



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ
CURSO DE FARMÁCIA



DETERMINAÇÃO SIMULTANEA DE EZETIMIBA E SINVASTATINA POR MÉTODO
ESPECTROMETRICO VALIDADO UTILIZANDO ANÁLISE MULTIVARIADA E
CONTROLE DE QUALIDADE DE FORMULAÇÕES MAGISTRAIS

FERNANDA HERINGER DE SOUZA

Macaé
Novembro de 2014

FERNANDA HERINGER DE SOUZA

DETERMINAÇÃO SIMULTANEA DE EZETIMIBA E SINVASTATINA POR MÉTODO
ESPECTROMETRICO VALIDADO UTILIZANDO ANÁLISE MULTIVARIADA E
CONTROLE DE QUALIDADE DE CÁPSULAS DE FORMULAÇÕES MAGISTRAIS

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Maximiliano da Silva Sangoi

Macaé
Novembro de 2014

Souza, Fernanda Heringer de

Determinação simultânea de ezetimiba e sinvastatina por método espectrométrico validado utilizando análise multivariada e controle de formulações magistrais/ Macaé, RJ, 2014.

Orientador: Maximiliano da Silva Sangoi

49 páginas

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado força e saúde para chegar até aqui.

A minha mãe, por sempre me mostrar que quando se tem determinação é possível alcançar qualquer objetivo, independente da sua dificuldade.

Ao meu pai por todo o carinho e pela paciência ao aceitar meus momentos de ausência.

Aos meus amigos pelas forças somadas e pelos momentos de angústias repartidos.

Ao Prof. Dr. Maximiliano Sangoi pela oportunidade e pela dedicação ao longo deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da sinvastatina.....	17
Figura 2. Estrutura química da ezetimiba	18
Figura 3. Esquema das fontes de colesterol e das inibições feitas pelos fármacos.	18
Figura 4. Esquema de diluições da ezetimiba.	22
Figura 5. Esquema de diluições da sinvastatina.....	23
Figura 6. Espectro das soluções contendo sinvastatina e ezetimiba em separado. .	26
Figura 7. Resultados obtidos a partir da análise do método PLS da mistura de diferentes concentrações de ezetimiba e sinvastatina no comprimento de onda de 238 nm.	33
Figura 8. Resultados obtidos a partir da análise do método PLS da mistura de diferentes concentrações de ezetimiba e sinvastatina no comprimento de onda de 247 nm.	34
Figura 9. Espectro na região do ultravioleta da solução placebo.	35
Figura 10. Curva de linearidade do ezetimiba (A) e da sinvastatina (B) obtidos em 238 e 247 nm, respectivamente.	36
Figura 11. Gráficos de Pareto da ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, para avaliação da robustez.	39
Figura 12. (Cont.) Gráficos de Pareto da ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, para avaliação da robustez.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volumes utilizados para preparar as diluições padrões de uso com os dois medicamentos em associação.	23
Tabela 2. Concentrações dos fármacos utilizadas no delineamento fatorial multinível para obtenção da curva pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS).....	25
Tabela 3. Qualitativo e quantitativo dos excipientes utilizados para a especificidade.	27
Tabela 4. Concentrações preparadas para o ensaio de linearidade.....	28
Tabela 5. Preparo das soluções utilizadas no ensaio de exatidão.....	28
Tabela 6. Ensaio realizado para otimização do método espectrofotométrico obtidos a partir do delineamento fatorial multinível validado pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS).	31
Tabela 7. Valores encontrados da precisão intradia e intermediária da ezetimiba e sinvastatina.	37
Tabela 8. Valores encontrados no ensaio de exatidão para ambos os fármacos.	38
Tabela 9. Resultados obtidos através do ensaio de robustez.....	39
Tabela 10. Teores encontrados para os medicamentos obtidos em farmácias comerciais e magistrais.....	41
Tabela 11. Peso médio obtido dos comprimidos e cápsulas.	42
Tabela 12. Dureza obtida com os comprimidos.....	43
Tabela 13. Resultados dos testes de friabilidade com comprimidos não revestidos.	44

LISTA DE ABREVIações

mL	Mililitro
mg	Miligrama
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
mm	Milimetro
µm	Micrometro
HPTLC	High performance thin layer chromatography
ng	Nanograma
LDL-C	Colesterol de baixa densidade
HDL-C	Colestetol de alta densidade
VLDL	Colesterol de densidade muito baixa
NPC1L1	Nielmann-Pick C1 Like 1 Protein
UV	Ultravioleta
HCl	Ácido clorídrico
M	Molar
µg	Micrograma
LD	Limite de Quantificação
LQ	Limite de Detecção
NM	Nanomêtro
V/V	Volume/Volume
PLS	Partial Least Squares
Abs	Absorbância
HMG-CoA	-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. Análise Multivariada	13
1.2. Análise Fatorial	13
1.3. Metodologia de análise de ezetimiba e sinvastatina em formulações farmacêuticas.....	14
1.4. Dislipidemia.....	16
1.5. Tratamento farmacológico.....	16
2. Justificativa	19
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. Materiais e métodos	21
4.1. Materiais.....	21
4.1.1. Substâncias químicas de referência e produtos farmacêuticos.....	21
4.1.2. Reagentes	21
4.1.3. Equipamentos.....	21
4.2. Preparo das soluções.....	21
4.2.1. Preparo das soluções padrões de estoque	21
4.2.2. Preparo das soluções padrões de trabalho	21
4.2.3. Preparo das amostras a partir dos comprimidos.	24
4.2.4. Preparo das amostras a partir das cápsulas.	25
4.3. Desenvolvimento e otimização da metodologia analítica	25
4.4. Validação da metodologia analítica.....	26
4.4.1. Especificidade.....	27
4.4.2. Linearidade.....	27
4.4.3. Precisão.....	28
4.4.4. Exatidão.....	28
4.4.5. Limite de detecção.....	29
4.4.7. Robustez	29

4.5. Análise das formas farmacêuticas	30
4.5.1. Teor	30
4.5.2. Análise física.....	30
4.5.2.1. Determinação do peso médio	30
4.5.2.2. Teste de dureza	30
4.5.2.3. Teste de friabilidade.....	30
4.5.2.4. Teste de desintegração.....	31
5. Resultados e discussões	31
5.1. Otimização do método	31
5.2. Validação	35
5.2.1. Especificidade.....	35
5.2.2. Linearidade.....	36
5.2.3. Precisão.....	37
5.2.4. Exatidão.....	37
5.2.5. Limite de detecção e quantificação.....	38
5.2.6. Robustez	38
5.3. Análise das formas farmacêuticas	40
5.3.1. Teor	40
5.3.2. Análise física.....	41
5.3.2.1. Determinação do peso médio	41
5.3.2.2. Teste de dureza	43
5.3.2.3. Teste de friabilidade.....	43
5.3.2.4. Teste de desintegração.....	44
6. Conclusão	45

RESUMO

Dislipidemias são fatores de risco para doenças cardiovasculares e esse tipo de condição é uma das principais causas de morte pelo mundo, sendo responsável por cerca de 25% de mortes ao ano. A associação entre ezetimiba e a sinvastatina é utilizada para reduzir níveis de colesterol e tratar as dislipidemias. Esta associação apresenta fármacos com mecanismos complementares que auxiliam na redução de níveis de colesterol LDL. Além disso, é importante para redução dos riscos cardiovasculares em pacientes de risco, podendo reduzir em até 30% a ocorrência de morte em pacientes com essas condições. O método espectrofotométrico no ultravioleta (UV) foi escolhido por se apresentar como um método simples, rápido e preciso para análise simultânea dos fármacos. Sabe-se também que a falta de qualidade de um medicamento pode ocasionar sérios transtornos na saúde do paciente, tanto com um aumento na dose, quando com a redução da mesma, visto isso, podemos notar a necessidade de ser realizado um controle de qualidade adequado. Esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a validação do UV para a análise simultânea de sinvastatina e ezetimiba em fórmulas comerciais e magistrais. A validação do método foi realizada de acordo com os guias oficiais, avaliando os parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez, limite de quantificação e detecção. Para os testes de controle de qualidade, avaliou-se principalmente o teor das formas farmacêuticas oficinais e magistrais e tempo de desintegração, assim como os demais métodos preconizados pela Farmacopeia Brasileira. As determinações espectrofotométricas foram obtidas nos comprimentos de onda de 238 nm e 247 nm, para o ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, de acordo com os resultados obtidos nos testes de análise multivariada realizada, utilizando solução etanol/água (1:1, v/v) como solvente. Durante a validação do método, observou-se uma relação linear entre as concentrações de 2 a 8 µg/mL para o ezetimiba e 4 a 16 µg/mL para a sinvastatina ($r^2 > 0,99$), apresentando os limites de detecção e quantificação calculados do ezetimiba 0,28 e 0,93 µg/mL, respectivamente, e para a sinvastatina os valores foram 0,16 e 0,53 µg/mL, respectivamente. A validação do método também demonstrou resultados aceitáveis para a precisão, especificidade, exatidão e robustez. As amostras comerciais e magistrais analisadas apresentaram valores de teor entre 97,12 e 113,88%. Outros testes de controle de qualidade obtiveram resultados adequados. Dessa forma, o

método validado para determinação simultânea de ezetimiba e sinvastatina em diferentes formulações farmacêuticas é importante para o domínio tecnológico e científico, aprimorando a área de controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos comercializados no País.

1.Introdução

A falta de qualidade de um medicamento pode ocasionar sérios transtornos na saúde do paciente. Esse problema pode ser proveniente de vários fatores, como a utilização de matérias-primas inadequadas, acondicionamento irregular, manuseio inadequado ou até mesmo a observação incorreta das Boas Práticas de Fabricação e das Boas Práticas de Manipulação. Desvios na qualidade do medicamento acarretam graves riscos para o paciente, podendo até se tornar um problema de saúde pública. Com isso, foi vista a grande necessidade de um controle de qualidade adequado para que os medicamentos se apresentem em conformidade com os guias oficiais. O controle de qualidade é um conjunto de operações com o objetivo de verificar a conformidade do medicamento e engloba as avaliações qualitativas e quantitativas das propriedades químicas e físicas das formas farmacêuticas (PEIXOTO *et al.*, 2005; ABIDO *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2011).

Os métodos analíticos são capazes de avaliar a qualidade do medicamento em estudo e essa metodologia deve possuir adequabilidade comprovada através de sua validação, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Nesse sentido, a validação da metodologia analítica deve estar de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

As farmácias magistrais passaram por um grande processo de expansão de medicamentos dispensados nos últimos anos, podendo gerar riscos para o paciente, caso os requisitos de eficácia, segurança e qualidade não sejam comprovados. Sendo assim, é essencial que se faça um controle de qualidade adequado não somente dos produtos officinais, mas também dos produtos acabados nas farmácias magistrais. Esse processo de expansão pode ser justificado pelas farmácias magistrais proporcionarem à população o acesso a fórmulas personalizadas por preços acessíveis, podendo ter um ajuste de dose adequado, além de serem manipulados fármacos de quase todas as categorias terapêuticas. Podem ainda elaborar associações que não produzidas pelas indústrias farmacêuticas. Porém, as farmácias magistrais ainda geram desconfiâncias em relação à qualidade para algumas pessoas, sendo assim, torna-se necessário um controle de qualidade adequado das formulações dessas farmácias. A qualidade do medicamento produzido em tais farmácias depende principalmente do processo de produção (SCHESHOWITSCH *et al.*, 2007; POLONINI *et al.*, 2011).

