (70:30, v/v) – Isocrática. Coluna: Zorbax XDB C 18 $5\mu\text{m}$ $50 \times 4.6\text{mm}$. Temperatura Coluna: 30°C . Volume Injeção: $40\mu\text{L}$. Temperatura do Amostrador: 5°C . Fluxo: $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Detecção CAD. Temperatura do Nebulizador CAD: 35°C . Ganho CAD: 100 pA.

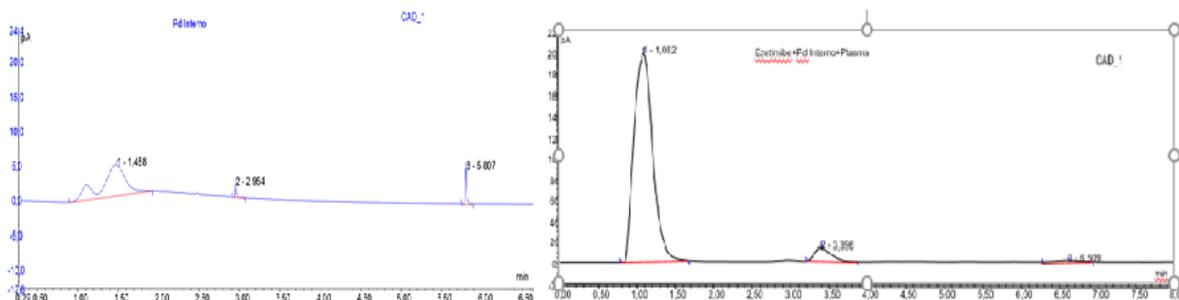


Figura 20 - Cromatogramas da solução padrão de 4-metoxi-cumarina (padrão interno) (à esquerda) e solução padrão de ezetimiba+padrão interno em plasma humano (à direita). Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE). Condições: Fase Móvel: acetonitrila e ácido fórmico 0,1% em água (70:30, v/v) – Isocrática. Coluna: Zorbax XDB C 18 5 μ m 50x4.6mm. Temperatura Coluna: 30°C. Volume Injeção: 40 μ L. Temperatura do Amostrador: 5°C. Fluxo: 0,6 mL. min⁻¹. Detecção CAD. Temperatura do Nebulizador CAD: 35°C. Ganho CAD: 100 pA.

Foi avaliada a possível interferência da solução padrão de 4-metoxi-cumarina (padrão interno) considerando o método de extração SALLE, observa-se em figura 19 a não interferência desta substância utilizada como padrão interno, embora saia próximo da acetonitrila que é utilizada como um dos compostos de extração.

Foi preparada uma solução padrão da ezetimiba+padrão interno em plasma pra verificar possíveis interferências. Observou-se a interferência do agente extrator acetonitrila junto ao padrão interno. Porém como este será utilizado como fator de correção, não foi necessária a correção desta interferência.

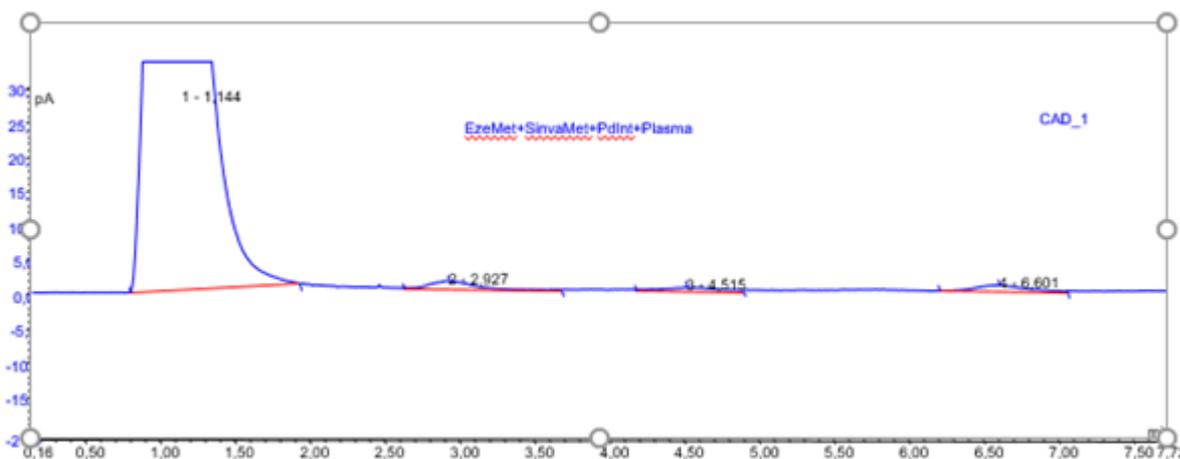


Figura 21 - Cromatograma da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em plasma humano (à direita). Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE). Condições: Fase Móvel: acetonitrila e ácido fórmico 0,1% em água (70:30, v/v) – Isocrática. Coluna: Zorbax XDB C 18 5 μ m 50x4.6mm. Temperatura Coluna: 30°C. Volume

Injeção: 40µL. Temperatura do Amostrador: 5°C. Fluxo: 0,6 mL. min⁻¹. Detecção CAD. Temperatura do Nebulizador CAD: 35°C. Ganho CAD: 50 pA.

Evidencia-se na figura 21, a identificação da ezetimiba e sinvastatina, porém não se observa a identificação do padrão interno devido a interferência da acetonitrila.

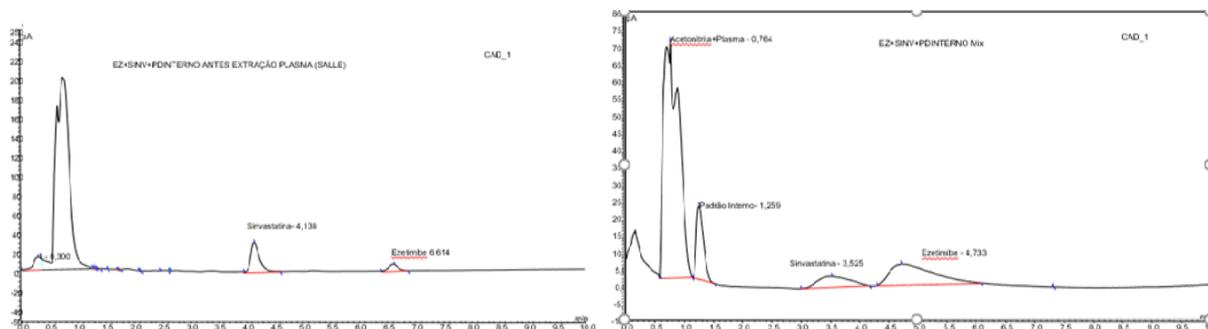


Figura 22 - Cromatogramas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em plasma humano adicionados antes da extração e limpeza do plasma (à esquerda) e adicionados após a extração e limpeza do plasma (direita). Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE). Condições: Fase Móvel: isopropanol; acetonitrila e tampão acetato de amônio 30 mM pH 4,5. – Gradiente. Coluna: Zorbax XDB C 18 5µm 50x4.6mm. Temperatura Coluna: 30°C. Volume Injeção: 40µL. Temperatura do Amostrador: 5°C. Fluxo: 0,6 mL. min⁻¹. Detecção CAD. Temperatura do Nebulizador CAD: 35°C. Ganho CAD: 100 pA.

Na figura 22, adotou-se uma nova composição de fase móvel para otimizar a separação e identificação das substâncias, composta de isopropanol: acetonitrila: tampão acetato de amônio 30 mM pH 4,5 no modo gradiente, o que se comprovou através dos cromatogramas. Embora tenha sido otimizada a identificação, a separação não apresentou resultados eficientes uma vez que os picos de ezetimiba e sinvastatina (na figura à direita) apresentaram-se quase adjacentes.

É conhecido que a viscosidade da fase móvel é importante para a separação, porque pode afetar tanto o nebulizador quanto o processo de secagem. Baixa viscosidade de fases móveis (elevada concentração de orgânico) produzem um número maior de gotículas de geração de partículas sendo mais eficiente que os de alta viscosidade (ou seja, aquoso), aumentando a resposta do detector e sensibilidade. Além disso, com fases móveis de baixa viscosidade, mais analito está disponível para a detecção; com fases aquosas maior quantidade de analito vai para o descarte, o que afeta a sensibilidade do método.

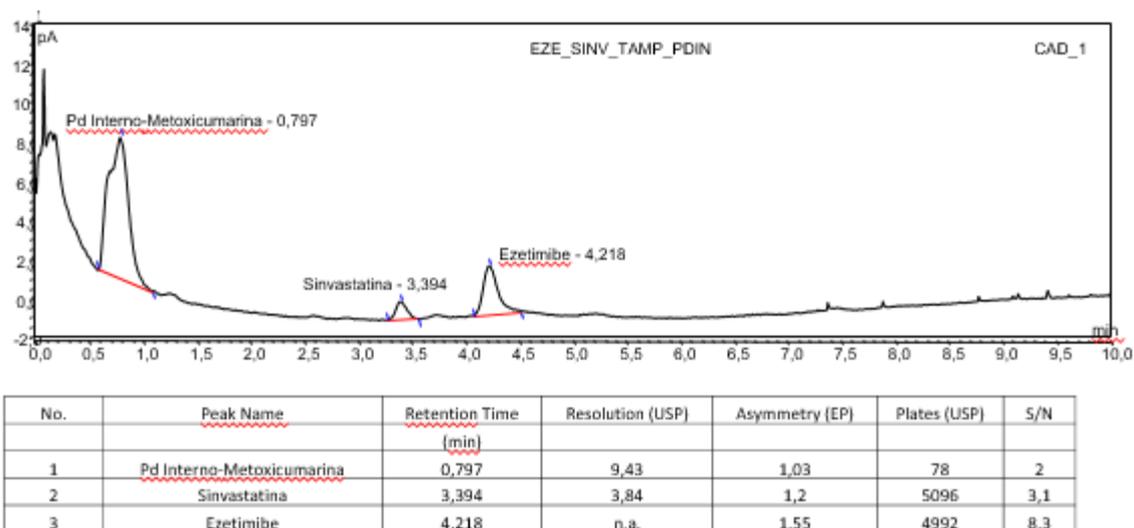


Figura 23 - Cromatograma da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em plasma humano adicionados antes da extração e limpeza do plasma. Método Extração: Acetonitrila Refrigerada proporção e tampão acetato de amônio 100 mM pH 4,5 (SALLE). Condições: Fase Móvel: isopropanol; acetonitrila e tampão acetato de amônio 30 mM pH 4,5. – Gradiente. Coluna: Zorbax XDB C 18 5µm 50x4.6mm. Temperatura Coluna: 30°C. Volume Injeção: 40µL. Temperatura do Amostrador: 5°C. Fluxo: 0,6 mL. min⁻¹. Detecção CAD. Temperatura do Nebulizador CAD: 35°C. Ganho CAD: 100 pA.

Foi efetuada uma otimização dos parâmetros do CAD aumentando-se o ganho para 100 pA conforme indicado na figura 20. Verifica-se um aumento do tamanho da área dos picos melhorando sua identificação, porém o nível de sinal ruído S/N permanece inferior a 10. Desta forma, nestas condições é inviável o método para quantificação dos analitos, pois conforme preconizado em normas da legislação brasileira e da farmacopeia americana o nível de sinal ruído mínimo para quantificação é de 10.

O comparativo dos métodos desenvolvidos encontram-se no Anexo **XXX**.

