

Nelson Mendes Nunes

**Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica do Teor de
Atorvastatina Cálcica em insumo farmacêutico ativo e em comprimidos por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**

PPGVS/INCQS

FIOCRUZ

2010

**Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica do Teor de
Atorvastatina Cálcica em Insumo Farmacêutico Ativo e em Comprimidos por
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.**

Nelson Mendes Nunes

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Orientadora: Dra. Tereza Cristina dos Santos

Rio de Janeiro

2010

Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica do Teor de Atorvastatina Cálcica em Insumo Farmacêutico Ativo e em Comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Nelson Mendes Nunes

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Aprovado:

Prof. _____

Dra. Kátia Christina Leandro (FIOCRUZ)

Prof. _____

Dra. Gláucia Barbosa Cândido Alves Slana (FIOCRUZ)

Prof. _____

Dra. Sheila Garcia (UFRJ)

Orientadora:

Prof. _____

Dra. Tereza Cristina dos Santos

Nunes, Nelson Mendes

Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica do Teor de Atorvastatina Cálcica em Insumo Farmacêutico Ativo e em Comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/ Nelson Mendes Nunes. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2010.

xviii, 75 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010. Orientador: Tereza Cristina dos Santos.

1. Atorvastatina 2. Cromatografia líquida de alta eficiência
3. Validação 4. Insumo farmacêutico ativo 5. Comprimidos.
I. Título.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Nelson (*in memoriam*) e Antonia pela dedicação, amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Tereza Cristina dos Santos, por aceitar orientar-me e pelo tempo dedicado a isto.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento e Validação Analítica de Farmanguinhos, especialmente a Laís Bastos da Fonseca, pela disposição em ajudar-me, com seu conhecimento e experiência, nos momentos em que precisei.

À Profa. Kátia Christina Leandro pelas orientações fornecidas na avaliação deste trabalho.

À minha mãe pela paciência e compreensão nos momentos difíceis durante a realização deste trabalho e pelo seu amor incondicional.

RESUMO

As estatinas são substâncias capazes de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol sanguíneo, o qual é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da arteriosclerose e das doenças coronarianas. Atualmente, representam a maior causa de óbitos no mundo ocidental e o tratamento de escolha para reduzir as taxas de colesterol consiste no emprego de estatinas, por serem estas mais seguras e eficazes, especialmente a atorvastatina.

Diminuir os riscos associados à utilização de medicamentos é uma das atribuições da Vigilância Sanitária e pode ser realizada por meio do monitoramento do controle de qualidade dos produtos comercializados.

Os Laboratórios Centrais (LACENS) são responsáveis por esta ação e, através do emprego de metodologias capazes de gerar resultados confiáveis, são capazes de fornecer o suporte adequado às decisões da Vigilância Sanitária. A validação, por sua vez, torna evidente a capacidade de uma metodologia fornecer resultados seguros e confiáveis.

A maioria das técnicas descritas na literatura para o doseamento da atorvastatina não são adequadas à rotina dos laboratórios de controle de qualidade. Até o momento, não estão disponíveis em compêndios oficiais metodologias analíticas para o monitoramento da qualidade da atorvastatina, seja como insumo farmacêutico ativo ou comprimidos.

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma técnica analítica para o doseamento de atorvastatina, enquanto insumo farmacêutico ativo e comprimidos de 40 mg. O método proposto empregou coluna cromatográfica Novapak[®] C18 (150 x 3,9 mm; 4µm) e fase móvel constituída de uma mistura de tampão acetato de amônio 0,02 M (ajustado a pH 3,0) e acetonitrila (60:40 %v/v). O fluxo empregado foi de 1,3 mL.min⁻¹ e detecção UV/VIS a 248 nm.

A metodologia apresentou especificidade, linearidade na faixa de 50-150 µg.mL⁻¹ ($R \approx 0,999$), precisão e exatidão satisfatórios.

ABSTRACT

Statins are substances that are able to reducing cholesterol blood levels which are considered one of most important risk factor for the arteriosclerosis and coronary heart disease. Actually, they represent the main cause of deaths in the West World and the therapy of choice for reducing the cholesterol rates is based on the use of statins, specially Atorvastatin.

Lowering the risks associated to drug using is one of the Sanitary Surveillance attributions and it can be realized through the monitoring of commercialized products control quality.

The Central Laboratories (LACENs) are responsible for this action and, toward the employment of analytical methodologies capable to generate reliable results, are able to provide the appropriate support to the Sanitary Surveillance decisions. Validation, on your turn, makes evident the analytical methodology capability in providing reliable and safe results in accordance to parameters established by regulatory authorities.

The most of techniques described on literature for the quantification of Atorvastatin is applied to biological samples and they are not suitable for routine pharmaceutical quality control laboratory analysis. Moreover, there's no analytical methodology described on official formularies for the Atorvastatin quality assessment, active pharmaceutical ingredient or finished product.

The aim of this study is to develop and validate an analytical methodology for the quantification of Atorvastatin in active pharmaceutical ingredient and 40 mg-formulated product (tablets).

The proposed method employed a Novapak[®] C18 column (150 x 3,9 mm; 4 μ m), mistura de 0,02 M ammonium acetate buffer: acetonitrile(60:40 %v/v) adjusted to pH 3,0, with glacial acetic acid as mobile phase at a flow rate of 1.3 mL⁻¹ and a 248 nm detection.

The method was selective, linear over the concentration range of 50-150 μ g.mL⁻¹ ($R \approx 0,999$) and showed satisfactory precision and accuracy.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[α] – rotação específica

4S – *Scandinavian Simvastatin Survival Study*

a – coeficiente linear

AFCAPS/TexCAPS – *Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*

ANOVA – *Analysis of Variance* ou análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b – coeficiente angular

$C_{\text{calculado}}$ – C estatístico calculado (Teste de Cochran)

C_{tabelado} – C estatístico tabelado (Teste de Cochran)

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNSP – Departamento Nacional de Saúde Pública

DP – Desvio-padrão

DPR – Desvio padrão relativo

$F_{\text{calculado}}$ – F estatístico de Snedecor (Teste de F de Snedecor)

F_{tabelado} – F estatístico tabelado (Teste de F de Snedecor)

FDA – *Food and Drug Administration*

gl – Graus de liberdade

H_0 – Hipótese nula

H – Hipótese alternativa

HF – Hipercolesterolemia Familiar

HIV – *Human Immunodeficiency virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana

HMG-CoA – Hidroximetilglutaril coenzima A

IC – Intervalo de Confiança

IPs – Inibidores de protease

k' – fator de capacidade

LDL – *Low Density Lipoprotein*

mol.L^{-1} – molaridade

MQ – Média quadrática

N – Números de pratos teóricos

P.A. – para análise

pH – Potencial Hidrogeniônico

r – coeficiente de correlação

R – resolução (cromatografia)

R^2 – coeficiente de determinação

SNVS – Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

T – Fator de cauda ou assimetria

TR – Tempo de retenção

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*

USP – *United States Pharmacopeia*

UV/VIS – ultravioleta/visível

v/v – volume por volume

WOSCOPS – *West of Scotland Coronary Prevention Study*

FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas HMG-CoA e Mevastatina - forma ácida	4
Figura 2 – Estruturas químicas Mevastatina e Lovastatina	4
Figura 3 – Estrutura química da atorvastatina.....	5
Figura 4 – Representação esquamática do metabolismo da atorvastatina	7
Figura 5 – Biossíntese do colesterol	8
Figura 6 – Tipos de cromatografia.....	15
Figura 7 – Equipamento de CLAE.....	16
Figura 8 – Cromatograma obtido da solução padrão 0,1 mg.mL ⁻¹	36
Figura 9 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse com HCl 1M a 80 °C por 2h	37
Figura 10 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse com NaOH 1M a 80 °C por 2h	38
Figura 11 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse com H ₂ O ₂ 3% a 80 °C por 2h.....	38
Figura 12 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse a 80 °C por 2h.....	39
Figura 13 – Espectro de massas obtido para o sinal cromatográfico referente ao produto de degradação formado	40
Figura 14 – Cromatograma obtido da solução padrão (0,1 mg.mL ⁻¹).....	52
Figura 15 – Amostra de Lipitor [®] 40 mg, submetida a estresse com HCl 1M a 80 °C por 2h	53
Figura 16 – Amostra de Lipitor [®] 40 mg, submetida a estresse com NaOH 1M a 80 °C por 2h.....	54
Figura 17 – Amostra de Lipitor [®] 40 mg, submetida a estresse com H ₂ O ₂ 3% a 80 °C por 2h	54
Figura 18 – Amostra de Lipitor [®] 40 mg, submetida a estresse a 80 °C por 2h.....	55