1.1. Análise Multivariada

Com o crescimento de dados coletados em análises na área de química analítica foi vista a necessidade de utilizar ferramentas novas e mais sofisticadas para tratar tais dados e retirar o máximo de informações relevantes possíveis, essa necessidade deu origem à quimiometria, técnica utilizada no Brasil em três campos principais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada, sendo essa uma área destinada principalmente à análise de dados químicos de natureza multivariada. A análise multivariada é mais interessante, por permitir um estudo com vários fatores ao mesmo tempo, não importando a alta correlação entre os dados e com essa técnica também é possível avaliar problemas eventuais com interferentes nas amostras utilizadas (FERREIRA *et al.*, 1999; NETO *et al.*, 2006).

A análise multivariada tem como objetivo explorar dados complexos, de forma a reduzir e simplificar, sem que ocorra perda de informações relevantes. Nesse tipo de estudo é feita uma organização dos dados e, em seguida, é verificada a dependência entre as variáveis, de modo a possibilitar previsões e validar as hipóteses. Desse modo, podemos ver que a análise multivariada pode ser considerada um instrumento poderoso para analisar informações e por ser capaz de correlacionar diferentes variáveis analisadas simultaneamente, permite a extração de uma grande quantidade de informações (HAIR *et al.*, 2009).

O método dos mínimos quadrados parciais, PLS (do inglês *partial least squares*), é um método matemático para a realização da calibração multivariada. Dentre outros métodos matemáticos existentes, o PLS tem ganhado destaque pelo excelente poder de previsão e pela simplicidade do seu algoritmo (PERALTA-ZAMORA *et al.*, 1997).

1.2. Análise Fatorial

Com o passar dos anos foi aumentando o número de variáveis a serem consideradas em técnicas laboratoriais, isso se deve também ao fato da crescente sofisticação das técnicas instrumentais, nesse sentido foi vista a necessidade de se ter um maior conhecimento da estrutura e das inter-relações das variáveis. Uma das técnicas estatísticas para avaliar as variáveis é a análise fatorial, sendo ela adequada para analisar os padrões de relações complexas multidimensionais.

Nessa análise agrupamos variáveis por sua correlação, de modo que as variáveis pertencentes à um grupo têm elevadas correlações umas com as outras e é capaz de estimar as interações entre os fatores, assim como todos os efeitos principais para cada fator (MULHOLLAND, 1988; HAIR *et al.*, 2009). Essa técnica de planejamento experimental é uma das mais utilizadas, juntamente com o planejamento de compostos centrais completos ou fracionários (NETO *et al.*, 2006).

Esse tipo de análise pode maximizar o rendimento, a produtividade e a qualidade dos resultados, pois possibilita que ocorra uma variação constante e simultânea dos fatores, podendo obter um grande número de informações com o menor número possível de experimentos. Nesse sentido podemos ver que a análise fatorial confere vantagens sobre o *design* de grupos paralelos (GABRIELSSON *et al.*, 2002; MONTGOMERY *et al.*, 2003).

1.3. Metodologia de análise de ezetimiba e sinvastatina em formulações farmacêuticas

Wang e Asgharnejad (2000) validaram o método de segunda derivada para determinação de sinvastatina em comprimidos utilizando um espectrofotômetro com detecção no UV em 243 nm, linear no intervalo de 5-15 µg/mL

Em relação à ezetimiba, Sankar *et al.* (2005) desenvolveram um método espectrofotométrico acoplado ao UV para a análise de etoricoxibe e ezetimiba em formulações farmacêuticas, utilizando os comprimentos de onda 235 e 230 nm, respectivamente, para a detecção dos fármacos, onde os fármacos foram diluídos com água destilada. Sistla *et al* (2005) desenvolveram e validaram uma metodologia para a determinação da ezetimiba em formulações comerciais através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa. A metodologia foi realizada com coluna C₁₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm), a fase móvel utilizada foi água:acetonitrila, a calibração foi feita no intervalo entre 0,5 à 50 µg/mL, mostrando-se linear para a faixa estudada.

Já Imran *et al* (2006) analisaram a estabilidade da ezetimiba e carvedilol através da espectrofotometria, nesse caso foi necessário o uso da acetonitrila para a solubilização dos fármacos, os comprimentos de onda utilizados foram 232 e 238 nm para a ezetimiba e o carvedilol, respectivamente. O intervalo entre 2-50 µg/mL para a ezetimiba obteve uma resposta linear, enquanto que o carvedilol obteve uma

resposta linear para o intervalo entre 2-20 µg/mL. O método também se mostrou preciso e exato.

Singh *et al* (2006) desenvolveram um estudo de estabilidade para a ezetimiba através da degradação forçada utilizando água e acetonitrila (70:30) como solventes e coluna C₈ (250 mm x 4 mm, 5 µm) e foi aplicado para concentrações de 5 à 500 µg/mL, mostrando-se preciso, exato e específico para a ezetimiba.

Ashfaq *et al* (2007) desenvolveram o método para doseamento de formulações farmacêuticas contendo ezetimiba através da CLAE, utilizando coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consiste em uma mistura de acetato e amônia de 0.1M, pH 5.0 e acetonitrila (30:70 v/v). O intervalo utilizado foi de 20 à 60 µg/mL para ambos os fármacos, o método se mostrou preciso e exato para essa faixa de concentração.

Oliveira *et al.*, (2007) desenvolveram e validaram a metodologia através cromatografia líquida de fase reversa, utilizando coluna C₁₈ (150 mm x 4,6 mm). A fase móvel foi preparada com tampão fosfato 0,3M e acetonitrila (35:65 v/v), o comprimento de onda utilizado foi 234 nm e o intervalo foi 0,5-200 µg/mL. O método se mostrou preciso e linear, podendo ser utilizado na rotina de controle de qualidade de formulações comerciais contendo sinvastatina e ezetimiba.

A análise com a associação entre os dois fármacos foi desenvolvida por Dixit *et al* (2008) através da cromatografia em camada delgada de alta eficiência. A calibração foi feita no intervalo de 200-1600 ng/µL, utilizando metanol como diluente. O estudo foi elaborado para analisar a estabilidade dos fármacos no estudo. Além disso, mostrou linear, exato e específico.

Markman *et al* (2010) desenvolveram e validaram a metodologia para a quantificação da sinvastatina através da CLAE com detecção em 238 nm e fluxo 1,5 mL/min, a coluna utilizada foi C₁₈ (100 mm x 4,6 mm) e a fase móvel foi constituída por tampão de fosfato dibásico de sódio com ácido fosfórico e acetonitrila, na proporção de 35:65 (v/v). O método se mostrou linear, exato e específico para a sinvastatina.

Zepon *et al* (2013) desenvolveram um método para o doseamento da sinvastatina em formulações comerciais através do uso do espectrofotômetro no UV, o intervalo validado foi entre 4 à 12 µg/mL, utilizando o comprimento de onda de 239 nm e lauril sulfato de sódio como diluente. O método foi linear ($r^2=0,9994$), assim

como obteve resultado positivo nos demais parâmetros de validação preconizados pelos guias oficiais.

1.4. Dislipidemia

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte nos dias atuais, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Isso deve-se em parte às mudanças de estilo de vida a partir da segunda metade do século XX, incluindo mudanças nos hábitos alimentares e estilos de vida mais sedentários. No Brasil o valor percentual de morte por doenças cardiovasculares está em torno de 25%. Dados recentes mostram que as doenças cardiovasculares e a hipertensão arterial tem uma prevalência estimada de 35% na população acima de 40 anos e ocorrência de hipertensão arterial ocorre cada vez mais precocemente. Estima-se que cerca de 4% de crianças e adolescentes também sejam portadoras (BRASIL, 2002; POZZAN *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2005; RIBEIRO, *et al.* 2012).

Altos índices de colesterol de baixa densidade (LDL-C), associado com a redução dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-C) e também com o aumento de triglicerídeos são fatores de riscos para eventos cardiovasculares, sendo assim a redução dos valores de LDL-C é um dos fatores mais importantes para impedir doenças cardiovasculares. Ensaios clínicos mostraram que a redução de LDL-C diminui a taxa de eventos cardiovasculares, quando usados na prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares. Esse procedimento pode reduzir entre 25 a 60% na incidência de doença isquêmica do coração e reduzir o risco de morte em 30%, além de reduzir o risco de outros efeitos mórbidos, como angina e acidentes vasculares cerebrais (BRASIL, 2002; ARAUJO *et al.* 2005).

1.5. Tratamento farmacológico

Nas últimas décadas ocorreram avanços notáveis em medicamentos com potencial para a redução da hipercolesterolemia. As estatinas ainda são muito utilizadas para o tratamento dessas desordens, porém, hoje em dia associações entre fármacos de diferentes classes estão sendo bastante empregadas (ARAUJO *et al.* 2005; SBC, 2013).

As estatinas, classe a qual pertence a sinvastatina (Fig. 1), atuam inibindo a HMG-CoA, o que por sua vez, leva a uma redução da síntese intracelular de

colesterol, ao aumento da formação dos LDL-receptores e à diminuição do colesterol de densidade muito baixa (VLDL). Além desses efeitos, ao inibirem a HMG-CoAredutase, as estatinas reduzem a formação de mevalonato e de radicais isoprenil, atenuando a ativação de proteínas fundamentais à resposta inflamatória e à biodisponibilidade de óxido nítrico. Porém, a resposta não linear à dose é uma característica comum desta classe de fármacos e a duplicação da sua dosagem produz redução adicional de apenas 6% nos níveis de LDL-C. Além disso, ocorre o aumento na incidência de efeitos colaterais com altas doses, o que pode comprometer a adesão do paciente ao tratamento com estatinas. A hepatotoxicidade, por exemplo, é um evento raro, mas está relacionado com doses altas (ARAÚJO *et al.* 2005; Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013).

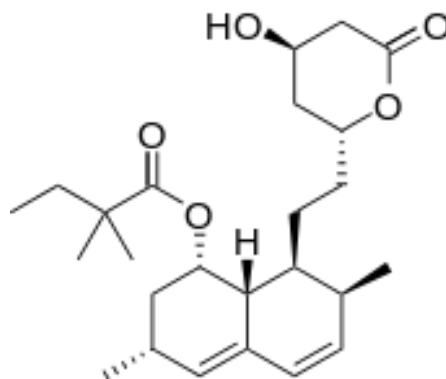


Figura 1. Estrutura química da sinvastatina.

A partir desses fatos, foram sendo estudadas terapias adicionais, com o intuito de otimizar a prevenção e o tratamento das doenças cardiovasculares. Com isso, novas associações foram surgindo para interferir no metabolismo e produção do colesterol (ARAÚJO *et al.* 2005).

Outro medicamento utilizado para as dislipidemias, também em associação à sinvastatina, é a ezetimiba (Fig. 2). Esse fármaco atua inibindo a absorção do colesterol no intestino delgado através da inibição seletivamente da NPC1L1, principal proteína na membrana responsável pela captação de colesterol (LOTTEBERG, 2009; SBC, 2013).

A sinvastatina está disponível no mercado em comprimidos contendo 10, 20, 40 e 80 mg, ela é administrada em dose única à noite, enquanto a ezetimiba está

presente na forma de comprimidos contendo 10 mg, sendo usada apenas uma vez ao dia.