5.2.2. Método por CLAE – acoplado ao espectrômetro de massas QTOF (MS)

Durante o desenvolvimento do método por CLAE-MS, a fonte de ionização escolhida foi Eletro Spray Ionization Dual Jet Stream devido ao baixo peso molecular da ezetimiba e sinvastatina. A escolha da coluna foi feita levando-se em conta a matriz biológica e o tempo gasto nas corridas, portanto foi utilizada uma coluna Agilent Poroshell EC C18 50mmx2,1mm, 7 µm.

É recomendável a utilização do modo isocrático devido as muitas variáveis a serem otimizadas e também avaliadas com a detecção por espectrometria de massas.

Entre os parâmetros que foram avaliados para escolha da fase móvel, consideramos o fator de capacidade e resolução entre picos, o volume de injeção – devido a limitação da quantidade por se tratar de uma amostra biológica, sensibilidade do método e o tempo de corrida.

O modo de ionização por EletroSpray (ESI) foi escolhido a partir dos grupamentos e pKas que cada molécula apresentou, sendo assim a ezetimiba, a ezetimiba glucoronídeo e sinvastatina considerados ácidos fortes, e, portanto, com bases conjugadas fracas. Isto implica obrigatoriamente na protonação dos mesmos e aquisição de cargas positivas quando analisados no modo ESI positivo. Analogamente a sinvastatina hidroxí-ácida é uma base forte e, portanto, seu ácido conjugado é fraco. Desta forma, o ideal é trabalhar com esta última no modo ESI negativo.

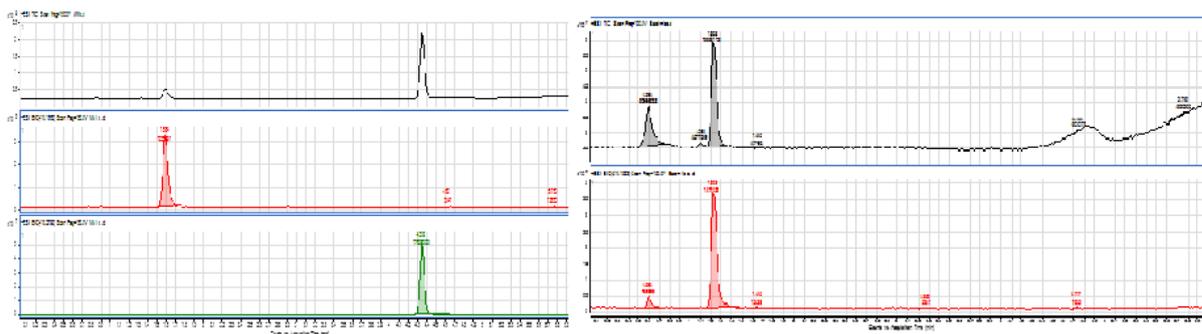


Figura 24 – Espectro de massas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina+padrão interno em metanol: água (50:50 v/v). Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (20:80 v/v) (à esquerda) e Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila (50:50 v/v) (à direita). Coluna: Poroshell EC C 18 7 μ m 50x2.1mm. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção: 10 μ L. Temperatura do Amostrador: 15°C. Fluxo: 0,7 mL. min⁻¹. Tempo de Corrida: 8 min+3 post run. ESI Modo Positivo.

Na figura 24, foi efetuado um teste de varredura no espectrômetro de massas (QTOF) para verificar a habilidade de separação dos compostos em um mesmo modo de ionização. Foi verificada a separação das duas moléculas (ezetimiba e sinvastatina) e padrão interno utilizando-se o modo positivo de ionização.

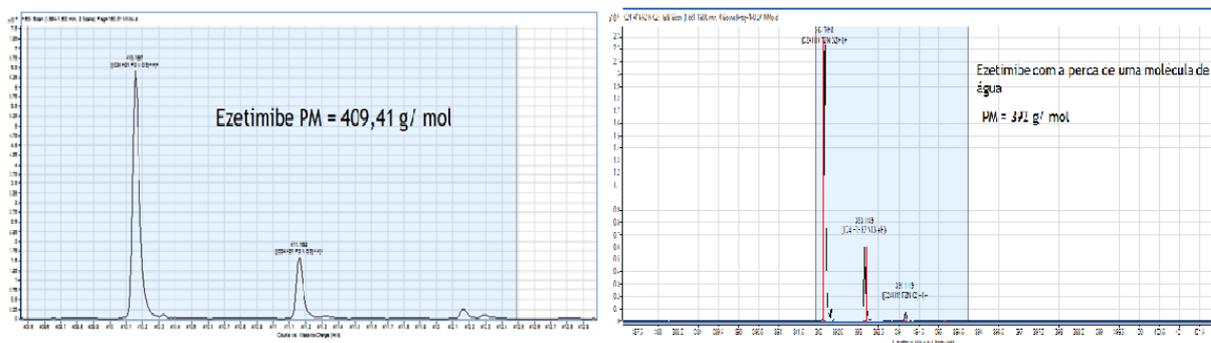


Figura 25 – Verificação da Distribuição Isotópica da Ezetimiba (à esquerda) e Verificação de formação de adutos e percas de moléculas (à direita). Espectro de massas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina concentração $100,0 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em fase móvel. Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (20:80 v/v). Coluna: Poroshell EC C 18 $7\mu\text{m}$ $50 \times 2,1\text{mm}$. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção: $10\mu\text{L}$. Temperatura do Amostrador: 15°C . Fluxo: $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Tempo de Corrida: 8 min+3 post run. ESI Modo Positivo.

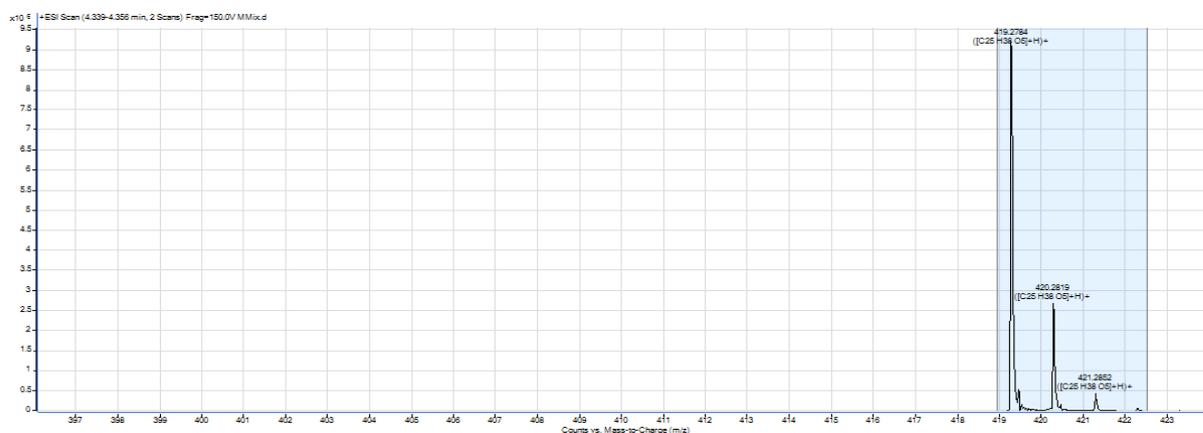


Figura 26 – Verificação da Distribuição Isotópica da Sinvastatina. Espectro de massas da solução padrão de ezetimiba+sinvastatina concentração $100,0 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em fase móvel. Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (50:50 v/v). Coluna: Poroshell EC C 18 $7\mu\text{m}$ $50 \times 2,1\text{mm}$. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção: $10\mu\text{L}$. Temperatura do Amostrador: 15°C . Fluxo: $0,7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Tempo de Corrida: 8 min+3 post run. ESI Modo Positivo.

A abundância isotópica de um elemento indica a abundância relativa de cada um de seus isótopos, desta forma a distribuição de abundância isotópica comprova qual elemento está sendo identificado através dos picos e padrões isotópicos. Na figura 22 e 23, verifica-se a distribuição isotópica da ezetimiba e sinvastatina nas condições de análise acima descritas.

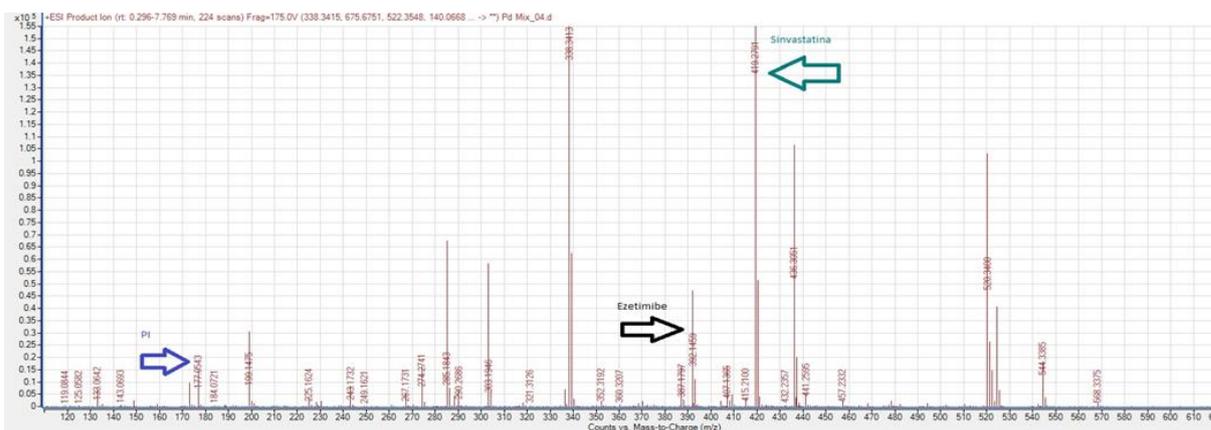


Figura 27 – Espectro de massas da solução padrão da ezetimiba+sinvastatina+padrão interno concentração 100,0 ng/ mL⁻¹ em fase móvel. Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (50:50 v/v). Coluna: Poroshell EC C 18 7µm 50x2.1mm. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção: 10µL. Temperatura do Amostrador: 15°C. Fluxo: 0,7 mL. min⁻¹. Tempo de Corrida: 6 min+4 post run. ESI Modo Positivo. Condições de otimização para fragmentação: Charging/Nozzle Voltage, 1000 Volts, Corona, 73,2 uA, Drying Gas, 8,0, l/ min, Temp. 300C, Nebulizer, 35 psig, Ion Polarity, 1,0 “0=Positive, 1=Negative”.

5.3. Validação do método cromatográfico para a determinação simultânea de Ezetimiba e Sinvastatina

5.3.1. Efeito Residual

Foram ser realizadas, 3 (três) injeções da mesma amostra de plasma (branco), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas de maior concentração do analito na curva analítica preparada na matriz.

Não foram observados picos interferentes no tempo de retenção dos analitos, e portanto, o resultado foi considerado inferior a 20% da resposta do analito nas amostras.

Não foram observados picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno, portanto considerou-se o resultado inferior a 5% (cinco por cento) da resposta do padrão interno.

5.3.2. Efeito Matriz

Foram analisadas amostras de matrizes biológicas processadas e adicionadas de analitos e padrão interno, e soluções preparadas nas concentrações médias de Controle de Qualidade. Não foram dispostas amostras de lipêmicas ou hemolisadas, sendo analisadas ao total 8 (oito) amostras normais.

Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por Padrão Interno (FMN), conforme a fórmula a seguir:(ANVISA, 2012). A fim de demonstrar que a performance da identificação e quantificação é independente da matriz, amostras em concentrações similares a baixa concentração de controle de qualidade (CQB) foram preparadas usando três lotes diferentes de matriz. A avaliação da concentração das amostras foi medida usando a curva de calibração da linearidade.