TABELAS

Tabela 1 – Evolução histórica do desenvolvimento das estatinas.....	5
Tabela 2 – Classificação das metodologias analíticas	13
Tabela 3 – Ensaio necessários para a valiação, segundo a categoria	14
Tabela 4 – Parâmetros Cromatográficos das Metodologias Descritas na Literatura.	18
Tabela 6 – Preparações das soluções para a avaliação da linearidade.....	25
Tabela 7 – Pesagem de amostras para estudos de exatidão do método.....	26
Tabela 8 – Condições empregadas no teste de estresse	30
Tabela 9 – Preparações das soluções para a avaliação da linearidade.....	31
Tabela 10 – Pesagem de amostras para estudos de exatidão do método.....	33
Tabela 11 – Resultado para o teste de adequação do sistema para o método de análise do teor de Atorvastatina	37
Tabela 12 – Índices de pureza de sinal obtidos no teste de estresse	39
Tabela 13 – Resultados obtidos para a avaliação da linearidade	41
Tabela 14 – Dados para a verificação da homocedasticidade do método	42
Tabela 15 – Confirmação da linearidade por ANOVA	44
Tabela 16 – Dados para o cálculo do intervalo de confiança dos coeficientes da reta	44
Tabela 17 – Resíduos obtidos.....	45
Tabela 18 – Resultados da Exatidão (percentual recuperado).....	46
Tabela 19 – Resultados obtidos para a avaliação da repetitividade.....	47
Tabela 20 – Resultados da avaliação de precisão intermediária	48
Tabela 21 – Resultados do teste F de Snedecor entre os analistas 1 e 2	48
Tabela 22 – Resultados obtidos no ensaio de robustez.....	49
Tabela 23 – Resultados de ANOVA do ensaio de robustez.....	50
Tabela 24 – Áreas obtidas em diferentes períodos de tempo - estabilidade.....	51
Tabela 25 – Cálculo da ANOVA - estabilidade.....	51
Tabela 26 – Resultado para o teste de adequação do sistema para o método de análise do teor de Atorvastatina em Comprimidos de 40 mg	53
Tabela 27 – Índices de pureza de sinal obtidos no teste de estresse	55
Tabela 28 – Resultados obtidos para a avaliação da linearidade	56
Tabela 29 – Dados para a verificação da homocedasticidade do método	57

Tabela 30 – Confirmação da linearidade por ANOVA	59
Tabela 31 – Dados para o cálculo do intervalo de confiança dos coeficientes da reta	59
Tabela 32 – Resíduos obtidos.....	60
Tabela 33 – Resultados da Exatidão (percentual recuperado).....	61
Tabela 34 – Resultados obtidos para a avaliação da repetitividade.....	62
Tabela 35 – Resultados da avaliação de precisão intermediária	63
Tabela 36 – Resultados do teste F de Snedecor entre os analistas 1 e 2	64
Tabela 37 – Resultados obtidos no ensaio de robustez.....	64
Tabela 38 – Resultados de ANOVA do ensaio de robustez.....	65

QUADROS

Quadro 1 – Planejamento dos experimentos	27
--	----

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Espectro de varredura da solução padrão atorvastatina 0,02 mg.mL ⁻¹ ...	36
Gráfico 2 – Curva Analítica.....	43
Gráfico 3 – Plotagem de resíduos da Curva Analítica apresentada no Gráfico 2.....	45
Gráfico 4 – Plotagem de ajuste de linha.....	46
Gráfico 5 – Espectro de varredura da solução padrão atorvastatina 0,02 mg.mL ⁻¹ ...	52
Gráfico 6 – Curva Analítica.....	58
Gráfico 7 – Plotagem de resíduos da Curva Analítica apresentada no Gráfico 6.....	60
Gráfico 8 – Plotagem de ajuste de linha.....	61

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1	Apresentação.....	1
1.2	Histórico das Estatinas	3
1.3	Atorvastatina.....	6
1.3.1	Propriedades Físico-químicas	6
1.3.2	Propriedades Farmacocinéticas	6
1.3.3	Propriedades Farmacodinâmicas	7
1.4	Um Breve Histórico da Vigilância Sanitária.....	8
1.5	O papel dos Laboratórios Analíticos na Vigilância Sanitária.....	10
1.6	Validação	11
1.6.1	Especificidade e seletividade.....	12
1.6.2	Linearidade.....	12
1.6.3	Intervalo	12
1.6.4	Precisão.....	12
1.6.5	Limite de Detecção	12
1.6.6	Limite de Quantificação	13
1.6.7	Exatidão.....	13
1.6.8	Robustez.....	13
1.7	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	14
1.8	Metodologias analíticas descritas na literatura	16
2.	Objetivos	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos.....	20
3.	Metodologia.....	20
3.1	Materiais	20
3.1.1.	Reagentes e solventes	20
3.1.2.	Substâncias e Materiais de Referência.....	21
3.1.3.	Instrumental Analítico e Equipamentos.....	21
3.2	Metodologia analítica para doseamento de atorvastatina cálcica.....	21
3.2.1.	Condições Cromatográficas.....	21
3.2.2.	Preparo da solução tampão de acetato de amônio 0,02 mol.L ⁻¹ pH 3,0	22
3.2.3.	Preparo da Fase móvel.....	22

3.2.4. Preparo da solução padrão (0,1 mg.mL ⁻¹)	22
3.2.5. Preparo da solução amostra (0,1 mg.mL ⁻¹)	22
3.2.6. Procedimento.....	22
3.3 Protocolo de Validação da Metodologia Analítica para o Insumo Farmacêutico Ativo.....	23
3.3.1. Avaliação da Especificidade	23
3.3.2. Avaliação de Linearidade.....	24
3.3.3. Avaliação de Exatidão	25
3.3.3.1. Preparo da solução padrão	25
3.3.3.2. Cálculo da taxa de recuperação (%)	25
3.3.4. Avaliação da Precisão	26
3.3.4.1. Repetitividade.....	26
3.3.4.1.1. Preparo da solução padrão.....	26
3.3.4.1.2. Preparo da solução amostra.....	26
3.3.4.2. Precisão Intermediária.....	27
3.3.5. Avaliação da robustez.....	27
3.3.5.1. Preparo da solução padrão	27
3.3.5.2. Preparo da solução amostra	27
3.3.6. Estabilidade da solução padrão.....	28
3.4 Protocolo de Validação da Metodologia Analítica para Comprimidos de 40mg	29
3.4.1. Avaliação da Especificidade	29
3.4.2. Avaliação de Linearidade.....	30
3.4.3. Avaliação de Exatidão	31
3.4.3.1. Determinação da concentração original	31
3.4.3.2. Fortificação da amostra de Lipitor [®] 40 mg.....	32
3.4.4. Avaliação da Precisão	33
3.4.4.1. Repetitividade.....	33
3.4.4.1.1. Preparo da solução padrão.....	33
3.4.4.1.2. Preparo da solução amostra.....	33
3.4.4.2. Precisão Intermediária.....	34
3.4.5. Avaliação da robustez.....	34
3.4.5.1. Preparo da solução padrão	34
3.4.5.2. Preparo da solução amostra	34
4. Resultados e Discussão.....	35

4.1	Metodologia de Teor para Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)	35
4.1.1.	Adequação do sistema	36
4.1.2.	Especificidade	37
4.1.3.	Linearidade	41
4.1.4.	Exatidão	46
4.1.5.	Precisão	47
4.1.5.1.	Repetitividade	47
4.1.5.2.	Precisão Intermediária	47
4.1.6.	Robustez	49
4.1.7.	Estabilidade da solução padrão	50
4.2	Metodologia de Teor para Comprimidos de 40 mg	51
4.2.1	Adequação do sistema	53
4.2.2	Especificidade	53
4.2.3	Linearidade	56
4.2.4	Exatidão	61
4.2.5	Precisão	62
4.2.5.1.	Repetitividade	62
4.2.5.2.	Precisão Intermediária	63
4.2.6	Robustez	64
4.3	Comparação entre o método proposto e o método de melhor desempenho encontrado na literatura	66
5.	Conclusão	67
6.	Referências	69

1. Introdução

1.1 Apresentação

A arteriosclerose é a maior causa de doenças cardíacas coronarianas e infarto do miocárdio e, por sua vez, as doenças cardiovasculares a maior causa de óbitos no mundo ocidental. No Brasil, representam uma expressiva taxa de morbidade e mortalidade – 32% de todas as mortes no País, em 2002 (ARAÚJO et al., 2007; LENNERNÄS, 2003).

