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

**Métodos eletroforéticos e cromatográficos aplicados para a
determinação simultânea de fármacos hipolipidêmicos em
medicamentos**

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

Antonio Marcos Callejo de Souza

**Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
MESTRE**

Orientadora:
Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo
2015

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

**Métodos eletroforéticos e cromatográficos aplicados para a
determinação simultânea de fármacos hipolipidêmicos em
medicamentos**

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

Antonio Marcos Callejo de Souza

**Dissertação apresentada para obtenção do Grau de
MESTRE**

Orientadora:
Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo
2015

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

Souza, Antonio Marcos Callejo de
S729m Métodos eletroforéticos e cromatográficos aplicados para
a determinação simultânea de fármacos hipolipidêmicos em
medicamentos / Antonio Marcos Callejo de Souza. -- São
Paulo, 2015.
146p.

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

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

615.19015 CDD

Antonio Marcos Callejo de Souza

**Métodos eletroforéticos e cromatográficos aplicados para a
determinação simultânea de fármacos hipolipidêmicos em
medicamentos**

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado
Orientadora/Presidente

1 ° Examinador

2 ° Examinador

São Paulo, _____ de _____.

***Por que Deus é quem efetua em voz tanto o quer como o realizar,
segundo a sua boa vontade.”***

Filipenses 2:13

À Deus por ter me ofertado
capacidade, entendimento, direção
para conduzir este projeto

A minha esposa Ana Paula pela
paciência, compreensão e que me
apoiou e encorajou em todos os
momentos

Ao meu filho Davi pela ausência

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra. María Segunda Aurora Prado, pela oportunidade ser seu aluno, pelos ensinamentos, pelo constante incentivo e por acreditar no meu potencial durante todas as etapas.

A meu grande amigo, Mestre Fernando Lino Dias, pelo incentivado e apresentação da atmosfera acadêmica.

As meus amigos Nelson Kenji Furuya, Suli Higa, dos laboratórios Stiefel, uma empresa GSK, pelo apoio, incentivo e companheirismo durante o tempo que trabalhamos juntos.

Aos colegas do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Aos professores e aos funcionários, Principalmente aos colegas de laboratório: Cláudia Oliveira, Elenice, Laura Español, Lourdes Marcela, Aline de Souza, Adriana Marcondes pela ajuda e discussões durante esta caminhada.

Ao Laboratório Stiefel, uma empresa GSK, por possibilitarem o desenvolvimento de uma etapa deste projeto, por fornecerem os recursos necessários para o desenvolvimento deste projeto e o incentivo a pesquisa no país.

Ao laboratório *Merck Sharp and Dohme* pela doação de padrões e amostras para o desenvolvimento desta pesquisa.

A prof. Dr. Felipe Rebello por nos auxiliar na análise estatística dos dados analíticos.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, pela oportunidade.

A todos que contribuíram de alguma maneira para execução deste projeto, tornando possível sua realização.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	24
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1	A Dislipidemia.....	27
2.2	O Colesterol.....	29
2.2.1	Metabolismo do colesterol.....	29
2.2.2	Biossíntese do colesterol.....	31
2.3	Ezetimiba.....	33
2.4	Sinvastatina.....	36
2.5	Métodos Analíticos para Determinação Quantitativa da Ezetimiba Associada à Sinvastatina.....	39
2.6	Validação de Métodos Analíticos.....	41
2.6.1	Especificidade.....	43
2.6.2	Linearidade.....	43
2.6.3	Intervalo.....	44
2.6.4	Exatidão.....	44
2.6.5	Precisão.....	46
2.6.6	Limite de detecção.....	46
2.6.7	Limite de quantificação.....	46
2.6.8	Robustez.....	47
2.7	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	48
2.7.1	História da cromatografia.....	48
2.7.2	Cromatografia líquida clássica e de alta eficiência.....	49
2.7.3	Cromatografia líquido sólido ou por adsorção.....	50
2.7.4	Cromatografia de fase reversa (RPC).....	51
2.7.5	Cromatografia de fase normal (NPC).....	51
2.8	Equipamentos para HPLC.....	52
2.8.1	Reservatório de fase móvel.....	53
2.8.2	Bomba para HPLC.....	53
2.8.3	Injetores.....	54
2.8.4	Coluna para HPLC.....	55
2.8.4.1	Fases estacionárias em HPLC.....	55
2.8.5	Detectores.....	55
2.9	Eletroforese Capilar.....	57

2.9.1	Instrumentação.....	59
2.9.1.1	Introdução de amostra.....	60
2.9.1.2	Detectores.....	61
2.10	Adequabilidde do Sistema.....	62
2.10.1	Resolução.....	62
2.10.2	Número de pratos.....	63
2.10.3	Fator de cauda.....	64
2.10.4	Seletividade ou fator de separação.....	65
2.10.5	Fator de capacidade.....	66
3.	OBJETIVOS.....	67
3.1	Geral.....	67
3.2	Específicos.....	67
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
4.1	Materiais e Equipamentos.....	68
4.1.1	Placebo/ padrões/ amostra.....	68
4.1.2	Reagentes e solventes.....	69
4.1.3	Equipamentos.....	69
4.2	Métodos.....	69
4.2.1	Temperatura de fusão.....	69
4.2.2	Espectrometria de absorção na região do infravermelho (IR).....	70
4.2.3	Espectrometria de absorção na região do ultravioleta (UV)	70
4.2.4	Desenvolvimento de métodos analíticos.....	71
4.2.4.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	71
4.2.4.2	Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC).....	71
4.2.4.2.1	Composição do eletrólito de corrida.....	72
4.3	Validação de Métodos Analíticos para Doseamento de Ezetimiba Associado a Sinvastatina por HPLC (Categoria I).....	72
4.3.1	Especificidade.....	72
4.3.2	Teste de estresse com produto acabado.....	73
4.3.3	Linearidade e intervalo.....	75
4.3.4	Precisão e precisão intermediária.....	76
4.3.5	Exatidão.....	77
4.3.6	Limites de quantificação e detecção.....	78
4.3.7	Robustez.....	79
	Validação de Métodos Analíticos para Doseamento de Ezetimiba	

4.4	Associada à Sinvastatina por MECK (Categoria I).....	79
4.4.1	Especificidade – CE	79
4.4.2	Teste de estresse com amostra de produto acabado – CE	80
4.4.3	Linearidade e intervalo - CE.....	82
4.4.4	Precisão e precisão intermediária - CE.....	83
4.4.5	Exatidão - CE.....	84
4.4.6	Robustez - CE.....	85
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
5.1	Caracterização das Matérias-primas.....	86
5.1.1	Temperatura de fusão.....	86
5.1.2	Espectrometria na região do infravermelho (IV).....	86
5.1.3	Espectro na região do ultravioleta (UV).....	88
5.2	Desenvolvimento Analítico.....	89
5.2.1	HPLC.....	89
5.2.2	CE.....	95
5.2.2.1	Composição do eletrólito de corrida.....	96
5.3	Validação do Método Analítico por HPLC.....	102
5.3.1	Especificidade.....	102
5.3.2	Linearidade e intervalo.....	107
5.3.3	Limite de quantificação e detecção.....	111
5.3.4	Exatidão.....	112
5.3.5	Precisão.....	113
5.3.6	Precisão intermediária.....	114
5.3.7	Robustez.....	115
5.4	Validação de Método Analítico por CE.....	117
5.4.1	Especificidade - CE.....	117
5.4.2	Linearidade e intervalo - CE.....	123
5.4.3	Exatidão - CE.....	127
5.4.4	Precisão - CE.....	128
5.4.5	Precisão intermediária - CE.....	129
5.4.6	Robustez - CE.....	130
5.4.7	Comparação entre as técnicas de HPLC e CE para determinação quantitativa de ezetimiba associada à sinvastatina.....	132
6.	CONCLUSÃO.....	133

7.	REFERÊNCIAS.....	134
-----------	-------------------------	------------

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Transporte dos lipídios e lipoproteínas no organismo
- FIGURA 2** Etapas da síntese do colesterol mediada pela absorção alimentar
- FIGURA 3** Estrutura química da ezetimiba
- FIGURA 4** Estrutura química da sinvastatina
- FIGURA 5** Esquema de um cromatógrafo líquido
- FIGURA 6** Eletroforese – separação em um campo elétrico
- FIGURA 7** Esquema de um equipamento de eletroforese capilar
- FIGURA 8** Separação cromatográfica de duas substâncias
- FIGURA 9** Influência de N na resposta da coluna cromatográfica
- FIGURA 10** Esquema de cromatograma para cálculo de fator de alargamento
- FIGURA 11** Esquema de pico cromatográfico com vários fatores de simetria
- FIGURA 12** Espectro de absorção do padrão da ezetimiba na região do infravermelho
- FIGURA 13** Espectro de absorção do padrão da sinvastatina na região do infravermelho.
- FIGURA 14** Espectro de absorção da solução padrão de sinvastatina ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) na região do ultravioleta (UV)
- FIGURA 15** Espectro de absorção da solução padrão de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) na região do ultravioleta (UV)
- FIGURA 16** Sobreposição dos espectros de ezetimiba e sinvastatina

FIGURA 17 Cromatograma da ezetimiba e sinvastatina utilizado uma coluna C18

FIGURA 18 Cromatograma obtido com ACN: água purificada 90:10 v/v (**A**); ACN: água purificada 80:20 v/v (**B**); ACN: água purificada 70:30 v/v (**C**); ACN: água purificada 70:20 v/v (**D**); ACN: água purificada 52:48 v/v (**E**), vazão 0,8 mL / min, 35 °C, detecção UV em 238 nm: Coluna: *NST CN* (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 µm)

FIGURA 19 Eletroferograma da losartana potássica (100,0 µg mL⁻¹) (1); ezetimiba (100,0 µg mL⁻¹) (2) e sinvastatina (200,0 µg mL⁻¹) (PI). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238nm

FIGURA 20 Eletroferograma da losartana potássica (1) (200,0 µg mL⁻¹) (PI); ezetimiba (2) 200,0 µg mL⁻¹ e sinvastatina (3) (200,0 µg mL⁻¹). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm

FIGURA 21 Eletroferograma da losartana potássica (1) (200,0 µg mL⁻¹) (PI); ezetimiba (2) (200,0 µg mL⁻¹) e sinvastatina (3) (200,0 µg mL⁻¹). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 1s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm

FIGURA 22 Cromatograma da solução diluente (acetonitrila: água purificada 65:35 v/v) (Fase móvel :Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão 0,8 mL/min, 35 °C, detecção UV em 238nm). Coluna: *RP NST CN* (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 µm)

FIGURA 23 Cromatograma da solução placebo (Fase móvel :Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão 0,8 mL / min, 35 °C, detecção UV em 238 nm). Coluna: *NST CN* (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 µm)

FIGURA 24 Cromatograma da solução padrão de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL / min}$, 35°C , detecção UV em 238 nm): Coluna: *NST CN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ interno $\times 3,5 \mu\text{m}$)

FIGURA 25 Cromatograma obtido após da hidrólise ácida da amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /168 horas. Fase móvel (Isocrático): ACN: Água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL / min}$, 35°C , detecção UV em 238nm) Coluna: *NST CN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ interno $\times 3,5 \mu\text{m}$)

FIGURA 26 Cromatograma obtido após da hidrólise alcalina da amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 5 minutos. Fase móvel (Isocrático): ACN: Água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL / min}$, 35°C , detecção UV em 238nm) Coluna: *NST CN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ interno $\times 3,5 \mu\text{m}$)

FIGURA 27 Cromatograma obtido após da hidrólise oxidativa da amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** H_2O_2 3% / 168 horas. Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL / min}$, 35°C , detecção UV em 238 nm) Coluna: *NST CN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ interno $\times 3,5 \mu\text{m}$)

FIGURA 28 Cromatograma obtido após aquecimento (60°C /168 horas) de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48v/v), vazão $0,8 \text{ mL / min}$, 35°C , detecção UV em 238 nm) Coluna: *NSTCN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ interno $\times 3,5 \mu\text{m}$)

FIGURA 29 Cromatograma obtidos após exposição à luz UV (fotólise) de amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** Exposição em balão transparente a luz direta/168 horas. (Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL / min}$, 35°C , detecção UV em 238 nm) Coluna: *NSTCN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ interno $\times 3,5 \mu\text{m}$).

FIGURA 30 Curva analítica – ezetimiba

FIGURA 31 Análise de resíduos para ezetimiba

FIGURA 32 Curva analítica para sinvastatina

FIGURA 33 Análise de resíduos para sinvastatina

FIGURA 34 Eletroferograma da solução placebo. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238nm

FIGURA 35 Eletroferograma do eletrólito de corrida. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30cm, injeção: 20mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm

FIGURA 36 Eletroferograma da solução padrão de losartana potássica (1) (100,0 µg mL⁻¹) (PI); ezetimiba (2) (100,0 µg mL⁻¹) e sinvastatina (3) (200,0 µg mL⁻¹). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm.

FIGURA 37 Eletroferograma da solução amostra losartana potássica (1) (100,0 µg mL⁻¹) (PI); ezetimiba (2) (100,0 µg mL⁻¹) e sinvastatina (3) (200,0 µg mL⁻¹). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm.

FIGURA 38 Eletroferograma da solução amostra obtida após exposição à luz (fotólise) de losartana potássica (1) (100,0 µg mL⁻¹) (PI); ezetimiba (2) (100,0 µg mL⁻¹) e sinvastatina (3) (200,0 µg mL⁻¹). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50µm de d.i, comprimento efetivo de 30cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm.

FIGURA 39 Eletroferograma obtidos após hidrólise ácida da amostra de losartana potássica (1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$); Produto de degradação (PD). Condição: HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ / 168 h horas. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura $30 ^\circ\text{C}$, e detecção 238 nm.

FIGURA 40 Eletroferograma obtidos após hidrólise alcalina da amostra de losartana potássica (1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) Produtos de degração (PD). Condição: NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 5 minutos. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: $50\mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura $30 ^\circ\text{C}$, e detecção 238 nm

FIGURA 41 Eletroferograma obtidos após hidrólise oxidativa da amostra losartana potássica (1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$); Produto de degradação (PD). Condição: H_2O_2 30% / 168 horas. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH = 9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura $30 ^\circ\text{C}$, e detecção 238nm.

FIGURA 42 Eletroferograma obtidos após aquecimento da amostra de losartana potássica(1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$); Produto de degradação (PD). Condição: $60 ^\circ\text{C}$ / 168 horas. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH= 9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura $30 ^\circ\text{C}$, e detecção 238 nm.

FIGURA 43 Curva analítica CE – ezetimiba

FIGURA 44 Análise de resíduos para ezetimiba CE

FIGURA 45 Curva analítica para sinvastatina – CE

FIGURA 46 Análise de resíduo para sinvastatina CE

LISTA DE TABELA

TABELA 1	Preparo das soluções para o teste de linearidade
TABELA 2	Preparo das soluções para o teste de exatidão
TABELA 3	Parâmetros cromatográficos alterados para o ensaio de robustez
TABELA 4	Preparo das soluções para o teste de linearidade – CE
TABELA 5	Preparo das soluções para o teste de exatidão – CE
TABELA 6	Parâmetros eletroforéticos alterados para o ensaio de robustez – CE
TABELA 7	Resultados obtidos para determinação da temperatura de fusão (ezetimiba / sinvastatina) – Método Capilar
TABELA 8	Resultados de adequabilidade do sistema (<i>System suitability</i>)
TABELA 9	Resultados de adequabilidade do sistema (<i>System suitability</i>) - CE
TABELA 10	Resumo das condições de trabalho para CE
TABELA 11	% Degradação dos ativos do analito nas condições de estresse
TABELA 12	Área obtida para ensaio de linearidade - ezetimiba
TABELA 13	Análise de variância entre área e concentração de ezetimiba
TABELA 14	Área obtida para ensaio de linearidade – sinvastatina
TABELA 15	Análise de variância entre área e concentração de sinvastatina
TABELA 16	Resultados relativo ao ensaio de exatidão de ezetimiba e sinvastatina

TABELA 17	Resultados relativo ao ensaio de repetibilidade
TABELA 18	Resultados relativo ao ensaio de precisão intermediária
TABELA 19	Resultados do ensaio de robustez para ezetimiba
TABELA 20	Resultados do ensaio de robustez para sinvastatina
TABELA 21	Área obtida para ensaio de linearidade CE – ezetimiba
TABELA 22	Análise de variância entre área e concentração de ezetimiba CE
TABELA 23	Área obtida para ensaio de linearidade CE – sinvastatina
TABELA 24	Análise de variância entre área e concentração de sinvastatina – CE
TABELA 25	Resultados relativo ao ensaio de exatidão de ezetimiba e sinvastatina – CE
TABELA 26	Resultados relativo ao ensaio de repetibilidade - CE
TABELA 27	Resultados relativo ao ensaio de precisão intermediária - CE
TABELA 28	Resultados do ensaio de robustez para ezetimiba – CE
TABELA 29	Resultados do ensaio de robustez para sinvastatina – CE
TABELA 30	Comparação dos resultados entre as técnicas de HPLC e CE para determinação quantitativa de ezetimiba associada à sinvastatina

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Parâmetros cromatográficos descritos na literatura para quantificação de ezetimiba associada a sinvastatina
QUADRO 2	Parâmetro necessário durante a validação de método analítico
QUADRO 3	Limites percentuais do teor que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos
QUADRO 4	Exemplos de fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico
QUADRO 5	Detectores usados em CE e seus limites de detecção aproximados
QUADRO 6	Atribuição de posições das principais bandas de absorção da ezetimiba na região do IR
QUADRO 7	Atribuição de posições das principais bandas de absorção da sinvastatina na região do IR
QUADRO 8	Resultados relativo ao LOQ e LOD de ezetimiba e sinvastatina

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Enzima acil-CoA colesterol aciltransferase
AACE	American association of clinical endocrinologists
Acetil-CoA	Acetil coenzima – A
ACN	Acetonitrila
APÓS	Apoproteínas
AVC	Acidente vascular cerebral
CE	Eletroforese capilar
CLC	Cromatografia líquida clássica
CIEF	Focalização isoeletrica capilar
CIPT	Isotacoforese capilar
CN	Cianopropil
CT	Colesterol total
CGE	Eletroforese capilar em gel
CZE	Eletroforese capilar de zona
DAD	Detector de arranjo diodos
DC	Doença coronariana
DCV	Doença cardiovascular
DPR	Desvio padrão relativo
EZE	Ezetimiba
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia gasosa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3metilglutaril coenzima – A
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência

IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
K	Fator de retenção
KBr	Brometo de Potássio
Kv	Kilovolts
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
MeOH	Metanol
Nm	Nanômetro
N	Número de pratos
NCP	Cromatografia de fase normal
nL	Nanolitro
NST	Nano Separation Technologies
R_s	Resolução
RPC	Cromatografia de fase reversa
SDS	Dodecilsulfonato de sódio
SIM	Sinvastatina
TBS	Tetraborato de sódio
TLC	Cromatografia em camada delgada
TC	Triglicerídios
TG	Triacilglicerol
Tr	Tempo de retenção
Tm	Tempo de migração
UV	Ultravioleta
VIS	Visível
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	Organização mundial da saúde

SOUZA, A. M. C. **Métodos eletroforéticos e cromatográficos aplicados para determinação simultânea de fármacos hipolipidêmicos em medicamentos.** 2015. 146f. (Dissertação mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

RESUMO

A ezetimiba e a sinvastatina são fármacos hipolipidêmicos. A ezetimiba pertence à nova classe das 2 - azetidinona, inibidores e bloqueadores do colesterol intestinal. A sinvastatina pertence à classe dos inibidores competitivos da hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA), que é a última etapa regulada na síntese do colesterol. O objetivo do trabalho foi desenvolver e validar métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE), rápidos, seletivos e confiáveis para determinação dos hipolipidêmicos em formulações farmacêuticas. A separação cromatográfica foi realizada usando coluna *Nano separation technologies* (NST) Cianopropil (CN) (150 mmx 4,6 mm, com partícula 3,5 µm), e eluição isocrático usando água purificada: acetonitrila (48:52, v/v); vazão 0,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A temperatura da coluna foi de 35 °C e a detecção foi realizada com detector na região do UV em 238 nm. O método por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) foi desenvolvido utilizando capilar de sílica fundida 30 cm (comprimento efetivo) x 50 µm d.i. e eletrólito constituído de tetraborato de sódio (TBS) 20 mmol L⁻¹: dodecil sulfato de sódio (SDS) 30 mmol L⁻¹, pH 9,0 ajustado com 10% ácido fosfórico: acetonitrila 12% v/v. O tempo de injeção foi de 3 segundos com pressão hidrodinâmica de 20 mbar, voltagem aplicada de 30 kV e detecção no UV em 238 nm. Os métodos analíticos foram validados de acordo com os requerimentos vigentes da ANVISA, ICH e Farmacopéia Americana. Portanto, os métodos propostos demonstraram ser lineares, precisos, exatos e adequados para quantificação simultânea da ezetimiba e sinvastatina em formas farmacêuticas sólidas.

Palavras-chave: Ezetimiba, Sinvastatina, Cromatografia eletrocínica micelar, HPLC, Validação analítica.

SOUZA, A. M. C. **Electrophoretic and chromatographic methods applied for the simultaneous determination of hypolipidemic drugs in medicines.** 2015. 146f (Dissertação mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

ABSTRACT

Ezetimibe and simvastatin are hypolipidemic drugs. Ezetimibe belongs to a new class of 2 - azetidione, inhibitors and blockers of intestinal cholesterol. Simvastatin belongs a class of competitive inhibitors of 3-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which is the last regulated step in the cholesterol synthesis. The aim of this project was to develop and validate fast, selective and reliable chromatographic and electrophoretic methods, to determine hypolipidemic drugs in pharmaceutical formulations. The chromatographic separation was carried out on a Nano separation technologies (NST) Cyanopropyl (CN) (150 mm x 4,6 mm, 3,5 μm), isocratic elution using purified water: acetonitrila (48:52 v/v), the flow rate was 0,8 mL/min and the injection volume was 20 μL . The column temperature was kept at 35 $^{\circ}\text{C}$ and detection wavelength was set at 238 nm. The micellar electrokinetic chromatographic method was developed using a fused silica capillary column 30 cm (effective length) x 50 μm i.d, the electrolyte was constituted of 20 mmol L^{-1} tetraborate buffer solution: 30 mmol L^{-1} sodium dodecyl sulphate (SDS), pH 9.0 adjusted with 10% phosphoric acid: 12 % v/v acetonitrile. The injection time was 3 s at 20 mbar, the applied voltage was 30 kV and detection was set at 238 nm. The both methods were developed and validated according to ANVISA, ICH and US Pharmacopeia guidelines. Therefore, the proposed methods proved to be linear, precise, accurate and suitable for simultaneous quantitation of ezetimibe and simvastatin in solid pharmaceutical formulations.

Key words: Ezetimibe, Simvastatin, Micellar electrokinetic chromatography, HPLC, Analytical validation.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são responsáveis pela maior taxa de morbidade e mortalidade em todo mundo, matando mais que qualquer outra doença. (WHO, 2012; WU, *et al.*, 2010).

São diversos os fatores de risco que predisõem ao desenvolvimento de DCVs. Dentre estes, as dislipidemias e a hipertensão representam mais de dois terços destes riscos, sendo que as dislipidemias destacam-se como as mais importantes tanto pela sua importância na gênese das DCVs, como pela sua frequência populacional e possibilidade de tratamento (AACE, 2012; BERTOLAMI, 2007; CHAPMAN *et al.*, 2010; GOODMAN e GILMAN, 2007; POLANCZYK, 2005).

A dislipidemia mais comumente associada com o aumento no risco das DCVs é a hipercolesterolemia (BERTOLAMI, 2007). A hiperlipidemia ou hipercolesterolemia, caracterizada pela elevação da concentração de lipídios no plasma, é a manifestação de um distúrbio na síntese e na degradação de lipoproteínas plasmáticas e representa a principal causa de aterosclerose (FERNANDES *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013; SILVA, 2009). Para pacientes com a hiperlipidemia estabelecida, recomenda-se controle dos fatores de risco através de medicamentos, bem como, mudança no estilo de vida através da prática de atividade física e terapia nutricional. Todavia, quando a prevenção primária não apresentar efeito satisfatório ou impossibilidade de aguardar os efeitos da mudança no estilo de vida por prioridade clínica, medidas farmacológicas e o tratamento com hipolipemiantes devem ser adotados simultaneamente (AACE, 2012; GENEST, *et al.*, 2009; HATZITOLIOS *et al.*, 2009; SILVA, 2009).