Foi obtida uma média de 8,51% de coeficiente de variação dos FMNs relativos as amostras. Nenhum valor esteve acima de 15%.

5.3.3. Especificidade/ Seletividade

A especificidade ou seletividade como parâmetro de validação em um ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando um detector de espectrômetro de massas, composto por um quadrupolo acoplado a um tempo de vôo, é dependente do tipo de fonte que seja utilizado e o modo em que opera.

Para avaliação da especificidade, foram feitas algumas análises de amostra de plasma branco contaminada com os analitos e metabólitos, em modo positivo e negativo de ionização por eletrospray.

Também foi feito um estudo das amostras de pacientes submetidos ao processo de extração “salting out” e avaliado nos modos positivo e negativo frente aos analitos e metabólitos.

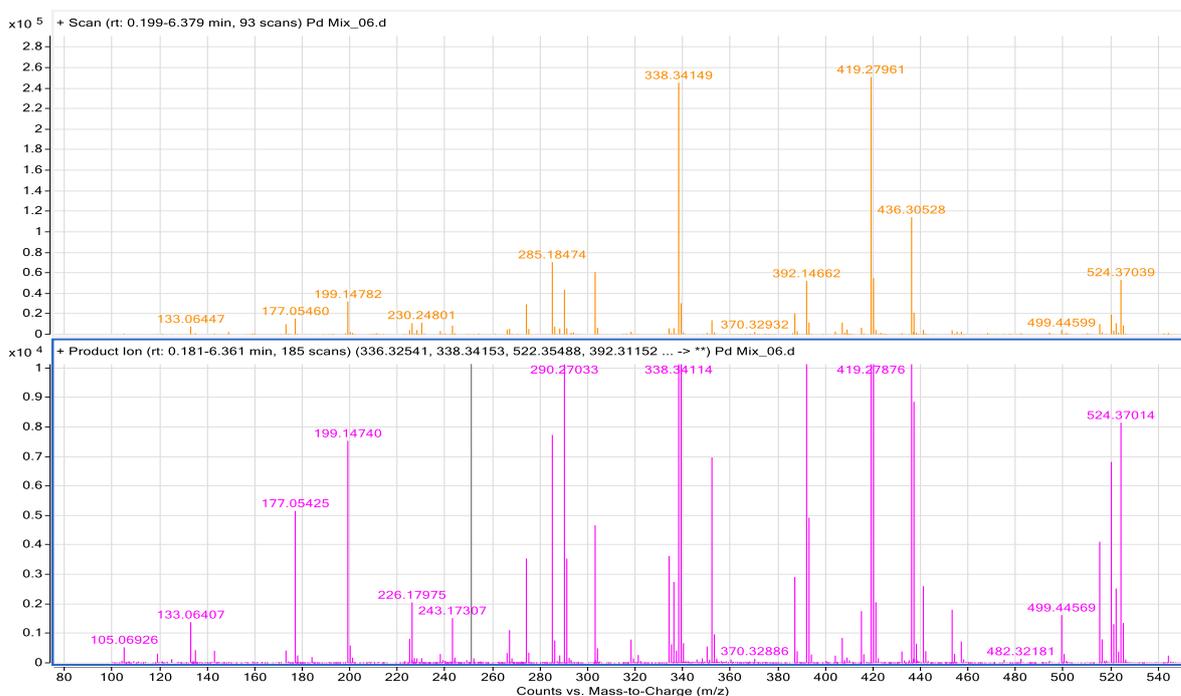


Figura 28 – Espectro de massas da amostra de plasma branco contaminada com uma solução padrão da ezetimiba+simvastatina+padrão interno concentração 100,0 ng/ mL⁻¹ em fase móvel. Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (50:50 v/v). Coluna: Poroshell EC C 18 7µm 50x2.1mm. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção: 10µL. Temperatura do Amostrador: 15°C. Fluxo: 0,7 mL. min⁻¹. Tempo de Corrida: 6 min+4 post run. ESI Modo Positivo. Condições de otimização para fragmentação: Charging/Nozzle Voltage, 1000 Volts, Corona, 73,2 uA, Drying Gas, 8,0, l/ min, Temp. 300C, Nebulizer, 35 psig, Ion Polarity, 1,0 “0=Positive, 1=Negative”.

Na figura 28 observamos o espectro de massas obtido da solução contendo o plasma contaminado com a solução de ezetimiba, simvastatina e padrão interno. Na figura 29, observamos o detalhe do espectro na forma de scan e product ion para verificação dos fragmentos frente às condições de análise.

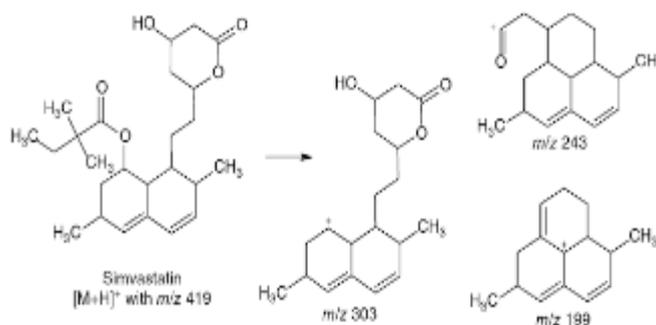


Figura 29 – Esquema proposto de fragmentação da Simvastatina m/z 419,27961 > 199,14740 Modo ESI +

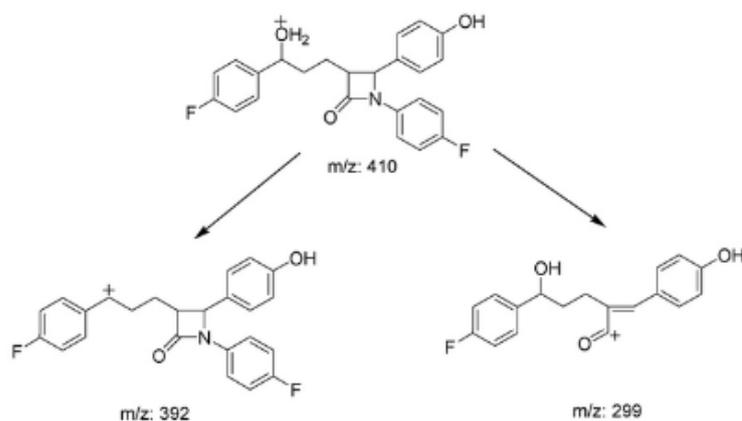


Figura 30 – Esquema proposto de fragmentação da Ezetimiba m/z 407,13722>392,14662 Modo ESI +

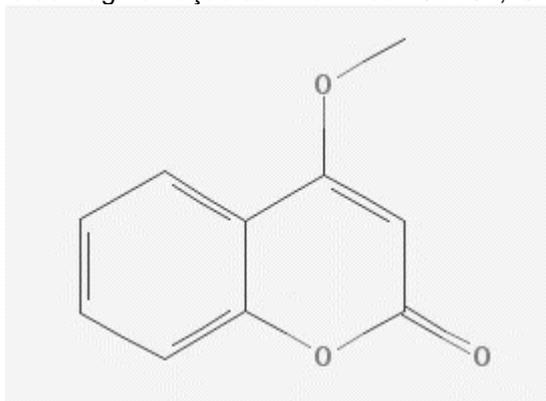


Figura 31 – Esquema proposto de fragmentação da 4-methoxy-coumarin m/z 177,06460>133,06407 Modo ESI +

Nas figuras 29 30 e 31, observamos as estruturas moleculares envolvidas no mecanismo de fragmentação proposto e a estrutura do fragmento utilizado para quantificação.

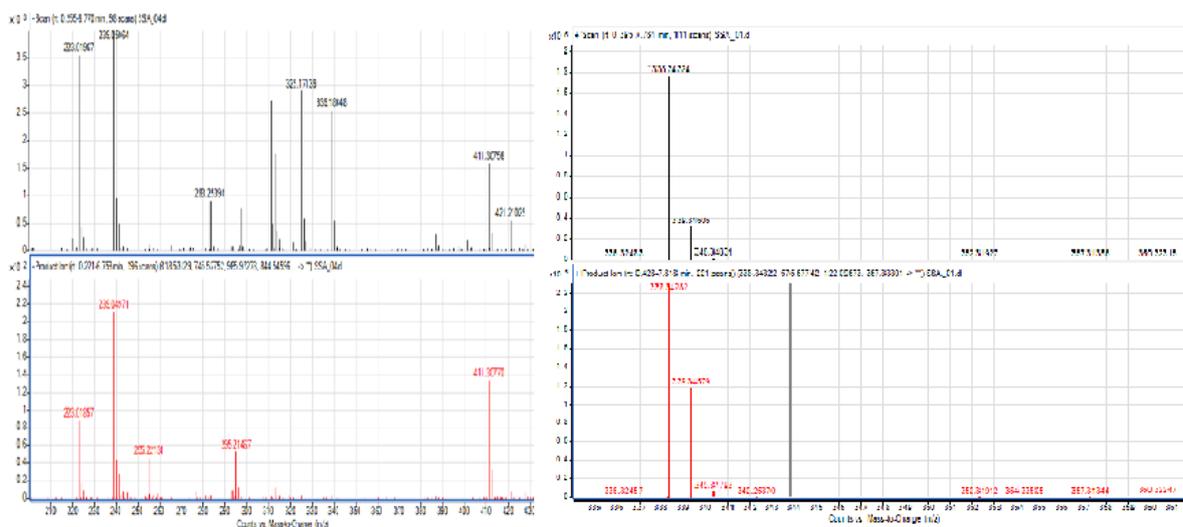


Figura 32 – Espectro de massas da amostra de plasma branco contaminada com uma solução padrão da simvastatina hidroxi-ácida na concentração $100,0 \text{ ng/mL}^{-1}$ em fase móvel Modo ESI – (à esquerda) e Modo ESI + (à direita). Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (50:50)

v/v). Coluna: Poroshell EC C 18 7 μ m 50x2.1mm. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção: 10 μ L. Temperatura do Amostrador: 15°C. Fluxo: 0,7 mL. min⁻¹. Tempo de Corrida: 6 min+4 post run. ESI Modo Negativo. Condições de otimização para fragmentação: Charging/Nozzle Voltage, 1000 Volts, Corona, 73,2 uA, Drying Gas, 8.0, l/ min, Temp. 300C, Nebulizer, 35 psig, Ion Polarity, 1,0 “0=Positive, 1=Negative”.

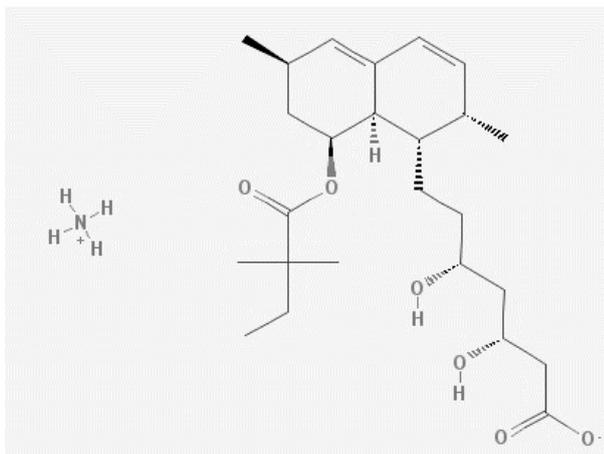


Figura 33 – Esquema proposto de fragmentação Sal de Amônio da Simvastatina Ácida m/z 339,18648>239,04971 Modo ESI -.

Na figura 32, observamos as diferenças dos mecanismos de fragmentação no modo positivo e modo negativo (esquerda e direita). Nesta figura identificamos o melhor modo de identificação e quantificação da simvastatina hidroxí-ácida através da intensidade de abundância de fragmentos.