É importante ressaltar que, entre outros fatores, as altas taxas de LDL constituem fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LIMA e GLANER, 2006).

Ademais, o aumento da participação das doenças cardiovasculares para o total dos óbitos ocorridos, entre 1930 e 1999, caracteriza a evidente mudança nos padrões de morbimortalidade na população brasileira e reflete a importância do tema para a agenda da saúde pública (CARMO, 2003).

Estudos clínicos em larga escala como, por exemplo, o *West of Scotland Coronary Prevention Study* (WOSCOPS), *Scandinavian Simvastatin Survival Study* (4S) e o *Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study* (AFCAPS/TexCAPS) demonstraram que as estatinas reduzem de maneira substancial a mortalidade e a morbidade relacionadas a eventos cardiovasculares em pacientes portadores ou não de doenças cardiovasculares (DOWNS et al., 1998; SHEPERD et al., 1995; SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1994).

Atualmente, são os agentes terapêuticos mais eficazes para promover a redução dos níveis plasmáticos de colesterol, sendo bem tolerados pelos pacientes. Estudos angiográficos demonstraram que tais substâncias são capazes de reduzir a progressão e podem induzir a regressão da arteriosclerose (STANCU e SIMA, 2001).

A questão das dislipidemias tem ainda notória importância para um restrito grupo de pacientes.

As anormalidades no metabolismo lipídico são comuns em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, em inglês). Desta maneira, possuem uma maior tendência a apresentarem eventos cardiovasculares.

Isto se deve a dislipidemia causada pelo tratamento com medicamentos antirretrovirais, especialmente os inibidores de protease (IPs). Na classe das estatinas, se ressalta o papel da atorvastatina para tratamento deste grupo por seu histórico de segurança com uso concomitante de IPs (SOLER et al., 2006).

Dentro da classe das estatinas, como a lovastatina e sinvastatina, a atorvastatina é o derivado com maior eficácia terapêutica. Foi demonstrado que ocorre uma maior redução nos níveis de LDL e de triglicérides quando comparado às outras estatinas (40-60% *versus* 25-35% e 26,5-46,8% *versus* 4-19%, respectivamente) (MALINOWSKI, 1998).

Estudos clínicos multicêntricos realizados na Coreia do Sul e no Japão evidenciaram que não há diferença significativa entre os efeitos da pitavastatina, aprovada pelo FDA em 2009, e atorvastatina (YOKOTE et al., 2008; LEE et al., 2007).

No Brasil, a primeira estatina a entrar no mercado foi a lovastatina (1988), seguida pela sinvastatina (1990), pravastatina (1991), fluvastatina (1995), atorvastatina e cerivastatina (1998) e rosuvastatina (2004). Destas, somente a atorvastatina e a rosuvastatina estão sob proteção patentária.

Importante ressaltar também que apesar de todas as estatinas disponíveis no Brasil possuírem a mesma indicação terapêutica, o gasto do Sistema Único de Saúde (SUS) para a aquisição de atorvastatina representa quase todo o recurso fornecido ao setor público para a compra de tais medicamentos. Dados referentes ao período entre julho/2008 e junho/2009 mostram que foram gastos R\$ 92 milhões com a compra destes medicamentos, sendo 96% somente com a atorvastatina (BRASIL, 2010).

A patente do medicamento Lipitor[®] (atorvastatina), do fabricante Pfizer, irá expirar em dezembro de 2010, se a decisão do Tribunal Regional Federal for mantida a favor da multinacional. O Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) já recorreu contra a decisão sobre a ação anterior questionando a concessão da extensão da proteção, alegando que a mesma deveria ter expirado em 29 de julho de 2009.

Em 2008, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Medicamentos Genéricos, este medicamento vendeu mais de 1,3 milhão de unidades, correspondendo a um faturamento de R\$ 136 milhões. No ranking do faturamento da indústria farmacêutica nacional, o Lipitor® ocupa o 3º lugar entre os 20 mais rentáveis (NEUMAM, 2010).

Para o SUS, a queda da patente representa uma enorme economia para o setor público.

No campo das ações da vigilância sanitária, é de fundamental importância, para as atividades de monitoramento e fiscalização de produtos pelos LACENs, dispor de métodos analíticos capazes de gerar resultados seguros que possam respaldar adequadamente as decisões decorrentes de intervenções sanitárias.

Fornecer resultados confiáveis somente é possível através da utilização de metodologias analíticas validadas.

Estas instituições devem empregar as chamadas monografias oficiais, as quais estão descritas em compêndios oficiais, tais como a Farmacopéia Brasileira e a USP. Porém, tais documentos não estão disponíveis para a avaliação da atorvastatina cálcica, enquanto insumo farmacêutico ativo e comprimidos.

1.2 Histórico das Estatinas

A partir dos anos 70, em função da ausência de fármacos hipocolesterolemiantes adequados, pesquisadores iniciaram o desenvolvimento de inibidores da Hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) de origem microbiana (ENDO, 1992).

A mevastatina foi o primeiro composto ativo isolado a partir de uma cultura de *Penicillium citrinum*.

Em 1973, sua estrutura foi completamente elucidada e evidenciada a semelhança estrutural com o substrato da enzima HMG-CoA redutase (HMG-CoA), o que reforça a hipótese de ser o grupamento lactona desta molécula a porção que se liga ao sítio ativo da enzima (ENDO, 1992), ver figura 1.

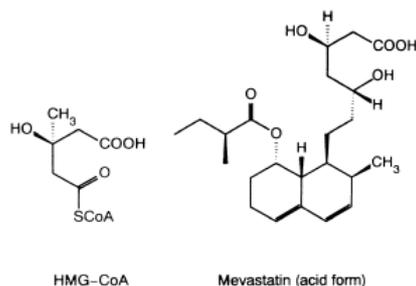


Figura 1 – Estruturas químicas HMG-CoA e mevastatina - forma ácida
(ENDO, 1992)

Em meados de 1980, estudos clínicos realizados com a mevastatina envolvendo seres humanos foram suspensos em função de efeitos tóxicos causados em cães.

Apesar disto, o desenvolvimento de inibidores da HMG-CoA redutase, a partir da década de 80, foi acelerado significativamente. O primeiro destes, a lovastatina, é um análogo da mevastatina isolada por pesquisadores do grupo Merck. As estruturas químicas destes compostos estão representadas na Figura 2.

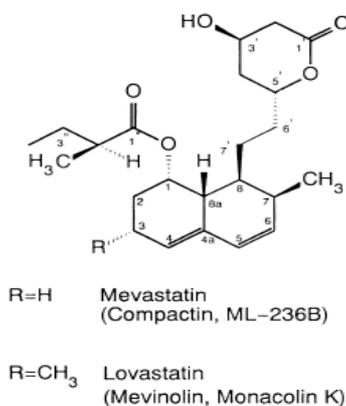


Figura 2 – Estruturas químicas mevastatina e lovastatina (ENDO, 1992)

A síntese de novos agentes hipocolesterolemiantes foi baseada na substituição do anel decalínico funcionalizado por diversos núcleos aromáticos e heteroaromáticos, como fluvastatina (indol), cerivastatina (piridina), atorvastatina (pirrol) e rosuvastatina (pirimidina) (CAMPO e CARVALHO, 2007), como mostra a Tabela 1. A Figura 3 representa a estrutura química da atorvastatina.