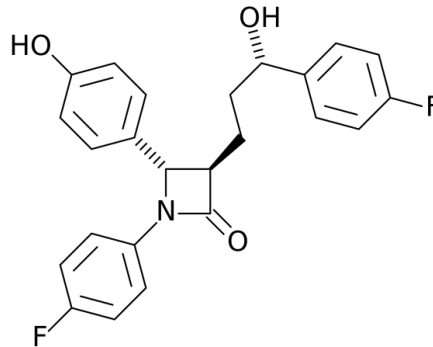


Figura 2. Estrutura química da ezetimiba

Quando a ezetimiba é utilizada em monoterapias, sua eficácia máxima na redução dos níveis de LDL-C ocorre entre 15 a 20% em relação ao uso com as estatinas. As estatinas, que tem como mecanismo de ação reduzir a biossíntese de colesterol, pode aumentar a absorção intestinal de colesterol, enquanto a ezetimiba, que inibe a absorção de colesterol, pode aumentar a biossíntese de colesterol. Sendo assim, a terapia em associação com esses medicamentos impede a síntese aumentada do colesterol induzida pela ezetimiba e o aumento da absorção de colesterol induzido pelas estatinas, sendo uma combinação uma potente redução dos níveis de LDL-C (GOODMAN e GILMAN, 2006).

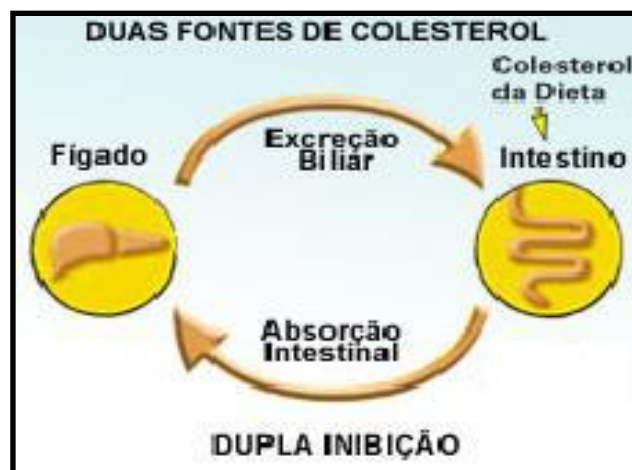


Figura 3. Esquema das fontes de colesterol e das inibições feitas pelos fármacos.

2. Justificativa

Visto que há um aumento no número de casos de dislipidemias e uma vez que esse aumento está altamente relacionado com eventos cardiovasculares e, conseqüentemente, relacionado com o risco de morte, há um maior aumento na utilização dessas classes de medicamento. Com isso, aumenta a importância de que seja feito um controle de qualidade eficiente das formulações.

Uma vez que a ezetimiba não está inserida nos compêndios oficiais utilizados, foi visto a necessidade de se desenvolver e validar metodologia analítica simples e rápida para análise dos fármacos em associação, para garantir um controle de qualidade adequado das formas farmacêuticas disponíveis no mercado brasileiro.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar método analítico para determinação simultânea de ezetimiba e sinvastatina em formas farmacêuticas, além de efetuar o controle de qualidade físico-químicos dos medicamentos existentes do mercado, assim como, os produzidos por farmácias magistrais.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para identificação e doseamento dos fármacos por espectrofotometria no ultravioleta (UV);
- Otimizar método eficiente de análise com baixa utilização de solventes;
- Desenvolver método com auxílio de ferramentas matemáticas como o PLS;
- Fazer a análise física das formulações, realizando testes de peso médio, dureza, friabilidade e desintegração;
- Determinar o teor dos fármacos nas formulações oficiais e magistrais adquiridas na cidade de Macaé.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Substâncias químicas de referência e produtos farmacêuticos

As substâncias químicas de referência do ezetimiba e sinvastatina utilizadas neste estudo foram adquiridas no comércio local, importadas da China com teor de 99,37% e 100,50%, respectivamente. As cápsulas contendo 10 mg de ezetimiba e 20 mg de sinvastatina foram adquiridas em duas farmácias magistrais locais, citadas aqui como A e B. Os comprimidos revestidos contendo as mesmas concentrações do fármacos foram adquiridos em comércio local. Foram utilizados comprimidos contendo os medicamentos isolados (Zetia® 10 mg e Sinvastacor® 20 mg) e em associação (Vyrocin® 10 mg de ezetimiba e 20 mg de sinvastatina), todos os medicamentos estavam dentro do prazo de validade.

4.1.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram etanol, água destilada e solução de ácido clorídrico 0,1M.

4.1.3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: balanças analíticas Sartorius, agitadores, ultrassom, durômetro Nova Ética, friabilômetro Nova Ética, desintegrador Nova Ética e espectrofotômetro com detector ultravioleta/visível Lambda35, PerkinElmer.

4.2. Preparo das soluções

4.2.1. Preparo das soluções padrões de estoque

Os padrões de ezetimiba e sinvastatina foram preparados individualmente a partir da pesagem de 10 mg de cada fármaco, respectivamente. A seguir foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, completando volume com a mistura de água destilada e etanol (1:1, v/v), obtendo a concentração de 1,0 mg/mL. As soluções de estoque foram armazenadas em refrigerador com temperatura entre 2-8 °C e protegidas da luz. O ajuste de concentração foi realizado durante os cálculos.

4.2.2. Preparo das soluções padrões de trabalho

Para o preparo das soluções de trabalho, pipetou-se 5 mL de cada solução estoque em balões de 100 mL individualmente, completando volume com

água:etanol (1:1), obtendo a concentração final de 50 µg/mL. A partir desta, foram feitas soluções contendo 5 e 10 µg/mL de ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. Para isso, foram adicionados 1 e 2 mL de ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, em balões de 10 mL, completando volume com água:etanol (1:1). Para avaliação da linearidade do método, foram preparadas soluções estoques contendo 10 µg/mL de ezetimiba e 20 µg/mL de sinvastatina.

Com a solução estoque de ezetimiba contendo 10 µg/mL foram preparadas as soluções de 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 µg/mL, seguindo o esquema abaixo:

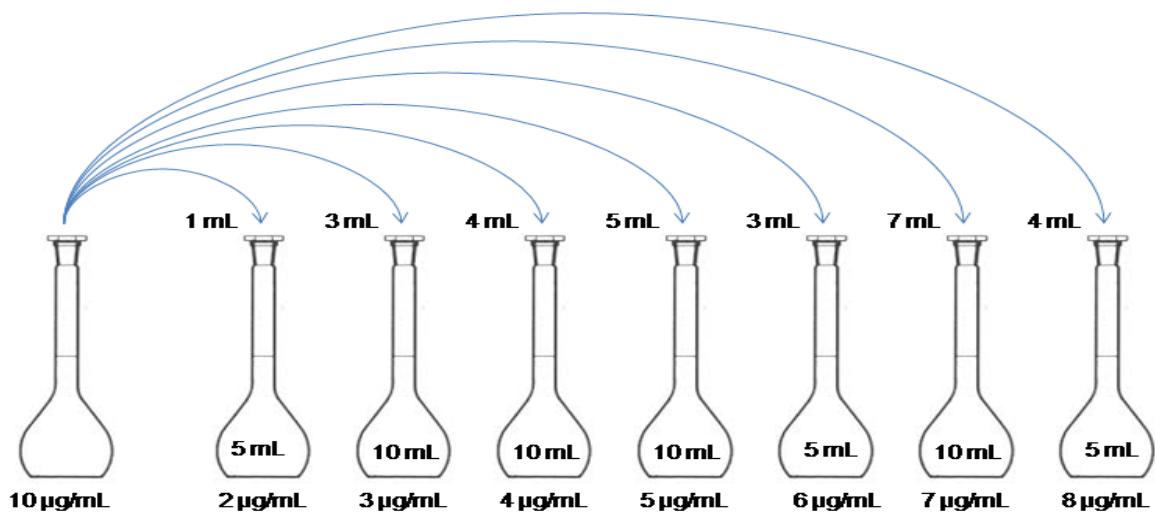


Figura 4. Esquema de diluições do padrão da ezetimiba.

Com a solução estoque contendo 20 µg/mL de sinvastatina foram preparadas as seguintes soluções:

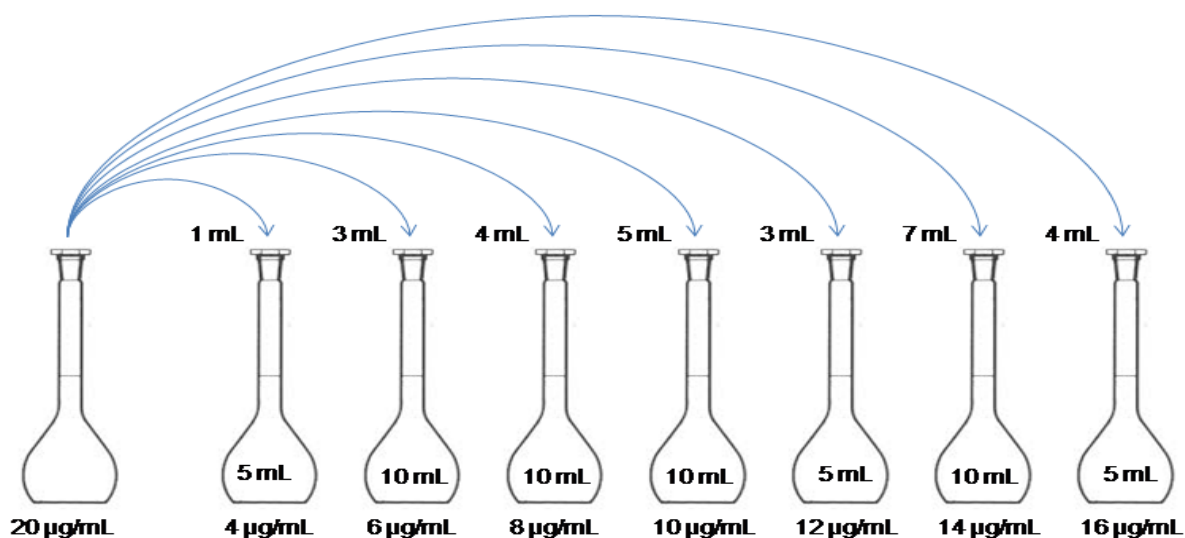


Figura 5. Esquema de diluições do padrão da sinvastatina.

Também foram preparadas soluções contendo ezetimiba e sinvastatina durante a otimização do método espectrofotométrico. Para isso foram preparadas soluções de estoque contendo 20 e 40 µg/mL de ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. Em seguida, as soluções foram preparadas como descrito na tabela a seguir:

Tabela 1. Volumes utilizados para preparar as diluições padrões de uso com os dois medicamentos em associação.

Volume Sinvastatina (mL)	Volume Ezetimiba (mL)	Balão utilizado (mL)	Concentração Sinvastatina (µg/mL)	Concentração Ezetimiba (µg/mL)
0	1	10	0	2
0	1	5	0	4
0	3	10	0	6
0	2	5	0	8
1	0	10	4	0
1	1	10	4	2
1	2	10	4	4
1	3	10	4	6
1	4	10	4	8
1	0	5	8	0
2	1	10	8	2
1	1	5	8	4

2	3	10	8	6
5	2	5	8	8
3	0	10	12	0
3	1	10	12	2
3	2	10	12	4
3	3	10	12	6
3	4	10	12	8
10	0	25	16	0
4	1	10	16	2
4	2	10	16	4
4	3	10	16	6
10	10	25	16	8

Como os teores das matérias-primas não eram de 100,0% foi necessário o ajuste da concentração. Para isso pesou-se com exatidão aproximadamente 9,95 mg de sinvastatina e 10,06 mg de ezetimiba. Eventuais diferenças de pesagem foram utilizadas nos cálculos seguintes.