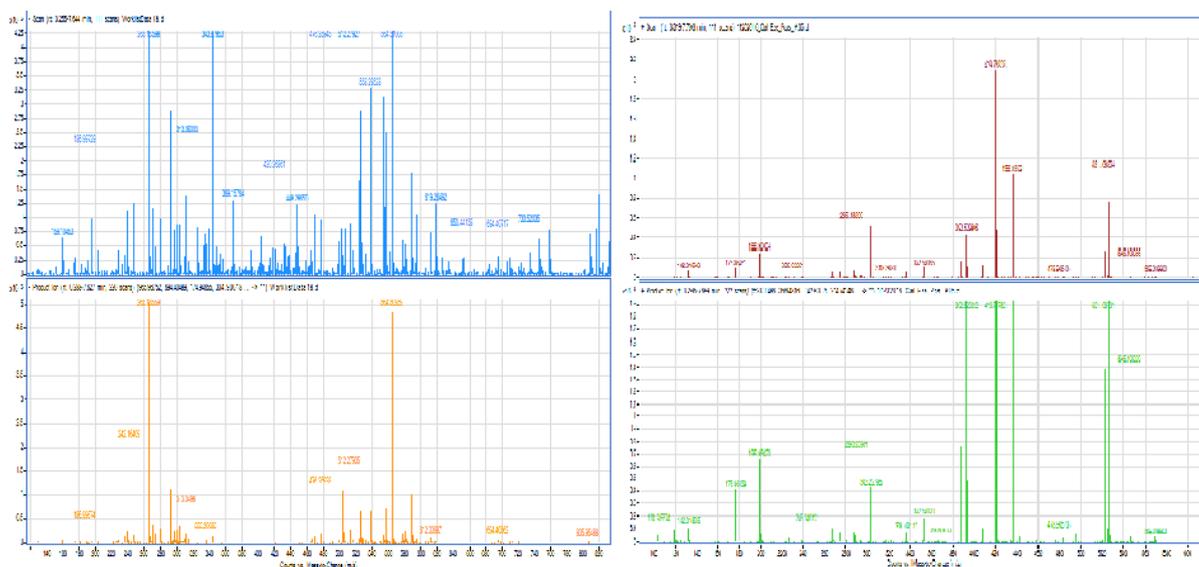


Figura 34 – Espectro de massas da amostra de plasma branco contaminada com uma solução padrão da ezetimiba glucuronídeo na concentração 100,0 ng/ mL⁻¹ em fase móvel Modo ESI – (à esquerda) e Modo ESI + (à direita). Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (50:50 v/v). Coluna: Poroshell EC C 18 7 μ m 50x2.1mm. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção:

10 μ L. Temperatura do Amostrador: 15°C. Fluxo: 0,7 mL. min⁻¹. Tempo de Corrida: 6 min+4 post run. ESI Modo Negativo. Condições de otimização para fragmentação: Charging/Nozzle Voltage, 1000 Volts, Corona, 73,2 uA, Drying Gas, 8,0, l/ min, Temp. 300C, Nebulizer, 35 psig, Ion Polarity, 1,0 “0=Positive, 1=Negative”.

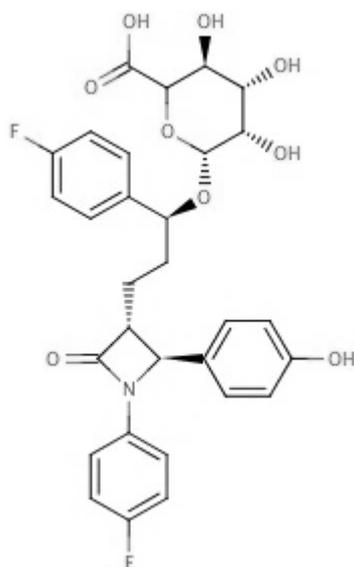


Figura 35 – Estrutura Molecular da Ezetimiba Hidroxi Glucoronídeo m/z 521,08854>290,25901 Modo ESI +.

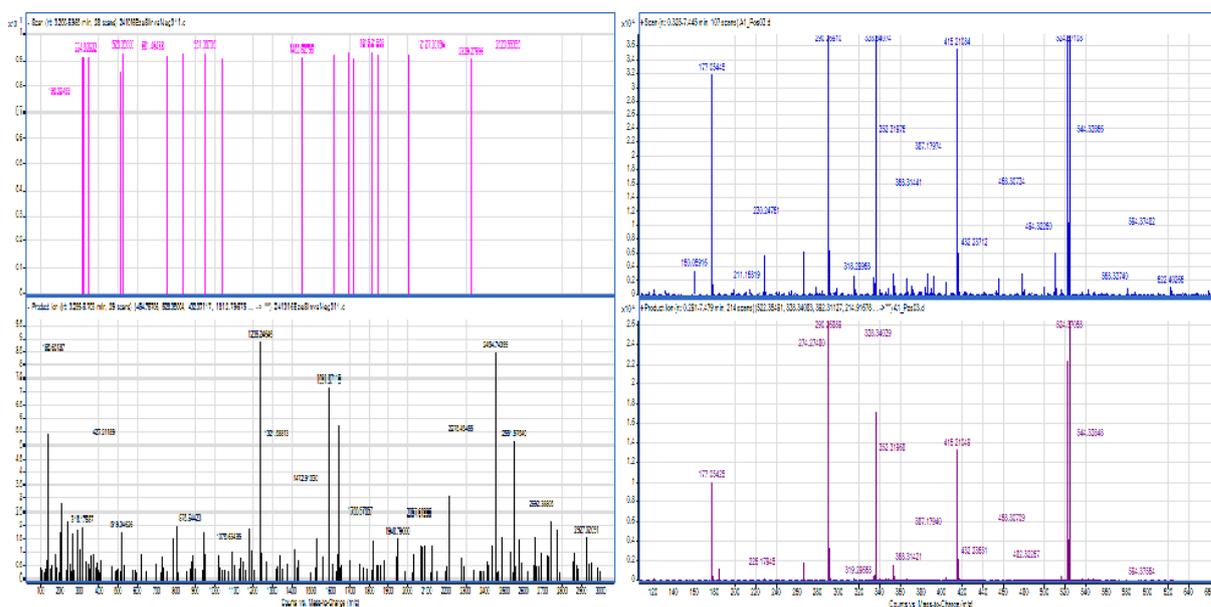


Figura 36 – Espectro de massas da amostra de plasma de paciente em fase móvel Modo ESI – (à esquerda) e Modo ESI + (à direita). Condições: Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,1%: Acetonitrila – Isocrático (50:50 v/v). Coluna: Poroshell EC C 18 7 μ m 50x2.1mm. Temperatura Coluna: Ambiente. Volume Injeção: 10 μ L. Temperatura do Amostrador: 15°C. Fluxo: 0,7 mL. min⁻¹. Tempo de Corrida: 6 min+4 post run. ESI Modo Negativo. Condições de otimização para fragmentação: Charging/Nozzle Voltage, 1000 Volts, Corona, 73,2 uA, Drying Gas, 8,0, l/ min, Temp. 300C, Nebulizer, 35 psig, Ion Polarity, 1,0 “0=Positive, 1=Negative”.

Um espectro de massas nos dá informações estruturais sobre a substância porque os valores de m/z e as abundâncias relativas dos fragmentos dependem da força das ligações do íon molecular e da estabilidade dos fragmentos (BRUICE, 2006).

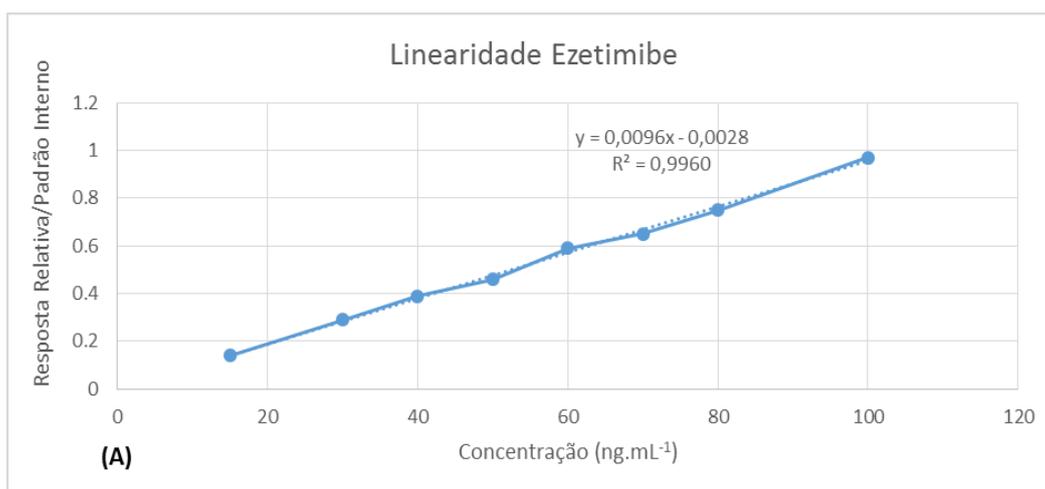
Um método normalmente empregado para identificar fragmentos iônicos é a determinação da diferença entre o valor de m/z de um fragmento iônico e o valor de m/z do íon molecular (BRUICE, 2006).

A identificação dos analitos pôde ser efetuada considerando as funções orgânicas tais como ácidos carboxílicos, fenóis, aminas, ésteres, e utilizou-se as propriedades químicas dos analitos que geraram reações redox, com a protonação e a desprotonação de uma substância (CROTTI; LOPES, 2006).

Após avaliação dos picos interferentes, sensibilidade do método, efeito matriz e efeito residual, verificamos que o método apresenta características dentro dos limites preconizados pelo ICH e ANVISA.

5.3.4 Curva Analítica (Linearidade)

O método demonstrou ser linear nas faixas: (i) de 15 ng a 100 ng.mL⁻¹ para Ezetimiba; e; (ii) de 15 ng a 50 ng.mL⁻¹ para Sinvastatina, apresentando coeficiente de determinação (r^2) de 0,996 para ezetimiba e 0,992 para sinvastatina.



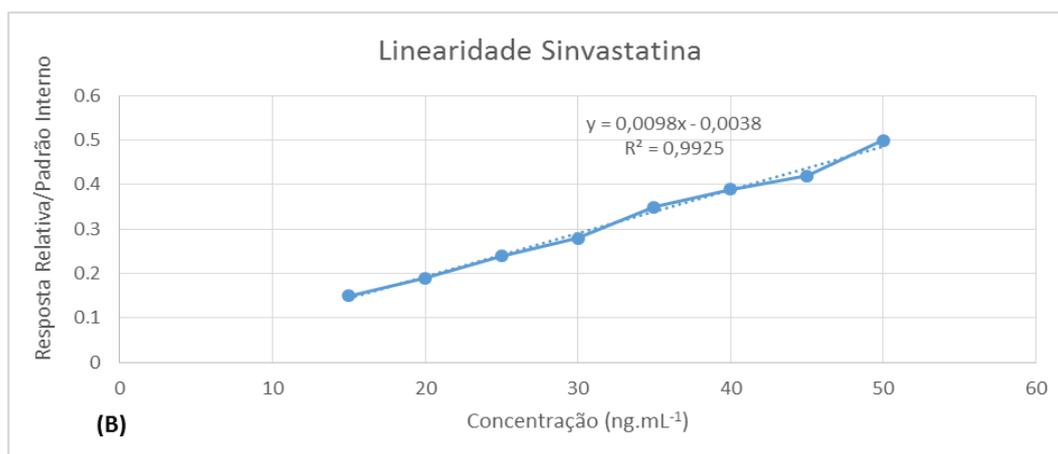


Figura 37 – Curvas analíticas obtidas para (A) Ezetimiba e (B) Sinvastatina

Os parâmetros coeficiente angular; coeficiente linear e coeficiente de determinação (r^2) obtidos por regressão estatística das curvas analíticas definidas para Ezetimiba e Sinvastatina encontram-se descritos na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Parâmetros relacionados à regressão linear das curvas analíticas obtidas para a quantificação de Ezetimiba e Sinvastatina por CLAE acoplado ao detector de espectro de massas.