Tabela 1 – Evolução histórica do desenvolvimento das estatinas

ANO	
1976	Pesquisadores isolaram a <u>mevastatina</u> (ML-236B) a partir de cultura de <i>Penicillium citrinum</i>
1978	Pesquisadores isolaram a <u>lovastatina</u> a partir de cultura de <i>Aspergillus terreus</i>
1987	Aprovação da <u>lovastatina</u> (Mevacor [®]) pelo FDA
1991	Aprovação da <u>sinvastatina</u> (Zocor [®]) pelo FDA
1993	Aprovação da <u>fluvastatina</u> (Lescol [®]) pelo FDA
1996	Aprovação da <u>atorvastatina</u> (Lipitor [®]) pelo FDA
1997	Aprovação da <u>cerivastatina</u> (Baycol [®]) pelo FDA
2001	Retirada da <u>cerivastatina</u> do mercado
2003	Aprovação da <u>rosuvastatina</u> (Crestor [®]) pelo FDA
2009	Aprovação da <u>pitavastatina</u> (Livalo [®]) pelo FDA

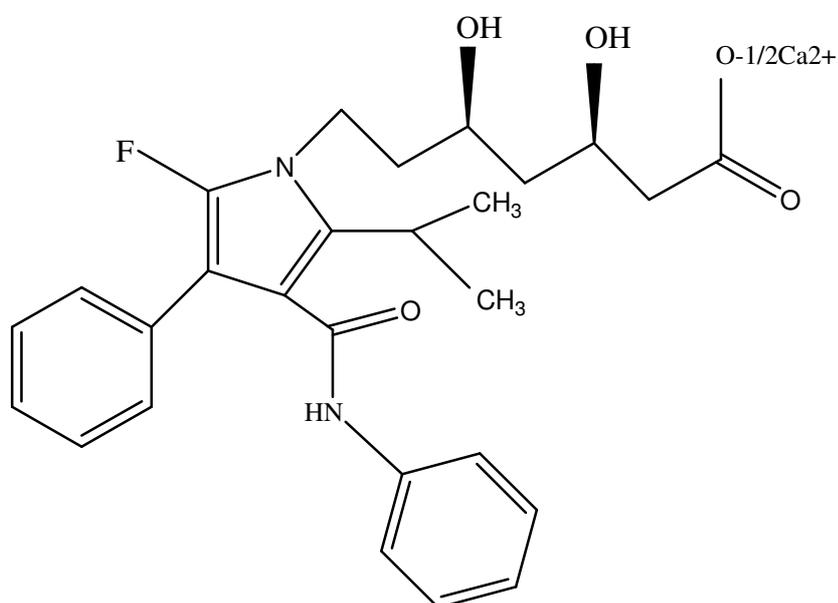


Figura 3 – Estrutura química da atorvastatina

1.3 Atorvastatina

1.3.1 Propriedades Físico-químicas

A atorvastatina é uma estatina sintética, sendo uma substância relativamente lipofílica. Os grupamentos laterais ao anel pirrol da estrutura da atorvastatina definem a sua solubilidade e, conseqüentemente, as suas propriedades farmacocinéticas (SCHACHTER, 2005).

O sal de cálcio da atorvastatina é um sólido cristalino branco a quase branco. O peso molecular é igual a 1209,42. É insolúvel em soluções aquosas com pH abaixo de 4, muito pouco solúvel em tampão fosfato pH 7,4, pouco solúvel em etanol e bem solúvel em metanol. O valor de pKa é de $4,30 \pm 0,10$. Possui atividade ótica ($[\alpha]_D -7,4^\circ$ (c= 1, DMSO) (BAUMANN et. al, 1992).

1.3.2 Propriedades Farmacocinéticas

A atorvastatina é administrada na forma de sal cálcico. Sofre extensa metabolização de primeira passagem a nível hepático. Em função disto, a biodisponibilidade do fármaco é reduzida a 30%. O tempo de meia-vida é de aproximadamente 14 horas e esta propriedade pode contribuir para a maior eficácia da Atorvastatina em relação às outras estatinas. É altamente ligada às proteínas plasmáticas (80-98%) e, portanto, uma redução nos efeitos adversos periféricos é observada. A enzima citocromo P450, em sua isoforma CYP3A4, desempenha um papel fundamental na metabolização do fármaco. Os principais produtos são compostos o- e p-hidroxilados, que possuem atividade farmacológica (representam 70% da atividade inibitória demonstrada pela atorvastatina) (MALINOWSKI, 1998).

A Figura 4 representa o esquema metabólico da atorvastatina.

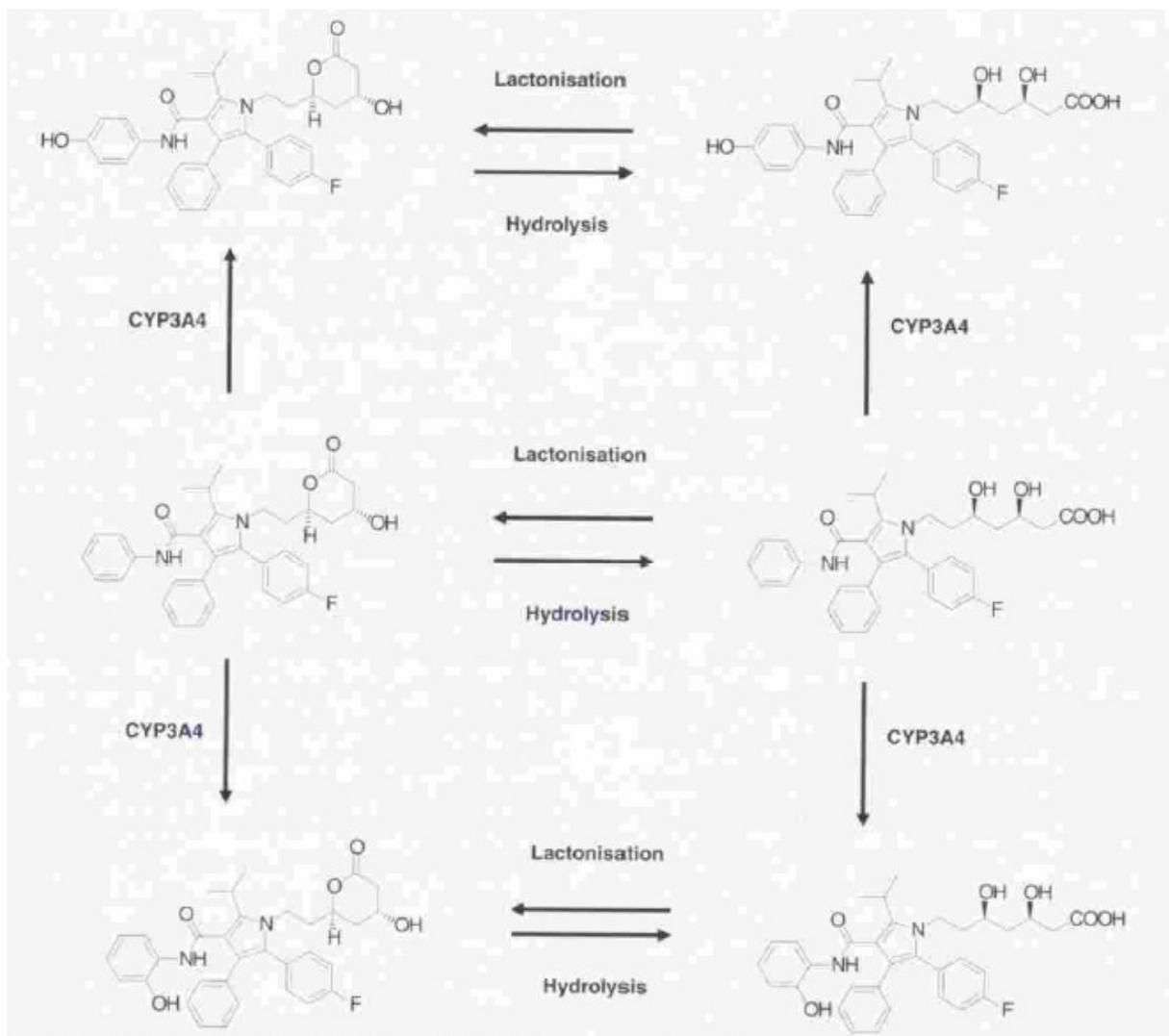


Figura 4 – Representação esquemática do metabolismo da atorvastatina (LENNERNÄS, 2003)

1.3.3 Propriedades Farmacodinâmicas

A atorvastatina é um derivado sintético da família das estatinas com atividade inibitória sobre a hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase impedindo a formação do mevalonato, a etapa limitante da biossíntese de colesterol. O tecido alvo das estatinas é o hepático (STANCU e SIMA, 2001).