4.2.3. Preparo das amostras a partir dos comprimidos.

Calcularam-se os pesos médios de 10 comprimidos de Vytorin® e 10 comprimidos de Zetia®. Os comprimidos foram triturados separadamente. Pesou-se quantidade referente a 2,5 mg de ezetimiba e 5 mg de sinvastatina do Vytorin® e transferido para balão volumétrico de 50 mL. Pesou-se quantidade referente a 5 mg do princípio ativo do Zetia® para balão volumétrico de 100 mL. Ambas as preparações foram diluídas com etanol, obtendo a concentração de 50 µg/mL de ezetimiba e 100 µg/mL de sinvastatina. Os balões volumétricos foram colocados em ultrassom por 15 minutos e, em seguida, as soluções foram filtradas em papel filtro. Aliquotou-se 1 mL das soluções filtradas e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL, completando volume com etanol e água destilada (1:1, v/v), obtendo à concentração final de 5 µg/mL de ezetimiba e 10 µg/mL de sinvastatina para a solução amostra de Vytorin® e 5 µg/mL de Zetia®.

Para a solução amostra de Sinvastacor®, os comprimidos foram pesados e triturados, transferindo para balões volumétricos de 100 mL e diluídos com etanol, obtendo a concentração de 200 µg/mL. A seguir, os balões foram colocados no

ultrassom por 15 minutos e posteriormente filtrados. Por fim, foram transferidos 0,5 mL para balões volumétricos de 10 mL, completando volume com etanol e água (1:1, v/v), obtendo à concentração final de 10 µg/mL.

4.2.4. Preparo das amostras a partir das cápsulas.

Os conteúdos de 10 cápsulas contendo ezetimiba e sinvastatina obtidas das farmácias A e B foram retirados e pesados, a partir deles calcularam-se os pesos médios. Uma quantidade referente a 5 mg de ezetimiba e 10 mg de sinvastatina de cada medicamento foi pesada. Estas foram transferidas para balões volumétricos e diluídas com etanol, obtendo a concentração de 50 µg/mL. Colocou-se em ultrassom por 15 minutos e, em seguida, seu conteúdo foi filtrado. 1 mL de cada amostra foi transferido para balão volumétrico de 10 mL, diluindo com etanol e água (1:1, v/v), obtendo a concentração final de 5 µg/mL de ezetimiba e 10 µg/mL de sinvastatina.

4.3. Desenvolvimento e otimização da metodologia analítica

Foram realizados vários testes de solubilidade, concentrações e comprimentos de onda analisados durante o desenvolvimento analítico. Para otimização do método, optou-se por realizar análise pelo método dos quadrados mínimos parciais (PLS). Para isso, foram pré-definidas 5 concentrações de cada fármaco e combinadas utilizando delineamento fatorial multinível, com 2 fatores e 25 combinações. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimentos de onda selecionados previamente. Abaixo, a tabela com a descrição das concentrações dos fármacos utilizados na otimização do método.

Tabela 2. Concentrações dos fármacos utilizadas no delineamento fatorial multinível para obtenção da curva pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS).

Sinvastatina (µg/mL)	Ezetimiba (µg/mL)
0	0
4	2
8	4
12	6
16	8

A definição do delineamento fatorial e a análise do PLS foram realizadas utilizando o software Minitab.

A seguir, os espectros da solução contendo ezetimiba e sinvastatina de 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ em etanol:água (1:1, v/v), respectivamente, após desenvolvimento e otimização do método.

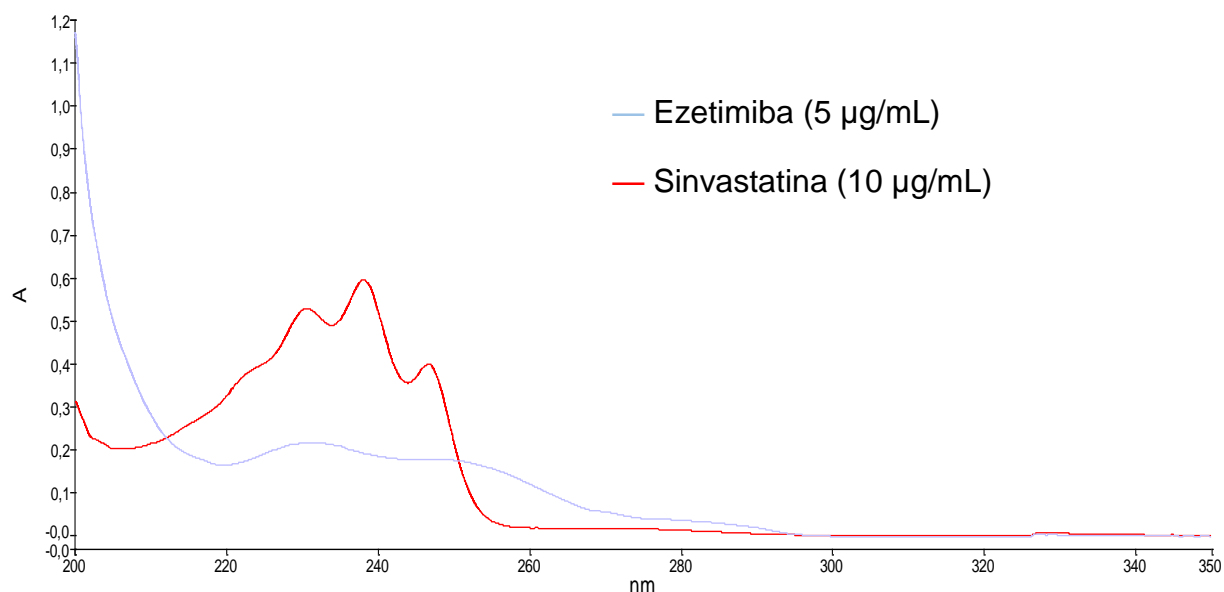


Figura 6. Espectro das soluções contendo sinvastatina e ezetimiba em separado.

4.4. Validação da metodologia analítica

Validação analítica pode ser definida como um processo pelo qual se estabelece as características de performance de um método que atende às necessidades analíticas para o qual o trabalho vai ser aplicado. A validação ocorre através de estudos laboratoriais (PINTO *et al.*, 2003).

A metodologia foi validada de acordo com a RE n° 899 de 2003, sendo essa a legislação vigente no Brasil para tal fim, seguindo os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. A metodologia foi desenvolvida utilizando espectrofotômetro com detector de UV, utilizando os comprimentos de onda selecionados durante a otimização de 238 e 247 nm, sendo para determinação de ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. A mesma foi feita utilizando o Vytorin®.

4.4.1. Especificidade

A especificidade foi determinada através da leitura de um placebo nos comprimentos de onda de 238 e 247 nm. Foram utilizados os seguintes excipientes nas seguintes quantidades descritas na tabela abaixo:

Tabela 3. Qualitativo e quantitativo dos excipientes utilizados para a especificidade.

Excipiente	Quantidade (mg)
Celulose microcristalina	15,00
Croscarmelose sódica	4,0
Estearato de magnésio	1,70
Ácido cítrico	0,50
Hipromelose	20,00
Lactose anidra	126,00
Total	167,2

Os excipientes e as respectivas quantidades foram escolhidos a partir da análise da bula do medicamento e do Handbook of Pharmaceutical Excipients (2012), para adequação dos excipientes (ROWE *et al.*, 2012), de acordo com o peso médio do medicamento. O espectro obtido do placebo foi comparado com o espectro da mistura dos fármacos. Ambas as soluções foram preparadas de acordo com a concentração de trabalho de 5 µg/mL e 10 µg/mL de ezetimiba e sinvastatina, respectivamente.

4.4.2. Linearidade

A linearidade foi realizada em triplicata com os fármacos em separado em dias consecutivos. As curvas foram obtidas a partir de 7 concentrações de cada fármaco. Posteriormente, foram analisados os coeficientes de determinação pelo método dos mínimos quadrados utilizando o software MS Excel. As concentrações utilizadas estão dispostas na tabela a seguir:

Tabela 4. Concentrações preparadas para o ensaio de linearidade

Ezetimiba ($\mu\text{g/mL}$)	Sinvastatina ($\mu\text{g/mL}$)
2	4
3	6
4	8
5	10
6	12
7	14
8	16

4.4.3. Precisão

A precisão intra-dia foi executada utilizando 6 amostras na mesma concentração do comprimido Vytorin® frente à solução padrão de mesma concentração, referente à 5 $\mu\text{g/mL}$ de ezetimiba e 10 $\mu\text{g/mL}$ de sinvastatina em um mesmo dia. A precisão intermediária foi obtida em 3 dias consecutivos.

4.4.4. Exatidão

A exatidão foi executada em triplicata, utilizando as concentrações referentes a 80, 100 e 120% da concentração trabalho de ambos os fármacos e comparadas com a solução padrão da mistura de ezetimiba e sinvastatina. Ambas as soluções padrão e amostra iniciais continham 33,33 $\mu\text{g/mL}$ de ezetimiba e 66,67 $\mu\text{g/mL}$ de sinvastatina. Para a solução final todas as diluições foram realizadas em balão de 50 mL. Adicionou-se padrão às amostras e as seguintes concentrações estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Preparo das soluções utilizadas no ensaio de exatidão.

	Volume adicionado da amostra (mL)	Volume adicionado do padrão (mL)	Concentração de ezetimiba ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de sinvastatina ($\mu\text{g/mL}$)
80%	5	1	4	8
100%	5	2,5	5	10
120%	5	4	6	12

4.4.5. Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado através da equação da reta obtida em três curvas analíticas do ezetimiba e da sinvastatina a partir do ensaio da linearidade. A fórmula utilizada, a qual é padronizada pela resolução RE 899 de 2003 da ANVISA, segue abaixo:

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

Nessa fórmula LD significa limite de detecção, DP_a desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC é a inclinação da curva, onde foi obtido o IC médio das três curvas.

4.4.6. Limite de quantificação

Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação também foi calculado pela fórmula preconizada pela ANVISA, sendo ela:

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

Nesse caso, LQ é o limite de quantificação, DP_a desvio padrão do intercepto com o eixo Y e IC é a inclinação da curva, onde foi obtido o IC médio das três curvas.

4.4.7. Robustez

A robustez foi realizada com amostras contendo 5 µg/mL de ezetimiba e 10 µg/mL de sinvastatina utilizando delineamento fatorial completo com 3 fatores. Foram realizadas as seguintes alterações:

- Comprimento de onda: os comprimentos de ondas utilizados foram 236, 240, 245 e 249 nm, sendo os comprimentos de onda de 236 e 240 referentes ao ezetimiba e 245 e 249 referentes à sinvastatina;
- Temperatura: as amostras foram analisadas nas temperaturas de 5 e 23 °C

- Diluente: a última diluição foi realizada com HCl 0,1M e mistura de etanol e água destilada (1:1, v/v).

As combinações e as análises posteriores foram realizadas utilizando o software Minitab. As amostras foram analisadas frente à solução padrão preparada nas mesmas condições.

4.5. Análise das formas farmacêuticas

4.5.1. Teor

As formas farmacêuticas foram analisadas por espectrofotometria no UV com comprimentos de onda de 238 nm para o ezetimiba e 247 nm para a sinvastatina. A ezetimiba foi analisada na concentração de 5 µg/mL e a sinvastatina na concentração de 10 µg/mL. Todas as análises foram executadas em triplicata.