Os níveis de colesterol plasmático originam-se através de duas vias, a exógena (absorção intestinal) através da alimentação, e a endógena (derivados da biossíntese) proveniente da síntese de Acetil Coenzima-A (Acetil-CoA), e podem ser controlados através de mecanismos que atuem na síntese, no aumento da eliminação ou na absorção intestinal do colesterol (ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005; OLIVEIRA, 2007). As estatinas, inibidores da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase, são os fármacos hipolipidêmicos de primeira escolha no tratamento das hipercolesterolemia, porém atua somente na síntese endógena do colesterol.

Recentemente foi introduzido na terapêutica um novo aliado no tratamento das dislipidemias, a ezetimiba (EZE). A EZE pertence à classe das

2- azetidinonas sintéticas, um inibidor seletivo da absorção do colesterol intestinal, o qual inibe fortemente a absorção do colesterol biliar e dietético, bloqueia a absorção intestinal do colesterol, resultando em redução do colesterol plasmático total e dos níveis de LDL, sem afetar a absorção de vitaminas lipossolúveis, triglicérides e ácidos biliares. Pode ser utilizada como monoterapia ou combinada às estatinas, produzindo um efeito adicional na redução dos níveis de LDL nas dislipidemias (DAVIS, 2004).

Os grandes progressos na área farmacêutica e da tecnologia contribuíram para o desenvolvimento de novas moléculas de interesse terapêutico, que exigem métodos analíticos e bioanalíticos para sua determinação quantitativa em produtos farmacêuticos e em matriz biológica, que são imprescindíveis no controle de qualidade e para avaliação e interpretação de dados de biodisponibilidade (OLIVEIRA, 2007). O desenvolvimento de método analítico envolve a avaliação e otimização de condições, as quais incluem preparação de amostra, separação cromatográfica e eletroforética, detecção e quantificação (OLIVEIRA, 2007). Para assegurar que um método gere dados confiáveis e interpretáveis sobre uma amostra, ele deve ser validado. A validação é necessária para demonstrar que o método é apropriado para finalidade pretendida, garantindo através de estudos experimentais, que o método atende aos parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limite de quantificação e de detecção e robustez adequados para análise (ANVISA, 2003; ICH, 1996; RIBANI *et al*, 2004).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica de separação, principalmente com detecção no ultravioleta (UV), que passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão fortemente relacionadas à sua boa sensibilidade, precisão e exatidão, além disso, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente estáveis. Por sua vez, a inclusão de análises por eletroforese capilar (CE) pode acrescentar vantagens em relação ao consumo de solventes (1 – 100 mL diários), maior eficiência e resolução obtidas em um menor tempo de análise, constituindo uma alternativa sofisticada aos métodos de separação existentes para o controle de qualidade (OLIVEIRA, 2007; TAVARES, 1997).

Assim, há uma urgente necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos para determinação simultânea de estatinas (sinvastatina) e ezetimiba nas

diversas apresentações farmacêuticas, devido ao contínuo crescimento do uso clínico destes dois agentes combinados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Dislipidemia

As doenças cardiovasculares são responsáveis pela maior taxa de morbidade e mortalidade em todo mundo, matando mais que qualquer outra doença. Estima-se que 17 milhões de pessoas morreram de DCVs em 2008, representando aproximadamente 30% das mortes ao redor do mundo. Destas mortes, 7,3 milhões foram devido as doença coronariana (DC) e outros 6,2 milhões atribuídos ao acidente vascular cerebral (AVC). De acordo com o *World Health Organization* (WHO), em 2030 as DCVs terão feito 25 milhões de novas vítimas principalmente de doenças coronárias e derrames (WHO, 2012; WU, *et al.*, 2010).

Os principais fatores de risco que predispõem ao desenvolvimento de DCVs e suas manifestações clínicas estão fortemente associados ao histórico familiar, sedentarismo, tabagismo, dislipidemias, diabetes, hipertensão arterial sistêmica e obesidade. Dentre estes, as dislipidemias e a hipertensão representam mais de dois terços destes riscos, sendo que as dislipidemias destacam-se como as mais importantes, tanto pela sua importância na gênese das DCVs, como pela sua frequência populacional e possibilidade de tratamento (AACE, 2012; BERTOLAMI, 2007; CHAPMAN *et al.*, 2010; GOODMAN e GILMAN, 2007; POLANCZYK, 2005).

As dislipidemias são caracterizadas por distúrbios nos níveis de lipídios circulantes com ou sem repercussão sobre o território vascular, associadas a manifestações clínicas diversas.

A dislipidemia mais comumente associada com o aumento no risco das DCVs é a hipercolesterolemia (BERTOLAMI, 2007). A hiperlipidemia ou hipercolesterolemia, elevação da concentração de lipídios no plasma, é a manifestação de um distúrbio na síntese e na degradação de lipoproteínas plasmáticas e representa a principal causa de aterosclerose (FERNANDES *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013; SILVA, 2009). Estas por su vez, podem ser influenciadas por distúrbios genéticos e /ou adquiridos. Entre as variáveis ambientais envolvidas na determinação do perfil lipídico incluem-se tabagismo, sedentarismo e dieta. Ingestão calórica excessivas, com elevado teor de gordura e colesterol, está associada a níveis séricos aumentados de colesterol total (CT) e fração da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Em adultos, concentração

aumentada de CT e diminuída e da fração da lipoproteína de alta densidade (HDL), leva ao acúmulo deste nas paredes dos vasos sanguíneos (placas ateroscleróticas), e conseqüentemente a obstrução dos vasos (aterosclerose). Existem também outros fatores envolvidos, porém não controláveis, são eles: idade, sexo, raça e hereditariedade (COELHO, *et al.*, 2005).

A doença aterosclerótica é atualmente uma das maiores causas de óbito, principalmente em países de vida ocidental. Baixos níveis de HDL colesterol contrapostos com elevadas concentrações plasmáticas de triglicerídios e LDL estão consistentemente relacionados com o aumento de eventos cardiovasculares (ARAÚJO, FILHO, e CHAGAS, 2005). Sendo uma doença multifatorial sua prevenção passa pela identificação e controle das hiperlipidemias, assim com fatores de risco decorrente de dieta alimentar e estilo de vida inadequado e sedentarismo (MARKMAN, ROSA e KOSCHTSCHAK, 2010).

A aterosclerose caracteriza-se pelo estreitamento das paredes dos vasos sanguíneos devido à deposição de gordura na camada mais interna da artéria, formando lesões ateroscleróticas, denominada ateromas. Estas placas consistem em depósito de gorduras, principalmente o colesterol, mas também plaquetas, macrófagos, células musculares deterioradas e outros tecidos, o interior dos vasos, diminuindo o fluxo sanguíneo. A ruptura da placa e a conseqüente trombose podem levar ao bloqueio de artérias e causar AVC, enfarte do miocárdio, angina do peito, morte súbita ou insuficiência cardíaca (BRUNZELL, *et al.*, 2008; NELSON e COX, 2006; FERRO, 2010; OLIVEIRA, 2007).

O principal fator de risco é a combinação do elevado nível plasmático de LDL e baixo nível de HDL, todavia, as placas tornam-se maiores e numerosas com a idade e nos homens, fatores com antecedentes familiares de hiperlipidemia, obesidade, dietas ricas em gorduras, ausência de exercícios físicos, consumo elevado de álcool, tabagismo, diabetes podem contribuir para uma disfunção lipídica. O papel das dislipidemias no desenvolvimento das doenças cardiovasculares tem sido estabelecido por evidências epidemiológicas, clínicas, genéticas e de estudos em animais de laboratório. Para reversão do quadro clínico pode-se intervir no controle dos fatores de risco através de medicamentos, bem como através de programa de atividades físicas e terapias nutricionais (OLIVEIRA, 2007).

2.2 O Colesterol

2.2.1 Metabolismo do colesterol

O colesterol é o lipídio que vem recebendo grande atenção e é famoso principalmente pela correlação existente na espécie humana entre os elevados níveis de colesterol no sangue e a incidência de doenças do sistema cardiovascular.

O colesterol é um esteroide da membrana celular e um importante precursor dos hormônios esteróides e dos ácidos biliares, enquanto os triglicerídeos são responsáveis pelo armazenamento e transporte de energia pelo organismo. Todavia, presente em concentrações elevada pode contribuir para incidência de doenças cardiovasculares, sendo a maior causa de desenvolvimento e progressão da aterosclerose (OLIVEIRA, 2007; CAMPO E CARVALHO, 2007). Os níveis de colesterol plasmático originam-se através de duas vias, a exógena (absorção intestinal) através da alimentação, e a endógena (derivados da biossíntese) proveniente da síntese de Acetil coenzima - A (acetil-CoA) (ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005; OLIVEIRA, 2007).

A característica geral dos lipídios é serem insolúveis em água. Esses lipídios precisam, no entanto, ser transformados no plasma sanguíneo. As lipoproteínas são complexos macromoleculares esféricos, compostos por um núcleo hidrofóbico contendo triglicerídeos e ésteres de colesterol e por uma superfície hidrofílica constituída de fosfolipídios, colesterol livre e proteínas. As lipoproteínas permitem a solubilização e o transporte dos lipídios, através do plasma sanguíneo pelas proteínas denominadas apoproteínas (Apos). Diferentes combinações de lipídios e proteínas produzem subclasses de lipoproteínas com tamanhos e densidades diferentes divididas em quilomícrons, lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), baixa (LDL), intermediária (IDL) e alta (HDL). Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinado pelo seu local de síntese, por sua composição lipídica (NELSON e COX, 2006).

No homem a maior parte da síntese do colesterol ocorre no fígado. Uma pequena fração do colesterol sintetizado neste órgão é incorporada nas membranas dos hepatócitos, mas a maior parte é transportada em uma das três formas: colesterol biliar, ácidos biliares e ésteres de colesterol (NELSON e COX, 2006). São,

portanto, considerados dois sistemas interligados que metabolizam as lipoproteínas (uma via exógena e outra via endógena) (NELSON e COX, 2006).

Os níveis de colesterol plasmático originam-se através de duas vias, a exógena (absorção intestinal) através da alimentação, e a endógena (derivados da biossíntese) proveniente da síntese de Acetil-CoA. Os ácidos graxos provenientes da dieta (via exógena) são absorvidos e convertidos em triglicerídios no intestino delgado e são incorporados em lipoproteínas sintetizadas no retículo endoplasmático dos quilomícrons, que os transportam para corrente sanguínea. Na circulação os triglicerídios são removidos pela ação da proteína lipase. Esse processo dá origem aos quilomícrons remanescentes que são transportados para o fígado e os ácidos graxos são liberados em diferentes tecidos de forma a serem utilizados em mecanismos celulares ou armazenados, sob forma de triacilgliceróis. Na **Figura 1** são apresentados os ciclos dos lipídios e das lipoproteínas.

FIGURA 1 – Transporte dos lipídios e lipoproteínas no organismo (FERRO, 2010)

Os ácidos biliares e seus sais são derivados do colesterol relativamente hidrofóbicos e sintetizados no fígado ajudam na digestão dos lipídios. Os ésteres de colesterol são originados no fígado através da ação da enzima acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT). A ACAT catalisa a transferência de um ácido graxo da coenzima A para o grupo hidroxila do colesterol. Os ésteres de colesterol são

armazenados no fígado ou transportados carregados em partículas lipoprotéicas para outros tecidos que utilizam o colesterol (NELSON E COX, 2006; OLIVEIRA, 2007).

Quando a dieta contém mais ácidos graxos e/ ou carboidratos que a quantidade necessária como combustível, esses são convertidos em triacilgliceróis no fígado e unidos com as apoproteínas específicas para originar as VLDL. Essas lipoproteínas são transportadas do fígado para os músculos e para os tecidos adiposos, onde a ativação da lipoproteína lipase provoca a separação dos ácidos graxos livres dos triacilgliceróis das VLDL. Os adipócitos captam esses ácidos graxos livres, resintetizam os triacilgliceróis e armazenam os produtos em gotículas lipídicas; os miócitos oxidam esses ácidos graxos para produção de energia. A maior parte da VLDL remanescentes é removida da circulação pelos hepatócitos. Essa captação é mediada por receptores e dependentes da presença da Apo E no remanescente da VLDL. A perda de triacilgliceróis converte algumas VLDL em VLDL remanescentes, denominada IDL; a remoção adicional de triacilgliceróis das VLDL resulta LDL. As LDL são muito ricas em colesterol e em ésteres de colesterol sendo a apo B-100 sua principal lipoproteína, e atuam no transporte do colesterol para os periféricos, considerada vulgarmente como sendo colesterol nocivo ao organismo, elevando o risco das DCVs (NELSON e COX, 2006).

A HDL é sintetizada no fígado e no intestino delgado como partículas ricas e proteínas possuindo pouco colesterol e nenhum éster de colesterol. As HDL são lipoproteínas protetoras, que contribuem para o declínio de DCVs protegem o leito vascular contra aterogênese, tais como a remoção de lipídeos oxidados de LDL, inibição de moléculas de adesão e estimula produção de óxido nítrico (NELSON e COX, 2006).

2.2.2 Biossíntese do colesterol

A síntese do colesterol é um processo complexo que envolve uma grande gasto energético, por esta razão, é de fundamental importância o conhecimento do mecanismo que regula a síntese que é obtida pela via exógena (FERRO, 2010).

A biossíntese do colesterol inicia-se no organismo pela associação de três moléculas de acetil-CoA produzindo HMG-CoA. A HMG-CoA é a seguir reduzida em ácido mevalônico, numa reação catalisada pela HMG-CoA redutase. Há três possibilidades de controle do colesterol: pela inibição do gene da enzima HMG-

redutase, pela regulação a nível hormonal (glucagom e insulina) e pela ativação a ACAT, **Figura 2** (CAMPO e CARVALHO, 2007; FERRO, 2010; MARZZOCO e TORRES, 1999, OLIVEIRA, 2007).

FIGURA 2 - Etapas de síntese do colesterol mediada pela absorção alimentar (FERRO, 2010).

A presença de níveis elevados de um esteroide não identificado (colesterol ou derivado) promove uma rápida degradação da enzima HMG-redutase e inibição da transcrição deste gene. Não sendo produzida esta enzima, a conversão da HMG-CoA em mevalonato não ocorrerá. Os medicamentos utilizados para inibir esta etapa na produção de colesterol são conhecidos como estatinas (FERRO, 2010; NELSON e COX, 2006).

As lipoproteínas envolvidas na aterogênese são classificadas dependendo da maior apolipoproteína presente e o conteúdo dos componentes lipídico. Os componentes da dislipidemia aterogênica inclui elevados níveis de TC (≥ 240 mg/dL), LDL- C (≥ 160 mg/dL), fragmentos de lipoproteínas VLDL, IDL e baixos níveis de HDL (< 40 mg/dL – homens e < 50 mg/dL - mulheres) (AACE, 2012; SILVA, 2009).

Em um estudo estatístico conduzido pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em 2009, as DCVs aparecem como principal causa de óbitos no Brasil, representando 31,3% da mortalidade proporcional a doenças crônicas não transmissíveis (BRASIL, 2010).

A cada ano estima-se que 785 mil americanos terão um novo evento de doença do sistema circulatório, e aproximadamente 470 mil terão um ataque recorrente. Em 2007, a doenças coronarianas causaram aproximadamente 1 de cada 6 mortes nos Estados Unidos da América. A *American association of clinical*

endocrinologists (AACE) estima que 33,6 milhões de adultos com 20 anos ou mais, tenham os níveis de colesterol total ≥ 240 mg/dL, o que representa 15 % da população americana (AACE, 2012).

As estatísticas revelam a importância de identificação e controle dos fatores de riscos das DCVs, especialmente os níveis de colesterol, tabagismo e pressão sanguínea (GENEST *et al.*, 2009). Para o tratamento de pacientes com alteração nos níveis lipídicos é necessário avaliar parâmetros como o nível de colesterol e triglicerídios plasmáticos, presença de DCVs, a severidade de dos fatores de risco, quando presentes, e avaliação baseada nos níveis de risco da *PROspective Cardiovascular Munster* (PROCAM), ferramenta quantitativa, que estima o risco de um paciente com dislipidemia, livre de DCVs, desenvolver em um período de 10 anos, levando em consideração idade, LDL-C, HDL-C, TG, hábito de fumar, pressão arterial sistólica e histórico familiar doenças cardiovasculares prematuras (HATZITOLIOS *et al.*, 2009; SILVA, 2009).

Para pacientes com a hiperlipidemia estabelecida, recomenda-se mudança no estilo de vida e comportamento alimentar, com dieta pobre em gorduras e sódio, restrição calórica para controle do peso, atividade física, controle da pressão arterial e cessação do tabagismo. Contudo, quando a prevenção primária não apresentar efeito satisfatório ou impossibilidade de aguardar os efeitos da mudança no estilo de vida por prioridade clínica, medidas farmacológicas e o tratamento com hipolipemiantes devem ser adotados simultaneamente. (AACE, 2012; IV DIRETRIZ BRASILEIRA SOBRE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE, 2007; GENEST, *et al.*, 2009; HATZITOLIOS *et al.*, 2009; SILVA, 2009).

2.3 EZetimiba

Recentemente foi introduzido na terapêutica um novo aliado no tratamento das dislipidemias, a ezetimiba (EZE). A EZE pertence à classe das 2- azetidinonas sintética, um inibidor seletivo da absorção do colesterol intestinal, o qual inibe fortemente a absorção do colesterol biliar e dietético, bloqueia a absorção intestinal do colesterol, resultando em redução do colesterol plasmático total e dos níveis de LDL, sem afetar a absorção de vitaminas lipossolúveis, triglicérides e ácidos biliares. Pode ser utilizada

como monoterapia ou combinada as estatinas, produzindo um efeito adicional na redução dos níveis de LDL nas dislipidemias (DAVIS, 2004).

Pesquisadores ao estudarem a inibição da enzima colesterol acetil transferase (ACAT) intestinal observaram que diversos compostos inibiam a absorção do colesterol, e um deste composto foi a *azetidinone*. Posteriormente, descobriram que o poder inibitório da ACAT era proveniente de um metabólito da azetidinonas, dando origem a ezetimiba. (ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005; GOODMAN e GILMAN, 2007).

A EZE é denominada quimicamente (**Figura 3**) 1-(4-Fluorofenil)-3(R)-[3-(4-fluorofenil)-3(S) hidroxipropil]-4-(S)-(4-hidroxifenil)-2-azetidiona. É um pó branco, cristalino, muito solúvel em etanol, metanol e acetona, porém praticamente insolúvel em água. (LESTARI, ARDIANA e INDRAYANTO, 2011; OLIVEIRA, 2007;). A fórmula molecular da ezetimiba é $C_{24}H_{21}F_2NO_3$, e sua massa molecular é 409,4 Daltons (LESTARI, ARDIANA e INDRAYANTO, 2011). Possui ponto de fusão na faixa de 163 °C e 166 °C é estável em temperatura ambiente, a na sua forma hidratada perde água entre 25 e 70°C, com rotação óptica em $[\alpha]D_{22} = 33.9^\circ$ (LESTARI, ARDIANA e INDRAYANTO, 2011; OLIVEIRA, 2007). O coeficiente de partição (octanol/água), log P, igual a 4,56. O pK_a da ezetimiba é 9,75 e determinada através da titulação potenciométricas (LESTARI, ARDIANA e INDRAYANTO, 2011).

Figura 3 - Estrutura química da ezetimiba

Após administração oral, a ezetimiba é rapidamente absorvida pela parede intestinal, onde sofre um processo denominado de glucuronidação, dando origem a um metabólito glucuronideo, farmacologicamente ativo. Posteriormente este metabólito é absorvido rapidamente e atinge concentração plasmática entre 4 e 12 horas, quando então é captada pela fígado e retorna a luz intestinal onde

permanecerá na borda vilosa dos enterócitos, bloqueando a captação dos esteróis. A meia-vida plasmática é de aproximadamente 22 horas, o que sugere uma recirculação enterohepática, permitindo administração em dose única diária (ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005; DAVIS, 2004; SLIN e THOMPSON, 2008).

A EZE e/ ou seu metabólito glucuronídeo, são excretados principalmente por via fecal (90%) e uma pequena parcela pela urina (10%). Como a EZE não influencia a atividade das enzimas do citocromo P450, confere a esta classe de fármaco baixa interação medicamentosa (ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005; DAVIS, 2004). Além desta propriedade, a ezetimiba não interfere na absorção de triglicerídios, de vitaminas lipossolúveis como A e D, de hormônios de reposição hormonal ou contraceptivos (estradiol e levonorgestrel), além de não ter sido observado alterações na ação de anticoagulantes como warfarinas, tampouco a ação hipolipidêmica dos hipoglicemiantes orais (estatinas, fibratos) e digitálicos (digoxina) (ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005; DAVIS, 2004).

Como monoterapia essa classe de fármaco pode efetivamente diminuir os níveis de LDL colesterol para redução da absorção do colesterol. Em paciente com hiperlipidemia primária, EZE 10mg/dia produziu redução dos níveis LDL, assim como, as concentrações de apolipoproteína B. A EZE na concentração de 10 mg/dia reduz em aproximadamente 20% o LDL colesterol, em 8% o triglicerídios e aumenta o HDL em aproximadamente 5%. Pacientes com TG $\geq$ 150 mg/dL obtiveram uma significativa redução na concentração de partículas pequenas e densas do LDL comparado com aqueles com níveis de TG normal (49% contra 19%, respectivamente) (MIURA E SAKU, 2008; SHANKAR, *et al.*, 2007).

Diversos estudos demonstram a eficiência da terapia combinada de ezetimiba associada às estatinas comparada a monoterapia com estatinas (ABATE, *et al.*, 2008; AVERNA *et al.*, 2010; BARDINI *et al.*, 2010; FRIEDMAN, *et al.*, 2011; GENEST, 2006). Um estudo, concluiu que a EZE (10 mg/dia) associada à sinvastatina (SIM) SIM/EZE (10/20 mg/dia) produziu maior redução de LDL em comparação ao uso da SIM (40 mg/dia) (32,2% contra 20,8%) isoladamente (BARDINI *et al.*, 2010). Aversa *et al.* em um estudo envolvendo pacientes com idades entre 18 e 75 anos com hipercolesterolemia primária com DCVs estabelecida demonstrou que após 6 (seis) semanas de tratamento com a combinação de EZE/SIM (10/20 mg) resultou em uma significativa redução do nível de LCL - C (LCL - C $\square$ 100 mg/dL) (-27% contra -12%) e

considerável redução no colesterol total comparado (-16% contra -7.5%) ao dobro da dose de SIM 40 mg (AVERNA *et al.*, 2010).

BARDINI *et al.*, concluiu que a EZE (10mg/dia) associada à sinvastatina SIM/EZE (10/20 mg/dia) produziu maior redução de LDL em comparação ao uso da SIM (40 mg/dia) (32,2% contra 20,8%) isoladamente (BARDINI *et al.*, 2010). Friedman *et al.*, conduziu um estudo entre julho de 2004 a dezembro de 2007, com pacientes portadores de hipercolesterolemia tratados com associação de ezetimiba/sinvastatina e outras duas estatinas (atorvastatina e rosuvastatina) isoladamente, e conclui que o tratamento combinado de ezetimiba/sinvastatina é superior a monoterapia com as outras estatinas no tratamento de pacientes com hiperlipidemia com risco de eventos cardiovasculares (FRIEDMAN, *et al.*, 2011).

Estes resultados demonstram que EZE associada à SIM pode fornecer uma alternativa superior para redução do LDL-C comparado à duplicação de dose da SIM em pacientes hiperlipidêmicos com diabetes mellitus tipo II (DM2) e doenças coronarianas (BARDINI *et al.*, 2010). Como praticamente não há miopatia quando estatinas são usadas nas suas doses iniciais, a combinação de EZE promove uma margem maior de segurança (GOODMAN e GILMAN, 2003). Além disso, a terapia combinada pode fornecer uma alternativa de tratamento para paciente que necessitam de redução maior do LCL - C, do que elas podem conseguir com SIM 20 mg isoladamente (BARDINI *et al.*, 2010).

Os principais efeitos colaterais observados com o uso da ezetimiba são distúrbios gastrointestinais, alterações das enzimas hepáticas e raramente miopatia (FORTI e DIAMENT, 2008). Paciente com alterações hepáticas podem apresentar declínio na excreção da ezetimiba sem que isto altere significativamente sua concentração plasmática máxima (ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005).