A representação esquemática da via biossintética do colesterol está representada na Figura 5.

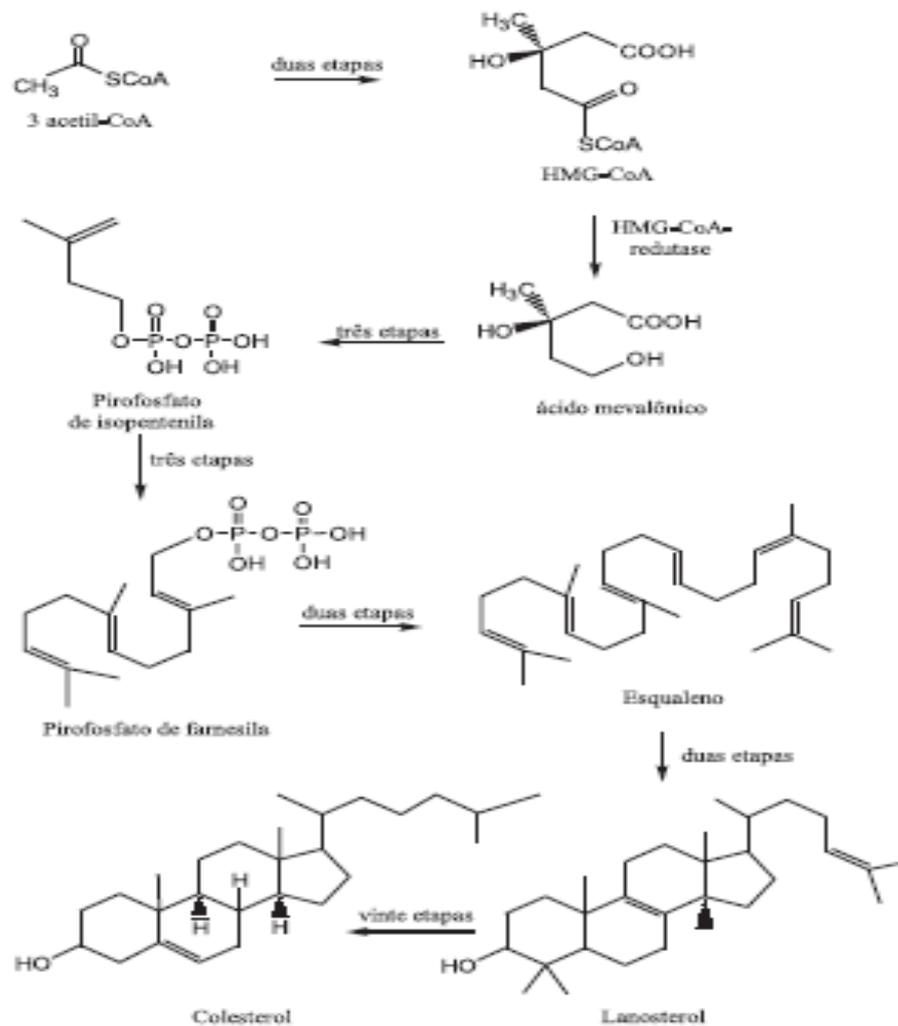


Figura 5 – Biossíntese do colesterol (CAMPO e CARVALHO, 2007)

A conseqüente redução do nível intracelular de colesterol nos hepatócitos induz a ativação de uma protease que cliva a proteína de ligação a elemento regulador de esteroide do retículo endoplasmático. Esta é translocada a nível nuclear onde aumenta a transcrição dos receptores de LDL hepáticos, o que determina a redução do LDL circulante (STANCU e SIMA, 2001).

1.4 Um Breve Histórico da Vigilância Sanitária

Segundo COSTA (1999), a Vigilância Sanitária constitui um subsetor específico da Saúde Pública e sua face mais complexa. Denota uma área peculiar

de articulações entre três esferas ou domínios: o econômico, o jurídico-político e o médico-sanitário. Configura também uma área crítica das relações entre Estado e sociedade, ao lidar com produtos, processos, serviços, trabalho e ambiente e uma grande diversidade de interesses.

Segundo COSTA e ROZENFELD (2009), na França do século XVIII, é que surge um conceito marcante para a história da Vigilância Sanitária: a salubridade. Ou seja, o que é salubre favorece a saúde. As ações de higiene pública e do controle do meio através de políticas-científicas, estabelecidas durante o século XIX por meio da criação de institutos de pesquisas e laboratórios de saúde pública, foram originadas a partir desse conceito.

No Brasil, as primeiras ações relacionadas ao controle sanitário foram efetivadas com o advento da chegada da família real ao país, em 1808. Uma vez que o Brasil passaria a fazer parte da rota comercial inglesa, o país passaria por mudanças econômicas sendo necessária a realização de um maior controle sobre os produtos brasileiros, de modo que os mesmos pudessem ter uma maior aceitação no mercado e que evitassem a disseminação de doenças no país (COSTA e ROZENFELD, 2009).

Durante o império, a legislação pouco evoluiu e as ações tinham pouco alcance. Com o advento da independência do Brasil, houve a municipalização dos serviços sanitários e a criação dos regimentos próprios pelas Câmaras (COSTA e ROZENFELD, 2009).

A instalação da república permitiu a organização das administrações sanitárias estaduais, assim como a constituição de órgão de Vigilância Sanitária nas Unidades da Federação. As pesquisas bacteriológicas fundamentaram as ações de combate às doenças nesse período (COSTA e ROZENFELD, 2009).

Em 1945, após a queda de Getúlio Vargas, o país recebeu muito investimento estrangeiro, principalmente nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Diversas normas relacionadas ao setor foram editadas a partir de então como, por exemplo, o Decreto nº 20.397, que fixou normas para o controle de produtos, disposições sobre psicotrópicos e entorpecentes, em 1946; a Lei nº 1.283, que versa a respeito da fiscalização prévia dos produtos de origem animal, em 1950 (COSTA e ROZENFELD, 2009).

Neste período, o Departamento Nacional de Saúde Pública (DNSP), criado em 1920, foi transformado em Ministério da Saúde para ampliar e centralizar as ações de Saúde Pública (COSTA e ROZENFELD, 2009).

Na década de 70, houve a consagração da Vigilância Sanitária com a criação da Lei nº 6.360/76. O Ministério da Saúde, através do decreto nº 79.056, elevou o campo de controle sanitário à categoria de secretaria ministerial, e daí surge a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) (COSTA e ROZENFELD, 2009).

Com a Reforma Sanitária, uma grande conquista é alcançada: a Lei 8.080/90. Nela, a Vigilância Sanitária passa a ser vista como “um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde” (COSTA e ROZENFELD, 2009; BRASIL, 1990).

Numa tentativa para a reestruturação deste campo da Saúde Pública, é criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999. Uma das atribuições desta é a coordenação do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) do país (BRASIL, 1999).

1.5 O papel dos Laboratórios Analíticos na Vigilância Sanitária

As ações de Vigilância Sanitária constituem tanto uma ação de saúde quanto um instrumento da organização econômica da sociedade.

Com a intensa produção e circulação de mercadorias, os riscos à saúde ocorrem em escala ampliada: as conseqüências de produtos defeituosos colocados no mercado podem afetar a saúde de milhões de consumidores, extrapolando as fronteiras de um país; também afetam a credibilidade nos produtos e nas instituições públicas encarregadas do controle sanitário, provocando enormes prejuízos econômicos.

Nesse sentido, a ação protetora da Vigilância Sanitária abrange não apenas cidadãos e consumidores, mas também os produtores (COSTA, 1999).