Parâmetro	Ezetimiba	Sinvastatina	Critérios Aceitação RDC 27 de Maio, 2012.
Coeficiente angular (a)	0,0096	0,0098	Informativo
Coeficiente linear (b)	-0,0028	-0,0038	Informativo
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9960	0,9925	Mínimo de 0,99

O método demonstrou ser linear nas faixas: (i) de 0,5 ng a 200 ng.mL⁻¹ para Ezetimiba Glucoronideo; e; (ii) de 0,2 ng a 60 ng.mL⁻¹ para Sinvastatina Hidroxi Ácida.

5.3.5. Precisão e Exatidão

Tabela 17 – Plasma Contaminado de Sinvastatina) Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9) ‘

<i>Analito Contaminado (ng/mL) Inter corridas (n = 5) Intra Corridas (run = 4, n = 5) Recuperação (%) (n = 5) (mean</i>						
<i>Analito</i>	<i>Contaminação (ng/ mL)</i>	<i>Inter-corridas</i>				<i>Recuperação (%) (n=5)</i>
		<i>Resultados</i>	<i>Média Resultados</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Exatidão</i>	<i>Média Exatidão</i>
Sinvastatina	14,26	12,08	12,61	9,52%	84,71%	88,41%
		13,98			98,04%	
		11,76			82,47%	
	19,25	18,23	17,66	3,58%	94,70%	91,74%
		17,77			92,31%	
		16,98			88,21%	
	24,59	23,01	22,20	4,80%	93,57%	90,27%
		22,59			91,87%	
		20,99			85,36%	
	29,94	28,54	26,38	7,44%	95,32%	88,10%
		24,71			82,53%	
		25,88			86,44%	
	35,28	32,92	34,63	5,27%	93,31%	98,17%
		36,55			103,60%	
		34,43			97,59%	
	39,91	37,23	37,29	2,98%	93,28%	93,44%
		38,43			96,29%	
		36,21			90,73%	
	44,91	43,87	43,59	2,78%	97,68%	97,05%
		42,26			94,10%	
		44,63			99,38%	
	49,90	50,01	50,56	1,53%	100,22%	101,33%
		50,23			100,66%	
		51,45			103,11%	

Tabela 18 – Plasma Contaminado de Ezetimiba Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9)

Analito	Contaminação (ng/mL)	Inter-corridas			Recuperação (%) (n=5)	
		Resultados	Média Resultados	CV (%)	Exatidão	Média Exatidão
Ezetimiba	14,97	13,56	12,46	10,25%	90,58%	83,23%
		12,76			85,24%	
		11,06			73,88%	
	29,94	27,04	26,90	0,49%	90,31%	89,86%
		26,89			89,81%	
		26,78			89,45%	
	39,92	36,55	35,78	1,88%	91,56%	89,62%
		35,45			88,80%	
		35,33			88,50%	
	49,90	45,45	45,55	2,82%	91,08%	91,28%
		46,88			93,95%	
		44,32			88,82%	
	59,88	55,65	56,17	1,02%	92,94%	93,80%
		56,78			94,82%	
		56,08			93,65%	
	69,86	63,87	64,11	0,46%	91,43%	91,77%
		64,44			92,24%	
		64,02			91,64%	
	79,84	75,47	75,28	0,59%	94,53%	94,29%
		75,60			94,69%	
		74,78			93,66%	
	89,82	85,25	86,59	1,48%	94,91%	96,40%
		86,72			96,55%	
		87,80			97,75%	
99,80	98,75	96,98	1,74%	98,95%	97,17%	
	95,40			95,59%		
	96,78			96,97%		

Tabela 19 – Plasma Contaminado Ezetimiba Glucoronídeo Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9)

Analito	Contaminação (ng/ mL)	Intra-corrída (n=6)			Recuperação (%) (n=3)	
		Resultados	Média Resultados	CV (%)	Exatidão	Média Exatidão
Ezetimiba Glucoronídeo	0,500	0,434	0,39	10,56%	86,80%	77,73%
	LIQ	0,354			70,80%	
		0,378			75,60%	
	1,500	1,150	1,23	5,88%	76,67%	82,09%
	CQB	1,255			83,67%	
		1,289			85,93%	
	50,000	43,888	44,26	0,87%	87,78%	88,52%
	CQM	44,233			88,47%	
		44,655			89,31%	
	200,000	176,789	180,37	1,72%	88,39%	90,18%
	CQD	182,345			91,17%	
		181,973			90,99%	

Três corridas consecutivas da validação foram feitas para avaliar a exatidão e precisão do método. Cada corrida incluiu uma amostra de solução de referência para verificação do sistema, uma amostra do branco (plasma), uma amostra de branco (plasma) com padrão interno e a corrida de padrões para calibração, seis replicatas de LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. Os resultados das corridas também foram usados para avaliação da linearidade dos padrões e avaliação da precisão e exatidão.

A média de recuperação (exatidão) foi de 90% e 90% para os padrões de calibração da ezetimiba e sinvastatina. O coeficiente de determinação mínimo (r^2) foi de 0,999 para ezetimiba e 0,998 para sinvastatina. As tabelas 18, 19, 20 e 21 mostram o sumário da precisão e exatidão na validação.

Tabela 20 – Plasma Contaminado Sinvastatina Hidroxi-Ácida Inter corridas (n=6) Recuperação (%) (n=9)

Analito	Contaminação (ng/ mL)	Intra-corrída (n=6)			Recuperação (%) (n=3)	
		Resultados	Média Resultados	CV (%)	Exatidão	Média Exatidão
Sinvastatina Hidroxi- Ácida	0,200	0,154	0,15	1,63%	77,00%	77,17%
	LIQ	0,157			78,50%	
		0,152			76,00%	
	0,500	0,448	0,40	12,19%	89,60%	79,33%
	CQB	0,352			70,40%	
		0,390			78,00%	
	30,000	27,664	27,38	3,01%	92,21%	91,27%
	CQM	26,451			88,17%	
		28,024			93,41%	
	50,000	45,008	44,88	0,98%	90,02%	89,75%
	CQD	45,237			90,47%	
		44,385			88,77%	

Por meio destes resultados, observou-se que o método desenvolvido atendeu aos critérios de aceitação apresentando desvio padrão relativo inferior a 15% e recuperação acima de 75% de acordo com o que a *RDC n.27, de 17 de maio de 2012* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária preconiza (BRASIL, 2012).

5.3.6. Aplicação do Método

O método foi utilizado com êxito para a detecção e quantificação simultânea de ezetimiba e sinvastatina, na análise de uma amostra de paciente voluntário hipercolesterêmico submetido a tratamento com administração de ezetimiba 10 mg/dia, durante 4 semanas e sinvastatina 10 mg/dia, durante 8 semanas e a associação e ezetimiba 10mg e sinvastatina 10 mg durante o período de 4 semanas.

Para a ezetimiba e ezetimiba glucoronídeo os resultados foram condizentes com os achados em literatura conforme parâmetros farmacocinéticos (Li et al, 2005 e Bahrami et al, 2010).

Porém para a sinvastatina e sinvastatina hidróxi-ácida foram encontrados valores que não correspondem aos da literatura. Nirogi et al, 2007 cita sobre os problemas encontrados na quantificação da sinvastatina e sinvastatina hidróxi-ácida devido a rápida inter conversão da sinvastatina hidróxi-ácida em sinvastatina dependente do pH do meio. Ocorre também que na presença de colesterol endógeno, a sinvastatina continua sendo metabolizada e seus níveis reduzem drasticamente devido a ligação com a enzima hidróxi-metil glutarase. Os comprimidos foram administrados no período noturno (às 22 horas) e as amostras foram coletadas no período da manhã (8 hs) porém não houve a inativação das enzimas presentes e do colesterol endógeno – sendo dois fatores amplamente citados na literatura como interferentes e limitantes das metodologias analíticas testadas. (Zhang et al, 2009).

Tabela 21 – Resultados Amostra de plasma conforme estudo clínico.

Amostra	EZE (ng.mL⁻¹)	SIN (ng.mL⁻¹)	EZE-G (ng.mL⁻¹)	SSA (ng.mL⁻¹)
1a.inj	42,501	0,539	21,903	0,531
2a.inj	46,833	0,529	20,747	0,567
3a.inj	48,142	0,545	22,428	0,596
4a.inj	41,989	0,512	27,568	0,578
5a.inj	44,654	0,557	24,215	0,544
6a.inj	45,732	0,569	26,327	0,551
Média	44,9752	0,5418	23,8647	0,5612
DP Absoluto	2,4164	0,0202	2,6658	0,0238
CV%	5,37%	3,73%	11,17%	4,25%

5.3.7 Sensibilidade

Para equipamentos como o cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas a sensibilidade de um método pode ser dada pela intensidade da abundância dos íons moleculares ou fragmentados.

De acordo com o fabricante Agilent, a intensidade mínima para que os íons moleculares possam ser quantificados é de 10^2 .

Além da intensidade da abundância, o equipamento necessita sofrer calibração , diária através de uma solução com massas de referência (ESI Tuning Mix) para que possa estar devidamente ajustado com a resolução mínima de 4 casas decimais para identificação dos compostos através de suas massas moleculares.

De acordo com a figura 25 a ezetimiba e a sinvastatina apresentaram intensidade na faixa de 10^5 e para o ezetimiba glucoronídeo (figura 34) e sinvastatina hidróxi-ácida (figura 36) apresentaram intensidade na faixa de 10^2 e 10^3 respectivamente, comprovando sua sensibilidade frente a este método.

6. CONCLUSÃO

- Foi efetuado o desenvolvimento de método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas em série quadrupolo e tempo de voo (QTOF) para a determinação simultânea e quantitativa de ezetimiba e sinvastatina em plasma humano, obtido através de uma técnica de extração simplificada (SALLE) mesmo em uma matriz complexa como o plasma humano;
- Foi efetuada a validação do método segundo os parâmetros exigidos pelas diretrizes da ICH, da Farmacopeia Americana (USP) e ANVISA para validação de metodologia bioanalítica, tais como: especificidade (efeito matriz), linearidade (curva de calibração), limites de detecção e quantificação (sensibilidade), precisão e exatidão (recuperação) e foi atendido o critério de aceitação conforme ANVISA e ICH;
- Foi feita a aplicação dos métodos para quantificação dos fármacos em amostras biológicas (plasma) e identificação dos metabólitos (ezetimiba glucoronídeo e sinvastatina hidroxí-ácida) por espectrometria de massas;
- Foi efetuado o desenvolvimento de um método analítico para a detecção e quantificação simultânea da ezetimiba e sinvastatina em plasma humano através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de aerossol carregado, e em função da limitação da técnica, seria interessante a continuação de testes com opção de utilizar uma bomba para gradiente reverso para melhorar o sinal dos analitos e assim efetuar a sua quantificação.
- Os testes em CLAE acoplado ao espectro de massas para a sinvastatina e sinvastatina hidroxí-ácida sugerem continuidade devido a interconversão das duas formas considerando a inativação do colesterol endógeno para quantificação destas substâncias.