2.4 Sinvastatina

As estatinas foram isoladas a partir de um fungo e identificadas como inibidoras da biossíntese de colesterol em 1976. A primeira estatina estudada foi a *compactina*, posteriormente renomeada *mevastatina*, que demonstrou o potencial terapêutico dessa classe de fármaco. Algumas estatinas são isoladas a partir do metabolismo de fungos, como a mevastatina, a lovastatina, a pravastatina e sinvastatina (derivados quimicamente modificados) e as sintéticas como a

atorvastatina, a cerivastatina e a fluvastatina (GOODMAN e GILMAN, 2007; SILVA, 2009).

Todas as estatinas são absorvidas rapidamente após administração oral, alcançando pico plasmáticos dentro de 4 (quatro) horas. As estatinas existem em duas formas, lactonas e α -hidróxiácido. *In vivo*, a forma hidróxiácido é a forma ativa, porção que promove a redução do colesterol plasmático, enquanto a forma lactona é inativa (pró-fármaco).

As estatinas demonstram uma efetiva redução de LDL, todavia um número considerável de pacientes recebendo moderadas doses não atinge o objetivo de redução do LDL esperado. O tratamento intensivo com as estatinas pode conferir uma grande redução de LDL, porém alguns pacientes podem não tolerar altas doses de estatinas e apresentar alteração na função hepática miopatia e mesmo com altas doses não conseguir o objetivo do tratamento (AVERNA *et al.*, 2010). Recomenda-se a utilização de outros fármacos associados, que atuam através de diferentes vias metabólicas do colesterol resultando em benefícios adicionais as estatinas (BARDINI *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013; SILVA, 2009).

Dentre as estatinas supracitadas a sinvastatina é um dos agentes mais efetivos e bem tolerados, sendo recomendado com terapia de primeira escolha para redução dos níveis de colesterol plasmático (GOODMAN e GILMAN, 2007; NOVÁKOVA, SATÍNSKY E SOLICH, 2008).

Este fármaco pertence à classe dos potentes e específicos inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG- CoA) redutase. A HMG-CoA redutase é uma enzima que sintetiza o ácido mevalônico, importante precursor na síntese de colesterol, através do substrato HMG-CoA. (GOODMAN e GILMAN, 2007; MOLCANYIOVÁ, *et al.*, 2006; NOVÁKOVA, SATÍNSKY E SOLICH, 2008; SILVA, 2009).

A sinvastatina é um pro-fármaco, o qual é administrado na forma inativa e absorvida no trato gastrointestinal e transformada (hidrólise) para sua forma ativa no fígado. As demais estatinas são administradas na sua forma ativa. A lipofilicidade da sinvastatina proporciona maior seletividade pelo fígado, o maior sítio de síntese de colesterol, comparado as outras estatinas administradas na forma ativa (SILVA, 2009). No entanto, a sinvastatina (α -hidróxiácido) sofre intenso metabolismo de primeira passagem no fígado e é excretado principalmente nas fezes através da bile (85%) e uma aproximadamente 15% excretada na urina. Aproximadamente 95% das

estatinas estão intensamente ligadas à proteína plasmática, e devido ao extenso metabolismo de primeira passagem. As estatinas apresentam baixos níveis de biodisponibilidade sendo apenas 5% a da sinvastatina (GOODMAN e GILMAN, 2007; NOVÁKOVA, SATÍNSKY E SOLICH, 2008; SILVA, 2009). Após um estudo de 8 (oito) semana com dose de 20 mg/dia de SIM, observou-se uma significativa redução do colesterol total em 26%, do LDL em 29%, da Apo B em 24% e o nível de triglicerídeo em 26% (MOLCANYIOVÁ, *et al.*, 2006).

Recentemente, têm sido atribuídos efeitos clínicos associados à com as estatinas que são independentes da redução do colesterol, são denominados efeitos pleiotrópicos. Apesar de não serem completamente compreendidos, os efeitos pleiotrópicos estão associados à melhora na função endotelial, bem como propriedades antiflamatória, como diminuição da inflamação da placa aterosclerótica, diminuição da oxidação do LDL e benefícios na hemostasia (ARAÚJO, 2007; FONSECA, 2005; SILVA, 2009).

A combinação de fármacos que tenha duplo mecanismo de ação na regulação do colesterol pode ser mais efetivo na redução do LDL-C em pacientes que não estão alcançando o objetivo do tratamento com estatinas isoladamente. Tratamento com EZE associado com estatinas resulta em uma significativa redução no LDL-C e outros parâmetros lipídicos, além de alcançar o objetivo do tratamento, quando comparado com a terapia de estatinas isoladamente em pacientes com hipercolesterolemia. Por esta razão, associar drogas com mecanismo de ação atuando em diferentes vias metabólicas do colesterol pode resultar em benefícios adicionais as estatinas (AVERNA *et al.*, 2010; ARAUJO, FILHO e CHAGAS, 2005).

A associação estatina e ezetimiba reduzem o colesterol total, colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), a apolipoproteína B (Apo B) e as triglicérides e eleva o colesterol HDL-C, em pacientes com hipercolesterolemia, mais do que tratamento isoladamente (AVERNA *et al.*, 2010; SILVA, 2009; SMITH e ARONSON, 2002).

Quimicamente a sinvastatina (**Figura 4**) é a 8-hexahidro-3,7-dimetil-8-[2-(2R,4R)-tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-yl]-1-naftil-2,2-dimetil butanoato (DIXIR *et al.*, 2010). A sinvastatina é um pó branco com ponto de fusão na faixa de 135 °C a 138 °C, insolúvel em água (0,03 g/L) e ácido clorídrico 0,1 mol/L (0,06 g/L) e solúvel em clorofórmio (610 g/L), metanol (200 g/L), etanol (160 g/L), polietilenoglicol (70 g/L) e hidróxido de sódio 0,1M (70 g/L). A fórmula molecular é C₂₅H₃₈O₅, o coeficiente de

QUADRO 1 - Parâmetros cromatográficos descritos na literatura para quantificação de ezetimiba associada a sinvastatina

Fármaco	Condições Cromatográficas	Método utilizado	Referências
Sinvastatina comprimidos	Coluna: Chromolith Monolítica – RP 250 mm x 4,6 mm x 5 µm FM: Fosfato de sódio monobásico pH=4,5/ Acetonitrila (35:65v/v) em modo isocrático Volume de injeção 10 µL Vazão da FM: 1,5 mL/min Detector: 238 nm	HPLC - UV	USP 37
Ezetimiba e Sinvastatina Comprimidos	Coluna: Chromolith monolítica – RP 180 mm x 4,6 mm x 5 µm FM: Acetato de amônio 50 mmol L ⁻¹ pH=5,0/ Acetonitrila (65:35 v/v) em modo isocrático Volume de injeção 10 µL Vazão da FM: 3,0 mL/min Detector: 240 nm	HPLC - UV	HEFNAWY <i>et al.</i> , 2009
Ezetimiba e Sinvastatina Comprimidos	Coluna: Hypersil MOS C8 200 mm x 4,6 mm x 5 µm FM A: ACN/Água purificada 50:50 v/v FM B: ACN/Água purificada 80:20 v/v modo gradiente Volume de injeção: 20 µL Vazão da FM: 1,0 e 0,5 mL/min Detector: 240 nm	HPLC -DAD	OZALTIN e UÇAKTURK, 2007
Ezetimiba e Sinvastatina Comprimidos	Coluna: Merck C18 250 mm x 4,6 mm x 5 µm FM : Acetato de amônio 1,0 mmol L ⁻¹ pH=5,0: ACN 30:70 v/v Volume de injeção: 20 µL Vazão da FM: 1,5 mL/ min Detector: 240 nm	HPLC - UV	ASHFAQ <i>et al.</i> , 2007
Ezetimiba e Sinvastatina Comprimidos	Coluna: Supercosil C18 250 mm x 4,6 mm x 5 µm FM : Acetato de amônio 0,01 mmol L ⁻¹ pH=5: ACN 35:65 v/v Volume de injeção: 20 µL Vazão da FM: 1,0 mL/min Detector: 240 nm	HPLC-UV	KUMAR <i>et al.</i> , 2009
Ezetimiba e Sinvastatina Comprimidos	Coluna: Hypersil ODS C18 250 mm x 4,6 mm x 5 µm FM : Tampão fosfato 0,01 mmol L ⁻¹ pH=4,5: ACN 35:65 v/v Volume de injeção: 20 µL Vazão da FM: 1,0 mL/min Detector: 232 e 238 nm	HPLC-UV	DIXIT <i>et al.</i> , 2010
Ezetimiba e Sinvastatina Comprimidos	Coluna: Lichospher 100 C18 250 mm x 4,0 mm x 5 µm FM : ACN: água purificada: metanol 60:25:15 v/v Volume de injeção: 20 µL Vazão da FM: 1,5 mL/min Detector: 232 e 238 nm	HPLC-UV	CHAUDHARI <i>et al.</i> , 2007
Ezetimiba e Sinvastatina Comprimidos	Capilar de sílica fundida 56 cm X 50 µm i.d (64,5 cm) : Temperatura: 30 °C Voltagem: 30 kV Eletrólito de corrida: 25 mm L ⁻¹ tampão borato: 25 mm L ⁻¹ SDS pH= 9,0: 10% ACN Injeção hidrodinâmica (3s 50 mbar)	CE -DAD	YARDIMCI e OZALTIN, 2010

2.6 Validação de Métodos Analíticos

Conforme definição na *United States Pharmacopeia* (USP PHARMACOPEIA), a validação de métodos assegura a credibilidade durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para qual é indicado para fazer”. De acordo com a *Internacional Conference on Harmonisation* (ICH) a validação de um método analítico tem o objetivo de demonstrar que determinado método é adequado para seu propósito (ICH, 1996).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de método analítico e, para isso, a maioria deles tem estabelecido diretrizes a serem adotadas no processo de validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Os métodos analíticos são normalmente utilizados em laboratórios de análises para determinação qualitativa e quantitativa de fármacos, constituem um fator importante nos diferentes processos de desenvolvimento, produção e controle de qualidade dos medicamentos. Os dados analíticos permitem um acompanhamento da síntese de uma nova molécula, auxiliam os estudos de uma nova formulação, determinam os prazos de validade, baseados em estudos de estabilidade, além da importante tarefa de avaliar os materiais com especificações estabelecidas. Assim o entendimento do que constitui a validação de métodos cromatográficos é um fator de importância fundamental (FERRO, 2010; SWARTZ e KRULL, 1998).

A validação de técnicas cromatográficas consiste de uma série de testes que atestem que esta cumpre todas as exigências de aplicações analíticas, gerando resultados confiáveis e reprodutibilidade comprovada (RIBANI, *et al.*, 2004; BRASIL, 2003). Para garantir a confiabilidade dos dados gerados, devem-se atender alguns pré-requisitos como qualificação dos equipamentos, a estabilidade das soluções analíticas e a adequabilidade do sistema (RIBANI, *et al.*, 2004; BRASIL, 2003).

Os métodos analíticos podem ser classificados em quatro categorias conforme sua finalidade:

- **Categoria I:** Procedimento para quantificação de fármacos, excipientes ou ingredientes ativos (incluindo conservantes) em produtos farmacêuticos;
- **Categoria II:** Procedimentos para determinação de impurezas, incluindo os ensaios quantitativos e testes limites;
- **Categoria III:** Procedimentos analíticos para determinação de ensaios como dissolução, e liberação de ativo;
- **Categoria IV:** Testes de identificação.

Os parâmetros a serem considerados para atender as exigências mínimas de validação de métodos analíticos são: especificidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), linearidade, limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), faixa de aplicação (intervalo) e robustez. (BRASIL, 2003; ICH, 1996;) Cada categoria exige um determinado conjunto de parâmetros ser avaliado, como mostra o **Quadro 2**.

QUADRO 2 : Parâmetro necessário durante a validação de método analítico (BRASIL, 2003)

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

* Ensaio pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico

2.6.1 Especificidade

A especificidade de um método analítico de separação é a capacidade de avaliar um composto na presença de outros componentes, de forma inequívoca, tais como impurezas, produto de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003; ICH, 1996). A especificidade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto. Quando não há disponível o padrão de impurezas recomenda-se comparar o resultado teste a um método analítico validado. Esta análise deve ser realizada com amostras, contendo o analito de interesse sob condições de estresse, como fotólise, umidade, oxidação, hidrólise ácida e hidrólise alcalina (ANVISA, 2003, ICH, 1996). Outra maneira de determinar a seletividade é através do método de adição padrão. Este método é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. A pureza do pico deve ser assegurada através de cromatógrafo líquido equipados com detectores de arranjos de fotodiodos ou técnica mais sofisticadas como a espectrometria de massas (ANVISA 2003; ICH 1996, RIBANI, 2004).

A especificidade em cromatografia é obtida na prática otimizando condições cromatográficas como: polaridade da fase móvel, pH da fase móvel, vazão da fase móvel, temperatura da coluna e fase estacionária. Paralelamente são avaliados parâmetros cromatográficos como: resolução, fator de cauda, fator de retenção, seletividade e número de pratos. Seletividade e especificidade são definidas pelo ICH como mesmo significado. Apesar de gerar certa polêmica, sugere-se utilizar apenas o termo seletividade, conforme sugerido pela IUPAC. Um método de separação que produz uma resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado de específico, por outro lado método que produz resposta para vários compostos químicos, com características em comum, pode ser chamado de seletivo. (RIBANI, 2004).

A seletividade é o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliada constantemente. Se este parâmetro não for garantido, a linearidade, a exatidão e precisão estarão comprometidas (RIBANI, 2004).

2.6.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA 2003; ICH, 1996).

Esse parâmetro é avaliado pela análise de no mínimo cinco diferentes concentrações, em triplicata, sem a inclusão do zero, pelos erros associados. Para análise de linearidade é exigido o tratamento estatístico da reta encontrada, determinado o coeficiente de determinação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma dos quadrados resíduos mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

O coeficiente de correlação (r) permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação $\geq 0,999$ é considerado como evidência de uma ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI, 2004). Os critérios mínimos aceitos pela ANVISA são de um coeficiente de correlação $\geq 0,99$.

2.6.3 Intervalo

É faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, que possa ser determinado com precisão, exatidão e linearidade adequado (ANVISA, 2003; ICH, 1996). O intervalo é derivado de um estudo de linearidade e é dependente da aplicação pretendida (**Quadro 3**).

QUADRO 3 - Limites percentuais do teor que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos

Ensaio	Intervalo
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	80% - 120% da concentração nominal do teste
Determinação de impurezas	Do nível da impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeito farmacológico inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas

2.6.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo a um valor de referência aceito como verdadeiro (ANVISA, 2003).

A medida varia conforme o ensaio realizado. Os métodos mais utilizados para determinação da exatidão são: materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaio de recuperação e adição padrão (RIBANI, 2004).

A exatidão pode ser determinada das seguintes maneiras:

I. FÁRMACO ISOLADO

- Aplicação do método analítico proposto na análise de uma substância de pureza conhecida;
- Comparação dos resultados encontrados pelo método analítico proposto, com aquele resultante de uma metodologia bem caracterizada, cuja exatidão já tenha sido determinada.

II. PRODUTO ACABADO

- Na avaliação de uma amostra, em que quantidades conhecidas do fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);
- Nos casos em que todos os componentes da amostras estão indisponíveis, se aceita o para determinação da exatidão, o método de adição de padrão, em que adiciona-se quantidades conhecidas do analito ao medicamento em estudo.

III. IMPUREZAS

- Análise ocorre pelo método de adição de padrão, na qual se adiciona quantidades da impureza (conhecida) e / ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco isolado;
- Na ausência de amostras de impurezas e/ou produtos de degradação, se aceita comparação dos resultados obtidos com outro método bem caracterizado (métodos farmacopêicos ou métodos analíticos validados).

A exatidão é expressa como percentual de fármaco recuperado no teste, em relação ao valor dito verdadeiro que corresponde a 100% (ICH, 2005). O *Food and Drug Administration (FDA)* recomenda uma recuperação em torno de $\pm 2\%$ do valor real, nas concentrações testadas dentro do intervalo linear do método (SHABIR, 2003). Todavia, a ANVISA e o ICH não definem critério para valores de recuperação (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

2.6.5 Precisão

A precisão de um método analítico consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Este parâmetro é expresso através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) em porcentagem (%) (ANVISA, 2003, ICH, 2005).

Para avaliação da precisão de um método analítico os guias de validação sugerem três testes distintos: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Repetibilidade (precisão intra-corrida): concordância entre os resultados obtidos de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medida, curto período de tempo.

Precisão intermediária (precisão inter-corrida): concordância de resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias, analistas ou equipamentos diferentes. Recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes, com analistas ou equipamentos diferentes.

Reprodutibilidade (precisão inter-laboratórios): concordância entre os resultados obtidos em diferentes laboratórios, como em estudos colaborativos.

2.6.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não obrigatoriamente quantificado, sob condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

O LD é determinado através de soluções de concentrações conhecidas decrescente do analito, até o menor nível detectado.

2.6.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de uma analito que pode ser determinada com precisão e exatidão, sob condições experimentais definidas. O LQ é um parâmetro utilizado na determinação de impurezas e produtos de degradação em uma matriz (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

O LQ é um parâmetro determinado, principalmente, para testes quantitativos de impurezas, produto de degradação em fármacos e em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003).

2.6.8 Robustez

A robustez de um método analítico, é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, o confere confiança durante seu uso na rotina (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Exemplos dos principais fatores a serem avaliados durante a etapa de robustez recomendados pela ANVISA (**Quadro 4**):

QUADRO 4: Exemplos de fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico (BRASIL, 2003)

Identificação	Fatores a serem variados
Preparo de amostras	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade das soluções • Tempo de extração
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> • Variação do pH da fase móvel • Variação na composição da fase móvel • Temperatura • Fluxo da FM

A ANVISA não determinou quanto cada fator modificado pode ser variado, mas que essa variação não deva ser significativa para influenciar na corrida analítica e quantificação dos analitos (ANVISA, 2003).

Métodos que tiverem durante o desenvolvimento analítico variações de marca, fornecedores equipamentos sem alterações significativas dos resultados apresentam uma robustez intrínseca (RIBANI, 2004).

2.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

2.7.1 História da cromatografia

O princípio da cromatografia foi inicialmente pelo químico David Talbot Day em 1897. Day e colaboradores observaram a separação de frações do petróleo ao longo de uma coluna empacotada com sólidos (terra ou argila) publicados seus resultados em 1900. Paralelamente aos estudos conduzidos por Day, o botânico russo Michael Semenovich Tswett utilizou em dois trabalhos suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas (pigmento de folhas), nas quais usou colunas de vidro recheada com sólidos finamente divididos, e arrastou os diferentes componentes com éter de petróleo (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SOARES, 2009). Os termos e expressões “cromatografia” “cromatograma” e “métodos cromatográficos” são atribuídos a Tswett. O nome cromatografia deriva das palavras gregas *chron* (cor) e *graphe* (escrever), embora ele tenha explicitado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Considerou-se que época moderna da cromatografia se iniciou na década de 1930, quando Kuhn e Lederer “redescobriram e aperfeiçoaram a cromatografia em coluna, repetindo os ensaios de Tswett. Em 1941, Martin e Synge publicaram um trabalho de grande destaque, no qual descreveram a cromatografia de partição, aplicaram à cromatografia o conceito já bem conhecido em outros processos de separação, e anteciparam o surgimento das técnicas de cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência. Por esse trabalho, em 1952, receberam o Prêmio Nobel (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SOARES, 2009).

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar componentes semelhantes de misturas complexas. Desse modo, a cromatografia, pode ser considerada um método físico-químico de separação, onde a amostra é transportada por uma fase móvel é forçada a transpor uma fase estacionária. A fase móvel é um fluído insolúvel na fase estacionária, podendo ser um gás, um líquido ou um fluído supercrítico, que percola através da fase estacionária. Esta, por sua vez, é geralmente de grande área, podendo ser um sólido ou um líquido imiscível e fixa em uma coluna ou superfície sólida. A escolha das duas fases é baseada no grau de distribuição dos componentes da amostra

entre as fases. Os componentes que tiverem maior afinidade pela fase móvel serão arrastados primeiramente. Os componentes com maior afinidade pela fase estacionária ficarão mais retidos, se movendo lentamente. Portanto, os componentes eluirão em diferentes momentos, conforme a afinidade pela fase móvel e estacionária (SOARES, 2009).

A cromatografia pode ser classificada de acordo com as diferentes modalidades, sendo mais comuns aquelas relacionadas às técnicas empregadas, a mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas. De acordo com o meio físico no qual a fases estacionária e móvel entram em contato, a cromatografia é classificada em coluna ou planar. Na primeira, a fase estacionária é mantida dentro de um cilindro estreito, através da qual a fase móvel é forçada a passar. Na cromatografia planar, a fase estacionária é disposta sobre uma superfície planar, se movimentando por capilaridade ou gravidade. Outra maneira de classificar as cromatografias é de acordo com o estado físico da fase móvel, podendo ser dividido em cromatografia gasosa, no qual a fase móvel é um gás inerte, cromatografia líquida, no qual é um líquido que pode interagir com os solutos, contribuindo para a separação e cromatografia supercrítica, na qual é empregado um vapor pressurizado como fase móvel (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SOARES, 2009).

2.7.2 Cromatografia líquida clássica e de alta eficiência

No passado a cromatografia era uma técnica demorada, no qual a fase móvel, denominada eluente, fluía pela fase estacionária por gravidade. Na cromatografia líquida clássica (CLC) a fase estacionária era geralmente utilizada, uma só vez, pela sua adsorção irreversível. O enchimento da coluna se faz necessário a cada separação, representando um desperdício enorme de material e mão-de-obra. A aplicação da amostra exige habilidade e tempo por parte do operador. A eluição na CLC ocorre pela ação da gravidade e as frações individuais da amostra são coletadas, na porção inferior da coluna. Detecção e quantificação são realizadas por análise manual das frações ou por monitoração visual, através de algumas técnicas auxiliares, como a espectrofotometria ou uma simples análise gravimétrica. Os resultados analíticos são registrados sob forma de cromatograma através de um gráfico de coluna (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SOARES, 2009).

A HPLC se tornou uma técnica de separação analítica para fins qualitativos e quantitativos mais utilizados nos últimos trinta anos, com destaque para indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações ambientais e diversas outras áreas da ciência, como a medicina. As razões para este crescimento estão relacionadas a características peculiares, como grande poder de separação cromatográfica, adaptabilidade para determinações quantitativas com alta sensibilidade, maior velocidade de separação, possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente estáveis monitoramento *online* do efluente da coluna, análises quantitativas exatas, repetitivas e reprodutivas com a mesma coluna, além da automação dos procedimentos analíticos e processamento de dados.

Na HPLC utiliza-se coluna fechada, reaproveitável capaz de realizar inúmeras separações individuais com a mesma coluna (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SOARES, 2009; TONHI *et al*, 2002). Essas colunas são muito eficientes, no entanto, oferece grande resistência á vazão da fase móvel. Por este motivo, é necessária a utilização de bomba de alta pressão que permite a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. Diversos são tipos de detectores colocados na saída da coluna, que permitem um registro contínuo da composição do efluente, o que permite ter um cromatograma, que pode ser utilizado na identificação e/ou quantificação os componentes da amostra.

Ao longo dos anos diversos métodos cromatográficos foram desenvolvidos, sendo os mais importantes os de camada delgada (TLC) a cromatografia gasosa (CG), e a HPLC, existindo algumas variantes destes métodos (FERRO, 2010).

Os diversos processos de separação são classificados de acordo com os tipos de fases estacionárias o estado físico da fase móvel e são subclassificados segundo o mecanismo de separação do método cromatográfico.

2.7.3 Cromatografia liquido sólido ou por adsorção

Está técnica baseia-se na competição entre as moléculas dos solutos e as da fase móvel líquida, para ocupar sítios ativos na superfície de um sólido adsorvente (fase estacionária) (BONATO, 2007; FERRO, 2010).

A cromatografia de adsorção aplica-se, sobretudo na separação de acordo com a polaridade e a posição do grupo funcional. Para que a molécula do soluto possa ser adsorvida na fase estacionária, primeiramente uma molécula da fase

móvel deve ser deslocada da superfície. Se o adsorvente possuir uma superfície polar (sílica ou alumina), grupos apolares (hidrocarbonetos) apresentarão pouca afinidade com esta superfície e não irão deslocar a molécula da fase móvel. Portanto, não serão retidos. Grupos funcionais polares, capazes de formar ligações de hidrogênio, terão fortes afinidades com superfície polar e serão fortemente retidos. Moléculas polarizáveis, irão apresentar interações dipolo induzido-dipolo com a superfície adsorvente e, portanto serão igualmente retidas; o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional. Dessa maneira, pode-se inferir que compostos menos polares eluem antes de compostos mais polares.