Os problemas da área de Vigilância Sanitária requerem tratamento interdisciplinar e o conceito epidemiológico de risco é fundamental, mas não suficiente; outros conceitos são fundamentais, como atributos intrínsecos requeridos

dos objetos de cuidado, tais como qualidade, segurança e eficácia (LUCCHESI, 1992).

A avaliação dos atributos de qualidade, segurança e eficácia de produtos submetidos ao controle e à fiscalização sanitária, como no caso dos medicamentos de uso humano, é realizada através de ensaios laboratoriais.

Monitorar tais produtos é muito importante para o alcance dos objetivos das ações de vigilância sanitária. É no laboratório analítico que se encontra o apoio necessário para a verificação da conformidade dos mesmos em relação às normas sanitárias vigentes (SILVA, 2001).

Estão estabelecidas na legislação algumas modalidades de análise: análises fiscais, análises de controle e análises prévias. A primeira avalia a capacidade de se seguir produzindo conforme o estabelecido no processo de registro, durante toda a vida útil do produto; a segunda está relacionada à avaliação da capacidade de produzir, de acordo com os termos relatados no ato do registro; a terceira avalia a eficácia e a segurança do produto durante a etapa de concessão do registro (SILVA, 2001).

O laboratório é parte integrante da estrutura da Vigilância Sanitária e permite ações consistentes, particularmente no controle de produtos. As análises laboratoriais sempre serão uma complementação à ação fiscalizadora da Vigilância Sanitária (SILVA, 2001).

1.6 Validação

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou, em 2001, o “Guia de Validação de Métodos Analíticos” como um anexo da Resolução da Diretoria Colegiada nº 10, que estabelecia o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos.

Em 2002, tal documento foi publicado na forma de resolução (RE nº 475, de 19 de março de 2002). O guia especificava que a aplicação do mesmo seria no contexto da determinação de fármacos em matrizes biológicas como, por exemplo, o sangue e o plasma.

Em 2003, foi estabelecido o “Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”, ampliando a aplicação do documento incluindo fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

Este documento estabelece, até os dias atuais, as diretrizes para a realização dos estudos de validação de metodologias analíticas, em âmbito nacional.

Os métodos analíticos descritos em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, são considerados validados. Caso contrário, determinados parâmetros deverão ser avaliados para que a metodologia seja considerada validada. Tais parâmetros serão descritos nos tópicos a seguir:

1.6.1 Especificidade e seletividade:

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes.

1.6.2 Linearidade:

É a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito.

1.6.3 Intervalo:

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método.

1.6.4 Precisão:

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra.

1.6.5 Limite de Detecção:

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado.

1.6.6 Limite de Quantificação:

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão adequadas.

1.6.7 Exatidão:

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

1.6.8 Robustez:

É a medida da capacidade de um método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos.

A norma classifica as metodologias analíticas em quatro categorias diferentes conforme Tabela 2. Os parâmetros de validação a serem avaliados dependem da categoria a qual o método está inserido, ver Tabela 3.

Tabela 2 – Classificação das metodologias analíticas

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

Tabela 3 – Ensaio necessários para avaliação, segundo a categoria

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

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

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

A validação, de acordo com a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, possui como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (BRASIL, 2003). Deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Portanto, uma metodologia analítica deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequadas a sua aplicação.

1.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Em 1906, tem-se o registro do primeiro uso do termo cromatografia por um botânico russo chamado Michael S. Tswett no decorrer de seus experimentos envolvendo a separação de componentes do extrato de folhas (CASS e DEGANI, 1998) e, nos últimos trinta anos, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência tornou-se um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos (TONHI et al., 2002).

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação, no qual os constituintes da amostra são particionados entre duas fases, uma estacionária e outra insolúvel, na fase estacionária, que percola através da primeira (CIOLA, 2000).

A interação entre o analito e a fase estacionária é o que promove a sua separação dos outros componentes da matriz. Diferentes mecanismos podem governar tal processo: partição, adsorção, exclusão e troca iônica ou par iônico (GIL, 2010).

Diversos critérios podem ser considerados para classificar as diferentes formas de cromatografia: (1) Classificação pela forma física do sistema – cromatografia em coluna ou em papel; (2) Classificação pela fase móvel empregada – cromatografia gasosa, líquida ou supercrítica; (3) Classificação pela fase estacionária – líquida, sólida ou quimicamente ligada; (4) Classificação pelo modo de separação – adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou combinação destes (CASS e DEGANI, 1998).

A Figura 6 ilustra os diferentes tipos de cromatografia para um melhor entendimento.

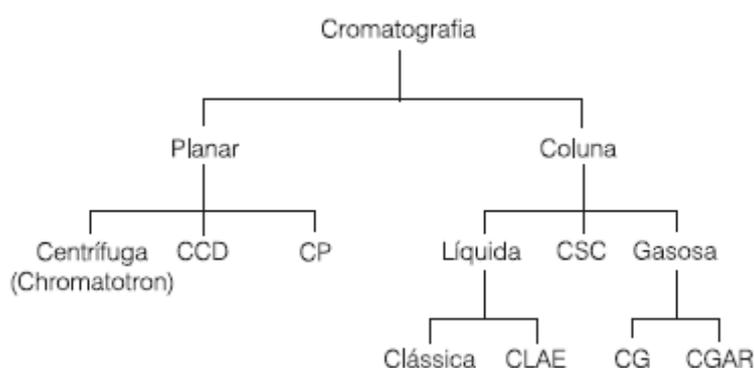


Figura 6 – Tipos de cromatografia (CASS e DEGANI, 1998)

A operação da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é efetuada através de um equipamento chamado cromatógrafo líquido. Os componentes que constituem esse aparelho são: (1) reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel (**a e b**); (2) sistema de introdução da amostra (**c**); (3) sistema analítico – coluna cromatográfica e termostato das colunas (**d**); (4) sistema de detecção (**e**); (5) sistema de registro e tratamento de dados (**f**) (CIOLA, 2000).

A Figura 7 mostra um esquema do equipamento de CLAE.

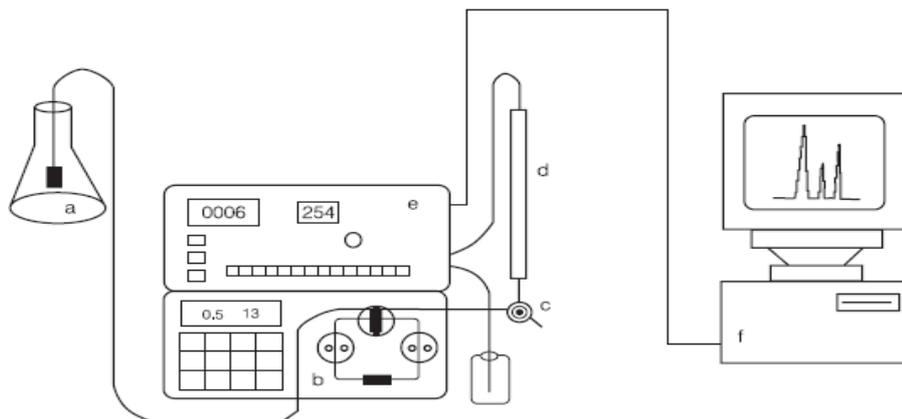


Figura 7 – Equipamento de CLAE (CASS e DEGANI, 1998)

Os principais parâmetros para a avaliação da eficiência cromatográfica são a resolução (R), o número de pratos teóricos (N) e o tempo de retenção (TR). O primeiro está relacionado à seletividade, ou seja, o poder de separação; o segundo à sensibilidade, esta será maior quanto maior for o sinal cromatográfico gerado por uma determinada massa de analito; o terceiro à rapidez da análise, fatores como tamanho da coluna cromatográfica, tamanho e tipo das partículas da fase estacionária e propriedades relacionadas ao eluente e estrutura química do analito.

A CLAE possui algumas vantagens quando comparada às outras técnicas analíticas: alta eficiência, análises rápidas (em média, entre 8-15 min), baixo consumo de solventes (fluxos médios de 0,5-2 mL), baixos limites de detecção, excelente reprodutibilidade e repetibilidade (GIL, 2010).