4.5.2. Análise física

4.5.2.1. Determinação do peso médio

Para a determinação do peso médio foram pesados, individualmente, 20 comprimidos de cada medicamento, além do conteúdo individual de 20 cápsulas. A seguir, foi calculado o peso médio e os pesos foram analisados de acordo com o preconizado na FB 5 (2010).

4.5.2.2. Teste de dureza

O teste de dureza foi realizado com 10 comprimidos de cada medicamento, utilizando para isso o durômetro Ethik Technology, os comprimidos foram analisados individualmente e sempre seguindo a mesma orientação.

4.5.2.3. Teste de friabilidade

Foram pesados 20 comprimidos com exatidão e, em seguida, foram colocados no friabilômetro, os comprimidos permaneceram no aparelho pelo tempo de 4 minutos com 25 rotações por minuto. Após esse tempo, os comprimidos foram retirados do aparelho, foi retirado o pó da superfície e foram novamente pesados. Em seguida os resultados foram analisados.

4.5.2.4. Teste de desintegração

Teste realizado conforme o descrito na FB 5 (2010). Para esse teste foi utilizada cesta com 6 tubos. Em cada análise foi adicionado um comprimido ou cápsula por tubo, sendo assim, foram utilizados 6 comprimidos de cada medicamento, assim como 6 cápsulas de cada formulação magistral. Adicionou-se um disco na parte superior ao comprimido ou cápsula e água como líquido de imersão na temperatura de 37 ± 1 °C. Os comprimidos foram deixados no aparelho por no máximo 30 minutos, enquanto as cápsulas permaneceram no aparelho por no máximo 45 minutos.

5. Resultados e discussões

5.1. Otimização do método

A calibração do método foi definida através do método PLS de acordo com a Tabela 2. Os dados obtidos para a otimização demonstrados na Tabela 6 foram plotados no Minitab e após análise estatística obteve-se os seguintes gráficos, demonstrados nas Figuras 5 e 6, dos resíduos padronizados para a mistura de ezetimiba e sinvastatina nas concentrações avaliadas:

Tabela 6. Ensaios realizados para otimização do método espectrofotométrico obtidos a partir do delineamento fatorial multinível validado pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS).

Ordem padrão	Ordem executada	Ezetimiba (µg/mL)	Sinvastatina (µg/mL)	Abs (238 nm)	Abs (247 nm)
11	1	4	0	0,162	0,149
21	2	8	0	0,294	0,278
22	3	8	4	0,549	0,452
1	4	0	0	0	0
15	5	4	16	1,159	0,824
9	6	2	12	0,836	0,581
8	7	2	8	0,577	0,408
7	8	2	4	0,331	0,242
18	9	6	8	0,718	0,543

25	10	8	16	1,295	0,958
23	11	8	8	0,792	0,617
3	12	0	8	0,512	0,344
13	13	4	8	0,647	0,475
20	14	6	16	1,24	0,897
6	15	2	0	0,084	0,076
4	16	0	12	0,748	0,503
12	17	4	4	0,406	0,311
24	18	8	12	1,066	0,791
19	19	6	12	0,962	0,72
16	20	6	0	0,245	0,224
5	21	0	16	1,002	0,686
14	22	4	12	0,892	0,639
17	23	6	4	0,482	0,385
10	24	2	16	1,063	0,744
2	25	0	4	0,273	0,185

De acordo com a validação dos resultados pelo método dos mínimos quadrados (PLS), obtiveram-se valores de coeficientes de determinação de 0,9994 e 0,9995 para os dois fármacos nos comprimentos de onda de 238 e 247 nm, respectivamente. Dessa forma, ambos os comprimentos de onda podem ser utilizados para análise de qualquer um dos fármacos em estudos. Optou-se por padronizar as determinações de teor para análise de ezetimiba e sinvastatina em 238 e 247 nm, respectivamente.

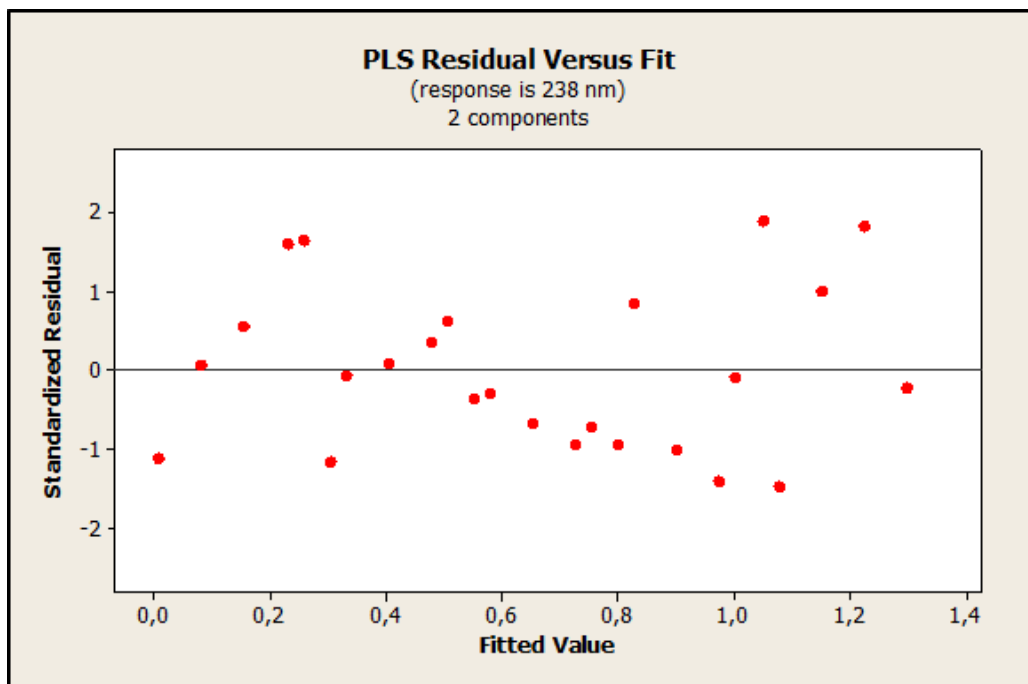
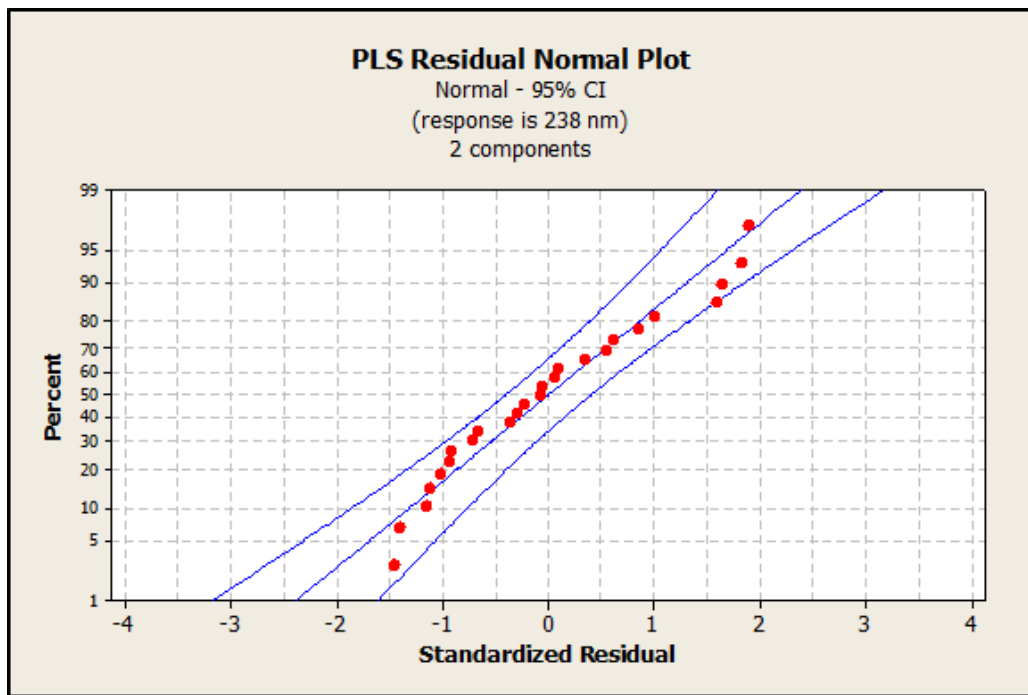


Figura 7. Resultados obtidos a partir da análise do método PLS da mistura de diferentes concentrações de ezetimiba e sinvastatina no comprimento de onda de 238 nm.

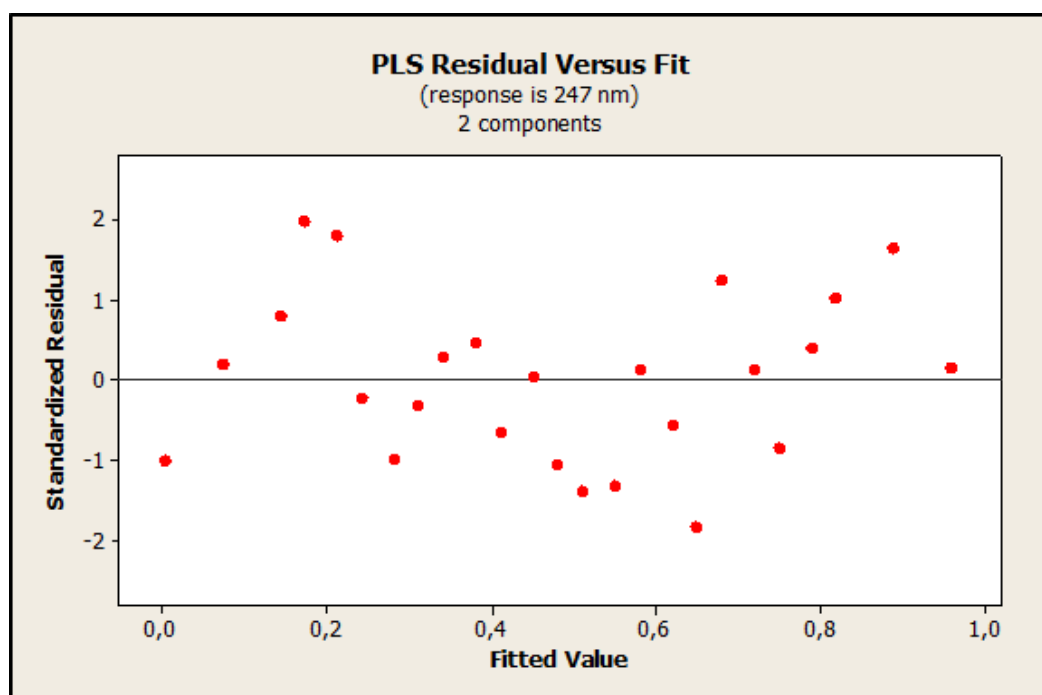
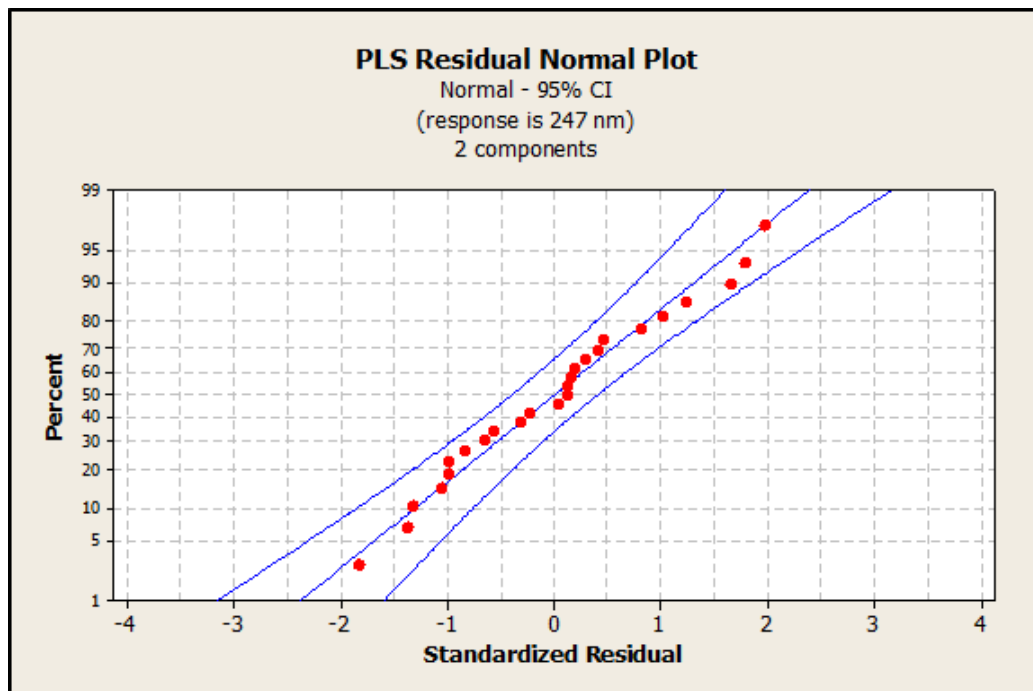