2.7.4 Cromatografia de fase reversa (RPC)

Na indústria farmacêutica, a RPC é muito empregada devido aos compostos serem em sua grande maioria polares e altamente hidrofílicos. A RPC é um método cromatográfico que utiliza moléculas não polares na fase estacionária, como por exemplo, C8 ou C18 e fases móveis moderadamente polares, na maioria das vezes uma mistura de uma solução aquosa e um solvente orgânico, como acetonitrila ou metanol.

A retenção em RPC é o resultado entre interações da molécula do soluto com a fase móvel ou a coluna cromatográfica. A adição de solventes orgânicos (moduladores) torna a fase móvel menos polar e conseqüentemente diminuem o tempo de retenção, ou seja, ocorre uma maior retenção de moléculas de característica apolar, enquanto que as moléculas polares eluem primeiro (FERRO, 2010; SYDNER, 2010). São introduzidos grupos alquil ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), sendo o comprimento das cadeias mais comuns C3, C4, C8, C18 ligados à sílica, entretanto grupos amino, ciano e fenil podem ser usados (FERRO, 2010).

2.7.5 Cromatografia de fase normal (NPC)

A NPC é caracterizada pelo uso de colunas com fase estacionária mais polar que a fase móvel, e é usada para separar compostos muitos polares, os quais não são retidos e separados pela RPC (FERRO, 2010; SYDNER, 2010).

O componente polar é fortemente atraído para a superfície da fase estacionária. Quando maior polaridade apresentar um composto maior a força de adsorção e conseqüentemente maior o tempo de retenção. A fase móvel mais hidrofílica diminui o tempo de retenção enquanto as fases móveis mais hidrofóbicas aumentam o tempo de retenção (FERRO, 2010; SYDNER, 2010).

A técnica de NPC é utilizada para separar isômeros, compostos aromáticos com baixos pesos moleculares e compostos de cadeias alifáticas longas (FERRO, 2010).

2.8 Equipamentos para HPLC

A HPLC é uma técnica que atualmente emprega um conjunto de equipamentos especiais, que se diferenciam em características, grau de automação, pelo custo, versatilidade e complexidade. Um cromatógrafo líquido é caracterizado pelos seguintes componentes: Reservatório e sistema de bombeamento de fase móvel, o injetor, a coluna cromatográfica, o termostato das colunas, detector e sistema de processamento de dados (**Figura 5**) (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; FERRO, 2010).

FIGURA 5 – Esquema de um cromatógrafo líquido (FERRO, 2010).

De acordo com a **Figura 5**, o solvente que se acha no reservatório de fase móvel (FM) é bombeado sob alta pressão com auxílio de uma bomba através do sistema de introdução de amostra até da coluna cromatográfica, situada em um compartimento denominado termostato. Uma pequena quantidade de amostra é

introduzida por uma válvula injetora, sendo por sua vez, arrastada pela fase móvel através da coluna cromatográfica. Na coluna a velocidade da eluição dos compostos é inversamente proporcional à interação destes com o material da fase estacionária, e a separação depende do número de pratos. A FM, contendo os componentes da amostra, ao deixar a coluna passa por um detector, que produz um sinal proporcional à concentração do soluto, que é enviado para um sistema de registro e processamento dos dados, gerando um gráfico chamado de cromatogramas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; FERRO, 2010).

Um cromatograma é um gráfico da resposta do detector em função do tempo de retenção no qual se obtém uma série de picos. Em um cromatograma ideal, cada banda cromatográfica representa um componente da amostra e os mesmos apresentam-se bem separados e simétricos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; FERRO, 2010).

2.8.1 Reservatório de fase móvel

Podem ser utilizados recipiente de vidro, o mais comumente utilizado, aço inoxidável ou plásticos inertes como politetrafluoretileno (PTFE), com diversos volume de capacidade. A captação da FM é geralmente realizada através de filtros aço inox ou vidro para remover pequenas partículas que podem entupir os tubos conectores, avariar o sistema de bombeamento e coluna. Para remover ar ou gases que estar dissolvidos no solvente e que prejudicam o funcionamento dos detectores e a eficiência da coluna, o frasco devem ser desgaseificado por meio de banho de ultrassom (com o sem vácuo) ou agitadores (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

2.8.2 Bomba para HPLC

A bomba utilizada em HPLC deve ser capaz de fornecer, através da coluna, um fluxo contínuo e reprodutível. Atualmente as bombas são compostas por êmbolos com válvulas que controlam o fluxo da fase móvel com maior precisão. Há basicamente dos tipos de bombas com estas características: as mecânicas e as pneumáticas. Entre as bombas mecânicas, existem dois tipos distintos: recíprocas e tipo seringa (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; FERRO, 2010).

Bombas recíprocas consistem em uma pequena câmara na qual o solvente é bombeado por um movimento para trás e para frente de um pistão controlado por um motor. Duas válvulas unidirecionais, que alternadamente, abrem e fecham controlam o fluxo de fase móvel para dentro e para fora da coluna. As bombas recíprocas apresentam várias vantagens: geram altas pressões e vazões de volume constantes, a fácil adaptabilidade de eluição em gradiente e reservatório sem limite de volume, pois são alimentadas continuamente pela FM contida no reservatório de FM. As bombas de recíprocas possuem a desvantagem de sobre cavitação, que é a formação de bolhas durante o movimento dos pistões, devidos a compressibilidade dos líquidos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; FERRO, 2010).

Chamadas também de êmbolo ou de deslocamento contínuo, as bombas tipo seringa, são constituídas de uma câmara larga, tipo seringa, equipada com um êmbolo que é ativado por um mecanismo de rosca, sustentado por uma moto de precisão. O líquido flui através de uma abertura na mesma câmara, e se obtém assim uma vazão, que pode variar conforme se desloca o êmbolo a maior ou menor velocidade (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

A vazão deslocada por esta bomba é uniforme e contínua, ou seja, livre de pulsos. As desvantagens incluem capacidade limitada de solvente e considerável inconveniente quando há necessidade de troca de solvente. Atualmente poucos equipamentos empregam esse tipo de bomba, devido ao alto custo e às vantagens das bombas recíprocas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

2.8.3 Injetores

Um fator muito importante a se considerar na precisão e eficiência em análise cromatográfica é a maneira como se introduz a amostra na coluna. O método comumente utilizado está baseado em alças de amostragem. Estes dispositivos possuem laças que podem ser intercambiadas, permitindo, a escolha de tamanhos de amostras de cinco a 500µl (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

2.8.4 Coluna para HPLC

As colunas são consideradas o coração do sistema cromatográfico, uma vez que é responsável pela separação dos componentes da amostra. As colunas são geralmente construídas de um tubo de aço inoxidável, diâmetro interno uniforme, capaz de resistir a altas pressões. A maioria das colunas de HPLC apresenta comprimento na faixa de 10 a 30 cm e possuem diâmetro interno de 2 a 5 mm. O recheio das colunas tipicamente apresenta partículas de diâmetro entre 3 e 10 μm . As colunas com estas características fornecem entre 40.000 e 60.000 pratos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; SKOOG, 2007).

O tipo mais comum de recheio para HPLC é preparado a partir de sílica fundida, as quais são sintetizadas aglomerando-se partículas de sílica de tamanho submicrométrico sob condições que levam a formação de partículas maiores com diâmetros altamente uniformes (SKOOG, 2007).

2.8.4.1 Fases estacionárias em HPLC

A Fase estacionária (FE) consiste de pequenas partículas porosas que aumenta a área superficial. Os principais parâmetros da FE são: tamanho da partícula, tipo de distribuição do tamanho da partícula, o tamanho do poro, área superficial, tipo e qualidade do ligante (FERRO, 2010).

A natureza das FE é um importante parâmetro para determinar se a propriedade do sistema de separação de fase normal o reversa. Na cromatografia de fase reversa a sílica apresenta normalmente ligantes de cadeias carbonadas como, por exemplo, C8, C18 ou fenil. Na fase normal a sílica está ligada a cadeias com grupos de ciano, aminas ou diois (FERRO, 2010).

2.8.5 Detectores

Um detector é um transdutor que converte uma mudança de concentração na FM eluente em um sinal, que poderá ser registrado por um processador. A interpretação desses dados produz dados quantitativos e qualitativos sobre a amostra e seus constituintes. Os detectores devem ser caracterizados por responder

de maneira linear em função da concentração do soluto, em uma grande variedade de concentrações, e possuir uma elevada relação sinal/ruído. Este sinal deve ser baixo para baixas concentrações de analito possam ser detectadas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006, FERRO, 2010).

Os detectores de UV/VIS, fluorescência, eletroquímico de feixe simples ou duplo e de comprimento de onda fixo ou variável são considerados seletivos. Os fundamentos destes detectores (exceto dos eletroquímicos) se baseiam na Lei de Lambert-Beer (FERRO, 2010). Nos detectores espectrofotométricos o seu funcionamento baseia-se na absorbância da luz por parte da amostra ao passar por qualquer radiação eletromagnética; normalmente isso ocorre desde a região do UV até o infravermelho, em um dado comprimento de onda. A resposta deste detector será seletiva, uma vez que só detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda em que o detector esteja operando (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Existem três tipos de detectores de ondas de absorbância: fotométrico, que funciona com um ou dois comprimento de onda fixos, operando em comprimento de 254 e 280 nm, os de comprimento de onda variável (espectrofotômetro UV-VIS) são os mais comuns dos detectores de HPLC e permitem absorção de luz na região do UV (190-400nm) e na região do VIS (400-750nm) e aquele por arranjo de diodos, que detecta vários comprimento simultaneamente (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Os detectores por arranjo de diodos são extremamente versáteis, permitindo a obtenção de um espectro entre 190 e 750 nm, permitindo a identificação e avaliação da pureza de uma amostra através da comparação do espectro com um espectro de uma solução referência. Este detector permite também quantificar diversas bandas em vários comprimentos de onda utilizando um único cromatograma, ou obter gráficos 3D do pico eluído. Porém a sensibilidade deste detector é menor que os anteriormente descritos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; FERRO, 2010).

A espectrometria por fluorescência por ser usada como método de detecção seletivo, sendo o detector mais sensível para compostos que fluorescem. Esses detectores medem as mudanças na fluorescência no eluente das colunas quando estes forem expostos a comprimentos de onda selecionados (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

Os detectores eletroquímicos apresentam alta sensibilidade e seletividade, todavia, necessitam que os compostos tenham um grupo funcional que oxidável ou redutível (FERRO, 2010).

2.9 Eletroforese Capilar

Eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de composto iônico ou ionizável, em um campo elétrico. A eletroforese foi introduzida por Tiselius no início da década de 30, através do método da fronteira móvel. Por este trabalho pioneiro, no qual a separação parcial de algumas proteínas constituintes do soro sanguíneo é demonstrada, rendeu-lhe o prêmio Nobel de 1948 (TAVARES, 1996, QUEIROZ e JARDIM, 2001; WATZIG e GUNTER, 2003).

FIGURA 6 - Eletroforese – separação em um campo elétrico (WATZIG e GUNTER, 2003).

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica que foi introduzida por Jorgenson e Lukacs e tem sido cada vez mais aceita, como uma técnica alternativa que complementa as técnicas de HPLC e cromatografia gasosa (PRADO, 2002). O rápido avanço da CE decorre, em partes, da simplicidade instrumental, mas principalmente da variedade dos modos de separação que podem ser realizados em uma única coluna capilar e da diversidade dos compostos passíveis de análise. (TAVARES, 1997). A CE é uma técnica aplicável para determinação de uma variedade de amostras, das quais podemos citar: hidrocarbonetos aromáticos, vitaminas hidro e lipossolúveis, aminoácidos, fármacos substâncias quirais, proteínas, extratos de plantas são analisados a fim de determinar a concentração de flavonóides, alcalóides e açúcares. Uma característica que confere vantagem da CE das outras técnicas é sua capacidade única para separar macromoléculas

carregadas eletricamente de interesse tanto na indústria de biotecnologia quanto nas pesquisas biológicas (QUEIROZ e JARDIM, 2001; WATZIG e GUNTER, 2003). Na CE, a separação é realizada em tubos com dimensões na ordem de 15 a 10 μm de diâmetro interno, e 50 a 10 cm de comprimento, preenchidos com eletrólito condutor, e submetidos a um campo elétrico. O uso de capilar apresenta varias vantagens, em especial com respeito ao aquecimento Joule. Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite a aplicação de campos elétricos elevados (100 – 500 V/cm), pois gera um aquecimento mínimo, além disso o formato de capilar proporciona uma dissipação eficiente do calor gerado. O uso de campos elétricos elevados resulta em separações de alta eficiência, excelente resolução e tempos de análise apreciavelmente reduzidos (TAVARES 1997). A CE também apresenta diversas outras vantagens: consumo mínimo de amostra, reagentes e solventes (1 – 10 nL), versatilidade, baixo custo de análise e alto poder de separação e possibilidade de injeção e detecção em fluxo (JARDIM e QUEIROZ, 2001; TAVARES 1995; TAVARES 1997).

Diversos modos separação com mecanismos similares são possíveis: Eletroforese capilar em solução livre (ou *capillary zone electrophoresis*, CZE, como é popularmente conhecida), Eletroforese capilar em gel (CGE), Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), Focalização isoeletrica capilar (CIEF) e Isotacoforese capilar (CITP) (SILVA *et al.*, 2007; QUEIROZ E JARDIN, 2001).

Na CZE o capilar é preenchido com eletrólito, na maioria das vezes com capacidade tamponantes. A separação em CZE é baseada nas diferenças nas mobilidades eletroforéticas resultantes das diferentes velocidades de migração de espécies iônicas no tampão, contido dentro do capilar. O mecanismo de separação é baseado nas diferenças na razão massa/carga dos solutos em um dado pH. Neste modo de separação espécies neutras não são separadas, todavia, permite a separação de cátions e ânions na mesma corrida (QUEIROZ e JARDIN, 2001; TAVARES, 1995; TAVARES,1997).

A CGE é utiliza para separação de compostos com caráter iônicos e de alto massa molecular, tais como fragmentos de DNA e proteínas de alto massa molecular. Como a separação de biomoléculas grandes é muito difícil de ser realizada com CZE, devido à similaridade nas razões massa/carga, uma alternativa é preencher o capilar com gel, onde o principal mecanismo de separação está baseado nas diferenças nos tamanhos dos solutos que migram dos poros do

polímero. Esta técnica é denominada eletroforese capilar em gel (JARDIM e QUEIROZ, 2001; TAVARES, 1995, TAVARES, 1997).

A MEKC foi introduzida em 1984 por S. Terabe e colaboradores, na qual é empregado uma agentes tensoativos iônicos são utilizados em condições apropriadas para formação de micelas, são adicionadas ao eletrólito de corrida, formado assim um sistema com duas fases. A separação é baseada na partição das moléculas entre a fase micelar (pseudo-fase estacionária) e tampão aquoso. Solventes orgânicos e reagentes par iônico são comumente utilizados no tampão para ajustar o fator de retenção e seletividade. A MECK é útil para separação de solutos neutros insolúveis em água (TAVARES, 1997; WATZIG e GUNTER, 2003).

A CIEF é utilizada exclusivamente à separação de compostos anfotéricos em um gradiente de pH. A aplicação de um campo elétrico na mistura de anfólitos gera a formação de um gradiente de pH. Os anfólitos são armazenados em um meio onde se utiliza um cátodo com pH alto e uma ânodo com pH baixo. Na CITP a separação ocorre em sistema e tampão descontínuo. A amostra é condensada entre dois tampões diferentes, sendo que um deles possui íons com a mais alta mobilidade no sistema, denominado dianteiro ou líder e outro com íons coma baixa mobilidade no sistema chamado de terminador. Quando o campo elétrico é estabelecido, diferentes gradientes de potencial envolvem em cada banda de tal forma que todos os cátions eventualmente migram em velocidade constante e única (QUEIROZ e JARDIN, 2001; TAVARES, 1995, TAVARES, 1997).

2.9.1 Intrumentação

A configuração instrumental para eletroforese capilar é relativamente simples (**Figura 7**). O sistema de CE consiste de uma fonte de alta voltagem, reservatório, capilares (normalmente sílica fundida), eletrodos (platina) e um detector apropriado. Uma fonte regulada, de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Essa fonte envolve aplicação de voltagem ou corrente constante, com valores de voltagem de 0– 50 kV e corrente de 0 – 200 μ A. Uma caixa de acrílico dotada de uma chave de segurança, a qual evita a ativação da voltagem, para proteger o operador de qualquer acidente. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos, feitos de um material inerte, tal como, a platina, a dois

reservatórios contendo o eletrólito. Os capilares de sílica fundida são preenchidos com solução tampão, e servem como canal de migração. Para minimizar efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante. O controle da temperatura do sistema pode ser realizado pela circulação de um líquido (líquido refrigerante) ou ar através de cartuchos, contendo o capilar (QUEIROZ e JARDIN, 2001; TAVARES, 1995; WATZIG e GUNTER, 2003).

FIGURA 7 - Esquema de um equipamento de eletroforese capilar (TAVARES,1995).

2.9.1.1 Introdução da amostra

Diferentemente de outras técnicas de cromatográficas, na CE a amostra é introduzida no capilar e não injetada, pelo lado mais distante do detector. O modo de introdução mais empregado em CE é o hidrodinâmico, onde o capilar é mergulhado em um frasco contendo a amostra o qual posteriormente é pressurizado, submetido a vácuo ou erguido, provocando a entrada de certo volume de amostra no capilar. A outra maneira de introdução da amostra no capilar é através do método eletrocinético. Neste modo de introdução a amostra é introduzida no capilar como resultado da combinação entre as velocidades eletrocinética e eletrosmótica.

A principal desvantagem deste modo de injeção é a amostragem não representativa, que resulta na discriminação dos constituintes da amostra com diferentes mobilidades. A maior aplicabilidade da injeção eletrodinâmica é na eletroforese capilar em gel, onde não há possibilidade de transferência de volumes por injeção (QUEIROZ e JARDIN, 2001; TAVARES 1995).

2.9.1.2 Detectores

Os detectores espectrofométricos de UV/VIS é o mais utilizado em CE devido sua natureza quase universal, o qual pode ser utilizado na detecção de diversas classes de substâncias. Alguns equipamentos possuem também detectores de arranjo de diodo, o qual fornece um espectro de UV/VIS para cada substância detectada. No **Quadro 5** são apresentados os detectores alternativos para CE.

QUADRO 5 – Detectores usados em CE e seus limites de detecção aproximados (adaptado de QUEIROZ e JARDIM, 2001).

Detector	Limite de detecção aproximado (mg L⁻¹)
Absorção no UV-Visível	10^{-1}
Absorção Indireta no UV-Visível	1
Fluorescência	10^{-3}
Fluorescência Indireta	10^{-3}
Fluorescência Induzida por laser	10^{-6}
Espectrômetro de massa	10^{-4}
Amperométrico	10^{-5}
Condutividade	10^{-3}

2.10 Adequabilidade do Sistema

Para se iniciar uma análise cromatográfica ou eletroforética, deve-se assegurar as condições do sistema cromatográfico ou eletroforético e métodos utilizados são capazes de fornecer dados com exatidão e precisão adequados. Para tanto, realiza-se um conjunto de testes de adequação de sistema cujo objetivo é garantir que o método analítico possui e mantém o bom desempenho analítico.

Geralmente a definição dos parâmetros a serem avaliados para adequação do sistema é realizada após o desenvolvimento e a validação do método, conforme seu desempenho (USP 37). A análise só é válida quando o sistema satisfazer todos os requisitos necessários. E aplicável apenas para métodos espectrofotométricos, eletroforéticos e cromatográficos.

Os parâmetros a serem avaliados englobam os seguintes itens: resolução entre picos (R_s), número de pratos (N), fator de simetria, fator de retenção (k), tempo de retenção, fator de capacidade e desvio padrão relativos entre replicatas.

2.10.1 Resolução

A resolução (R_s) é função da eficiência da coluna, N , e é utilizado para avaliar a separação entre picos consecutivos. Quanto maior o valor de R_s , melhor é a separação entre picos.

O cálculo da resolução entre dois picos é realizado de acordo com a **Equação 1**:

$$R = 1,18 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_2 + w_1)} \quad \text{Equação (1)}$$

É recomendado um valor de $R_s \geq 2$, entre o pico de interesse e o pico com potencial para causar interferência (excipiente, impurezas, produto de degradação e padrão interno).

FIGURA 8 - Separação cromatográfica de duas substâncias

2.10.2 Número de pratos

O conceito de números de pratos (N) está relacionado a número de estágio de separação pela qual uma substância passa ao longo da coluna cromatográfica. Quanto maior o N melhor é separação proporcionada para determinada coluna para aquela substância.

O cálculo de N é realizado conforme a **Equação 2**

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_{base}} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde T_r é o tempo de retenção do pico, w_{base} é a largura do pico na linha de base e $w_{0,5}$ é a largura do pico a meia altura. Também podemos relacionar o número de pratos a altura de um prato teórico (H) e o comprimento da coluna (L), de acordo com a **Equação 3**:

$$N = L / H \quad \text{Equação (3)}$$

Os fatores que podem afetar diretamente o valor de N e/ou consequentemente H são a vazão da fase móvel, o tamanho de partícula a temperatura da coluna, a viscosidade da FM e o peso molecular dos compostos. A *Food and Drug Administration* (FDA), recomenda um número mínimo de 2000 pratos. Quanto menor o N mais largo será a banda cromatográfica observada, maior

será a distribuição do analito na coluna, conseqüentemente uma resposta prejudicada, de acordo com **Figura 9**.

FIGURA 9 – Influência de N na resposta da coluna cromatográfica

2.10.3 Fator de cauda

Estes parâmetros permitem avaliar e identificar se o pico tem um formato gaussiano (simétrico) e como estes fatores podem influenciar no desempenho do método. Fator de simetria ou fator de cauda (*tailing factor*) são erroneamente confundidos como mesmo parâmetro, por permitirem avaliação da banda cromatográfica. Estes dois fatores são sutilmente diferentes não podendo ser intercambiáveis.

O cálculo de de fator de cauda é realizado de acordo com a **Equação 4**:

$$T = W_{0,05} / 2f$$

Equação (4)

FIGURA 10 - Esquema de cromatograma para calculo de fator de cauda

É recomendado, de acordo com a Farmacopeia Americana, uma fator de cauda menor que 2. A dificuldade em avaliar o final da banda cromatográfica, devido ao alargamento da banda, leva à diminuição no desempenho do método analítico (**Figura 11**).

FIGURA 11 – Esquema de pico cromatográfico com vários fatores de simetria

2.10.4 Seletividade ou fator de separação

Aseletividade (α) compara a retenção de um componente com a retenção de outro, indicando até que grau o sistema físico-químico (coluna-fase móvel) está diferenciando entre um composto e outro composto. É expresso por α e é calculado conforme a **Equação 5**

$$\alpha = \frac{(t_{R2} - t_0)}{(t_{R1} - t_0)}$$

Equação (5)

O volume morto, t_0 é o tempo necessário para que um analito percorra a coluna, sem que sofra retenção pela FE. O t_0 é normalmente identificado pela primeira perturbação na linha de base no cromatograma.

2.10.5 Fator de capacidade

O fator de capacidade (k) indica o grau de afinidade que a coluna e fase móvel possuem para um determinado composto (**Equação 7**).

$$K' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad \text{Equação (7)}$$

Onde T_r e o t_0 , o tempo de retenção do pico principal tempo de retenção do solvente, respectivamente. O valor de k é específico para cada composto e dependendo da fase móvel, FE, temperatura da coluna de da qualidade do enchimento da coluna. Quanto maior o valor de k melhor será a retenção do soluto. O valor de k deve estar em 1 e 10, de forma a obter melhor desempenho cromatográfico. Todavia, para amostras complexas com múltiplos picos são aceitos valores de k entre 1 e 20. Quando k for inferior a 1, pode não haver separação adequada entre os picos e o volume morto t_0 , estando mais sensível variações da fase móvel.

3. OBJETIVOS

Os principais objetivos do trabalho são apresentados a seguir:

3.1 Geral

Desenvolver e validar método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência e Eletroforese Capilar para a separação e quantificação simultânea dos fármacos sinvastatina e ezetimiba em medicamentos.