1.8 Metodologias analíticas descritas na literatura

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais amplamente empregada para a determinação do teor de atorvastatina, assim como de suas impurezas e/ou produtos de degradação seja no plasma sanguíneo ou em comprimidos. Porém, muitas das metodologias encontradas na literatura são aplicáveis a amostras biológicas.

Algumas técnicas possuem o pH da fase móvel muito baixo (STANISZ e KANIA, 2006) e isto pode comprometer o tempo de vida útil das colunas cromatográficas empregadas.

ERTÜRK et al. (2003) propuseram um procedimento no qual a eluição da fase móvel é realizado pelo modo de gradiente, de modo a quantificar a atorvastatina e as suas impurezas. Entretanto, o tempo de análise assim como o tempo de retenção da atorvastatina são elevados: cerca de 60 e 30 minutos, respectivamente.

Além disto, alguns autores propõem metodologias que empregam técnicas que ainda não são muito difundidas na rotina do controle de qualidade – a técnica de *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UPLC) (VORA, 2008; NOVAKOVA et al., 2009).

O detector mais utilizado é o de UV/VIS, sendo que no método desenvolvido por KHEDR (2007) emprega-se o de fluorescência. Não é recomendada a utilização deste tipo de detector em função, provavelmente, da dificuldade encontrada com a etapa de derivatização e da repetitividade do procedimento (NOVAKOVA, 2008).

Algumas metodologias empregam padrão interno o que aumenta o custo das análises (STANISZ e KANIA, 2006; SONAWANE et al., 2006).

Em virtude das dificuldades encontradas em diversas metodologias descritas na literatura, buscou-se desenvolver uma metodologia adequada por seu menor custo e de fácil implantação.

A Tabela 4 sumariza os parâmetros cromatográficos referentes aos métodos descritos na literatura.

Tabela 4 – Parâmetros Cromatográficos das Metodologias Descritas na Literatura

Método	Condições	Autor
CLAE	C18, 5 µm; Fase Móvel - ACN : tampão NH ₄ OAc (pH 4) : THF (25:70:5/70:25:5)	ERTÜRK et al. (2003)
CLAE	C18, 5 µm; Fase Móvel -Tampão fosfato de sódio (0,05M): Metanol (33 : 67), pH 4,0	BAHRAMI et al. (2005)
CLAE	C18, 5 µm; Fase Móvel - ACN : Tampão NaH ₂ PO ₄ 0,025 M pH 4,5 (55 : 45)	MOHAMMADI et al. (2007)
CLAE	C18; Fase Móvel - ACN : Água pH 2,0(52 : 48)	STANISZ e KANIA (2006)
CLAE	C18, 5 µm; Fase Móvel - ACN : Acetato de sódio pH 4,2 (45 : 55)	KHEDR (2007)
CLAE	C18, 5 µm; Fase Móvel - ACN:Água:Metanol (45 : 40 : 15)	CHAUDARI et al. (2007)
CLAE	Hypersil [®] phenyl-2, 5 µm; Fase Móvel - ACN : Tampão NH ₄ OAc (pH 6,5; 0,1 M)(72 : 28), pH 6,5	QUTAB et al. (2007)
CLAE	C18; Fase Móvel - Metanol:Acetonitrila : Tampão KH ₂ PO ₄ (45 : 45 : 10), pH 6,85	ZAHEER et al. (2008)
CLAE	C18 Luna; Fase Móvel - Metanol : Tampão Acetato pH 3,7(82 :18)	JAIN et al. (2008)

Tabela 4 – Parâmetros Cromatográficos das Metodologias Descritas na Literatura (cont.)

Método	Condições	Autor
CLAE	C18 Luna (5µm, 25 cm x 4,6 mm); Fase Móvel – Tampão Acetato Amônio (pH 5,0) : ACN : Trietilamina (50:50:0,2)	SONAWANE et al. (2006)
UPLC	C18, 1,7 µm; Fase Móvel - A:Tampão Acetato Amônio (pH 4,7; 0,01M) / B: ACN	VORA (2008)
CLAE/MS	C18, 3,0 µm; Fase Móvel – Ácido Acético 0,1% : ACN (30:70) Detecção de massa com íon eletrospray	BOREK-DOHALSKI et al. (2006)
CLAE/MS	C18, 3,0 µm; Fase Móvel – A: ACN / B: Ácido Fórmico Detecção de massa com íon eletrospray	HERMANN et al. (2005)
CLAE/MS	C18, 4,0 µm; Fase Móvel – A: Ácido Acético 0,1% : ACN (30:70) Detecção de massa com íon eletrospray	BULLEN et al. (1999)
UPLC/MS	C18, 1,7 µm; Fase Móvel - A:Tampão Acetato Amônio (pH 4,0; 0,5 mM) / B: ACN	NOVAKOVA et al. (2009)
Espectroscopia FT-Raman		MAZUREK e SZOSTAK (2009)

2. Objetivos

2.1 Geral

Desenvolver e validar metodologia analítica para avaliação de teor de atorvastatina cálcica em insumo farmacêutico ativo e em comprimidos de 40 mg.

2.2 Específicos

- ✓ Desenvolver metodologia analítica para doseamento de atorvastatina cálcica insumo farmacêutico ativo e comprimidos de 40 mg.
- ✓ Validar metodologia analítica para doseamento de atorvastatina cálcica insumo farmacêutico ativo e comprimidos de 40 mg.
- ✓ Descrever as vantagens da metodologia desenvolvida sobre a metodologia desenvolvida com a metodologia analítica descrita na literatura que apresentar melhor desempenho.
- ✓ Contribuir para as atividades de monitoramento e fiscalização da Vigilância Sanitária, sugerindo a inclusão de uma metodologia analítica para avaliação de teor de atorvastatina cálcica, em insumo farmacêutico ativo e em comprimidos, na Farmacopéia Brasileira.

3. Metodologia

3.1 Materiais

3.1.1. Reagentes e solventes

- ✓ Água destilada
- ✓ Acetato de amônio P.A. VETEC
- ✓ Ácido acético glacial VETEC
- ✓ Acetonitrila P.A VETEC

3.1.2. Substâncias e Materiais de Referência

- ✓ Padrão Secundário atorvastatina cálcica NORTEC
- ✓ Padrão Primário Certificado PGS
- ✓ Medicamento de referência Lipitor® 40 mg

3.1.3. Instrumental Analítico e Equipamentos

- ✓ Balança Analítica XS205 METTLER TOLEDO
- ✓ Potenciômetro 780 pHMETER METROHM
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência VP SHIMADZU

3.2 Metodologia analítica para doseamento de atorvastatina cálcica

A metodologia analítica selecionada fundamenta-se na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Empregou-se coluna cromatográfica Novapak® C18 (150 x 3,9 mm; 4µm) e fase móvel constituída de uma mistura de tampão acetato de amônio 0,02 mol.L⁻¹ (ajustado a pH 3,0) e acetonitrila (60:40 %v/v). O fluxo empregado foi de 1,3 mL.min⁻¹ e detecção UV/VIS a 248 nm.

Durante o desenvolvimento analítico foram empregados os modificadores orgânicos metanol e acetonitrila.

O primeiro não demonstrou ser adequado por conferir ao sistema cromatográfico uma pressão de análise bem superior à proporcionada pela acetonitrila.

O padrão secundário empregado foi quantificado tendo como referência o padrão primário certificado.

3.2.1. Condições Cromatográficas

Coluna: Nova-Pak®; C18; 150 x 3,9 mm; 4µm

Comprimento de onda: 248 nm

Temperatura: 30°C

Fluxo: 1,30 mL/min

Volume de injeção: 10 µL

Tempo de análise: 15 minutos

Fase móvel: solução tampão acetato amônio pH 3,0 : acetonitrila (60:40)

Diluyente: água:acetonitrila (60:40)

3.2.2. Preparo da solução tampão de acetato de amônio 0,02 mol.L⁻¹ pH 3,0

Dissolver 1,54 g de acetato de amônio em 1000 mL de água e ajustar o pH para 3,00 ± 0,05 com ácido acético glacial. Filtrar através de membrana filtrante 0,45 µm e desgaseificar em banho de ultra-som.