➤

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMELING, S.; ILKO, D.; HOLZGRABE, U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 69, p. 50–63, 2012.

ALTMANN, S.W; DAVIS JUNIOR, H.R. – Review Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta* v.1791, p. 679–683, 2009.

AWAD, A.; EMANUELE, M, HARTLEY,D, SWARTZ, M, Charged Aerosol Detection in Pharmaceutical Analysis: An Overview. *ChromatographyOnLine LCGC Solutions for Separations Scientists*, 2009 Disponível em: , <http://www.chromatographyonline.com/print/233678?page=full> Acesso em: 20 de outubro de 2014.

BAE, J.W.; CHOI, C.I.; PARK, S.H et al. Analytical LC-MS/MS Method for Ezetimiba and its application for Pharmacokinetic Study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* v.35:1, p.141-152, 2012.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B.; KHATABI, P.M. et al. Application of one-step liquid chromatography-electrospray tandem MS/MS and collision-induced dissociation to quantification of ezetimiba and identification of its glucuronated metabolite in human sérum: A pharmacokinetic study. 2010. 878, 2789-2795.

BALLANTYNE, C.M. A companion to Braunwald’s Heart Disease, 10th ed., Elsevier, 2015.

BARDINI,G.;GIORDAZ, C.B.; PONTIROLIS, A.E.; LE GRAZIE, C.; ROTELLA, C.M. Ezetimiba+Simvastatin versus doubling the dose of simvastatin in high cardiovascular risk diabetics: a multicenter, randomized trial (the LEAD study).; *Cardiovascular Diabetology* 2010, 9: 20

BARRET, B.; et al. Validated CLAE–MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, p.517–526,2006

BASHA, S.J.S; NAVEED, S.A.; TIWARI, N.K; SASHIKUMAR, D.; MUZEEB, S.; KUMAR, T.R.; KUMAR, N.V.; RAO, N.P.; SRINIVAS, N. Concurrent determination of ezetimiba and its phase-I and II metabolites by CLAE with UV detection: Quantitative application to various in vitro metabolic stability studies and qualitative estimation in bile. *Journal of Chromatography B* v. 853, p. 88-96, 2007.

BAYS, H; STEIN, EA. Pharmacotherapy for dyslipidaemia. *Current therapies and future agents. Expert Opinion on Pharmacotherapy* v. 4, n. 11, p. 1901 – 1938, 2003.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002.D.O.U – Diário Oficial da União; Poder

Executivo, de 02 de junho de 2003. ANVISA. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES Acesso em: 20 de outubro de 2014.

BRITISH PHARMACOPOEIA. Appendix II A. Infrared Spectrophotometry. Disponível em: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2013updated/ixbin/bp.cgi?a=display&id=1004> Acesso em 20 novembro de 2013.

BRITISH PHARMACOPOEIA. Appendix II B. Ultraviolet and Visible Absorption Spectrophotometry. Disponível em: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2013updated/ixbin/bp.cgi?a=display&id=1003>

BRITISH PHARMACOPOEIA. Appendix IIC. Determination of Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. Disponível em: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2013updated/ixbin/bp.cgi?a=display&id=1002>

BRITISH PHARMACOPOEIA. Appendix V. Determination of Melting Point. Disponível em: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2013updated/ixbin/bp.cgi?a=display&id=978> Acesso em 20 de novembro de 2014.

BRUCE, P.Y. Organic Chemistry. 2006.

BRUNTON, L., CHABNER, B.A., KNOLMANN, B.C.- *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman Gilman*. Cap. 31 – p. 877-907, 2012.

BRUS, J.; JEGOROV, A.; MAIXNER, J.; ROHLIČEK, J. HUSÁK, M.; KRATOCHVÍL, B.; Simvastatin: structure solution of two new low-temperature phases from synchrotron powder diffraction and ss-NMR. *Structural Chemistry*. v. 21-3, p. 511-518, 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*, Campinas, SP, Editora da Unicamp, 2007

CROTTI, A.E.M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Química Nova*. v. 29-2, p.287-292, 2006.

DANAFAR, H.; HAMIDI, M. A Rapid and Sensitive LC–MS Method for Determination of Ezetimibe Concentration in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Chromatographia*. v. 76-23, p.1167-1675, 2013.

EL-BAGARY, E.I.; ELKADY, E.F; EL-SHERIF, Z.A.; KADRY, A.M. LC–MS–MS Simultaneous Determination of Atorvastatin and Ezetimibe in Human Plasma. *Journal of Chromatographic Science*. V. 52-8, p. 773-780, 2013.

FONSECA, F.A.H. Farmacocinética das Estatinas, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, volume 85, suplemento V, 2005.

GARRITANO, C.R.; LUZ, P.M.; PIRES, M.L.; BARBOSA, M.T.S.; BATISTA, K.M. Análise da Tendência da Mortalidade por acidente vascular cerebral no Brasil no século XXI, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v. 98-6, p. 519-5217, 2012.

GONZALEZ, J.B.; MIRANDA, R.U. Biotechnological production and applications of statins. *Applied microbiology and technology*. V. 85-4, p.869-883, 2010.

GONZÁLEZ, O.; BLANCO, M.E.; IRIARTE, G.; BARTOLOMÉ, L; MAGUREGUI, M.I.; ALONSO, R.M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *Journal of Chromatography A*, 1353, p. 10–27, 2014

GRIGORE, L.; NORATA, G.D.; CATAPANO, A.L. - Combination therapy in cholesterol reduction: focus on ezetimiba and statins. *Vascular Health and Risk Management* v. 4-2, p. 267–278, 2008.

GUO, L; WANG, M.M; QIU, F.R; JIANG, J. Simultaneous determination of ezetimibe and its glucuronide metabolite in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical and Sciences and Applications*. V.986-987, p. 108-114 2015.

JEMAL M.; OUYANG, Z.; POWELL, M.L. – Direct injection LC-MS/MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23, p. 323-340, 2000.

JEU, L.; CHENG, J.W., Pharmacology and Therapeutics of Ezetimiba (SCH 58235), a Cholesterol-Absorption Inhibit. *Clinical Therapeutics* v.25, Issue 9, p. 2352-2387, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures Text and Methodology Q2 (R1). Current Step 4 version. Parent Guideline dated 27 October 1994. (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005). Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf> Acesso em: 20 de Outubro de 2014.

Bioanalytical Method Validation
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM368107.pdf> Acesso em 01 de Agosto de 2014.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticas for human use: Guideline on Validacion of Analytical Procedures Q2 (R1), Text and methodology, 2005.

IKONEN, E. Mechanisms for Cellular Cholesterol Transport: Defects and Human Disease. *Physiological Reviews*. v. 86, p. 1237-1261, 2006. <http://physrev.physiology.org/by 10.220.33.5>. Acesso em 19 de dezembro de 2016.

KARANAM, S.R.; KATAKAM, P., CHANDU, B.R. et al. Simultaneous determination of ezetimiba and simvastatin in rat plasma by stable-isotope dilution LC-ESI-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. v. 4-4, p. 286-294, 2013

KUMARI, N.; SRIVASATVA, B.; TIWARI, A.K.; KALYANWAT, R. Optimization and Evaluation of Immediate Release Tablet in combination of Ezetimiba and Simvastatin drugs. *International Journal of Pharmacy and Natural Medicines*, 2013, Vol. 1 (1): 01-13.

MARJOS, R.E. Salting Out Liquid Liquid Extraction. *LCGC North America*. v. 27-7, p. 526-533, 2009. <http://www.chromatographyonline.com/salting-out-liquid-liquid-extraction-salle>. Acesso em 12/07/2016.

MUNAGA, S.B.; VALLURU, R.K.; BONGA, P.B.; RAO, V.S.; SHARMA, H.K. Development and Validation of an LC-MS-MS Method for the Simultaneous Determination of Simvastatin, Simvastatin Acid and Ezetimibe in Human Plasma and Its Application to Pharmacokinetic Study in the Indian Population. *Journal of Chromatography Science*. v-54-6 p. 985-996, 2016.

NAJIB, N.M.; IDKAIDEK, N.; ADEL, A.; ADMOUR, I.; ASTIGARRAGA, R.E.B.; DE NUCCI, G.; ALAM, S.M.; DHAM, R. Pharmacokinetics and bioequivalence evaluation of two simvastatin 40 mg tablets (*Simvast & Zocor*) in healthy human volunteers. *Biopharmaceuticals and Drug Disposition*. V. 24-5, p.183-189, 2003.

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

NOVAKOVA, L.; ŠATIŇSKY, D.; SOLICH, P. CLAE methods for the determination of simvastatin and atorvastatin, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 4, 2008.

ORLANDO, R.M.; CORDEIRO, D.D.; MATHIAS, A.E.B.; REZENDE, K.R.; GIL, E.S. Pré-tratamento de amostras. *Vita et Sanitas, Trindade-GO*, n. 03, p. 122-139, 2009.

PHAN, B.A.; DAYSPRING, T.D.; TOTH, P.P. Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vascular Health and Risk Management*. v. 8, p. 415-427, 2012.

PLANTE, M., BAILEY, B.; AWORTH, I. - The use of charged aerosol detection with HPLC for the measurement of lipids, in *Lipidomics: Vol. 1: Methods and Protocols*, Vol. 579 of series *Methods in Molecular Biology*, edited by D. Armstrong, Humana Press, New Jersey, 2009, pp. 469-482. <http://www.aocs.org/Membership/FreeCover.cfm?ItemNumber=11121> Acesso em 15/08/2015.

SUCHY, D.; LABUZEK, K.; STADNICKI, A.; OKOPIEN, B. Ezetimiba – a new approach in hypercholesterolemia management. *Pharmacological Reports*, v. 63, p. 1335-1348, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, Vol. 27, Nº 5, 771-780, 2004.

SONAWANE, L.V., POUL, B.N, USNALE, S.V., WAGHMARE, P.V., SURWASE, L.H.- Bioanalytical Method Validation and Its Pharmaceutical Application- A Review. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 2014, volume 5, issue 3, 1000288.

TANG, Y.Y.; LIN, H.Y.; CHEN, Y.C.; SU, W.T.; WANG, S.C.; CHIUEH, L.C.; SHIN, Y.C. Development of a quantitative multi-mycotoxin method in rice, maize, wheat and peanut using UPLC-MS/MS. *Food Analytical Methods*. v.6, p. 727-736, 2013.

THE MERCK INDEX: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 14 ed. New Jersey: Merck, 2006, p. 668 and 1529.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 34 ed. National Formulary: NF 29. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention, 2010.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and application of the charged aerosol detector, *Journal of Chromatography A*. v. 1217, p. 1549–1556, 2010.

YANGA, H.; FENGB, Y.; LUANA, Y. Determination of Simvastatin in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. v. 785, p. 369-375, 2003.

WATSON, J.T.; SPARKMAN, O.D. Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation, 4th Edition, Wiley Ed., 2007;

YU, L.; LI-HAWKINS, J.; HAMMER, R.E.; BERGE, K.E.; HORTON, J.D.; COHEN, J.C.; HOBBS, H.H. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 110-5, p. 671-680, 2002.

ZHANG, N.; YANG, A.; ROGERS, J.D.; ZHAO, J.J. Quantitative analysis of simvastatin and its α -hydroxy acid in human plasma using automated liquid–liquid extraction based on 96-well plate format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, p. 175–187, 2004.