3.2 Específicos

Desenvolver e padronizar os métodos analíticos por eletroforese capilar e cromatografia líquida de alta eficiência para a separação simultânea e determinação da sinvastatina e ezetimiba em medicamentos;

Validar os métodos desenvolvidos atendendo os parâmetros exigidos pelas diretrizes da ANVISA, ICH e da Farmacopéia Americana para validação de metodologia analítica que são: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez;

Aplicar os métodos na quantificação dos princípios ativos, sinvastatina associada a com ezetimiba, em formas farmacêuticas ;

Comparar estatisticamente os métodos desenvolvidos e validados (CE e HPLC) quanto à precisão (teste F) e exatidão (teste t).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materias e Equipamentos

4.1.1 Placebo/ padrões/ amostras

Os fármacos utilizados (ezetimiba e sinvastatina) para desenvolvimento dos métodos analíticos foram doados por duas indústrias farmacêuticas, sendo todos padrões secundarizados, validados dos padrões USP, com teor declarado de 99,8% para ezetimiba e 100,0% para sinvastatina.

Foram avaliadas amostras comerciais de sinvastatina associada à ezetimiba nas concentrações de 10/20 mg (Vytorin®), fabricado pela *Merck Sharpe & Dohme*.

Os excipientes utilizados na manipulação do placebo foram: butilhidroxianisol, ácido cítrico, croscellose sódica, hidropropilmetilcelulose, lactose monhidratada, estearato de magnésio, celulose micronizada e propilgalato.

4.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados no desenvolvimento do método analítico foram: água purificada (Milli-q), ácido clorídrico (Synth), ácido fosfórico (Sigma), hidróxido de sódio em lentilhas (Synth), peróxido de hidrogênio 30 % (Sigma), tetraborado de sódio (Synth), dodecil sulfato de sódio (Sigma), acetonitrila Tédia® grau HPLC e metanol grau HPLC.

4.1.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram:

- Aparelho de ponto de fusão B 545 (BUCHI, Suíça);
- Balança analítica AG 204 (Mettler Toledo);
- Banho de ultrassom USC 4880A (Unique®);
- Espectrofotômetro de infravermelho FT-IR (Spectrun GX) Perkin Elmer
- Espectrofotômetro Agilent UV- VIS (USA);

- Estufa de secagem (BINDER GmbH, Alemanha)
- HPLC Agilent 1200, equipado com bomba quartenária, desgaseificador, forno, injetor automático e detectores de arranjo de diodos (DAD) e comprimento de ondas variável (VWD) (USA) e *software* Chemstation;
- UHPLC Thermofisher Ultimate 3000 equipado com bomba quartenária, desgaseificador, forno, injetor automático e detectores de arranjo de diodos (DAD), comprimento de ondas variável (VWD) e detector corona (CAD) (USA) e *software* Chromilion.
- Equipamento de eletroforese capilar BeckmanandCoulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos, que permite a obtenção de espectros UV-VIS em tempo real de cada pico, controlador de temperatura e *software* 32 Karat® V.8.0 para aquisição e tratamento dos dados;
- Colunas capilares de sílica fundida (PolymicroTechnologies, USA) com diâmetro interno de 50 ou 75 µm e comprimento efetivo de 20 à 60 cm.

4.2 Métodos

As matérias-primas utilizadas como padrões, ezetimiba e sinvastatina foram submetidas a testes preliminares de identificação através de testes físico-químicos, com a finalidade de avaliar as condições de trabalho para uso com segurança nos procedimentos experimentais.

A identificação das matérias-primas ezetimiba e sinvastatina foram realizadas através da técnica de espectrofotometria de absorção nas regiões do infravermelho (IR), UV e pela determinação de temperatura de fusão.

4.2.1 Temperatura de fusão

A análise do ponto de fusão é considerada uma técnica indicativa da pureza dos compostos, uma vez que diversas substâncias apresentam ponto/faixa de fusão característicos e a presença de qualquer impureza altera seu resultado. A simplicidade, rapidez e baixo custo do equipamento são algumas das vantagens da aplicação desta técnica (GIL *et al.*,2005)

A determinação do ponto de fusão das matérias-primas ezetimiba e sinvastatina foram determinadas, em triplicata, pelo método capilar. As amostras foram compactadas em tubos capilares com diâmetro de 1 mm e 5 cm de comprimento. Aproximadamente 5 mm do capilar foi preenchido com amostra.

4.2.2 Espectrometria de absorção na região do infravermelho (IR)

A radiação no IR corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e microondas. Embora o espectro nesta região seja característico da molécula como um todo, alguns grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência. É exatamente a presença destas bandas características de grupos funcionais que permite, através de um simples exame do espectro e consulta de tabelas, a identificação de estrutura.

A caracterização das matérias-primas ezetimiba e sinvastatina por espectrofotometria IR foi realizada pela dispersão em pastilhas de brometo de potássio (KBr) individualmente.

Na ausência de um espectro de IV para comparação, atribuições das bandas foi efetuada considerando a região de absorção, o formato e a intensidade das bandas.

4.2.3 Espectrometria de absorção na região do ultravioleta (UV)

A espectrofotometria na região do UV é utilizado para identificação e quantificação de fármacos, apesar de apresentar algumas limitações, um vez que depende da existência de grupos cromóforos na estrutura do composto a ser analisado, o que compromete consequentemente sua especificidade. Todavia, é uma método alternativo de doseamento na ausência de técnicas mais sofisticadas, como cromatografia líquida de alta eficiência.

Para avaliação da absorbância máxima, preparou-se soluções de ezetimiba e sinvastatina na concentração de 10,0 µg mL⁻¹ em acetonitrila (ACN) grau HPLC. Os espectros foram traçados na faixa 200 a 400 nm, e comparados com os máximos de absorção descritos na literatura.

4.2.4 Desenvolvimento de métodos analíticos

4.2.4.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para o desenvolvimento do método analítico foi utilizado a coluna NST - CN de 150 x 4,6 mm, com diâmetro interno de 3,5 μm . Durante o desenvolvimento foi utilizada outra coluna com características diferentes. Foi avaliado entre as colunas disponíveis no laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas os parâmetros cromatográficos obtidos para ambos os fármacos, tais como: tempo de retenção, número de pratos (eficiência da coluna) resolução, fator de cauda e o tempo de corrida.

Determinado a coluna cromatográfica a ser utilizada, fez-se a seleção da fase móvel que demonstrasse a melhor capacidade de eluição da associação de fármacos de forma resolvida, com tempo aceitável para uma corrida analítica.

As fases móveis testadas foram compostas de água purificada:acetonitrila, acetato de amônio 25 mmol L⁻¹:acetonitrila, fosfato de potássio monobásico 25 mmol L⁻¹:acetonitrila, em diferentes combinações e faixa de pH.

Outras combinações compostas apenas de solvente orgânico e água purificada foram testadas para compor a fase móvel de eluição dos fármacos. As combinações testadas foram: acetonitrila:água purificada 90:10 v/v a 50:50 v/v. Paralelamente ao desenvolvimento da fase móvel foram avaliados diferentes vazões da fase móvel, avaliando o impacto nos resultados cromatográfico, a pressão do sistema, o consumo de fase móvel e tempo de análise.

4.2.4.2 Cromatografia eletrociclinética micelar (MEKC)

Para o desenvolvimento do método por MEKC foram conduzidos ensaios para seleção dos sistemas de solventes mais apropriados para definição da composição do eletrólito de corrida para obtenção de migração diferenciada para ezetimiba e sinvastatina, além da tentativa de otimização dos parâmetros experimentais e instrumentais críticos para garantia da adequada resolução na separação dos analitos.

Sendo os analitos em estudos insolúveis em meio aquoso, inicialmente, para o desenvolvimento do método, foi testado dois solventes orgânicos, acetonitrila e metanol para solubilização da solução estoque dos analitos.

O método de padronização interna foi utilizado para análise quantitativa das amostras de ezetimiba associada a sinvastatina, com o propósito de minimizar os erros analíticos associados às incertezas introduzidas pelo tempo de injeção das amostras e na preparação dos padrões, além do processo de injeção.

4.2.4.2.1 Composição do eletrólito de corrida

A composição do eletrólito de corrida foi testada com o propósito de obter migração diferenciada para os dois analitos em estudo. Testes realizados tomando como base alguns trabalhos da literatura que envolvem separação de substâncias neutras e insolúveis em água (SRINIVASU, RAJUE REDDY, 2002; YARDINCI e OZALTIN, 2010). Os seguintes sistemas foram testados: a) 25 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio (TBS) + 25 mmol L⁻¹ dodecil sulfato de sódio (SDS) pH = 9,0 b) 25 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS pH = 9,0 + 12% ACN; c) 25 mmol L⁻¹ TBS + 25 mmol L⁻¹ SDS pH = 9,0 + 12% MeOH; d) 20 mmol L⁻¹ TBS + 50 mmol L⁻¹ SDS pH = 9,0 + 10% ACN ; e) 20 mmol L⁻¹ TBS + 50 mmol L⁻¹ SDS pH = 9,0 + 12% ACN ; f) 20 mmol L⁻¹ TBS + 50 mmol L⁻¹ SDS pH = 9,0 + 10% MeOH ; g) 20 mmol L⁻¹ TBS + 50 mmol L⁻¹ SDS pH = 9,0 + 12% MeOH . A ACN e o MeOH foram utilizados como modificador orgânico de modo a melhorar as características de migração e garantir a completa solubilização dos analitos no meio aquoso. Para os testes iniciais utilizou-se a temperatura de 30°C, diferença de potencial de 30 kV e tempo de injeção de amostra de 3s.

4.3 Validação de Métodos Analíticos para Doseamento de Ezetimiba Associado a Sinvastatina por HPLC (Categoria I)

4.3.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada pela injeção da solução diluente e placebo da amostra e avaliado se o método foi capaz de separar os analitos dos

seus possíveis produtos de degradação, excipientes, sem que houvesse interferência na quantificação dos compostos em estudo.

O teste de especificidade foi avaliado pelo método de comparação com o placebo (matriz). Para isso um placebo foi manipulado com os excipientes comumente utilizados no preparado dos comprimidos. A seguir é apresentado a composição do placebo:

Butilhidroxianisol (0,1%), ácido cítrico (1,0%), croscamelose sódica (3,0%), hidroxipropilmetilcelulose (2,0%), lactose monihidratada (45,0%), estearato de magnésio (2,0%), celulose microcristalina (46,8%) e propilgalato (0,1%).

4.3.2 Teste de estresse com produto acabado

Preparo do placebo da amostra

Uma massa equivalente ao peso médio (PM) dos comprimidos de placebo (200 mg) foi pesada e transferida para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Imediatamente adicionou-se aproximadamente 35 mL de acetonitrila e submeteu a banho de ultrassom por 15 minutos com agitações ocasionais. Transferiu-se volumetricamente 5 mL da solução anterior para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro e 33 mm de diâmetro para vial âmbar descartando-se os primeiros 2 mL.

Preparo da amostra nas condições de trabalho (tempo zero)

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão âmbar de 50 mL. Imediatamente adicionou-se aproximadamente 35 mL de acetonitrila e submeteu a banho de ultrassom por 15 minutos com agitações ocasionais. Transferiu-se volumetricamente 5 mL da solução anterior para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF com poro de 0,45 µm e 33 mm de diâmetro para vial âmbar descartando-se os primeiros 2 mL (Concentração de final de ezetimiba = 10,0 µg mL⁻¹; sinvastatina = 20,0 µg mL⁻¹).

Preparo da amostra para hidrólise ácida e alcalina

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para diferentes balões volumétricos âmbar de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de ACN a cada balão para solubilização da amostra e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹, e em outro balão adicionou-se 5 mL de ACN e 2,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹. Submeteu-se os balões a banho de ultrassom por 15 minutos. Após 7 dias de exposição, completou-se o volume com ACN. Transferiu-se volumetricamente 5 mL da solução anterior para diferentes balões volumétricos de âmbar de 100 mL e completou-se o volume com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF com poro de 0,45 µm e 33 mm de diâmetro para *vial* âmbar descartando-se os primeiros 2 mL (Concentração de final ezetimiba = 10,0 µg mL⁻¹; sinvastatina = 20,0 µg mL⁻¹).

Preparo da amostra para hidrólise oxidativa

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de ACN para solubilização da amostra e 2,5 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%. Submeteu-se a banho de ultrassom por 15 minutos. Após 7 dias de exposição, completou-se o volume com ACN. Transferiu-se volumetricamente 5 mL da solução anterior para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se o volume com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45 µm e 33 mm de diâmetro para *vial* âmbar descartando-se os primeiros 2 mL (Concentração de final ezetimiba = 10,0 µg mL⁻¹; sinvastatina = 20,0 µg mL⁻¹).

Preparo da amostra submetida ao calor seco (60°C)

Transferiu-se, cerca de 500,0 mg de amostra para placa de petri. Submeteu-se a estufa à 60°C por 7 dias. Após exposição, uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico

âmbar de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de ACN para solubilização da amostra. Submeteu-se a banho de ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com ACN. Transferiu-se volumetricamente 5 mL desta solução para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se o volume com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45 μm e 33 mm de diâmetro para *vial* âmbar descartando-se os primeiros 2 mL (Concentração de final ezetimiba = 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; sinvastatina = 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Preparo da amostra para exposição à luz

Transferiu-se, cerca de 500,0 mg de amostra para placa de petri. Submeteu-se a amostra a exposição a luz direta em bancada por 7 dias. Após exposição, uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico transparente de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de ACN para solubilização da amostra. Submeteu-se a banho de ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com ACN. Transferiu-se volumetricamente 5 mL desta solução para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se o volume com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45 μm e 33 mm de diâmetro para *vial* âmbar descartando-se os primeiros 2 mL (Concentração de final ezetimiba = 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$; sinvastatina = 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.3.3 Linearidade e intervalo

Para a avaliação da linearidade do método, foram preparadas cinco soluções padrões em diferentes concentrações para os dois fármacos variando de 80% a 120% (INTERVALO) da concentração nominal de trabalho. Considerando que a concentração nominal para ezetimiba é de 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para sinvastatina é de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados de concentração e unidade de área foram plotados em um gráfico e determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação. Estas soluções foram preparadas partir de uma solução estoque e os valores médios encontrados foram plotados da concentração da amostra (eixo x) pela resposta do detector (eixo Y) para avaliar a linearidade nas concentrações testadas.

Para o ensaio de linearidade foram pesados aproximadamente 10,0 mg do padrão de ezetimiba para balões volumétricos âmbar de 10 mL. Diluiu-se os padrões com 5 mL de acetonitrila grau HPLC, submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de ezetimiba = $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (**Solução A**).

Em outro balão volumétrico âmbar de 20 mL foram pesados aproximadamente 20,0 mg do padrão de sinvastatina. Diluiu-se o padrão com 15 mL de acetonitrila grau HPLC, levou-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de sinvastatina = $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (**Solução B**).

Alíquotas das soluções estoque de ezetimiba (**Solução A**) e sinvastatina (**Solução B**) foram transferidas volumetricamente para balão volumétrico âmbar de 20 mL (triplicata). O volume foi completado com solução diluente de acordo com ao esquema a seguir:

TABELA 1 – Preparo das soluções para o teste de linearidade

Concentração (%)		Volume da solução estoque	Volume da solução estoque	Volume final (mL)	Concentração Teórica $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Ezetimiba	Sinvastatina	A (μL)	B (μL)		Ezetimiba	Sinvastatina
80		160	320	20	8,0	16,0
90		180	360		9,0	18,0
100		200	400		10,0	20,0
110		220	440		11,0	22,0
120		240	448		12,0	24,0

4.3.4 Precisão e precisão intermediária

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrida) e precisão intermediária (precisão intercorridas).

A repetibilidade do método é avaliada, por no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear, ou seja, concentrações baixa, média e alta com 3 replicatas ou no mínimo 6 determinações a concentração 100% da concentração nominal.

Para o ensaio de repetibilidade do método foram preparadas 6 determinações da solução amostra de Vytorin® (10mg ezetimiba/20mg sinvastatina) da seguinte maneira:

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos (PM= 200mg), em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão âmbar de 50 mL. Imediatamente adicionou-se aproximadamente 35 mL de acetonitrila e submeteu a banho de ultrassom por 15 minutos com agitações ocasionais. Transferiu-se volumetricamente 5 mL da solução anterior para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF com poro de 0,45 de diâmetro e 33 mm de diâmetro para vial âmbar descartando-se os primeiros 2 mL (Concentração de final de ezetimiba = 10,0 µg/mL-1; sinvastatina = 20,0 µg/mL-1).

Este teste foi realizado e um mesmo equipamento, em um curto período de tempo por um mesmo analista.

A precisão intermediária foi determinada por um segundo analista, utilizado o mesmo equipamento, na mesma concentração do ensaio de repetibilidade, todavia com intervalo de alguns dias.

A precisão de um método pode ser expresso como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável deve ser estabelecido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito, tipo de matriz e a finalidade do método analítico, não sendo aceito valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

Os testes *t* e *F* foram aplicados para avaliar se a dispersão e a variabilidade das médias obtidas (n=12) são estatisticamente semelhantes.

4.3.5 Exatidão

A exatidão foi determinada pela fortificação do placebo nas concentrações de 80%, 100% e 120% referente à concentração nominal do método a partir de uma solução estoque (vide item **LINEARIDADE E INTERVALO**).

Alíquotas das soluções estoque de ezetimiba (Solução A) e sinvastatina (Solução B) foram transferidas volumetricamente para balão volumétrico âmbar de

50 mL (triplicata), contendo aproximadamente 10,0 mg de placebo. O volume foi completado com solução diluente de acordo com ao esquema a seguir:

TABELA 2 – Preparo das soluções para o teste de exatidão

Concentração (%)		Volume da solução estoque	Volume da solução Estoque	Volume Final (mL)	Concentração Teórica $\mu\text{g mL}^{-1}$	
EZE	SIM	A (μL)	B (μL)		EZE	SIM
80		400	800	50	8,0	16,0
100		500	1000		10,0	20,0
120		600	1200		12,0	24,0

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionada ao placebo. O intervalo de confiança no nível de 95% foi considerado como critério para avaliação do parâmetro de exatidão.

4.3.6 Limites de quantificação e detecção

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. A estimativa do limite de detecção será realizada através da curva analítica obtida construída próximo ao limite de quantificação. A avaliação deve ser feita com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base.

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

A estimativa do limite de detecção será realizada através da curva analítica construída próximo ao limite de quantificação. Esta avaliação deve ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base.

4.3.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada considerando os parâmetros que poderiam afetar a resposta dos analitos em estudo. As amostras de produto acabado foram preparadas em triplicata na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ezetimiba e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sinvastatina. Os parâmetros modificados estão descritos na **Tabela 3**.

Os testes *t* foram utilizados para avaliar o comportamento dos dados após alteração nas condições analíticas.

TABELA 3 – Parâmetros cromatográficos alterados para o ensaio de robustez

Parâmetro modificado	Variação A	Nominal	Variação B
Vazão da Fase móvel (mL/minuto)	0,7	0,8	0,9
Proporção de solução orgânica na fase móvel (%)	50	52	54
Comprimento de ondas (nm)	235	238	240

4.4 Validação de Métodos Analíticos para Doseamento de Ezetimiba Associada à Sinvastatina por MECK (Categoria I)

4.4.1 Especificidade - CE

A especificidade do método foi determinada pela injeção da solução diluente e placebo da amostra e avaliado se o método foi capaz de separar os analitos dos seus possíveis produtos de degradação, excipientes, sem que houvesse interferência na quantificação dos compostos em estudo.

4.4.2 Teste de estresse com amostra de produto acabado - CE

Preparo do placebo da amostra

Uma massa equivalente ao peso médio (PM) de placebo (200 mg) foi pesada e transferida para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Imediatamente adicionou-se aproximadamente 15 mL de metanol e submeteu a banho de ultrassom por 15 minutos com agitações ocasionais. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se volumetricamente 2 mL da solução anterior para um tubo de centrífuga graduado de 15 mL e adicionou-se 4 mL solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF com poro de 0,45 μm de diâmetro e 33 mm de diâmetro para *microvial* descartando-se os primeiros 2 mL.

Preparo da amostra nas condições de trabalho (tempo zero)

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Imediatamente adicionou-se aproximadamente 15 mL de metanol e submeteu a banho de ultrassom por 15 minutos com agitações ocasionais. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se volumetricamente 2 mL da solução anterior para um tubo de centrífuga graduado de 15 mL e adicionou-se 0,4 mL da solução estoque de PI e 1,6 mL de solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45 μm e 33 mm de diâmetro para *microvial*. (Concentração de final ezetimiba = 0,1 mg mL^{-1} ; sinvastatina = 0,2 mg mL^{-1} ; losartana potássica 0,1 mg mL^{-1}).

Preparo da amostra para hidrólise ácida e alcalina

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para diferentes balões volumétricos âmbar de 25 mL. Adicionou-se 5 mL de MeOH para solubilização da amostra e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L^{-1} , e em outro balão adicionou-se 5 mL de MeOH e 2,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L^{-1} . Submeteu-se a banho de ultrassom por 15

minutos. Após 7 dias de exposição, completou-se o volume com MeOH. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se volumetricamente 2 mL da solução anterior para um tubo de centrífuga graduado de 15 mL e adicionou-se 0,4 mL da solução estoque de PI e 1,6mL de solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45 μ m e 33 mm de diâmetro para *microvial*. (Concentração de final ezetimiba = 0,1 mg mL⁻¹; sinvastatina = 0,2 mg mL⁻¹; losartana potassica 0,1 mg mL⁻¹).

Preparo da amostra para hidrólise oxidativa

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico âmbar de 25 mL. Adicionou-se 5 mL de MeOH para solubilização da amostra e 2,5 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%. Submeteu-se a banho de ultrassom por 15 minutos. Após 7 dias de exposição, completou-se o volume com MeOH. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se volumetricamente 2 mL da solução anterior para um tubo de centrífuga graduado de 15 mL e adicionou-se 0,4 mL da solução estoque de PI e 1,6mL de solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45 μ m e 33mm de diâmetro para *microvial*. (Concentração de final ezetimiba = 0,1 mg mL⁻¹; sinvastatina = 0,2 mg mL⁻¹; losartana potassica 0,1 mg mL⁻¹).

Preparo da amostra submetida ao calor seco (60°C)

Transferiu-se, cerca de 500,0 mg de amostra para placa de petri. Submeteu-se a estufa à 60°C por 7dias. Após exposição, uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico âmbar de 25 mL. Adicionou-se 5 mL de MeOH para solubilização da amostra. Submeteu-se a banho de ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com MeOH. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se volumetricamente 2 mL da solução anterior para um tubo de centrífuga graduado de 15 mL e adicionou-se 0,4 mL da solução estoque de PI e 1,6mL de solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45 μ m e 33mm de diâmetro

para microvial. (Concentração de final ezetimiba = $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$; sinvastatina = $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$; losartana potássica $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$).

Preparo da amostra para exposição à luz

Transferiu-se, cerca de 500,0 mg de amostra para placa de petri. Submeteu-se a amostra a exposição a luz direta em bancada por 7 dias. Após exposição, uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico transparente de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de MeOH para solubilização da amostra. Submeteu-se a banho de ultrassom por 15 minutos. Completou-se o volume com MeOH. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se volumetricamente 2 mL da solução anterior para um tubo de centrífuga graduado de 15 mL e adicionou-se 0,4 mL da solução estoque de PI e 1,6 mL de solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e 33 mm de diâmetro para *microvial*. (Concentração de final ezetimiba = $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$; sinvastatina = $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$; losartana potássica $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$).

4.4.3 Linearidade e intervalo - CE

Para a avaliação da linearidade do método, foram preparadas cinco soluções padrões em diferentes concentrações para os dois fármacos variando de 80% a 120% (INTERVALO) da concentração nominal de trabalho. Considerando que a concentração nominal para ezetimiba é de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para sinvastatina é de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados de concentração e unidade de área foram plotados em um gráfico e determinada a equação da reta e o coeficiente de correlação. Estas soluções foram preparadas partir de uma solução estoque e os valores médios encontrados foram plotados da concentração da amostra (eixo x) pela resposta do detector (eixo Y) para avaliar a linearidade nas concentrações testadas.

Para o ensaio de linearidade foram pesados aproximadamente 10,0 mg do padrão de ezetimiba e 10 mg de padrão de losartana potássica para balão volumétrico âmbar de 10 mL. Diluiu-se os padrões com 5 mL de metanol grau HPLC, levou-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura

ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de ezetimiba = $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (**Solução A**).

Em outro balão volumétrico âmbar de 10 mL foram pesados aproximadamente 10mg do padrão de sinvastatina. Diluiu-se o padrão com 5 mL de metanol grau HPLC, levou-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de sinvastatina = $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (**Solução B**).