Figura 8. Resultados obtidos a partir da análise do método PLS da mistura de diferentes concentrações de ezetimiba e sinvastatina no comprimento de onda de 247 nm.

Os gráficos anteriores demonstram que todos os valores encontrados dos resíduos padronizados ficaram dentro do intervalo de -2 e 2, com limite de confiança de 95%, sendo assim, podemos ver que não houve grandes disparidades entre os

valores encontrados, significando que não houve desvio de linearidade das concentrações selecionadas de ambos os fármacos. Com isso, podemos comprovar que os comprimentos de onda selecionados estão de acordo com a metodologia desenvolvida, assim como as concentrações definidas para o ensaio.

5.2. Validação

5.2.1. Especificidade

A especificidade pode ser definida como a capacidade de medir especificamente o fármaco na presença de outros componentes, como placebo ou em uma solução contendo impurezas (ICH, 2005). O espectro obtido com a solução placebo pode ser vista abaixo:

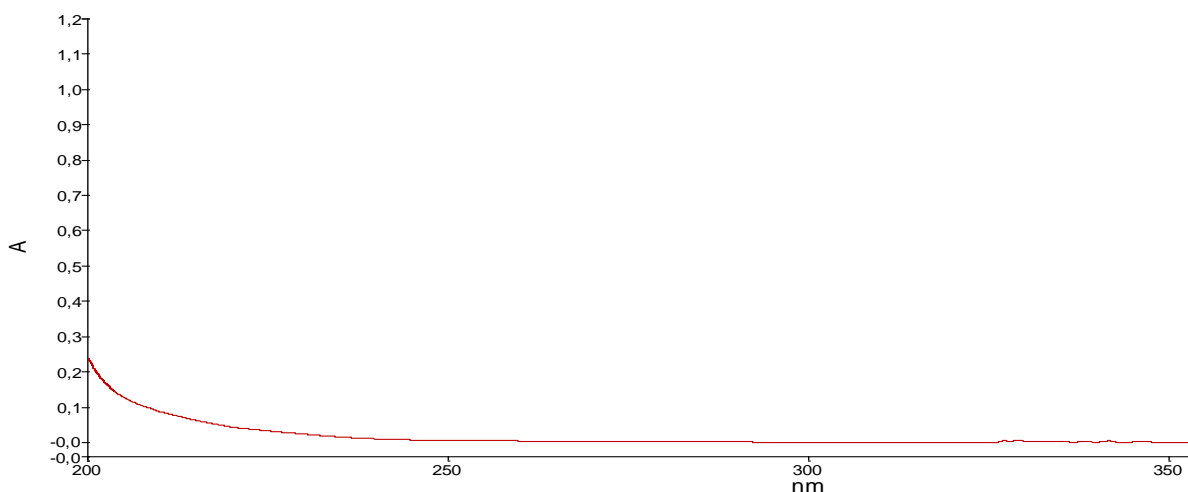


Figura 9. Espectro na região do ultravioleta da solução placebo.

A partir da curva podemos observar que não houve leitura significativa da solução placebo preparada somente com a mistura de excipientes nos comprimentos de onda utilizados durante o estudo. Sendo assim, o método pode ser considerado específico para os fármacos utilizados, demonstrando a não influência dos excipientes nas determinações quantitativas de ambos os fármacos.

5.2.2. Linearidade

A linearidade se refere à capacidade do método de gerar resultados proporcionais em relação à concentração do analito, dentro de uma faixa específica (ICH, 2005). Como descrito, a linearidade foi realizada a partir da média de três curvas em dias consecutivos. Abaixo segue a curva média obtida a partir das leituras da sinvastatina e ezetimiba em conjunto, juntamente com o valor do coeficiente de determinação (R^2) e a equação da reta.

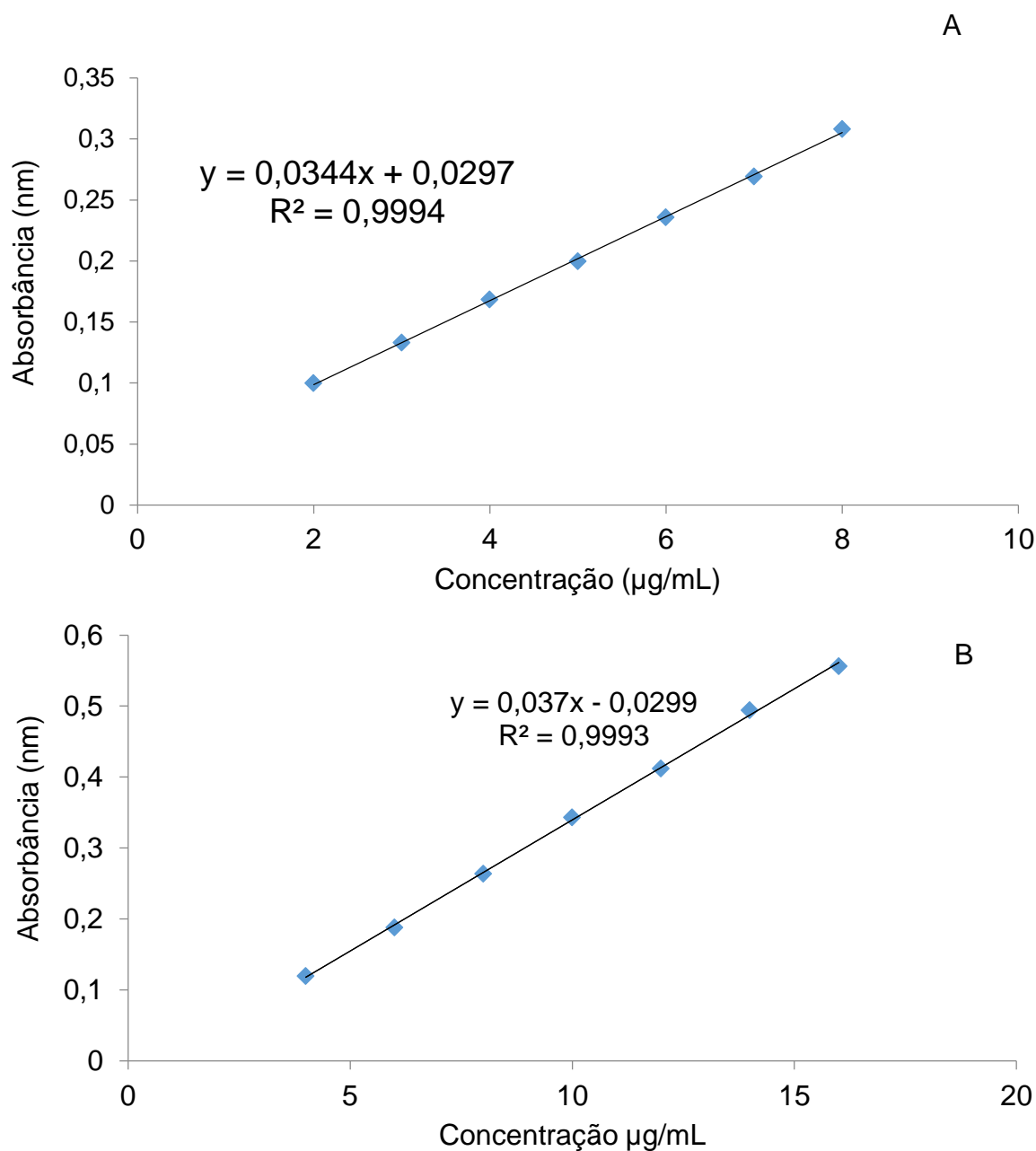


Figura 10. Curva de linearidade do ezetimiba (A) e da sinvastatina (B) obtidos em 238 e 247 nm, respectivamente.

Como podemos observar, os valores de R^2 estão acima de 0,99, como preconizado pela ANVISA. A partir disso, podemos afirmar que o método é linear de 2 a 8 $\mu\text{g/mL}$ para o ezetimiba e 4 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para a sinvastatina.

5.2.3. Precisão

Um parâmetro para analisar a proximidade entre os testes efetuados é a precisão do método analítico. Os valores obtidos com os ensaios de precisão normalmente são expressos como desvio padrão relativo (DPR). Na Tabela 7 abaixo podemos observar os resultados do ensaio de precisão realizado nos três dias para ambos os fármacos.

Tabela 7. Valores encontrados da precisão intradia e intermediária da ezetimiba e sinvastatina.

Ezetimiba				Sinvastatina			
Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Amostras	Dia 1	Dia 2	Dia 3
1	100,25%	103,21%	104,79%	1	100,34%	103,58%	104,51%
2	102,90%	103,72%	101,09%	2	103,69%	104,09%	101,32%
3	99,87%	103,21%	103,01%	3	100,00%	103,58%	103,20%
4	100,76%	104,49%	103,83%	4	100,67%	103,58%	103,76%
5	100,25%	104,36%	104,10%	5	99,16%	104,26%	104,51%
6	98,61%	104,36%	105,75%	6	98,99%	104,43%	105,45%
Média	100,44%	103,89%	103,76%	Média	100,47%	103,92%	103,79%
RSD	1,40%	0,57%	1,54%	RSD	1,69%	0,37%	1,38%
	Média	102,70%			Média	102,73%	
	DPR	1,98%			DPR	1,99%	

Como a ANVISA preconiza que os valores de DPR estejam abaixo de 5% (Brasil, 2003), os valores encontrados da precisão intradia e intermediária foram adequados, comprovando a precisão do método.

5.2.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). O guia ICH recomenda que a exatidão deve ser estabelecida ao longo da faixa de calibração somente depois que a precisão e a linearidade estejam estabelecidas. A partir dos

resultados obtidos na avaliação da linearidade e precisão, realizaram-se os testes de exatidão obtendo os seguintes resultados:

Tabela 8. Valores encontrados no ensaio de exatidão para ambos os fármacos.