ZHANG, J.; R, ODILA, R.; GAGE, E.;HAUTMAN, M.; FAN, L.; KING, L.L; H.; W, H.; EL-SHOUBAGY, T.A.- High-throughput salting-out assisted liquid/liquid extraction with acetonitrile for the simultaneous determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma with liquid , *Analytica Chimica Acta* 661, p. 167–172, 2009.

ANEXO I

**INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DA BANCA
JULGADORA DE MESTRADO/DOUTORADO**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

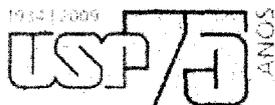
4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós- Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior Presidente da
CPG/FCF/USP

ANEXO II
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA
DA FCF/USP



São Paulo; 10 de julho de 2012

1ro(a). S"(a).

Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNIVER

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em indivíduos diabéticos tratados com hipolipemiantes"- **Pesquisador(a) Responsável:** Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Birata - **Equipe de trabalho:** Mario Hiroyuki Birata, Simone Cohen Sorkin, Fabiana Dalla Vecchia Gengivir, Claudia Villazori, Mária Martins SilvJira Bemik, Egidio Lima. Dórea, Elizandra Silva Guimarães, Tomás Zambrano Coloma, Luiz Salazar Navarreté, Cíntia Blujus dos Santos Rohde ... **CEP-HU/USP: 699/06-Registro CAEE::** 0013.0.198.018-07.

Prezada Professora

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São

Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 06 de julho de 2012, APROVOU a solicitação feita por V.Sa., através do documento datado de 27 de junho de 2012, referente à inclusão de objetivo com a finalidade de analisar as concentrações de simvastatina e ezetimiba em amostras de plasma de indivíduos hipercolesterolemicos e diabéticos e inclusão dos membros na equipe de trabalho do estudo: *Profa. Dra. Maria Segunda Aurora Prado e Antonio Marcos Callejo de Souza.*

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
**Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa Hospital Universitário da
(Universidade de São Paulo)**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
Av. Prof. Lineu Prestes 580 - Bloco 13 superior
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
CEP: 05508-900
Fone: +5511 3091 3655- Fax +551138154418

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, Adriana de Vicente França Marcondes, número USP 3644101, aluna de pós- graduação do(a) Laboratório de Controle de Qualidade Físico Químico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, declaro que participarei como colaborador no projeto intitulado "Estudo de genes envolvidos na regulação do metabolismo lipídico em indivíduos diabéticos tratados com hipolipemiantes, sob responsabilidade da pesquisadora Profa. Rosário Dominguez Crespo Hirata. Declaro ter ciência dos aspectos éticos contidos na Resolução CNS 466/2012.

São Paulo, 04 de maio de 2015.



Adriana de Vicente Marcondes

Nº USP 3644101

ANEXO III
FICHA DO ALUNO



FICHA DO ALUNO

9139 - 3644101/2 -Adriana de Vicente França Marcondes

Email: adriana.marcondes@usp.br
Data de Nascimento: 30/05/1975
Cédula de Identidade: RG-24.126.241-0 -SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas- Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 1997

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle
Farmacêuticos 07/02/2014
Data de Matrícula: 07/02/2014
Início da Contagem de Prazo: 05/12/2016
Data Limite para o Depósito: Prof(a). Dr(a). María Segunda Aurora Prado - 07/02/2014 até o presente. Email: msaprad06@usp.br
Orientador: Inglês, Aprovado em 07/02/2014 120 dias
Proficiência em Línguas: Período de 07/08/2016 até 05/12/2016
Prorrogação(ões): Aprovado em 28/04/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/02/2014
Prorrogação em 01/08/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 01/08/2016

Impresso em: 02/12/2016 02:55:11

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 3644101/2 -Adriana de Vicente França Marcondes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	HCar. g orária	Cred.	Freq.	Cone.	Exc.	Situação
FB 7;o 4-	Análise Espectrométrica de Fármacos	17/02/2014	01/06/2014	150	o			N	Matrícula cancelada
FBC5813-4/1	Aplicações de Cromatografia e Espectrometria de Massas em Análises Toxicológicas	11/03/2014	14/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FB 7; 28-	Aprimoramento Didático	25/03/2014	21/04/2014	60	o			N	Matrícula cancelada
FB 7; 77	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos 1	14/08/2014	26/11/2014	45	3	87	A	N	Concluída
FBF 5805 113	_ Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatística Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	80	B	N	Concluída
FBF5766-3/2	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	30/09/2014	01/12/2014	90	6	77	B	N	Concluída
FBF5706-7/2	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos	06/10/2014	16/11/2014	60	4	83	A	N	Concluída
FBF5710-8/2	Obtenção Racional de Insumos de Plantas Medicinais	02/03/2015	12/05/2015	90	o	20	R	N	Concluída
EDM5791-7/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	10/03/2015	20/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
EDM5103-2/1	Aprendizagem Colaborativa e Mapas Conceituais: Fundamentos, Desafios e Perspectivas (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	12/03/2015	03/06/2015	120	o			N	Matrícula cancelada
ED A 5031-212	Educação de Jovens e Adultos: Pensamento, Políticas e Práticas (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	12/08/2015	17/11/2015	120	o			N	Matrícula cancelada
FBF5722-7/2	Espectrofotometria Diferencial no Controle de Qualidade de Medicamentos	19/08/2015	22/09/2015	45	o	40	R	N	Concluída
MPT 6005 112	Técnicas de Separação : Fundamentos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	29/02/2016	24/04/2016	120	8	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	32
Estágios:			
Total:	0	25	32

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; **B** - Bom, com direito a crédito; **C** - Regular, com direito a crédito; **R** - Reprovado; **T** - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 01/08/2016

Impresso em: 02/12/2016 02:55:11

ANEXO IV

Curriculum lattes



Adriana De Vicente França Marcondes

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3794823926683095> Última

atualização do currículo em 04/12/2016

Resumo informado pelo autor

Graduação em Farmácia e Bioquímica - Faculdades Oswaldo Cruz (1998) Especialização em Indústrias - Faculdades Oswaldo Cruz (2000) Curso Livre de Gestão da Qualidade e Processos - Fundação Vanzolini (2008) Pós Graduação Strictu Sensu - Mestrado em Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos - USP - (2016) Atualmente é Analista de Desenvolvimento Analítico - Theraskin Farmacêutica Ltda. Professora de Controle de Qualidade na Faculdade Nova Cidade que pertence ao grupo Estácio - Carapicuíba - (2016) Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Garantia e Controle de qualidade farmacêuticos e Desenvolvimento Analítico de medicamentos e cosméticos. Habilidade em HPLC acoplado a espectrômetro de massas, PDA, IR, ELSD, CAD e CG acoplado a Headspace.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Adriana De Vicente França Marcondes

Nascimento 30/05/1975 - Brasil

CPF 195.293.398-60

Formação acadêmica/titulação

2014 Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

1994 - 2000 ^{Graduação em Farmácia.} Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Sao Paulo, Brasil, Ano de obtenção: 2000

Formação complementar

2008 - 2009 Extensão universitária em Gestão da Qualidade e Processos. (Carga horária: 128h).
Fundação Carlos Alberto Vanzolini, FCAV, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. *Theraskin Farmacêutica Ltda. - THERASKIN*

Vínculo institucional

2015 - Atual Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Analista de Desenvolvimento Analítico, Carga horária: 44, Regime: Integral

2. *Faculdade Nova Cidade - Estácio - FNC*

Vínculo institucional

2016 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Professor Especialista , Carga horária: 4, Regime: Parcial Outras informações:
Professora Especialista de Controle de Qualidade

3. *Astrazeneca do Brasil - ASTRAZENECA*

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Validação , Carga horária: 40, Regime: Integral Outras informações:

- Análise de validação e transferência de metodologia, Análise de requisitos de materiais, análise de documentação técnica. - Preparo de documentação técnica – protocolos e relatórios de validação, co- validação e transferência de metodologia, e procedimentos operacionais padrão. - Análise de validação de metodologia de resíduo e limpeza (detergente) - Análise de validação de processo e qualificação de performance - Análise de Adequação Farmacopéica de Matérias Primas e Produtos Acabados - Abertura de Controle de Mudanças e acompanhamento - Dar suporte e treinamento aos analistas junior e pleno e analistas de validação de processo.

4. *Pfizer - PFIZER*

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Validação , Carga horária: 40, Regime: Integral Outras informações:

- Análise de validação e transferência de metodologia, Análise de requisitos de materiais, análise de documentação técnica. - Preparo de documentação técnica – protocolos e relatórios de validação, co- validação e transferência de metodologia, e procedimentos operacionais padrão. - Dar suporte e treinamento aos analistas junior e pleno e analistas de validação de processo.

5. *Unichem Farmacêutica do Brasil Ltda. - UNICHEM*

Vínculo institucional

2010 - 2014 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Sênior , Carga horária: 40, Regime: Integral Outras informações:

- Coordenar a transferência de metodologia: Análise de requisitos de materiais, análise de documentação técnica, cronograma de implementação nos laboratórios de controle de qualidade físico químico/ microbiológico. - Preparo de documentação técnica – protocolos e relatórios de validação, co-validação e transferência de metodologia, e procedimentos operacionais padrão. - Documentação técnica relacionada a garantia da qualidade – auditorias em terceiros, desvios, revisão periódica de produto, plano mestre de validação e

análise crítica de riscos. - Compras de reagentes e consumíveis. - Análise instrumental (HPLC, CG, FTIR, UV-VIS, Dissolutor com amostrador automático). - Responsável pela área de resíduos, organização, CADRI e contato com a empresa responsável pela incineração.(PGRSS). - Responsável pelo Mapa de Produtos Controlados pela Polícia Federal, Civil e Ministério do Exército. - Programação de calibrações e manutenções preventivas e corretivas.

6. *Schering-Plough Saude Animal - SCHERING-PLOUGH*

Vínculo institucional

2009 - 2010 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Pleno , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:

- Participação no Projeto GAP Analysis com análise da documentação corporativa da garantia da qualidade e adequação dos procedimentos internos. - Participação do Projeto de Validação de Sistema Computadorizado com validação de planilha excel para plataforma GSS (Global Spreadsheet Solutions). - Análise instrumental (HPLC, CG, FTIR, UV-VIS, Dissolutor com amostrador automático) de produtos acabados e matéria prima - Análise de rotina, estabilidade e validação. - Revisão de procedimentos operacionais padrão. - Controle de Reagentes.

7. *Marjan Indústria e Comércio - MIC*

Vínculo institucional

2007 - 2009 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Pleno , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:

- Análise instrumental (HPLC, CG, FTIR, UV-VIS, Dissolutor com amostrador automático) de produtos acabados. - Análise de validação de processos, limpeza e rotina. - Revisão de procedimentos operacionais padrão. - Responsável pelo cuidado com as colunas de HPLC.

8. *Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG - BI*

Vínculo institucional

2001 - 2002 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Pleno , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:

- Análise instrumental em HPLC de produtos de rotina. - Treinamentos em GMP - Responsável pelos cuidados e manutenção de estoque de colunas para HPLC.

9. *Zambon Group - ZAMBON*

Vínculo institucional

1998 - 2000 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Analista de Laboratório Junior , Carga horária: 40, Regime: Integral
Outras informações:

- Análise instrumental em HPLC de produtos de rotina e matéria prima - Análise química clássica de produtos de rotina e matéria prima. - Organização do arquivo morto, com as ordens de produção e retém.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 08/04/2017 às 22:23:21.

ANEXO V

Determinação das Condições Ideais de Análise em HPLC DAD e CAD

Determinação das Condições Ideais de Análise em HPLC com DAD e CAD.