Alíquotas das soluções estoque de ezetimiba (**Solução A**) e sinvastatina (**Solução B**) foram transferidas volumetricamente para tubo de centrífuga 10 mL (triplicata). O volume foi completado com solução diluente de acordo com ao esquema a seguir:

TABELA 4 – Preparo das soluções para o teste de linearidade - CE

Concentração (%)		Volume da solução estoque A (µL)	Volume da solução estoque B (µL)	Volume Final (mL)	Concentração Teórica $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Ezetimiba	Sinvastatina				Ezetimiba	Sinvastatina
80		320	640	4	80,0	160,0
90		360	720		90,0	180,0
100		400	800		100,0	200,0
110		440	880		110,0	220,0
120		480	960		120,0	240,0

4.4.4 Precisão e precisão intermediária - CE

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão intercorrídas).

A repetibilidade do método é avaliada, por no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear, ou seja, concentrações baixa, média e alta com 3 replicatas ou no mínimo 6 determinações a concentração 100% da concentração nominal.

Para o ensaio de repetibilidade do método foram preparadas 6 determinações da solução amostra de ezetimiba e sinvastatina comprimidos 10 mg/ 20 mg de acordo com o item **PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA (10/20 mg EZETIMIBA /**

SINVESTATINA) - CE. Este teste foi realizado e um mesmo equipamento, em um curto período de tempo por um mesmo analista.

A precisão intermediária foi determinada utilizando o mesmo equipamento, na mesma concentração do ensaio de repetibilidade, todavia com intervalo de alguns dias.

A precisão de um método pode ser expresso como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável deve ser estabelecido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito, tipo de matriz e a finalidade do método analítico, não sendo aceito valores superiores a 5% (ANVISA, 2003).

Os testes t e F foram aplicados para avaliar se a dispersão e a variância das médias obtidas ($n=12$) são estatisticamente semelhantes.

4.4.5 Exatidão - CE

A exatidão foi determinada pela fortificação do placebo nas concentrações de 80%, 100% e 120% referentes à concentração nominal do método. Para determinação da exatidão do método procedeu-se da seguinte maneira:

Solução estoque dos padrões de ezetimiba e sinvastatina

Pesou-se aproximadamente cerca de 100,0 mg de placebo para 9 diferentes balões volumétricos de 25 mL. Adicionou-se para cada balão aproximadamente 5,0 mg de padrão secundário de ezetimiba, 5,0 mg de padrão secundário de losartana potássica e aproximadamente 10,0 mg de padrão secundário sinvastatina. Dilui-se com 15 mL de metanol grau HPLC, submeteu-se ao banho de ultrassom por aproximadamente 15 minutos com agitações ocasionais. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se com o mesmo solvente (Concentração de ezetimiba = $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$; sinvastatina = $0,40 \text{ mg mL}^{-1}$).

Alíquotas das soluções anteriores foram transferidas volumetricamente para tubos de centrífuga 15 mL (triplicata), e diluídos de acordo com o esquema abaixo:

TABELA 5 – Preparo das soluções para o teste de exatidão - CE

Concentração (%)		Volume da solução estoque (mL)	Volume Final (mL)	Concentração Teórica mg mL ⁻¹	
Ezetimiba	Sinvastatina			Ezetimiba	Sinvastatina
80,0		1,6	4	0,08	0,16
100,0		2,0		0,10	0,20
120,0		2,4		0,12	0,24

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionada ao placebo. O intervalo de confiança no nível de 95% foi considerado como critério para avaliação do parâmetro de exatidão.

4.4.6 Robustez - CE

A robustez do método analítico foi avaliada considerando os parâmetros que poderiam afetar a resposta dos analitos em estudo. As amostras de produto acabado foram preparadas nas concentrações de 100,0 µg mL⁻¹ de ezetimiba e 200,0 µg mL⁻¹ de sinvastatina. Os parâmetros modificados estão descritos na **Tabela 6**.

TABELA 6 – Parâmetros eletroforéticos alterados para o ensaio de robustez - CE

Parâmetro modificado	Variação A	Nominal	Variação B
Tempo de injeção (segundos)	1	3	5
Proporção de modificador orgânico (Acetonitrila) no eletrólito (%)	10	12	14

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das Matérias-Primas

5.1.1 Temperatura de fusão

A literatura descreve que a temperatura de fusão da sinvastatina abrange uma faixa de 135 a 138 °C, enquanto que para ezetimiba são descritos faixa de fusão entre 160–163 °C (LESTARI, ARDIANA, INDRAYANTO, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os valores encontrados experimentalmente estão foram 162 °C e 136 °C para ezetimiba e sinvastatina, respectivamente **Tabela 7**.

TABELA 7 - Resultados obtidos para determinação da temperatura de fusão (ezetimiba / sinvastatina) – Método Capilar

Identificação	Temperatura de Fusão	
	Ezetimiba	Sinvastatina
1	161	136
2	163	136
3	161	136
Média	162	136
DPR (%)	0,4	0,1

5.1.2 Espectrometria na região do infravermelho (IV)

Experimentos de FTIR foram conduzidos utilizando espectrofotômetro *Perkin Elmer*. Os espectros foram obtidos utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). As principais bandas descritas na literatura para sinvastatina estão localizadas nos seguintes números de onda: 1718, 1459, 1389, 1267 cm^{-1} , e em 3270, 2918, 1862, 1718 e 1510 cm^{-1} para ezetimiba. Essas bandas podem ser observadas nos espectros registrados nas **Figuras 12 e 13**, para ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. As principais atribuições das principais bandas estão apresentadas nas tabelas

FIGURA 12 Espectro de absorção do padrão da ezetimiba na região do infravermelho.

QUADRO 6 – Atribuição de posições das principais bandas de absorção da ezetimiba na região do IR.

Número de onda aproximado (cm ⁻¹)	Atribuição
3230, 3500	Estiramento O-H de grupamento hidroxila
2918	Estiramento axial CH ₂ -CH ₃ metila
1743	Estiramento de carbonila C=O
1500	Banda C=C aromáticos
1267	Estiramento de C-F

FIGURA 13 Espectro de absorção do padrão da sinvastatina na região do infravermelho

QUADRO 7 Atribuição de posições das principais bandas de absorção da sinvastatina na região do IR.

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
3200	Estiramento axial O- H de grupamento hidroxila
1728	Estiramento axial C=O de éster e lactona
1567	Estiramento axial C=O carboxilato
1459, 1389	Deformação angular de metil e metileno
1267	Deformação axial de C-O-C de éster e lactona

5.1.3 Espectro na região do ultravioleta (UV)

Foram preparadas soluções de ezetimiba e sinvastatina nas concentrações de 10,0 µg mL⁻¹ e 10,0 µg mL⁻¹, respectivamente, em ACN e traçados espectros na região do UV. A leitura foi realizada na faixa de comprimento de onda 200 – 400 nm. A definição do comprimento de onda para cada molécula foi estabelecido após levantamento bibliográfico e condução dos testes do espectro de absorção na região do UV e através da varredura de espectros com detector de arranjo diodos (DAD) (HEFNAWY, AL-OMAR E JULKHUF, 2009). Os espectros obtidos estão representados nas **Figuras 14, 15 e 16**.

FIGURA 14 - Espectro de absorção da solução padrão de sinvastatina (10,0 µg mL⁻¹) na região do ultravioleta(UV).

FIGURA 15 - Espectro de absorção da solução padrão de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) na região do ultravioleta (UV).

FIGURA 16 - Sobreposição dos espectros de ezetimiba e sinvastatina.

5.2 Desenvolvimento Analítico

5.2.1 HPLC

No desenvolvimento do método analítico por HPLC utilizou-se inicialmente uma coluna octadesilsilano (C18), e foram definidos parâmetros iniciais, baseados nos dados de literaturas, nas semelhanças entre metodologias existentes para quantificação da ezetimiba associada à sinvastatina..

Previamente, realizou-se uma varredura dos fármacos no espectrofotômetro UV- VIS, para determinar o melhor comprimento de ondas para o método analítico.

Após testes analíticos foi realizada uma varredura nos comprimentos de onda 232 nm, 238 nm e 240 nm. Observou-se que a ezetimiba e sinvastatina apresentam maior absorvidade no comprimento de onda 238 nm, quando comparado aos comprimentos de onda 232 nm e 240 nm. Portanto, o comprimento de ondas

escolhido foi 238 nm, que favorece a quantificação adequada para ambos os fármacos em estudo.

Após definição do comprimento de onda de análise, iniciaram-se alguns testes com coluna C18 e outra coluna de Cianopropil com sistema de eluição isocrático.

Observou-se uma maior retenção da molécula de sinvastatina ($k = 14$) e uma menor retenção da molécula de ezetimiba ($k = 2,7$). Segundo Snyder *et al*, o fator de retenção (k) dos analitos devem estar na faixa de 1 a 10, pois $k \leq 1$ pode levar a eluição próximo volume morto e ocorrer co eluição com excipientes e $k \geq 10$ poder acarretar em análise longas e bandas com menor intensidade.

Neste sentido, inúmeras combinações foram realizadas acetonitrila: tampão fosfato, tampão acetato e acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico. Contudo, não foram observadas diferenças com adição de tampões na fase móvel, ou acidificação da solução aquosa.

FIGURA 17 – Cromatograma de ezetimiba e sinvastatina utilizado um coluna C18

Testou-se posteriormente uma coluna de cianopropil, a qual apresenta diferente hidrofobicidade (polaridade) e seletividade quando comparadas as colunas C8 e C18, com ACN e água purificada como solventes em diversas proporções. Variou-se a composição da fase móvel de 90:10 (v/v) ACN: água purificada até 50: 50 (v/v) de ACN: água purificada, com objetivo de avaliar o impacto da ACN na separação dos analitos e parâmetros cromatográficos como resolução, fator de alargamento e número de pratos. Alteração nas proporções de ACN exerceu grande influência no tempo de retenção (k) dos dois analitos. Quando eluiu-se os fármacos em ACN: água purificada acima da proporção 90: 10 v/v não observou-se a separação adequada dos analitos ($k \leq 1$). Com o propósito de

promover a separação, diminui-se a força cromatográfica da fase pela adição de solvente aquoso. A proporção de ACN: água purificada 52: 48 v/v foi a que se mostrou mais adequada, proporcionando um tempo de retenção reproduzível de aproximadamente 3,9 minutos e 4,7 minutos para ezetimiba e sinvastatina respectivamente, obtendo-se boa eficiência (pratos acima de 2000) e picos simétricos (α 1,5) e resolução satisfatória (α 2).

FIGURA 18 - Cromatograma obtido com ACN: água purificada 90:10 v/v (**A**); ACN: água purificada 80:20 v/v (**B**); ACN: água purificada 70:20 v/v (**C**); ACN: água purificada 70:20 v/v (**D**); ACN: água purificada 52:48 v/v (**E**), vazão 0,8 mL / min, 35°C, detecção UV em 238 nm: Coluna: NSTCN (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 µm).

TABELA 8 – Resultados de adequabilidade do sistema

Parâmetros	Ezetimiba ± DPR	Sinvastatina ± DPR
Tempo de retenção (minutos)	4,1 ± 1,9	5,0 ± 1,9
Área dos picos (mAU)	104622 ± 1,8	224588 ± 0,6
Nº de pratos	8862 ± 2,7	10277 ± 3,8
Resolução	4,3 ± 1,5	N/A
Assimetria	1,3 ± 5,2	1,2 ± 3,5

Desta forma o método analítico desenvolvido teve as seguintes condições cromatográficas:

Fase Móvel (Isocrático)	Acetonitrila: Água purificada (52: 48 v/v)
Vazão	0,8 mL/minuto
Coluna	NST - CN (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 µm)
Volume de Injeção	20 µL
Temperatura da coluna	35 °C
Comprimento de onda	238 nm
Detector	PDA
Tempo de retenção	Ezetimiba 4,1 minutos
	Sinvastatina 5,1 minutos
Tempo de corrida	10 minutos

PREPARO DA FASE MÓVEL

Solução A: Acetonitrila grau HPLC

Solução B: Água ultrapurificada

PREPARO DA SOLUÇÃO DILUENTE

Transferiu-se com auxílio de proveta 650 mL de acetonitrila grau HPLC e 350 mL de água purificada para balão volumétrico de 1000 mL.

PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE EZETIMIBA

Foram pesados aproximadamente 20,0 mg $\pm$ 2 mg do padrão de ezetimiba para balão volumétricos âmbar de 20 mL. Diluiu-se os padrões com 15 mL de acetonitrila grau HPLC, submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de ezetimiba = 1,0 mg mL⁻¹) (**Solução A**).

PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE SINVASTATINA

Foram pesados aproximadamente 20,0 mg $\pm$ 2 mg do padrão de sinvastatina para balão volumétricos âmbar de 20 mL. Diluiu-se o padrão com 15 mL de acetonitrila grau HPLC, levou-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de sinvastatina = 1,0 mg mL⁻¹) (**Solução B**).

PREPARO DA SOLUÇÃO DE TRABALHO DE EZETIMIBA E SINVASTATINA

Transferiu-se com auxílio de micropipeta 100 µL, da solução A e 200 µL da solução B para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com solução diluente. Transferiu esta solução diretamente para *vial* âmbar. (Concentração de final ezetimiba = 10,0 µg mL⁻¹; sinvastatina = 20,0 µg mL⁻¹).

PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA (10/20 mg EZETIMIBA / SINVASTATINA)

Um massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão volumétrico âmbar de 50 mL. Imediatamente adicionou-se aproximadamente 35 mL de acetonitrila e submeteu a banho de ultrassom por 15 minutos com agitações ocasionais. Transferiu-se volumetricamente 5 mL da solução anterior para balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se com solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de 0,45µm e 33mm de diâmetro para *vial* âmbar descartando-se os primeiros 2 mL (Concentração de final ezetimiba = 10,0 µg mL⁻¹; sinvastatina = 20,0 µg mL⁻¹).

CÁLCULOS

a) Ezetimiba

$$\frac{AA}{AP} \times \frac{MP}{20} \times \frac{0,1}{10} \times PP \times \frac{50}{MA} \times \frac{100}{5} \times \frac{PM}{10} = mg/cpr \text{ Ezetimiba}$$

Onde:

AA = Área da amostra

AP = Área do padrão de ezetimiba

MP = Massa do padrão de ezetimiba

PP = Pureza do padrão de ezetimiba

MA = Massa da amostra (mg)

PM = Peso médio

10 = Concentração teórica de ezetimiba

b) Sinvastatina

$$\frac{AA}{AP} \times \frac{MP}{20} \times \frac{0,2}{10} \times PP \frac{50}{MA} \times \frac{100}{5} \times \frac{PM}{20} = mg/cpr \text{ Sinvastatina}$$

Onde:

AA = Área da amostra

AP = Área do padrão de sinvastatina

MP = Massa do padrão de sinvastatina

PP = Pureza do padrão de sinvastatina

MA = Massa da amostra (mg)

PM = Peso médio

20 = Concentração teórica de sinvastatina

5.2.2 CE

Eletroforese capilar de zona (CZE) é o modo mais simples de separação em eletroforese capilar e o mais utilizado. Inicialmente, este modo de separação foi utilizado, porém os resultados obtidos foram insatisfatórios. Estes resultados podem ser explicados pelas características físico-química das moléculas de EZE e SIM. Ambas não apresentam grupos ionizáveis e são insolúveis em água.

Sendo a EZE e SIM substâncias insolúveis em água, para o desenvolvimento do método analítico, foi conduzido um estudo para avaliar o solvente mais adequado para dissolver os analitos, e que fosse compatível com EC, uma vez que a técnica de escolha para moléculas com estas características é MEKC.

Testes foram realizados com base em alguns trabalhos da literatura que envolvem a separação de substâncias neutras (YARDIMCI e OZALTIN, 2010; DAMIC e NIGOVIC, 2010; SRINIVASU *et. al.*, 2002). Foram testados os seguintes sistemas: 1) ACN; 2) MeOH; 3) ACN: Água purificada 50:50%; 4) ACN: tampão borato 20 mmol L⁻¹ e 5) MeOH: Água purificada 50:50%. Todos os sistemas dissolveram os analitos em estudos, todavia, o que apresentou melhores resultados na separação foi dissolvendo os analitos em MeOH e a solução de trabalho em MeOH: água purificada 25:75% v/v.

O padrão interno (PI) (losartana potássica) foi utilizado para aumentar a precisão do método desenvolvido. Os IS são comumente utilizados para minimizar flutuações no volume de injeção, erros de diluição e erros durante o tratamento da amostra. Um PI pode aumentar consideravelmente a precisão na determinação da área do pico, principalmente, se o erro na injeção é o fator dominante.

5.2.2.1 Composição do eletrólito de corrida

A composição do eletrólito de corrida foi desenvolvida de maneira a obter uma migração diferenciada para os dois analitos estudados. Inicialmente utilizou-se 20 mmol L⁻¹ SDS, 12% ACN e tampão borato em diferentes faixas de pH.

A ACN foi introduzida como um modificador orgânico de maneira a melhorar as características de migração e garantir a solubilização dos analitos no meio aquoso. Para os ensaios iniciais, baseado em procedimentos descritos na literatura para separação de espécies neutras em EC utilizou temperatura de 30 °C, diferença de potencial 25 kV e tempo de injeção de amostra 3 s. Os melhores resultados foram obtidos utilizando TBS 20 mmol L⁻¹, SDS 30 mmol L⁻¹ pH= 9,0 e 12% ACN apresentando completa separação entre os analitos (**Figura 19**).

FIGURA 19 - Eletroferograma da losartana potássica (PI) (100,0 µg mL⁻¹) (1); ezetimiba (100,0 µg mL⁻¹) (2) e sinvastatina (200,0 µg mL⁻¹) Eletrolito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238nm.

Na separação de substâncias neutras, o ajuste de pH exerce pouca influência sobre a seletividade, contudo deve-se selecionar um valor de pH para o sistema no qual as micelas do surfactante se encontrem ionizadas de tal forma que permita sua migração em uma taxa diferente da taxa do EOF. Optou-se por manter constante tanto a concentração quanto o valor de pH em 9,0 do tampão TBS, pelos resultados satisfatórios e resolução adequada para as substâncias (GOMES, 2012).

A presença de solventes orgânicos miscíveis em água como acetonitrila, provoca a redução do valor de k , e conseqüentemente, a seletividade da separação. Após alguns testes optou-se por manter em 12% concentração de ACN no eletrólito de corrida. Quando adicionados no eletrólito de corrida, alteram a polaridade da fase aquosa, causando o aumento na atração do analito para esta fase. Todavia, presentes em altas concentrações podem dividir a estrutura das micelas, sendo recomendado, que a concentração não exceda 30% (GOMES, 2012).

Avaliou-se a concentração do surfactante numa faixa de 20 a 50 mmol L⁻¹. Utilizando-se a concentração de 30 mmol L⁻¹ no eletrólito de corrida obteve-se a melhor resposta e resolução entre os picos com um tempo de análise de aproximadamente 10 minutos (**Figura 20**).

FIGURA 20 - Eletroferograma da losartana potássica(1) (200,0 µg mL⁻¹) (PI); ezetimiba (2) 200,0 µg mL⁻¹ e sinvastatina (3) (200,0 µg mL⁻¹). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm.

Em relação ao valor de diferença de potencial aplicado, foram avaliados 20 e 30 kV. Como a força do campo elétrico é diretamente proporcional à diferença de potencial aplicada, e a magnitude do EOF é diretamente proporcional à força do campo elétrico, o aumento do potencial aplicado, conseqüentemente resultaria à redução do tempo de migração. Todavia, o aumento do EOF pode levar a redução da resolução entre os picos devido à diminuição da janela de detecção (GOMES, 2012). Nos testes realizados, podemos observar que o aumento da voltagem provocou diminuição do tempo de migração dos compostos em estudo, porém sem impactos significativos na resolução dos picos. Portanto o potencial de 30 kV foi selecionado para os testes.

Outro parâmetro instrumental avaliado foi o tempo de injeção. O volume injetado depende essencialmente do tempo de injeção. De forma, realizaram-se ensaios com tempos de 1s, 3s e 5s de injeção hidrodinâmica. Foi observado que acima de 3s ocorreu um alargamento da linha de base, provocando distorção e deformação dos mesmos. No tempo de 1s, não foi possível avaliar adequadamente.

FIGURA 21- Eletroferograma da losartana potássica(1) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 μm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 1s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 $^{\circ}\text{C}$, e detecção 238 nm.

TABELA 9- Resultados de adequabilidade do sistema - CE

Parâmetros	Ezetimiba ± DPR	Sinvastatina ± DPR
Tempo de migração (minutos)	5,72 ± 1,9	6,24 ± 1,9
Área dos picos (AU)	14556 ± 4,8	33996 ± 4,1
Nº de pratos	12507 ± 13,4	101066 ± 10,5
Resolução	7,0	N/A
Assimetria	1,1 ± 5,2	1,2 ± 3,3

Desta forma o método analítico desenvolvido teve as seguintes condições eletroforéticas:

TABELA 10 – Resumo das condições de trabalho para CE

Parâmetro	Descrição
Tampão TBS	20 mmol L ⁻¹
SDS	30 mmol L ⁻¹
Modificador orgânico	ACN 12%
pH	9,0
Pontencial	30 kV
Temperatura	30 °C
Pressão de injeção	50 mbar
Tempo de injeção	3s
Tamanho do capilar	30 cm comprimento total

Para obter-se uma maior robustez do sistema, manutenção e repetibilidade das respostas analíticas e o maior número de corridas com o mesmo capilar, condicionou-se o capilar com NaOH 1,0 mol L⁻¹ por 15 minutos, água purificada por 10 minutos e o eletrólito de por 15 minutos. Entre as corridas o capilar foi lavado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ por 1,0 minuto, água purificada por 1,5 minutos e o eletrólito de corrida por 1,5 minutos. O processo condicionamento inicial foi repetido a cada 6 corridas para evitar a deposição de TBS e SDS na parede do capilar, evitando o entupimento durante as análises e o aparecimento de picos interferentes.

PREPARO DO ELETROLITO DE CORRIDA

Transferiu-se volumetricamente 9,0 mL de SDS 100 mmol L⁻¹, 6 mL TBS 100 mmol L⁻¹ para um béquer de 25 mL e ajustou-se o pH da solução com solução de ácido fosfórico 10% para pH = 9,0. Transferiu-se a solução anterior para tubo de centrifuga graduado de 50 mL e adicionou-se 11,4 mL de água purificada e 3,6 mL de acetonitrila. Homogeneizou-se. Filtrou-se a solução Filtrou-se com membrana de PVDF 45 µm de poro de 33 mm de diâmetro.

SOLUÇÃO DILUENTE

Transferiu-se com auxílio de proveta 25 mL de metanol grau HPLC e 75 mL de água purificada para balão volumétrico de 100 mL.

PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE EZETIMIBA

Foram pesados aproximadamente 10,0 mg ± 1 mg do padrão de ezetimiba para balão volumétricos âmbar de 10 mL. Diluiu-se os padrões com 5 mL de metanol grau HPLC, submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de ezetimiba = 1,0 mg mL⁻¹) (**Solução A**).

PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE SINVASTATINA

Foram pesados aproximadamente 10,0 mg ± 1 mg do padrão de sinvastatina para balão volumétricos âmbar de 10 mL. Diluiu-se o padrão com 5 mL de metanol grau HPLC, levou-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de sinvastatina = 1,0 mg mL⁻¹) (**Solução B**)

PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE PADRÃO INTERNO (LOSARTANA POTÁSSICA)

Foram pesados aproximadamente $10,0 \text{ mg} \pm 1 \text{ mg}$ do padrão de losartana potássica para balão volumétricos âmbar de 10 mL. Diluiu-se o padrão com 5 mL de metanol grau HPLC, levou-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se atingir temperatura ambiente e completou-se o volume com o mesmo solvente (Concentração de sinvastatina = $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (**Solução C**).

PREPARO DA SOLUÇÃO DE TRABALHO DE EZETIMIBA E SINVASTATINA

Transferiu-se com auxílio de micropipeta 1,0 mL, da **solução A**, 2,0 mL da **solução B** e 1,0 mL da **solução C** para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com solução diluente. Transferiu esta solução diretamente para microvial. (Concentração de final ezetimiba = $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$; sinvastatina = $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$; losartana potássica = $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$).

PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA (10/20 mg EZETIMIBA / SINVASTATINA) - CE

Determinou-se o peso médio de 20 comprimidos, em seguida, foram triturados. Uma massa equivalente a 10,0 mg de ezetimiba e 20,0 mg de sinvastatina foi pesada e transferida para balão âmbar de 50 mL. Imediatamente adicionou-se aproximadamente 15 mL de metanol e submeteu a banho de ultrassom por 15 minutos com agitações ocasionais. Completou-se o volume com o mesmo solvente. Transferiu-se volumetricamente 2 mL da solução anterior para um tubo de centrífuga graduado de 15 mL e adicionou-se 0,4 mL da solução estoque de PI e 1,6 mL de solução diluente. Filtrou-se em membrana de PVDF de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e 33 mm de diâmetro para *microvial*. (Concentração de final ezetimiba = $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$; sinvastatina = $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$; losartana potássica $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$).

5.3 Validação do Método Analítico por HPLC

5.3.1 Especificidade

Este teste reflete a habilidade de um método analítico em determinar inequivocamente o composto em uma amostra, considerando a possibilidade da presença de outros compostos que possam interferir em sua determinação (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Avaliou-se a especificidade do método desenvolvido realizando adição de substâncias estressantes às amostras de comprimidos de EZE associado SIM para conhecer o comportamento químico dos dois compostos sob diferentes condições.

As amostras foram submetidas a condições estresse por hidrólise ácida, alcalina oxidativa, térmica (60°C) e fotolítica por um período de 168 horas (7dias) em seguida avaliado através do método proposto.

Os cromatogramas obtidos estão apresentados nas **Figuras 22 a 29**:

FIGURA 22- Cromatograma da solução diluente (acetonitrila: água purificada 65:35 v/v) (Fase móvel :Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão 0,8 mL/min, 35°C, detecção UV em 238nm). Coluna: *RP* NST CN (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 µm).

FIGURA 23 - Cromatograma da solução placebo (acetonitrila: água purificada 65:35 v/v) (Fase móvel :Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão 0,8 mL / min, 35 °C, detecção UV em 238 nm). Coluna: NST CN (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 μ m).

FIGURA 24 - Cromatograma da solução padrão de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão 0,8 mL / min, 35 °C, detecção UV em 238 nm): Coluna: NSTCN (150 mm x 4,6 mm interno x 3,5 μ m).

FIGURA 25 - Cromatograma obtido após da hidrólise ácida da amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** HCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ /168 horas. Fase móvel (Isocrático): ACN: Água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL/ min}$, 35°C , detecção UV em 238nm) Coluna: NST CN (150 mm x 4,6 mm interno x $3,5 \mu\text{m}$).

FIGURA 26 - Cromatograma obtido após da hidrólise alcalina da amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** NaOH $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ / 5 minutos horas. Fase móvel (Isocrático): ACN: Água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL min}$, 35°C , detecção UV em 238 nm) Coluna: NST CN (150 mm x 4,6 mm interno x $3,5 \mu\text{m}$).

Figura 27 - Cromatograma obtido após da hidrólise oxidativa da amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** H_2O_2 3% / 168 horas. Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL/ min}$, 35°C , detecção UV em 238 nm) Coluna: *NSTCN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm interno} \times 3,5 \mu\text{m}$).

FIGURA 28 - Cromatograma obtido após aquecimento ($60^\circ\text{C}/168 \text{ horas}$) de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48v/v), vazão $0,8 \text{ mL/ min}$, 30°C , detecção UV em 238nm) Coluna: *NSTCN* ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm interno} \times 3,5 \mu\text{m}$).

Figura 29 - Cromatograma obtidos após exposição à luz UV (fotólise) de amostra de ezetimiba ($10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina ($20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). **Condição:** Exposição em balão transparente a luz direta/168 horas. (Fase móvel (Isocrático): ACN: água purificada (52:48 v/v), vazão $0,8 \text{ mL/min}$, 35°C , detecção UV em 238 nm) Coluna: NSTCN ($150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ interno $\times 3,5 \mu\text{m}$).

TABELA 11 - % Degradação dos ativos do analito nas condições de estresse

Condição/Duração/Estado	% Degradação	
	EZE	SIN
HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /168 h/solução/temperatura ambiente	3,08	18,09
NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ /5min h/solução/temperatura ambiente	18,50	85,84
Oxidativo 30% H_2O_2 /168 h/solução/temperatura ambiente	7,53	80,69
Térmico/ 60°C / 168 h/ sólido	5,47	3,43
Luz branca/ 168h/sólido	2,60	2,51

Observou-se que a EZE e SIM são mais sensível à hidrólise básica com formação possíveis produtos de degradação nos $t_R = 3,8$ minutos e $4,7$ minutos apresentado degradação de aproximadamente 18% e 85% para EZE e SIM respectivamente (**Figura 26**). Já a amostra submetida ao aquecimento ocorreu aparecimento de picos de degradação no $t_R = 3,1$ minutos, $3,5$ minutos, $4,7$ minutos e $6,7$ minutos com degradação de aproximadamente 5% e 3% para EZE e SIM respectivamente (**Figura 28**). Comparando as condições de degradação, oxidação, fotolítica (**Figuras**

27, 29, respectivamente), foi observada na amostras submetidas à oxidação, o surgimento do pico correspondente ao peróxido de hidrogênio $t_R = 2,1$ minutos e degradação de 7,5% e 81% para EZE e SIM respectivamente .

A resolução entre os picos dos possíveis degradantes e os picos de principais foi satisfatória ($R_s \geq 1,5$).

5.3.2 Linearidade e intervalo

A faixa de concentração da variou de $8,26 - 12,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15,76 - 23,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. Estes dados foram plotados para obter a equação da reta: $y = 56,5588x - 11,4334$, com coeficiente de correlação (r) = 0,9992 e $y = 79,5505x - 4,3958$ com coeficiente de correlação (r) = 0,9997 para ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. A linearidade foi obtida através da análise de regressão linear a qual foi calculada através dos quadrados mínimos.

A análise de variância (ANOVA) indicou que o ajuste do modelo linear é adequado para as duas curvas analíticas construída, pois os valores de p encontrados foram inferiores aos valores de F crítico, indicando que as variâncias em y são independentes dos níveis de concentração em X . Além disso, os valores de F observado na análise de validade de regressão forma considerados maiores que F crítico, indicando a existência de relação linear entre as variáveis X e Y .

A linearidade do método proposto apresentou coeficiente de correlação (r) $\geq 0,99$ e o DPR das leituras em triplicata $\leq 2,0\%$ tanto para ezetimiba quanto para sinvastatina. O ajuste adequado ao modelo linear foi verificado pela distribuição aleatória dos resíduos.

Portanto, para as substâncias avaliadas o método proposto é linear na faixa estudada.

TABELA 12 – Área obtida para ensaio de linearidade - ezetimiba

Concentração		Área média (MaU)± DP	DPR
Concentração (%)	Concentração Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
80	8,26	455,41142± 1,16	0,25%
90	9,30	513,47672± 0,12	0,02%
100	10,33	576,72819± 0,71	0,12%
110	11,36	628,01110± 0,36	0,06%
120	12,40	690,26718±0,65	0,09%

Mau – unidade de absorbância

FIGURA 30 – Curva analítica – ezetimiba (Faixa avaliada 8,26 – 12,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

TABELA 13 – Análise de variância entre área e concentração de ezetimiba

Fonte de variação	SQ	GI	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	102402,82	1	102402,82	15357,82	0,03	2,48
Dentro dos grupos	86,68	13	6,67			
Totais	102489,50	14				

SQ- soma dos quadrados; **gi** – grau de liberdade; **QM** – quadrado médio; **F**- teste de variâncias; **F obs**- F observado; **F crítico** – F para nível de 5% de probabilidade; **p**: probabilidade para hipótese de nulidade.

FIGURA 31 – Análise de resíduos para ezetimiba

TABELA 14- Área obtida para ensaio de linearidade - sinvastatina

Concentração		Área média (MaU)± DP	DPR
Concentração (%)	Concentração Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
80	15,76	1251,13660 ± 1,37	0,11%
90	17,73	1405,25357 ± 0,75	0,05%
100	19,70	1557,93260 ± 1,97	0,13%
110	21,67	1724,92743 ± 0,09	0,01%
120	23,64	1874,90420 ± 1,55	0,08%

FIGURA 32 – Curva analítica para sinvastatina (Faixa avaliada 15,76 – 23,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

TABELA 15 – Análise de variância entre área e concentração de sinvastatina

Fonte de variação	SQ	GI	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	736843,28	1	736843,28	49614,20	0,55	2,48
Dentro dos grupos	193,07	13	14,85			
Totais	737036,34	14				

SQ- soma dos quadrados; **gi** – grau de liberdade; **QM** – quadrado médio; **F**- teste de variâncias; **F obs**- F observado; **F crítico** – F para nível de 5% de probabilidade; **p**: probabilidade para hipótese de nulidade.

FIGURA 33 – Análise de resíduo para sinvastatina.

5.3.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação foi estimado através de uma curva analítica construída próximo ao limite de quantificação do método proposto. Tanto LD quanto o LQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído (s/n). O LD foi baseado na relação de pelo menos três vezes a altura do ruído na linha de base e o LQ no mínimo dez vezes. Os resultados encontrados estão representados no **Quadro 8**.

QUADRO 8 – Resultados relativo ao LOQ e LOD de ezetimiba e sinvastatina

Analito	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$)		Relação (s/n)	
	EZE	SIM	EZE	SIM
Limite de quantificação (LOQ)	0,100	0,110	12,0	9,4
			11,5	10,4
			11,6	9,4
Limite de detecção (LOD)	0,05	0,06	3,6	3,6
			3,5	3,9
			3,4	3,7

5.3.4 Exatidão

O ensaio de exatidão foi avaliado pelo método de recuperação dos fármacos, dado em porcentagem de recuperação. Foi preparada uma solução estoque de ezetimiba e sinvastatina na concentração de 1 mg mL^{-1} a qual foi utilizada para fortificar os placebos. A exatidão foi avaliada através de 9 determinações em três níveis de concentração, sendo 80%, 100% e 120% da concentração nominal, cobrindo assim a faixa de trabalho.

TABELA 16 – Resultados relativo ao ensaio de exatidão de ezetimiba e sinvastatina

Analito	Nível de concentração	Resultados		
		Recuperação (%) $\pm$ DP	Intervalo de confiança* (%)	Média da Recuperação (%) $\pm$ DP
Ezetimiba	80	99,3 $\pm$ 0,2	98,8 – 99,9	99,3 $\pm$ 0,2
	100	100,8 $\pm$ 0,6	99,3 – 102,4	100,8 $\pm$ 0,6
	120	100,1 $\pm$ 0,9	98,1 – 102,1	100,1 $\pm$ 0,9
Sinvastatina	80	98,7 $\pm$ 0,8	96,8 – 100,7	98,7 $\pm$ 0,8
	100	100,3 $\pm$ 0,8	98,5 – 102,2	100,4 $\pm$ 0,8
	120	100,1 $\pm$ 0,3	99,3 – 100,8	100,1 $\pm$ 0,3

*Nível de confiança: 95%

Os valores de recuperação obtidos para ezetimiba variam 99,3% a 100,1% da concentração nominal. Já para sinvastatina os valores estiveram na faixa de 98,7% a 100, 1%. Os resultados forma satisfatórios para ambos os fármacos e atendem os critérios de aceitação de $100 \pm 5\%$, portanto o método por ser considerado exato.

5.3.5 Precisão

O ensaio de repetibilidade foi realizado a partir de 6 determinações das solução amostras do produto Vytorin 10 mg / 20 mg, preparadas de acordo com o item PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA.

A repetibilidade foi calculada pelo desvio padrão relativo (DPR%) entre as 6 determinações na concentração do nominal do método proposto. De acordo com a RE 899 da ANVISA, não se admitem valores superiores a 5%. Para ambos os analitos foram observadas variações (DPR) menores que 2% dentre as replicas avaliadas o que indica que o método analítico é repetitivo (**Tabela 16**).

TABELA 16 - Resultados relativo ao ensaio de repetibilidade

Analito	Concentração Teórica (mg/cp)	Concentração Real (mg/cp)*	Recuperação (%)	Média ± S	DPR (%)
Ezetimiba	10	9,7	97,7	9,8 ± 0,1	0,9
		9,7	98,9		
		9,7	98,4		
		9,8	98,5		
		9,7	97,9		
		9,9	99,8		
Sinvastatina	20	19,5	97,0	19,7 ± 0,1	0,8
		19,8	97,4		
		19,7	97,1		
		19,7	98,1		
		19,6	97,1		
		20,0	99,1		

*mg/cp = miligramas/comprimidos

5.3.6 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada na mesma concentração do ensaio de repetibilidade, porém com as analistas e dias diferentes. O DPR entre replicatas foi calculados e os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 18**.

Utilizou-se teste *F* e teste *t* para verificar se existe diferença significativa entre as variâncias da análises obtidas em dias diferentes.

A partir dos valores de *F* encontrados pode-se afirmar que não existe diferença significativa entre as variâncias dos dois analistas, já que os $F_{calc} \leq F_{tab}$. As médias dos resultados também foram comparados através do testes *t* ($p \geq 0,05$), indicam não existir diferença significativa entre as médias os obtidas em diferentes dias

TABELA 18 – Resultados relativo ao ensaio de precisão intermediária

Analito	Concentração Teórica (mg/cp)	Concentração encontrada (mg/cp)		Média $\pm$ S n=12	Valor de F	Valor de *p
		Analista 1	Analista 2			
Ezetimiba	10	9,7	9,7	9,8 $\pm$ 0,1	1,44	0,70
		9,7	9,7			
		9,7	9,8			
		9,8	9,8			
		9,7	9,8			
		9,9	9,8			
Sinvastatina	20	19,5	19,8	19,7 $\pm$ 0,1	0,79	0,08
		19,8	19,8			
		19,7	20,0			
		19,7	19,9			
		19,6	20,0			
		20,0	19,8			

* Nível de confiança de 95% para teste *t* de Student; F crítico = 5,05; **mg/ cp = miligramas / comprimidos**

5.3.7 Robustez

Durante a realização do ensaio de robustez, soluções de trabalho contendo cerca de exatamente 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ezetimiba e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas em e injetadas em triplicata e analisadas na condição nominal (otimizada) e variadas do método. Os resultados obtidos das médias das áreas nas diferentes condições foram comparados com aqueles obtidos na condição otimizada através do *test t* de Student. Os resultados obtidos estão descritos nas **Tabelas 19 e 20**.

O teste de robustez indicou que modificações na vazão da fase móvel podem interferir na exatidão e na quantificação dos resultados de ezetimiba e sinvastatina ($p \leq 0,05$).

Alterações na proporção de fase móvel, por sua vez, não foram capazes de comprometer os a exatidão dos resultados da sinvastatina ($p \leq 0,05$), todavia, a diminuição na proporção de solvente orgânico da fase móvel pode ser crítico para a ezetimiba.

Por fim, modificações deliberadas no comprimento de onda não demonstram impacto significativo nos valores de exatidão para sinvastatina em 235 nm ($p \geq 0,05$) diferentemente para ezetimiba a qual demonstra ser mais suscetível a essa alteração ($p \leq 0,05$).

TABELA 19 - Resultados do ensaio de robustez para ezetimiba

Parâmetros modificados	Condições	As	Rs	N	Área	Teste <i>t</i> student
					(média $\pm$ DP)	(valor de p)
Vazão da Fase móvel (mL/minuto)	0,7	1,4	5	10100	12,91027 $\pm$ 0,05	0,00
	0,8	1,4	5	9700	11,18347 $\pm$ 0,05	1,00
	0,9	1,3	5	10400	9,95917 $\pm$ 0,08	0,00
Proporção de solução orgânica FM (%)	50	1,3	6	9500	11,31763 $\pm$ 0,04	0,03
	52	1,4	5	9700	11,18347 $\pm$ 0,05	1,00
	54	1,4	5	10500	11,2780 $\pm$ 0,03	0,07
Comprimento de onda	235	1,3	5	9091	11,48917 $\pm$ 0,07	0,01
	238	1,4	5	9700	11,18347 $\pm$ 0,05	1,00
	240	1,3	5	9100	10,87463 $\pm$ 0,06	0,01

TABELA 20 - Resultados do ensaio de robustez para sinvastatina

Parâmetros modificados	Condições	As	Rs	N	Área (média ± DP)	Teste t (valor de p)
Vazão da Fase móvel (mL/minuto)	0,7	1,4	N/A	12800	26,303 ± 0,12	0,00
	0,8	1,3		12500	22,873 ± 0,14	1,00
	0,9	1,3		12100	20,587 ± 0,12	0,00
Proporção de solução orgânica na FM(%)	50	1,3	N/A	12020	22,667 ± 0,18	0,22
	52	1,3		12500	22,873 ± 0,14	1,00
	54	1,4		12700	23,229 ± 0,07	0,06
Comprimento de onda (nm)	235	1,3	N/A	12150	21,9875 ± 0,15	0,28
	238	1,3		12500	22,873 ± 0,14	1,00
	240	1,3		12350	23,024 ± 0,07	0,01

Todas as modificações realizadas foram críticas para um ou para outro analito e, portanto para que resultados confiáveis possam ser obtidos, a análise deve ser realizada exatamente conforme descrita no método proposto. É importante ressaltar que os resultados obtidos para este teste não condenam o método, mas indicam os cuidados que o operador deve observar durante a sua aplicabilidade na rotina.

5.4 Validação de Método Analítico por CE

5.4.1 Especificidade - CE

Este teste reflete a habilidade de um método analítico em determinar inequivocamente o composto em uma amostra, considerando a possibilidade da presença de outros compostos que possam interferir em sua determinação (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Avaliou-se a especificidade do método desenvolvido realizando adição de substâncias estressantes às amostras de comprimidos de EZE associado SIM para conhecer o comportamento químico dos dois compostos sob diferentes condições.

As amostras foram submetidas a condições estresse por hidrólise ácida, alcalina oxidativa, térmica (60°C) e fotolítica por um período de 168 horas (7 dias) em seguida avaliado através do método proposto.

Os eletroferogramas obtidos estão apresentados nas **Figuras 34 a 42**.

FIGURA 34 – Eletroferograma da solução placebo. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm.

FIGURA 35 – Eletroferograma do eletrólito de corrida. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L⁻¹ TBS + 30 mmol L⁻¹ SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: 50 µm de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30 °C, e detecção 238 nm.

FIGURA 36 - Eletroferograma da solução padrão de losartana potássica(1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30°C , e detecção 238 nm.

FIGURA 37- Eletroferograma da solução amostra losartana potássica(1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30°C , e detecção 238 nm.

FIGURA 38 - Eletroferograma da solução amostra obtida após exposição à luz (fotólise) de losartana potássica(1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$). Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: $50\mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30°C , e detecção 238 nm.

FIGURA 39 - Eletroferograma obtidos após hidrólise ácida da amostra de losartana potássica(1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$); Produto de degradação (PD). Condição: HCl $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ / 168 h horas. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: $50\mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30°C , e detecção 238 nm.

FIGURA 40 - Eletroferograma obtidos após hidrólise alcalina da amostra de losartana potássica(1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) Produtos de degração (PD). Condição: NaOH $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$ / 5 minutos . Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH=9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura $30 ^\circ\text{C}$, e detecção 238 nm

FIGURA 41 - Eletroferograma obtidos após hidrólise oxidativa da amostra losartana potássica (1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$); Produto de degradação (PD). Condição: H_2O_2 30% / 168 horas. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH = 9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20 mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura $30 ^\circ\text{C}$, e detecção 238 nm.

FIGURA 42 - Eletroferograma obtidos após aquecimento da amostra de losartana potássica (1) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (PI); ezetimiba (2) ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sinvastatina (3) ($200,0 \mu\text{g mL}^{-1}$); Produto de degradação (PD). Condição: 60°C / 168 horas. Eletrólito de corrida: tampão 20 mmol L^{-1} TBS + 30 mmol L^{-1} SDS + 12% de ACN, pH= 9,0, capilar: $50 \mu\text{m}$ de d.i, comprimento efetivo de 30 cm, injeção: 20mbar por 3s, voltagem: 30 kV, temperatura 30°C , e detecção 238 nm.

Observou-se que a EZE e SIM são sensíveis as hidrólise alcalina com formação de possíveis produtos de degração em $t_m = 3,7$ minutos e $4,4$ minutos com degradação quase total dos analitos (**Figura 40**). Sob aquecimento observou a formação de produto de degradação em $t_m = 5,0$ minutos, $5,7$ minutos, $6,1$ minutos e $6,2$ minutos (**Figura 42**)

Comparando as degradações fotolítica e oxidativa (**Figura 38 e 41**, respectivamente), pode-se dizer que há maior degradação dos analitos quando exposto ao peróxido de hidrogênio. Ocorre uma degradação sob hidrólise ácida, todavia, não podemos observar a formação da forma hidróxiácido, como observada no estudo de estresse com a HPLC.

A resolução entre os picos dos analitos e os possíveis degradantes foi superior a 1,5.

5.4.2 Linearidade e intervalo - CE

A avaliação dos dados do ensaio de linearidade por CE foi realizado da mesma forma que para o ensaio por HPLC.

A faixa de concentração da variou de 88,00 – 132,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 158,40 – 237,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. Estes dados foram plotados para obter a equação da reta: $y = 0,03377x - 1,08567$ com coeficiente de correlação $(r) = 0,9950$ e $y = 0,0421x - 1,7465$ com coeficiente de correlação $(r) = 0,9920$ para ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. A linearidade foi obtida através da análise de regressão linear a qual foi calculada através dos quadrados mínimos.

A análise de variância (ANOVA) indicou que o ajuste do modelo linear é adequado para as duas curvas analíticas construída, pois os valores de p encontrados foram inferiores aos valores de F crítico, indicando que as variâncias em y são independentes dos níveis de concentração em x. Além disso, os valores de F observado na análise de validade de regressão forma considerados maiores que F crítico, indicando a existência de relação linear entre as variáveis x e Y.

A linearidade do método proposto apresentou coeficiente de correlação $(r) \geq 0,99$ e o DPR das leituras em triplicata $\leq 5,0\%$ tanto para ezetimiba quanto para sinvastatina. O ajuste adequado ao modelo linear foi verificado pela distribuição aleatória dos resíduos.

Portanto, para as substâncias avaliadas o método proposto é linear na faixa estudada.

TABELA 21 – Área obtida para ensaio de linearidade CE - ezetimiba

Concentração		Área média (Au)± DP (PI/Analito)	DPR
Concentração (%)	Concentração Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
80	88,0	1,91360 ± 0,0429	2,24%
90	99,0	2,24530 ± 0,0209	0,93%
100	110,0	2,58153 ± 0,0123	0,48%
110	121,0	3,02305 ± 0,0062	0,20%
120	132,0	3,38210 ± 0,0484	1,43%

PI – Padrão interno

FIGURA 43 – Curva analítica CE – ezetimiba (Faixa avaliada 88,0 – 132,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

TABELA 22 – Análise de variância entre área e concentração de ezetimiba CE

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	4,1398	1	4,1398	2570,97	$1,81 \times 10^{-09}$	2,48
Dentro dos grupos	0,0209	13	0,0016			
Totais	4,1608	14				

SQ- soma dos quadrados; **gl** – grau de liberdade; **QM** – quadrado médio; **F**- teste de variâncias; **F obs**- F observado; **F crítico** – F para nível de 5% de probabilidade; **p**: probabilidade para hipótese de nulidade.

FIGURA 44 – Análise de resíduos para ezetimiba CE

TABELA 23 - Área obtida para ensaio de linearidade CE - sinvastatina

Concentração		Área média (Au)± DP (PI/Analito)	DPR
Concentração (%)	Concentração Média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
80	158,4	5,01110 ± 0,0152	0,30%
90	172,2	5,68400 ± 0,1060	1,86%
100	198,0	6,59150 ± 0,0629	0,95 %
110	217,8	7,29930 ± 0,0564	0,77%
120	237,6	8,37257 ± 0,0560	0,95%

FIGURA 45 – Curva analítica para sinvastatina – CE (Faixa avaliada 158,4 – 237,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

TABELA 24 – Análise de variância entre área e concentração de sinvastatina - CE

Fonte de variação	SQ	gl	QM	F obs	p	F crítico
Entre grupos	20,8578	1	20,8578	1606,24	$1,47 \times 10^{-06}$	2,48
Dentro dos grupos	0,1688	13	0,013			
Totais	21,0267	14				

SQ- soma dos quadrados; **gl** – grau de liberdade; **QM** – quadrado médio; **F**- teste de variâncias; **F obs**- F observado; **F crítico** – F para nível de 5% de probabilidade; **p**: probabilidade para hipótese de nulidade.