Ezetimiba			
Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	DPR	Exatidão
4,0	4,06	0,19%	101,60%
5,0	5,03	0,33%	100,61%
6,0	6,08	0,29%	101,39%
Sinvastatina			
Concentração nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração média encontrada ($\mu\text{g/mL}$)	DPR	Exatidão
8,0	8,25	0,33%	103,16%
10,0	10,15	0,27%	101,56%
12,0	12,29	0,23%	102,49%

Dessa forma, foram obtidos valores de exatidão entre 100,61 e 103,16% e valor máximo de DPR obtido foi de 0,33%. Sendo assim, o método analítico pode ser considerado exato.

5.2.5. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção é definido pela RE 899 de 2003 como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectado, enquanto o limite de quantificação é a menor quantidade de analito presente na amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão. Ambos foram calculados com a fórmula descrita acima, utilizando a equação da reta obtida no estudo da linearidade. Os resultados obtidos para o limite de detecção foram de 0,28 e 0,16 $\mu\text{g/mL}$ para a ezetimiba e sinvastatina, respectivamente. Em relação aos limites de quantificação, os resultados foram 0,93 e 0,53 $\mu\text{g/mL}$ para a ezetimiba e sinvastatina, respectivamente.

5.2.6. Robustez

O ICH define a robustez como a capacidade do método de permanecer inalterado sob pequenas variações no parâmetro do método. De modo geral, esse parâmetro serve para indicar os fatores que podem influenciar a resposta do método

estudado. Após a robustez ser analisada como descrito, os dados obtidos de teor (Tabela 9) foram analisados pelo Minitab, obtendo os gráficos de Pareto apresentados abaixo, onde a figura 10 representa o estudo de robustez da ezetimiba e a 11 da sinvastatina.

Tabela 9. Resultados obtidos através do ensaio de robustez.

Ensaio	Varição do comprimento de onda nominal (nm)	Solvente	Temperatura (°C)	Teor Ezetimiba (%)	Teor Sinvastatina (%)
1	+2	HCl 0.1M	5	96,95	98,92
2	-2	HCl 0.1M	5	100,63	101,89
3	+2	HCl 0.1M	23	101,07	104,10
4	-2	EtOH:H ₂ O	23	102,56	104,64
5	+2	EtOH:H ₂ O	23	102,26	105,68
6	+2	EtOH:H ₂ O	5	100,00	102,05
7	-2	EtOH:H ₂ O	5	104,22	105,04
8	-2	HCl 0.1M	23	104,44	105,46

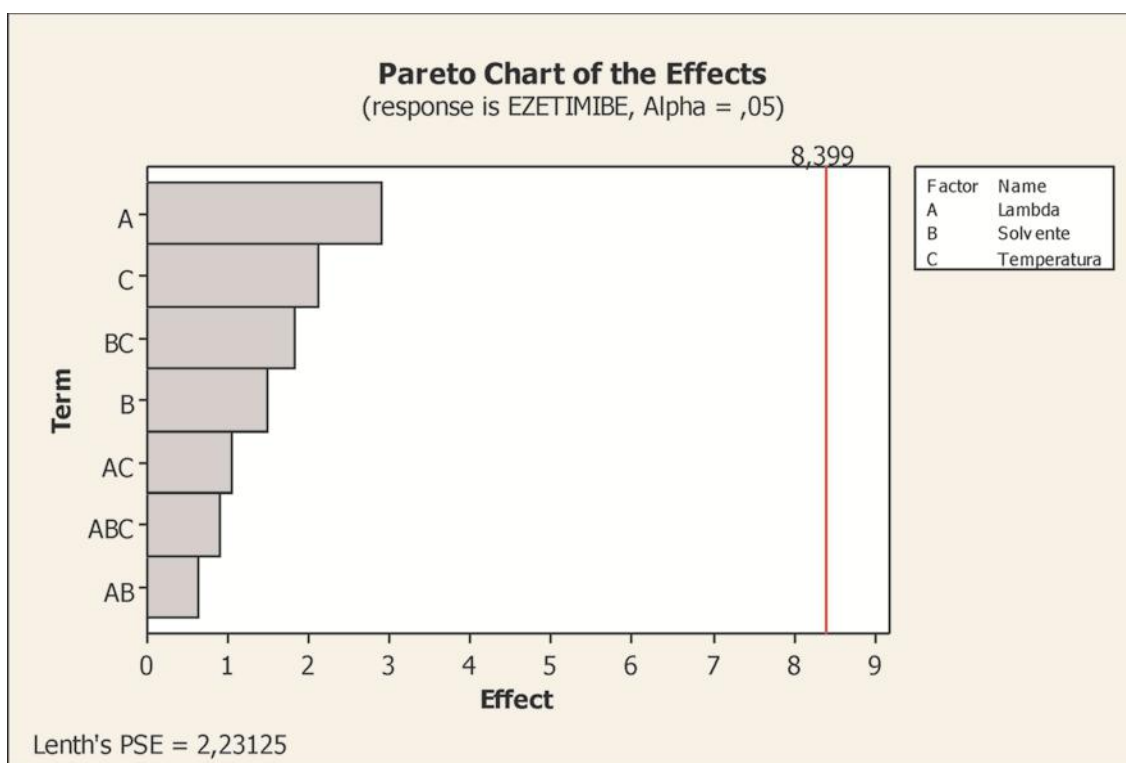


Figura 11. Gráficos de Pareto da ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, para avaliação da robustez.

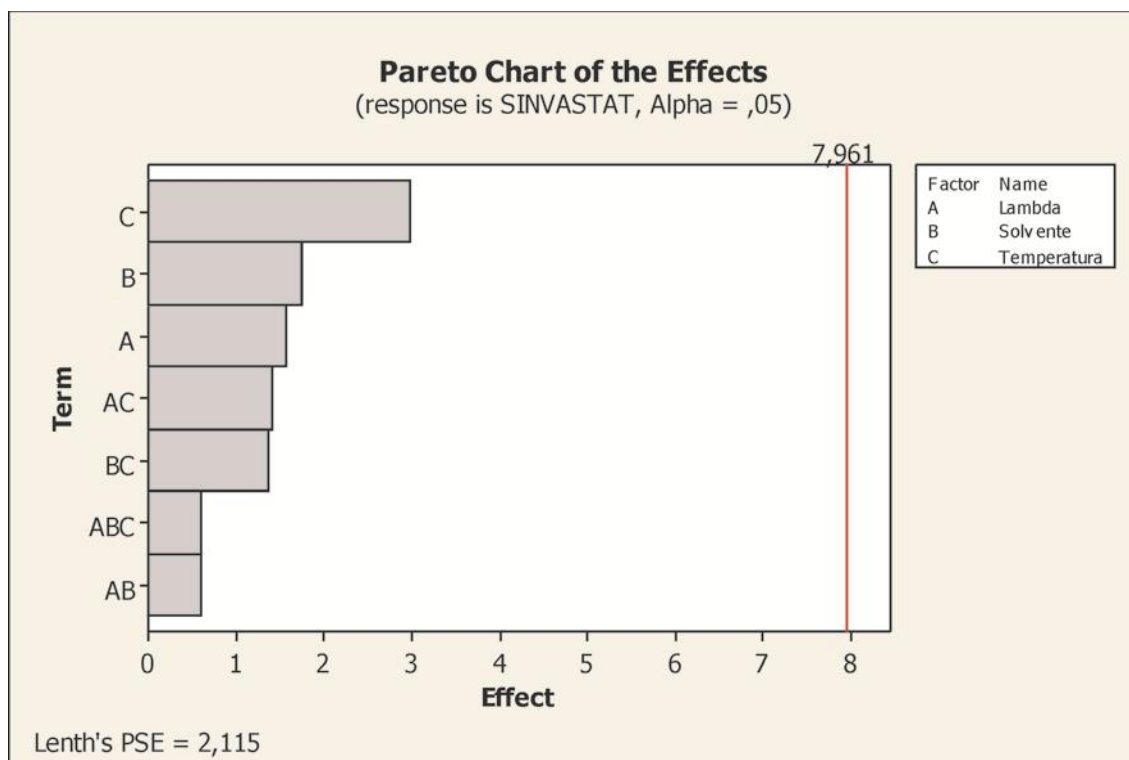


Figura 12. (Cont.) Gráficos de Pareto da ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, para avaliação da robustez.

Como podemos ver nos gráficos, todos os parâmetros alterados não influenciaram significativamente no método desenvolvido, uma vez que a linha vermelha representa o efeito crítico (constante de Lenth), com significância de 95%, sendo que todos os valores resultantes do experimento ficaram abaixo desses valores. A constante de Lenth é definida por cálculos matemáticos feitos pelo software. Portanto, podemos concluir que o método proposto é robusto nas condições testadas.

5.3. Análise das formas farmacêuticas

5.3.1. Teor

O Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira diz que os produtos farmacêuticos devem ter, em geral, de 90 a 110% do princípio ativo declarado no rótulo. A mesma informação ocorre na Farmacopéia Americana, onde diz que a sinvastatina deve estar entre 90 a 110% no medicamento (FB 5, 2010; USP 34, 2011). A análise do teor foi realizada em todas as formas farmacêuticas presentes no estudo, como apresentado na Tabela 10 a seguir:

Tabela 10. Teores encontrados para os medicamentos obtidos em farmácias comerciais e magistrais.

Ensaio	Farmácia A		Farmácia B		Vytorin®		Zetia®	Sinvastacor®
	Eze (%)	Sin (%)	Eze (%)	Sin (%)	Eze (%)	Sin (%)	Eze (%)	Sin (%)
1	105,73	110,65	98,41	100,00	99,03	98,51	100,00	107,32
2	110,21	115,97	97,12	97,99	99,86	100,19	98,95	102,25
3	108,95	113,88	97,41	97,99	104,98	104,47	102,62	109,58

Como podemos observar na tabela acima, as cápsulas da Farmácia A estão com valores acima do esperado tanto para o teor de ezetimiba quanto para a sinvastatina. As cápsulas analisadas da Farmácia B e os comprimidos industrializados estão dentro dos parâmetros preconizados pela FB 5 (2010).

5.3.2. Análise física

5.3.2.1. Determinação do peso médio

Como foi dito anteriormente, foi pesado o conteúdo de 20 cápsulas provenientes das farmácias magistrais e 20 comprimidos de cada medicamento, os resultados estão dispostos na tabela a seguir. Juntamente com a tabela também estão estabelecidos os limites inferiores e superiores para os pesos individuais, uma vez que a Farmacopéia preconiza os limites de variação de acordo com a forma farmacêutica e com o peso médio do medicamento:

Tabela 11. Peso médio obtido dos comprimidos e cápsulas.