Condições Cromatográficas	Condição Experimental 1	Condição Experimental 2	Condição Experimental 3	Condição Experimental 4	Condição Experimental 5	Condição Experimental 6
fase estacionária	Kinetex 2.6 C18 100x4.6mm					
comprimento de onda (nm)	$\lambda=280$ e $\lambda=238$	$\lambda=280$ e $\lambda=238$	$\lambda=280$ e $\lambda=238$	$\lambda=280$ e $\lambda=238$	$\lambda=280$ e $\lambda=238$	$\lambda=280$ e $\lambda=238$
CAD	NA			CAD	CAD	NA
volume injeção	20 μ L					
fase móvel	Isocrática - Acetonitrila : Água Purificada (60:40)	Gradiente: 0-4,5min: 100%Metanol-0%Água	Isocrática - Acetonitrila : Água Purificada (60:40)		Gradiente: 0-4,5min: 5%Acetonitrila-95%Ácido Fórmico 0,1%	Isocrática - Acetonitrila : Água Purificada (60:40)
		4,5-4,6min: 95%Metanol-5%Água			4,5-4,6min: 10%Acetonitrila-90%Ácido Fórmico 0,1%	
		4,6-11,5min: 25%Metanol-75%Água			4,6-8min: 5%Acetonitrila-95%Ácido Fórmico 0,1%	
		11,5-15,0min: 100%Metanol-0%Água				
fluxo (mL.min ⁻¹)	1,2	1	1		0,7	1
Diluyente	Metanol: Água (70:30)					
Temperatura Coluna (°C)	25°C	25°C	25°C	30°C	30°C	
Sample Cooler	5°C					

Determinação das Condições Ideais de Análise em HPLC com DAD e CAD.

Condições Cromatográficas	Condição Experimental 7	Condição Experimental 8	Condição Experimental 9
fase estacionária	Zorbax XDB C18 50x4.6mm, 5 µm		
CAD	Ganho 50 pA	Ganho 50 pA	Ganho 100 pA
temperatura nebulizador	30°C	35°C	35°C
volume injeção	20 µL	40 µL	50 µL
fase móvel	Isocrática - Acetonitrila : Água Purificada (50:50)	<p>Gradiente:</p> <p>0-2 min: 30%Isopropanol-50%Acetonitrila-20%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p> <p>2-5 min: 40%Isopropanol-50%Acetonitrila-10%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p> <p>5-9 min: 35%Isopropanol-60%Acetonitrila-5%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p> <p>9-10 min: 30%Isopropanol-50%Acetonitrila-20%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p>	<p>Gradiente:</p> <p>0 min: 30%Isopropanol-40%Acetonitrila-30%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p> <p>0-1 min: 30%Isopropanol-65%Acetonitrila-5%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p> <p>1-8 min: 14%Isopropanol-85%Acetonitrila-1%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p> <p>8-9 min: 35%Isopropanol-30%Acetonitrila-35%Acetato de Amônio 30 mM pH 4,5</p>
fluxo (mL.min ⁻¹)	0,7	1,0	1,2
Diluyente	Metanol: Água (70:30)		
Temperatura Coluna (°C)	25°C	30°C	30°C
Sample Cooler	5°C		

ANEXO VI

Determinação das Condições Ideais de Análise em HPLC acoplado ao espectro de massas (ESI QTOF)

Determinação das Condições Ideais de Análise em HPLC acoplado ao espectro de massas (ESI QTOF)

Condições Cromatográficas	Condição Experimental 1	Condição Experimental 2	Condição Experimental 3	Condição Experimental 4	Condição Experimental 5
fase estacionária	Poroshell EC C18 7µm 50mm x 2.1mm				
Fonte	ESI+	ESI+	ESI+	ESI+	ESI+/ ESI-
QTOF	Modo Qualitativo				
volume injeção	10 µL	1 µL	0,2 µL	0,1 µL	0,1 µL
fase móvel	Isocrática - Acetonitrila : Ácido Fórmico 0,1% (80:20)	Isocrática - Acetonitrila : Ácido Fórmico 0,1% (70:30)	Isocrática - Acetonitrila : Ácido Fórmico 0,1% (60:40)	Isocrática - Acetonitrila : Ácido Fórmico 0,1% (50:50)	Isocrática - Acetonitrila : Ácido Fórmico 0,1% (50:50)
fluxo (mL.min ⁻¹)	1	0,7	0,7	0,7	0,7
Diluyente	Fase Móvel				Metanol
Tempo Corrida	8 min+3post run			6min+4post run	
Sample Cooler	15°C				

ANEXO VII

Comparativo Métodos Cromatográficos utilizando espectrometria de massas para quantificação de Ezetimiba e Sinvastatina e seus metabólitos em matriz biológica.

Comparativo de Métodos para identificação e quantificação de ezetimiba e sinvastatina e metabólitos.

Análito	Matriz	Coluna	Fase Móvel	Preparo Amostra	Técnica LC	Referência
Sinvastatina	Plasma Humano	Coluna C18 Genesis 150x4,6mm (5µm), temperatura ambiente.	Fase Móvel A: NH ₄ OH 2.28mM, Fase Móvel B: NH ₄ OH 2.28 mM em Acetonitrila fluxo gradiente	PI-Lovastatina 10 ng/mL. Solução de extração- Dietiléter: Hexano- (80:20)Evaporação até securo em banho maria a 37°C sob corrente de nitrogênio. O resíduo foi reconstituído com acetonitrila: água (10:90)	LC-MS com MRM	NAJIB, 2003
Sinvastatina beta hidroxilada	Plasma Humano	Coluna C18 Alltech 150x4,6mm (3µm), temperatura ambiente	Fase Móvel: 90%Acetonitrila:10% Água+Ácido Fórmico 10mM; fluxo 1,0 mL/min	PI- (Sinvastatina OH 10 ng/ mL) Solução de extração (Dietiléter: Hexano-70:30)-vórtex 60 segundos. Evaporação em nitrogênio. O resíduo foi reconstituído com 200 mL de acetonitrila: água (20:80)	LC-MS com MRM	
Ezetimiba, Ezetimiba Cetona, Ezetimiba Glucoronideo	Bile	Coluna C18 Symmetry (4,6mmx250mm, 5 µm).	Fase Móvel ternária A: Ácido Fórmico 0,05M pH 3.0; B: Água MilliQ: Acetonitrila (10:90) e C: Água MilliQ: Metanol (10:90) gradiente. Fluxo 1,0 mL/ min. O eluído foi monitorado PDA a 250 nm.	Acetato de amônio 0,1M pH 4,5 - armazenados a -20°C. Precipitação com 75 µL de acetonitrila contendo 25% de ácido perclórico.	LC-MS API triplo quadrupolo	
Estatinas (Sinvastatina, Atorvastatina, Lovastatina)	Plasma Humano	Não citadas	Não citadas	SPE, LLE	ESI Triplo Quadrupolo Modo positivo e negativo	

Analito	Matriz	Coluna	Fase Móvel	Preparo Amostra	Técnica LC	Referência
Ezetimiba e Sinvastatina	Plasma Humano	Phenomenex Luna C18, 150x4.6mm , 3µm, 100 A, Security Guard 4mmx3mm	FM A-ACN com Ác.Fórmico 0,01% e Formiato de Amônio 10 mM, FM B-Ác.Fórmico 0,01% e Formiato de Amônio 10 mM pH 4.1. Gradiente.	Amostras centrifugadas após procedimento de precipitação de proteína (PPT). Centrifuga Eppendorf 5804-R, sobrenadante evaporado na corrente de nitrogênio usando turbovap, Pd Interno (Pravastatina)foi adicionado antes da extração , Diluição 1:20 Ácido Fórmico 0,2% e Formiato de Amônio 20 mM, Fase Móvel: Gradiente (LLE)	LC-PDA e Quadruopolo ESI	GONZALEZ, 2010
Ezetimiba	Plasma Humano	Luna C18 (2.0x100mm de 3 µm)	Fase Móvel Acetonitrila: Água (60:40), temperatura coluna 30°C, fluxo - 250 µL/ mL.	25 µL de PI (50 ng/mL)+ 250 µL de plasma. Extrator: metil-t-butil éter. Evaporado sob corrente de nitrogênio a 50°C. O resíduo foi reconstituído com 100 µL de Metanol:Água (50:50)	LC-MS com APCI	BAE, 2012
				25 µL de PI (500 ng/mL)+250 µL de plasma. Extrator: acetato de sódio 0.5M (pH-5.0) e 50 µL de beta glucoronidase (> 100,000 UI/ mL).		

Análito	Matriz	Coluna	Fase Móvel	Preparo Amostra	Técnica LC	Referência
Atorvastatina e Ezetimiba	Plasma Humano	C18 100x4,6mm de 3,5µm, Zorbax Eclipse Plus, temperatura coluna 40°C.	Fase Móvel: Ácido Fórmico 0,2%: Acetonitrila (30:70),	Extrator: etilacetato. Evaporação até a secura através de corrente de nitrogênio a 40±5°C. O resíduo foi reconstituído em 500 µL de fase móvel.	LC-MS triplo quadrupolo	BAGARI, 2013
Ezetimiba	Plasma Humano	Zorbax XDB-ODS C18 (2.1x100mm de 3,5 µm).	Fase Móvel: Acetato de Amônio 10mM pH 3,0: Acetonitrila (25:75)	EXtrator: etilacetato. Evaporação até a secura sob corrente de nitrogênio e em banho maria a 40°C. O resíduo foi redissolvido em 100 µL de fase móvel.	LC-MS com APCI	DANAFAR, 2013
Ezetimiba e Sinvastatina	Plasma de Ratos	Agilent Eclipse XDB-C18 150x4,6mm, 5µm, temperatura coluna-45°C	Fase Móvel: Acetonitrila: Acetato Amônio 10.0mM pH 4,5 (75:25)	Padrão de Ezetimiba, ezetimiba D4, sinvastatina, sinvastatina D6 a 1 mg/ mL. Diluente- Acetonitrila: Água Purificada (60:40), Branco, Padrão de Calibração e CQ retirados do freezer e ambientados.	Agilent 1200 acoplado a um API 4000 Qtrap ESI Modo Negativo e Positivo c/ MRM	KARANAM, 2014
Ezetimiba e Ezetimiba Glucoronídeo	Plasma Humano	Agilent Extend C18, 4,6mmx150mm, 5 µm c/ coluna de guarda C18, temperatura do forno-25°C.	Fase Móvel: Acetonitrila: Ácido Fórmico 0,08% (70:30),	10µL de PI (50 ng/ mL) + 200 µL de plasma + 300 µL de acetato de amônio-ácido acético 0,2M, pH 6.0-. Cartucho SPE Oasis HLB. Evaporar até secura em corrente de nitrogênio a 60°C. Reconstituir o resíduo em 200µL de fase móvel.	LC-MS ESI Modo Negativo	GUO, 2015

Analito	Matriz	Coluna	Fase Móvel	Preparo Amostra	Técnica LC	Referência
Ezetimiba, Sinvastatina e Sinvastatina Ácida	Plasma Humano	Kinetex XB C18, 150x4,6mm, 5µm, forno de coluna 35°C.	Fase Móvel: Formiato de Amônio 10 mM pH 4,0±0,3: Acetonitrila (27:73).	50 µL de PI (contendo 25 ng/ mL de ezetimiba D4 e 100 ng/ mL de sinvastatina D6 e sinvastatina ácida D3) foi adicionado, seguido de 0,4 mL de tampão de acetato de sódio 100 mM pH 4,0±0,3 e amostras resultantes foram brevemente misuradas em um vórtex e depois sujeitas ao SPE.	LC-MS-MS API Triplo Quadropolo	MUNAGA, 2016
				Cartucho Strata-X (30 mg/ cm3)		