FIGURA 46 – Análise de resíduo para sinvastatina CE

5.4.3 Exatidão - CE

A exatidão foi avaliada através de 9 determinações em três níveis de concentração, sendo 80% (baixa), 100% (média) e 120%(alta) da concentração nominal, cobrindo assim a faixa de trabalho.

Os resultados obtidos para o teste de exatidão aplicando-se o método de CE podem ser observados na **Tabela 25**.

TABELA 25 - Resultado relativo ao ensaio de exatidão de ezetimiba e sinvastatina - CE

Analito	Nível de concentração	Resultados		
		Recuperação (%) $\pm$ DP	Intervalo de confiança* (%)	Média da Recuperação (%) $\pm$ DP
Ezetimiba	80	100,1 $\pm$ 1,6	96,3 – 104,0%	100,1 $\pm$ 1,6
	100	101,6 $\pm$ 0,3	101,0 – 102,3%	101,6 $\pm$ 0,3
	120	101,2 $\pm$ 1,2	98,2 – 104,2%	101,2 $\pm$ 1,2
sinvastatina	80	100,4 $\pm$ 1,6	96,6 – 104,3%	100,4 $\pm$ 1,6
	100	100,1 $\pm$ 1,5	96,3 – 103,9%	100,1 $\pm$ 1,5
	120	100,8 $\pm$ 1,1	98,1 – 103,5%	100,8 $\pm$ 1,1

*Nível de confiança: 95%

Os valores de recuperação obtidos para ezetimiba variaram de 100,1% a 101,6% da concentração nominal. Já para sinvastatina os valores estiveram na faixa de 100,4% a 100,8%. Os resultados forma satisfatórios para ambos os fármacos e atendem os critérios de aceitação de $100 \pm 5\%$, portanto o método por ser considerado exato.

5.4.4 Precisão - CE

O ensaio de repetibilidade foi realizado a partir de 6 determinações das solução amostras do produto Vytorin 10 mg / 20 mg, preparadas com o mesmo lote utilizado para o teste de precisão em HPLC, de acordo com o item **PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA CE**.

A repetibilidade foi calculada pelo desvio padrão relativo DPR entre as 6 determinações na concentração do nominal do método proposto. Para ambos os analitos foram observadas variações (DPR) menores que 2% dentre as replicas avaliadas o que indica que o método analítico é repetitivo (**Tabela 26**).

TABELA 26 - Resultados relativo ao ensaio de repetibilidade - CE

Analito	Concentração Teórica (mg/cp)	Concentração Real (mg/cp*)	Recuperação (%)	Média ± S	DPR (%)
Ezetimiba	10	9,9	98,8	9,9 ± 0,1	0,3
		10,1	100,7		
		10,0	99,5		
		9,8	98,3		
		9,9	99,2		
		10,0	99,9		
Sinvastatina	20	19,7	98,7	19,7 ± 0,1	0,9
		19,7	98,6		
		19,6	98,2		
		19,7	98,6		
		19,8	99,1		
		19,6	98,2		

*mg/cp = miligramas/comprimido

5.4.5 Precisão intermediária - CE

A precisão intermediária foi realizada na mesma concentração do ensaio de repetibilidade, porém em dias diferentes. Utilizou-se teste *F* e teste *t* para verificar se existe diferença significativa entre as variâncias da análises obtidas em dias diferentes dias.

TABELA 27 - Resultados relativos ao ensaio de precisão intermediária - CE

Analito	Concentração Teórica (mg/cp)	Concentração encontrada (mg/cp)		Média $\pm$ S n=12	Valor de F	Valor de *p
		Analista 1	Analista 2			
Ezetimiba	10	9,9	9,9	9,9 $\pm$ 0,2	0,42	0,11
		10,1	10,2			
		10,0	10,1			
		9,8	10,2			
		9,9	10,0			
		10,0	10,0			
Sinvastatina	20	19,7	20,0	19,7 $\pm$ 0,2	2,06	0,23
		19,7	19,8			
		19,6	19,6			
		19,7	19,7			
		19,8	19,7			
		19,6	19,8			

* Nível de confiança de 95% para teste *t* de Student; F crítico = 5,05; **mg/ cp = miligramas / comprimidos**

Não foram observadas diferenças significativas entre os resultados ($F_{\text{calc}} \leq F_{\text{crítico}}$), portanto o método pode ser considerado preciso.

5.4.6 Robustez - CE

Durante a realização do ensaio de robustez, soluções de trabalho contendo cerca de exatamente $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ezetimiba e $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas em e injetadas e analisadas na condição nominal (otimizada) e variadas do método. Foi avaliado os impactos das mudanças nos parâmetros eletroforéticos). Os resultados obtidos estão descritos nas **Tabelas 28 e 29**.

O teste de robustez evidenciou que modificações deliberadas no tempo de injeção podem interferir significativamente nos parâmetros eletroforéticos. Foi observado alargamentos dos picos de ambos analitos com a diminuição do tempo de injeção ($A_s \leq 2$). Todavia, o aumento no tempo de injeção não comprometeu os parâmetros eletroforéticos ($A_s \leq 2$).

Pequenas alterações na proporção de solvente orgânico no eletrólito de corrida podem causar impactos significativos na reprodutibilidade e exatidão da sinvastatina. O incremento de 2 % de modificador orgânico causou deformação do pico de sinvastatina, impossibilitando sua avaliação. No entanto, para o teste de robustez houve a necessidade de troca do capilar, o que explicaria as alterações nos

tempos de migração dos analitos, quando comparados aos demais teste de validação.

TABELA 28 - Resultados do ensaio de robustez para ezetimiba - CE

Parâmetros modificados	Condições	<i>T_m</i>	<i>A_s</i>	<i>R_s</i>	<i>N</i>
Tempo de injeção (segundos)	0,1	4,51	2,6		303936
	0,3	4,23	1,1		2222274
	0,5	4,34	0,9		129372
Proporção de modificador orgânico (Acetonitrila) no eletrólito (%)	10	4,5	1,2	N/A	176390
	12	4,23	1,1		2222274
	14	5,5	2,1		142235

TABELA 29 - Resultados do ensaio de robustez para sinvastatina - CE

Parâmetros modificados	Condições	<i>T_m</i>	<i>A_s</i>	<i>R_s</i>	<i>N</i>
Tempo de injeção (segundos)	0,1	5,28	2,6	8	215398
	0,3	5,04	1,7	7	105749
	0,5	5,01	1,3	7	54074
Proporção de modificador orgânico (Acetonitrila) no eletrólito (%)	10	5,8	1,2	13	56821
	12	5,04	1,7	7	105749
	14	7,89	-----	-----	-----

5.4.7 Comparação entre as técnicas de HPLC e CE para determinação quantitativa de ezetimiba associada à sinvastatina

Os resultados obtidos na determinação de ezetimiba associada a sinvastatina estão descritos na **Tabela 30**.

TABELA 30 – Comparação dos resultados entre as técnicas de HPLC e CE para determinação quantitativa de ezetimiba associada à sinvastatina

PARÂMETROS	Ezetimiba		Sinvastatina	
	HPLC	CE	HPLC	CE
Média (%) n=6	98,53	99,40	99,40	98,57
DPR (%)	0,76	0,84	0,49	0,34
Teste F ^a	1,25		2,11	
Teste t ^b	1,87		2,57	

^a Valor crítico de *F* 95% de significância $P = 95\% = 5,05$

^b Valor crítico de *t student* com 95% de significância $P = 95 = 2,571$

Pela comparação estatística utilizado os testes *F* (Fisher - *Snedecor*) ($F_{\text{encontrado}} \square F_{\text{crítico}}$) e *t Student's* ($t_{\text{encontrado}} \square t_{\text{crítico}}$) demonstrou que não há diferenças significativas entre os dois métodos propostos.

6. CONCLUSÕES

Considerando a revisão bibliográfica e os resultados experimentalmente obtidos conclui-se que:

- ✓ Os métodos desenvolvidos para determinação quantitativa da associação de ezetimiba e sinvastatina em formulações farmacêuticas são simples, rápidos, exatos e precisos;
- ✓ Os excipientes provenientes das amostras comerciais não interferem na quantificação dos analitos, o que demonstra a seletividade dos métodos;
- ✓ O método desenvolvido por CE apresenta vantagens quando comparados aos métodos descritos na literatura, uma vez que utiliza pequenas quantidades de solventes orgânicos e reagentes de baixo custo.
- ✓ Os métodos desenvolvidos demonstraram ser adequados para determinação de ezetimiba associada a sinvastatina em comprimidos. Além disso, demonstrou seletividade, linearidade, precisão, exatidão aceitáveis conforme legislação nacional e internacional; e possibilitaram a determinação simultânea dos dois fármacos com tempo de análise adequado ($\leq$ 10 minutos);
- ✓ Quando doseados os fármacos no comprimido disponível comercialmente, foram obtidos valores de teor dentro das especificações para associação dos fármacos ezetimiba e sinvastatina (98,0% e 98,5%, respectivamente).
- ✓ Estatisticamente não há diferenças significativas entre os dois métodos utilizados (HPLC e CE);
- ✓ Os métodos desenvolvidos podem ser implementados, com segurança na rotina do controle de qualidade da indústria farmacêutica, sendo a CE uma alternativa “verde” análise dos comprimidos de ezetimiba associada à sinvastatina.

7. REFERÊNCIAS

AACE. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS. Guideline for management of dyslipidemia and prevention of atherosclerosis. **Endocrine Practice**, v. 18, n. 1, 2012.

ABATE, N.; CATAPANO, A.; BALLANTYNE, C. M.; DAVIDSON, M. H. POLIS, A.; SMUGAR, S. S.; TERSHAKOVEC, A. M. Effect of ezetimibe/simvastatin versus atorvastatin or rosuvastatin on modifying lipid profiles in patients with diabetes, metabolic syndrome, or neither: Results of two subgroups analyses. **Journal of Clinical Lipidology**, v.2, nº2, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília. Diário Oficial da União, 2003.

ARAUJO, R.G.; FILHO, A.C.; CHAGAS, A.C. P. Ezetimibe pharmacokinetics and therapeutics. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, nº5, 2005.

ASHFAQ, M.; ULLAHKHAN, I.; QUTAB, S. S.; NAEEMRAZZAQ, S. HPLC determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical formulation. **Journal of Chilean Chemical Society**, v.52, n.3, p.1220-1223, 2007.

AVERNA, M.; ZANINELLI, A.; GRAZIE, L. C.; GENSINI, G.F. Ezetimibe/ simvastatin 10/20 mg versus simvastatin 40mg in coronary heart disease patients. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 4, n.4, 2010.

BARDINI, G.; GIORGA, C. B.; PONTIROLI, A. E.; GRAZIE, C. L.; ROTELLA, C. M. Ezetimibe + Simvastatin versus doubling the dose of simvastatin in high cardiovascular risk diabetics: a multicenter randomized Trial (the LEAD Study). **Cardiovascular Diabetology**, v.9, 2010. n.p.

BHATIA, M. S.; JADHAY, S. D.; BHATIA, N. M.; CHOUDHARI, P. B.; INGALE, K. B. Synthesis, characterization and quantification of simvastatin metabolites and impurities. **Scientia Pharmaceutica**, v.79, p.601 – 614, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Saúde Brasil 2010. Uma Análise da Situação de Saúde e de Evidências Seleccionadas de Impactos de Ações de Vigilância em Saúde, Brasília, Ministério da Saúde, p. 117-133, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cap_5_saude_brasil_2010.p
Acessado em: 10.Março.2013

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 02 jun 2003.

BERTOLAMI, M. C. **Efeitos pleiotrópicos com redução equivalente do LDL-colesterol: estudo comparativo entre sinvastatina e associação sinvastatina/ezetimiba.** São Paulo, 2007, 77p. Tese de Doutorado em Doutor em Ciências – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A.; GAITANI, C. M. Análise enantiosselitiva de fármacos: contribuição da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, nº 28, v. 28, p 683-691, 2005.

BRITISH PHARMACOPEIA. *Appendix V A.* Determination of Melting Point.

Disponível em: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2012/ixbin/bp> Acesso em: 29 abril 2014.

BRITISH PHARMACOPEIA. *Appendix II A.* Infrared Spectrophotometry Disponível em: <http://www.pharmacopoeia.co.uk/bp2012/ixbin/bp> Acesso em: 29 abril 2014.

BRUNZELL, J.D.; DAVIDSON, M.; FURBERG, C.D.; GOLDBERG, R.B.; HOWARD, B.V.; STEIN, J.H.; WITZTUM, J.L. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic Risk. **Journal of the American College of Cadiology**, v. 51, nº 14, 2008.

CAMPOS, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipidêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, nº 2, p. 425-430, 2007.

CHAPMAN, M. J.; REDFERN, J. S.; MCGOVERN, M. E.; GIRAL, P. Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: Pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk.

Pharmacology and Therapeutics, v. 126, p. 314-345, 2010.

CHAUDHARI, B. G; SHAH, B; PATEL, N. M. Stability-indicating reversed-phase liquid chromatographic method for simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe from their combination drug products. **Journal of AOAC International**, v. 90, nº 5, 2007.

COELHO, V. G.; CAETANO, L. F.; JUNIOR, R. L.; CORDEIRO, J. A.; SOUZA, D. R. S. Perfil lipídico e fatores de risco para doenças cardiovasculares em estudantes de medicina. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v; 85, nº 1, 2005

COLLINS, C. H.; BRAGA, G, L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Editora Unicamp, 2006, p. 273 – 302.

DAMIC, M; NIGOVIC, B. Fast analysis of statins in pharmaceuticals by MEKC. **Chromatographia**, nº 71, p. 233 -240, 2010.

DAVIS, H. R. Ezetimibe: first in a new class of cholesterol absorption inhibitors. In: **International Congress Series**, v. 1262, p. 243-246, 2004.

IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.88, 2007.

DIXIT, R. P.; BARHATE, C.R.; VISWANATHAN, C. L.; NAGARSENKER, M. S. Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Simvastatin and Ezetimibe from Tablet Dosage Form. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.72, n.2, p.204-210, 2010.

FERNADES, R. F.; CHRISTOFARO, D. G. D.; CASONATTO, J.; CODOGNO, J. S.; RODRIGUES, E.Q.; CARDOSO, M. L.; KAWAGUTI, S. S.; ZANESCO, A. Prevalence of dyslipidemia in individuals physically active during childhood, adolescence and adult age. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.97, nº 4, p. 317-323, 2011.

FERRO, S. A. **Validação de métodos cromatográficos para análise de medicamentos**. Cidade de Aviero, 2010. 133p. Dissertação de Mestrado em Química Analítica e Controle de Qualidade, Universidade de Avieiro.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinética das estatinas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, nº 5, 2005.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Efeitos indesejáveis dos hipolipemiantes: condutas na prática clínica. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.54, nº 4, p. 357 – 362, 2008.

FRIEDMAN, H. S.; RAJAGOPALAN, S.; BARNES, J. P.; ROSEMAN, H. Combination therapy with ezetimibe/simvastatin versus statin monotherapy for low-density lipoprotein cholesterol reduction and goal attainment in a real-world clinical setting. **Clinical Therapeutics**, v. 33, nº2, 2011.

GENEST, J. Combination of statin and ezetimibe for the treatment of dyslipidemias and the prevention of coronary artery disease. **Canadian Journal of Cardiology**, v.22, nº 10, 2006.

GENEST, J.; MCPHERSON, R.; FROHLICH, R.; ANDERSON, T.; CAMPBELL, N.; CARPENTIER, A.; COUTURE, P.; DUFOUR, R.; FODOR, G.; FRANCIS, G. A.; GROVER, S.; GUPTA, M.; HEGELE, R. A.; LAU, D. C.; LEITER, L.; LEWIS, G. F.; LONN, E.; MANCINI, J.; DOMINIC, N. G.; PEARSON, G. J.; SNIDERMAN, A.; STONE, J. A.; UR, E. Canadian cardiovascular society /Canadian guideline for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention cardiovascular disease in the adult – 2009 recommendations. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 25, nº 10, 2009.

GOMES, T. V. D. Desenvolvimento e **validação intralaboratorial do método por cromatografia eletrocinética capilar micelar para determinação de vitamina K1 e k3 em chá verde e em suplemento farmacêuticos**. Rio de Janeiro, 2012. 167p. Dissertação de Mestrado em Metrologia para Qualidade e Inovação – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

GOODMAN, L. P.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 3^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p.731 – 754.

GOODMAN, L. P.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007. p.837 – 868.

GULSUN, T.; GURSOY, R. N.; ONER, L.; Design and chatacterization of nanocrystal formulation containing ezetimibe. **Pharmaceutical Society of Japan**, v. 59, n^o 1, 2011.

HEFNAWY, M; AL-OMAR, M; JULKHUF, S. Rapid and sensitive determination of ezetimibe and simvastatin from their combination drug product by monolithic silica high-performance liquid chromatographic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n^o 50, p. 527-534, 2009.

HATZITOLIOS, A. I.; ATHYYROS, V. G.; KARAGIANNIS, A.; SAVOPOULOS, C.; CHARALAMBOUS, C.; KYRIAKIDIS, G.; MILIDIS, TH.; PAPATHANAKIS, C.; BITLI, A.; VOGIATIS, I.; NTAIOS, GKATSIKI, N.; SYMEONIDIS, A.; TZIOMALOS, K.; MIKHAILIDIS, D.P. Implementation of strategy for the management of overt dyslipidemia: The improve – dyslipidemia study. **International Journal of Cardiology**, n^o 134, p. 322-329, 2009.

International Conference on Harmonisation (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, (Q2) (R1), 1996.

KARANAN, S. R.; KATAKAN, P. CHANDU, B. R.; HWISA, N. T.; ADIKI, S. K. Simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in rat plasma by stable-isotope dilution LC-ESI-MS/MS and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n^o4, p. 286-294, 2014.

KUMAR, D. A.; SUJAN, D. P.; VIJAYASREE, V.; SESHAGIRI, J. V. L. N. Simultaneous determination of simvastatin and ezetimibe in tablets by hplc. **E-Journal of Chemistry**, v. 6 nº 2, p. 541-544, 2009.

LESTARI, M. L. A. D.; ARDIANA, F.; INDRAYANTO, G. Ezetimibe. **Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology**, v. 35, 2011.

MARKMAN, B. E. O.; ROSA, P. C. P.; KOSCHTSCHAK, M. R. W. Avaliação da qualidade de cápsulas de sinvastatina de farmácias magistrais. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, nº 6, 2010.

MARZZOCCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2ª ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1999. 360p.

MIURA, S.; SAKU, K. Beneficial effects of ezetimibe-based therapy in patients with dyslipidemia. **Journal of Cardiology**, nº 52, p. 1-6, 2008.

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

NELSON, D, L.; COX, M, M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. São Paulo. Editora Sarvier, 2006. p. 1106.

NOVÁKOVÁ, L.; SATINSKY, D.; SOLICH, P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, nº 4, 2008.

OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; GOMES, E. C. L.; MUSSEL, W. N.; SOARES, C. D. V.; PIANETTI, G. A. Análise térmica aplicada à caracterização da simvastatina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 33, nº 8, 2010.

OLIVEIRA, P. R. **Desenvolvimento e validação de metodologias para avaliação de ezetimiba por cromatografia líquida e espectrometria de massas**. Rio Grande do Sul, 2007. 82p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade de Federal de Santa Maria.

OZALTIN, N.; UÇAKTURK, E. Simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical formulation by dual-mode gradient. **Chromatographia**, nº 66, p. 87 – 91, 2007.

POLANCZYK, C. A. Cardiovascular risks factor in Brazil: The next 50 years!. **Artigos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, nº 3, 2005.

PRADO, M. S.A. **Determinação de fármacos em formulações farmacêuticas empregando a eletroforese capilar como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência**. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIN, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p. 68-76, 2001.

QUEIROZ, S. C. N.; JARDIN, I. C. S. F. Eletroforese capilar. **Chemkeys: Liberdade para aprender**, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, nº5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, A. C.; SOBRINO, B.; GENVIGIR, F. D. V.; WILLRICH, M. A. V.; ARAZI, S. S.; BERNIK, M. M. S.; BERTOLAMI, M.; FALUDI, A. A.; BRION, M. J.; CARRACEDO, A.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R. D. C. Genetic variants in genes related to lipid metabolism and atherosclerosis, dyslipidemia and atorvastatin response. **Clinica Chimica Acta**, v 417, p.8 - 11, 2013.

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

SHANKAR, P. K.; BHAT, R.; PRABHU, M.; REDDY, B. P. S.; REDDY, M. S.; REDDY, M. Efficacy and tolerability of fixed-dose combination of simvastatin plus ezetimibe in patients with primary hypercholesterolemia: Result of multicentric trial from India. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 1, p. 264 – 270, 2007.

SILVA, T. D. **Desenvolvimento de métodos analíticos e de formulações para estatinas**. São Paulo, 2009.144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais.

SILVA, J. A. F; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para técnicas analíticas de eletromigração em capilares. *Química Nova*, nº 3, v. 30, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Fundamentos de Química Analítica**, tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo: Editora Thomson, 2007, p. 925 – 945.

SLIN, H; THOMPSON, P. D. Ezetimibe-related myopathy: a systematic review. **Journal of Clinical Lipodology**, nº 2, p. 328-334, 2008.

SMITH, D. G. G.; ARONSON, J. K. **Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.306 – 311.

SOARES, A. Q. **Desenvolvimento e Validação de metodologia por HPLC-PDA para monitoração terapêutica dos níveis plasmáticos de zidovudina e efavirenz.** 95p. Goiânia, 2009, Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás.

SRINIVASU, M. K.; RAJU, N.; REDDY, G. O. Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 29, p 715-721, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography.** 3^a ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. p. 254-297.

SWARTZ, M. E; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology.** São Paulo. P. 12 – 20, jun,1998.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, nº 2, 1995.

TAVARES, M. F. M. Mecanismo de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, nº5, 1997.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC- FR) baseadas em superfícies de óxido inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, nº4, p. 616-623, 2002.

UNITED States Pharmacopeia. 34th. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention. General Chapter <1225>: Validation of Compendial Procedures MD, 2012. p.773 - 777.

VULETIC, M.; CINDRIC, M.; KORUZZNJAK, J. D. Identification of unknown impurities in simvastatin substances and tablets by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Pharmaceutical and biometical analysis**, v. 37, p. 715-721, 2005.

WATZIG, H.; GUNTER, S. Capillary electrophoresis: A high performance analytical separation technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, nº 6, p. 724 – 738, 2003.

WHO. World Health Organization. Cardiovascular Diseases. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. Acesso em: 03 janeiro 2014.

WU, J. Y.; DUAN, X. Y.; LI, L.; DAI, F.; LI, Y. Y.; LI, X. J.; FAN, G. J. Dyslipidemia in Shanghai, China. **Preventive Medicine**, v. 51, p. 412- 414, 2010.

YARDINCI, C.; OZALTIN, N. Simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical preparations by MEKC. **Journal of Chromatographic Science**, v.48, n. 2, p.95 – 99, 2010.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9139 - 8048766/1 - Antonio Marcos Callejo de Souza

Email: acallejo@usp.br
Data de Nascimento: 13/06/1984
Cédula de Identidade: RG - 341159906 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em farmácia e Bioquímica - Centro Universitário Nove de Julho - São Paulo - Brasil - 2009

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 06/07/2012
Início da Contagem de Prazo: 06/07/2012
Data Limite para o Depósito: 06/01/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Segunda Aurora Prado - 06/07/2012 até o presente. E.Mail: msaprad06@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/07/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 16/09/2013
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: Ingressou no Mestrado em 06/07/2012
Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014
Impresso em: 23/12/14 15:19:27

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 8048766/1 - Antonio Marcos Callejo de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5784-1/4	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	01/08/2012	02/10/2012	90	0	0	-	N	Turma cancelada
QFL5709-4/2	Amostragem e Preparação de Amostra (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	13/08/2012	15/10/2012	90	6	100	C	N	Concluída
FBF5706-7/1	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos	15/10/2012	10/12/2012	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBF5784-2/1	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	17/10/2012	18/12/2012	90	6	89	A	N	Concluída
FBC5817-1/4	A Prática da Cromatografia Líquida e Eletroforese Capilar	18/02/2013	28/04/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5777-2/8	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	07/03/2013	19/06/2013	45	3	84	B	N	Concluída
FBF5805-1/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	14/08/2013	17/09/2013	45	3	80	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

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: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Impresso em: 23/12/14 15:19:27

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9139 - 8048766/1 - Antonio Marcos Callejo de Souza

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
1590540	Maria Segunda Aurora Prado	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/07/2014

Impresso em: 23/12/14 15:19:27

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