Unidades pesadas	Vytorin® (g)	Zetia® (g)	Sinvastacor® (g)	Farmácia 1 (g)	Farmácia 2 (g)
1	0,1949	0,1008	0,2882	0,2403	0,1720
2	0,2001	0,1000	0,2862	0,2371	0,1751
3	0,1953	0,0997	0,2861	0,2340	0,1741
4	0,1985	0,0987	0,2866	0,2325	0,1771
5	0,1989	0,0998	0,2894	0,2476	0,1710
6	0,1968	0,1004	0,2894	0,2379	0,1638
7	0,1973	0,0995	0,2866	0,2379	0,1687
8	0,1963	0,1005	0,2859	0,2402	0,1769
9	0,1994	0,0998	0,2859	0,2470	0,1783
10	0,1974	0,1012	0,2852	0,2394	0,1713
11	0,1971	0,0998	0,2887	0,2365	0,1658
12	0,1966	0,0986	0,2882	0,2395	0,1703
13	0,2022	0,0998	0,2828	0,2420	0,1649
14	0,2005	0,1003	0,2902	0,2400	0,1690
15	0,2057	0,0989	0,2897	0,2450	0,1698
16	0,2009	0,1002	0,2889	0,2452	0,1725
17	0,2001	0,0992	0,2905	0,2390	0,1708
18	0,2019	0,0998	0,2843	0,2385	0,1705
19	0,2023	0,0985	0,2858	0,2369	0,1694
20	0,2014	0,0986	0,2884	0,2470	0,1711
Peso médio	0,1992	0,0997	0,2874	0,2402	0,1711
Limite inferior	0,1843	0,0922	0,2730	0,2162	0,1540
Limite superior	0,2142	0,1071	0,3017	0,2642	0,1882

Analisando os dados, podemos relatar que todas as cápsulas e comprimidos estão dentro dos limites preconizados pela Farmacopéia Brasileira (FB 5, 2010).

5.3.2.2. Teste de dureza

Esse teste permite determinar a resistência dos comprimidos ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. A dureza de um comprimido é inversamente proporcional à sua porosidade e proporcional à força de compressão. Esse teste é apenas um informativo. Sendo assim, com ele não é possível reprovar um medicamento (FB, 2010). Abaixo segue a tabela com os resultados dos comprimidos:

Tabela 12. Dureza obtida com os comprimidos.

Unidades	Vytorin® (N)	Zetia® (N)	Sinvastacor® (N)
1	57,8	51,0	140,1
2	58,8	46,1	123,5
3	58,8	47,0	130,3
4	62,7	51,0	124,5
5	59,8	50,0	130,3
6	57,8	46,1	118,6
7	68,6	39,2	127,4
8	61,7	47,0	125,0
9	57,8	47,0	126,2
10	59,8	50,0	127,0
Média	60,36	47,44	127,29
DPR (%)	5,53	7,39	4,43

5.3.2.3. Teste de friabilidade

O teste de friabilidade tem como importância determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando os mesmos são submetidos a ações mecânicas. Como esse teste não se aplica a comprimidos revestidos, ele foi realizado somente com o Vytorin® e Zetia® (mg), pois o Sinvastacor® trata-se de um comprimido revestido. Abaixo, segue a tabela com os dados de friabilidade dos comprimidos e também o limite de perda permitido pela Farmacopéia, uma vez que a mesma preconiza que a perda máxima seja de 1,5% (FB 5, 2010).

Tabela 13. Resultados dos testes de friabilidade com comprimidos não revestidos.

	Vytorin®	Zetia®
Peso médio inicial (mg)	199,185	99,7
Limite máximo de peso médio final (mg)	196,197	98,2
Peso médio final (mg)	199,015	99,6
Variação da massa (%)	0,0853	0,9989

Como podemos ver na Tabela 13, ambos os medicamentos estão dentro do limite preconizado pela Farmacopéia Brasileira e nenhum comprimido apresentou rachaduras ou estava partido.

5.3.2.4. Teste de desintegração

Esse teste permite saber se os comprimidos e cápsulas se desintegram dentro do tempo limite especificado. Os comprimidos revestidos com filme, como o Sinvastacor®, é de 30 minutos, assim como os comprimidos não revestidos. As cápsulas têm tempo limite de 45 minutos (FB 5, 2010). No teste realizado todos os medicamentos foram completamente desintegrados em até 15 minutos, sendo assim, todos os medicamentos foram aprovados nesse parâmetro.

	Farmácia A	Farmácia B	Sinvastacor®	Zetia®	Vytorin®
Tempo de dissolução (min)	7	10	10	12	12
Tempo máximo permitido (min)	45	45	30	30	30

6. Conclusão

A partir do desenvolvimento de um método espectrofotométrico para análise simultânea de dois fármacos utilizando o método dos mínimos quadrados parciais, pode-se definir a faixa de concentração de trabalho e os comprimentos de ondas. O desenvolvimento desta validação foi importante visto a dificuldade de se avaliar a presença de dois fármacos simultaneamente em uma metodologia não separatista, como o UV. Com essas informações foi realizada a validação da metodologia seguindo os compêndios oficiais. Ao analisarmos os valores obtidos com a validação podemos ver que o método está adequado, uma vez que ele é específico para os fármacos em estudo, é linear dentro da faixa de concentração utilizada, é preciso, exato e robusto. O método respondeu adequadamente aos reagentes utilizados, sendo assim, foi visto que não é necessário o uso de solventes tóxicos. A metodologia foi desenvolvida de modo satisfatório com as ferramentas matemáticas propostas. Em relação ao estudo de controle de qualidade, todos os medicamentos estavam conforme os parâmetros de friabilidade, peso médio e desintegração. Porém uma das farmácias estudadas obteve o teor acima de 110% para os dois fármacos, teor acima do limite preconizado pela Farmacopéia Brasileira para o valor declarado no rótulo. Dessa forma, este trabalho contribui para o desenvolvimento técnico-científico das ciências farmacêuticas, proporcionando o desenvolvimento de metodologia analítica inovadora que pode ser aplicado para análise de rotina de formulações contendo ezetimiba e sinvastatina. Além disso, este estudo pode contribuir para garantir produtos farmacêuticos oficiais e magistrais com qualidade, segurança e eficácia terapêutica.

7. Referências Bibliográficas

ABIDO, A.; KNORST, M. T. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, R, v. 95, n. 1, p.529-600, 2014.

ARAÚJO, R. G.; CASELLA FILHO, A.; CHAGAS, A. C. P.. Ezetimiba - farmacocinética e terapêutica. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 85, n. 5, p.20-24, out. 2005.

ASHFAQ, M.; ULLAHKHAN, I.; QUTAB, S. S.; NAEEMRAZZAQ, S. HPLC Determination of Ezetimibe and Simvastatin in Pharmaceutical Formulations. **Journal Of The Chilean Chemical Society**, Concepción, v. 52, n. 3, p.1220-1223, set. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira**. 2ª ed. Brasília: ANVISA, 2012.

BRASIL. RE nº 899, de 2003. **Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**.

DEPARTAMENTO DE ATEROSCLEROSE DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p.01-13, out. 2013.

DIXIT, R. P.; BARHATE, C. R.; NAGARSENKER, M. S.. Stability-Indicating HPTLC Method for Simultaneous Determination of Ezetimibe and Simvastatin. **Chromatographia**, v. 67, n. 1-2, p.101-107, jan. 2008.

ESTADOS UNIDOS. United States Pharmacopeial Convention. **United States pharmacopeia, the national formulary**. United States Pharmacopeial Convention, 1985.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p.724-731, 1999.

GABRIELSSON, J.; LINDBERG, N.; LUNDSTEDT, T. Multivariate Methods in Pharmaceutical Applications. **Journal of Chemometrics**, v. 16, n. 3, p.141-160, 2002.

GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-hill Intarmericana do Brasil, 2006

HAIR, J. H. *et al.* **Análise Multivariada de Dados**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009.

ICH. **International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use**: validation of analytical procedures: text and methodology, 2005.

IMRAN, M.; SINGH, R. S. P.; CHANDRAN, S. Stability indicating ultraviolet spectroscopic method for the estimation of ezetimibe and carvedilol. **Pharmazie**, v. 61, n. 9, p.766-769, 2006.

LIMA, B. V.; VILELA, A. F.; ANDRADE, A.. Avaliação da qualidade de comprimidos de ácido ascórbico comercializados nas farmácias de Timóteo – MG. **Farmácia & Ciência**, v. 2, p.01-09, 2011.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 53, n. 5, p.595-607, jul. 2009.

MARKMAN, B. E. O.; ROSA, P. C. P.; KOSCHTSCHAK, M. R. W. Avaliação da qualidade de cápsulas de sinvastatina de farmácias magistrais. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 6, p.1055-1062, dez. 2010.

MONTGOMERY, A. A.; PETERS, T. J.; LITTLE, P.. Design, analysis and presentation of factorial randomised controlled trials. **Bmc Medical Research Methodology**, v. 3, n. 26, 2003.

MULHOLLAND, M. Ruggedness testing in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 10, n. 7, p.383-389, 1988.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 ANOS DE QUIMIOMETRIA NO BRASIL. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1401-1406, 2006.

PEIXOTO, M. M.; JUNIOR, A. F. S.; SANTOS, C. A. A.; JUNIOR, E. C. Avaliação da qualidade de comprimidos de captopril dispensados em feira de Santana - BA. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p.69-73, 2005.

PERALTA-ZAMORA, P.; CORNEJO-PONCE, L.; NAGATA, N.; POPPI, R. J. Alternativas quimiométricas para a resolução de problemas analíticos clássicos. Determinação espectrofotométrica de misturas de zircônio e háfnio. **Química Nova**, v. 5, n. 20, p.469-474, mar. 1997.

PINTO, T. J. A., FERRARINI, M., GATTI, R. M. Proposta de roteiro prático para a validação de métodos analíticos. **Farmácia & Química**, v.36, n.1, p.26-36, 2003.

POLONINI, H. C.; SANTOS, F. C.; VAZ, U. P.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, R. B.; FERREIRA, A. O. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de sinvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 3, p.516-519, jan. 2011.

POZZAN, R.; POZZAN, R.; MAGALHÃES, M. E. C.; BRANDÃO, A. A.; BRANDÃO, A. P. Dislipidemia, Síndrome Metabólica e Risco Cardiovascular. **SOCERJ**, v. 17, n. 2, p.97-104, abr./mai./jun. 2004.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares. 2002. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/dsra/protocolos/do_d07_01.pdf>. Acesso em: 12 out. 2014.

RIBEIRO, A. G.; COTTA, R. M. M.; RIBEIRO, S. M. R. A Promoção da Saúde e a Prevenção Integrada dos Fatores de Risco para Doenças Cardiovasculares. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 1, n. 17, p.7-17, 2012.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 7. ed. R: Pharmaceutical Press, 2012.

SANKAR, G. G.; KUMAR, D. V. S. P.; KRISHNA, M. V.; LATHA, P. V. M. UV Spectrophotometric Determination of Etoricoxib and Ezetimibe. **Asian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 4, p.2812-2814, 2005.

SCHESHOWITSCH, K.; PEREIRA, A.; CRUZ, A. P.; SILVA, M. A. S. Avaliação da Qualidade e Perfil de Dissolução de Cápsulas Manipuladas de Piroxicam. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p.645-651, 2007.

SINGH, S.; SINGH, B.; BAHUGUNA, R.; WADHWA, L.; SAXENA, R. Stress degradation studies on ezetimibe and development of a validated stability-indicating HPLC assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p.1037-1040, 2006.

SISTLA, R.; TATA, V. S.; KASHYAP, Y. V.; CHANDRASEKAR, D.; DIWAN, P. V. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 3-4, p.517-522, 2005.

WANG, L.; ASGHARNEJAD, M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, n. 6, p.1243-1248, jan. 2000.

ZEPON, K. M.; FRATONI, G.; BERNARDI, L. S.; REMOR, K. V. T. Validação de metodologia analítica para doseamento e estudo da equivalência farmacêutica de comprimidos de simvastatina 20 mg. **Revista Eletrônica de Farmácia**, F, v. 10, n. 2, p.43-57, 2013.