3.2.3. Preparo da Fase móvel

Em proveta graduada de 1000 mL, misturar 600 mL de solução tampão acetato de amônio pH 3,0 e 400 mL de acetonitrila.

3.2.4. Preparo da solução padrão (0,1 mg.mL⁻¹)

Foi pesado com exatidão cerca de 25 mg de padrão secundário de atorvastatina cálcica. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Dissolver e completar o volume com o diluyente. Pipetar 10,0 mL desta solução e transferir para balão volumétrico de 50,0 mL. Avolumar com o diluyente.

3.2.5. Preparo da solução amostra (0,1 mg.mL⁻¹)

Foi pesado com exatidão cerca de 25 mg de amostra de atorvastatina cálcica. Proceder como descrito para o preparo da solução padrão.

3.2.6. Procedimento

Foi aplicado no sistema cromatográfico 10 µL das soluções diluyente, padrão e amostra nesta ordem.

A verificação de adequação do sistema (*System Suitability*) deverá ser realizada levando-se em conta os seguintes parâmetros (SHABIR, 2003):

Fator de cauda: deverá ser menor que 2,0.

O número de pratos teóricos deve ser maior do que 2000.

O desvio padrão relativo (% DPR) das áreas dos picos obtidos com a solução padrão deverá ser menor do que 2,0.

3.3 Protocolo de Validação da Metodologia Analítica para o Insumo Farmacêutico Ativo

A metodologia empregada está classificada dentro da Categoria I, conforme descrito na Tabela 2. Os parâmetros a serem avaliados no protocolo de validação obedecem ao descrito na Tabela 3.

Os critérios para classificação da metodologia e estabelecimento dos parâmetros a serem avaliados durante o estudo de validação estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pela RE nº 899, de 23 de maio de 2003.

3.3.1. Avaliação da Especificidade

Por definição, a especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes.

Foram retiradas alíquotas de 5,0 mL de uma solução de padrão preparada conforme item 3.2.3, para diferentes balões volumétricos contendo 5,0 mL das soluções de HCl 1 mol.L⁻¹, NaOH 1 mol.L⁻¹ e H₂O₂ 3%.

Em outro balão volumétrico contendo 5,0 mL de água purificada, foi adicionada uma alíquota de 5,0 mL de uma solução preparada conforme item 3.2.4. Os balões volumétricos foram agitados para homogeneização das soluções. Em seguida, permaneceram em banho-maria a 80 °C durante 2 horas. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente, os mesmos foram filtrados em membrana de 0,45 µm e foi aplicado 10 µL de cada solução no sistema cromatográfico.

A Tabela 5 mostra as condições que foram empregadas no teste de estresse.

Tabela 5 – Condições empregadas no teste de estresse (GOMES, 2008)

Hidrólise	Aquecimento banho-maria	Tempo (horas)	Diluyente
Meio Neutro	80 °C	2	Água purificada
Meio Oxidante	80 °C	2	H ₂ O ₂ 3%
Meio Ácido	80 °C	2	HCl 1 mol.L ⁻¹
Meio Alcalino	80 °C	2	NaOH 1 mol.L ⁻¹

Os cromatogramas foram avaliados quanto à interferência dos produtos de degradação, utilizando as mesmas condições cromatográficas. Não deve haver co-eluição com o sinal correspondente a atorvastatina cálcica.

A pureza espectral do sinal também foi avaliada através do detector com arranjo de diodos. Esta deve ser no mínimo igual a 0,99 (LÖWEN, 2003).

3.3.2. Avaliação de Linearidade

De acordo com a RE nº 899, de 23 de maio de 2003, é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito.

Foram pesados cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de diluyente até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução.

Em seguida, transferiu-se alíquotas desta solução para balões volumétricos conforme descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Preparações das soluções para a avaliação da linearidade

Nível de concentração	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Alíquota (mL)	Balão volumétrico (mL)
50%	50,0	2,5	25
75%	75,0	3,0	20
100%	100,0	5,0	25
125%	125,0	5,0	20
150%	150,0	3,0	10

Através do método dos mínimos quadrados ordinários, foi determinado o coeficiente de correlação da reta (r), que deve ser no mínimo igual a 0,99, o coeficiente angular, a intersecção com o eixo Y.

Deve haver homocedasticidade dos resultados encontrados entre os diferentes níveis de concentração, conforme o teste de Cochran.

O coeficiente angular (b) da regressão ($y=a+bx$) deve ser diferente de zero, evidenciado pela análise de variância (ANOVA) a partir da distribuição F (LAPPONI, 2000).

As retas obtidas pelos valores de Y previstos e experimentais devem se sobrepor.

3.3.3. Avaliação de Exatidão

3.3.3.1. Preparo da solução padrão

Foi pesada com exatidão cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. Pipetou-se 10,0 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL. Avolumou-se com o diluente. A solução foi filtrada em membrana 0,45 μm .

3.3.3.2. Cálculo da taxa de recuperação (%)

Os resultados de recuperação devem estar compreendidos entre 98 e 102%. A taxa de recuperação (%) foi obtida conforme a Equação 1.

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração média obtida}}{\text{concentração esperada}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Tabela 7 – Pesagem de padrão para estudos de exatidão do método

Nível de concentração	Quantidade de Padrão (mg)	Concentração de atorvastatina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
50%	12,5	50,0
100%	25,0	100,0
150%	37,5	150,0

3.3.4. Avaliação da Precisão

3.3.4.1. Repetitividade

3.3.4.1.1. Preparo da solução padrão

Foi pesada com exatidão cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente. Retirou-se uma alíquota 10,0 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 μm .

3.3.4.1.2. Preparo da solução amostra

Realizou-se o mesmo procedimento de preparo da solução padrão, item 3.3.4.1.1. A solução obtida foi injetada 6 (seis) vezes.

O desvio padrão relativo (%DPR) dos resultados encontrados deve ser menor do que 2,0%.

3.3.4.2. Precisão Intermediária

Um segundo analista reproduziu o procedimento empregado nos subitens 3.3.4.1.1 e 3.3.4.1.2, em dias diferentes e em equipamentos diferentes.

Não deve haver diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos analistas conforme avaliado pelo teste de Snedecor.

3.3.5. Avaliação da robustez

3.3.5.1. Preparo da solução padrão

Foi pesada com exatidão cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente. Retirou-se uma alíquota 10,0 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 µm.

3.3.5.2. Preparo da solução amostra

Realizou-se o mesmo procedimento de preparo da solução padrão, item 3.3.5.1.

O parâmetro robustez foi avaliado variando-se os parâmetros pH da fase móvel (pH), composição da fase móvel (CFM), fluxo (FL) e temperatura da coluna (TC).

O planejamento dos experimentos seguiu como o descrito no Quadro 1.

Quadro 1 – Planejamento dos experimentos

FL	CFM (% ACN)	TC = 35 °C		TC = 25 °C	
		pH = 2,9	pH = 3,1	pH = 2,9	pH = 3,1
1,2 mL.min ⁻¹	38%				
	42%				
1,4 mL.min ⁻¹	38%				
	42%				

Legenda:

FL = fluxo da fase móvel

CFM = composição da fase móvel

TC = temperatura da coluna

ACN = acetonitrila

As soluções obtidas foram filtradas em membrana 0,45 μm . Aplicou-se 10 μL das soluções obtidas no equipamento, sob as condições cromatográficas descritas no Quadro 1 e foram determinadas as concentrações das amostras em cada teste.

A significância dos fatores controláveis foi avaliada através da análise de variância (ANOVA). Caso o valor de p-valor seja maior de 0,05 ($p\text{-valor} > \alpha$), o fator controlável não é considerado significativo (FL, CFM, TC e pH) (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Caso contrário ($p\text{-valor} < \alpha$), o fator controlável é significativo e deve ser controlado.

3.3.6. Estabilidade da solução padrão

Foi pesada com exatidão cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente. Retirou-se uma alíquota 10,0 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 μm .

Esta solução foi injetada em diferentes períodos de tempo por um período de 4 horas. A avaliação foi realizada através da comparação das áreas obtidas a partir de injeções dessa solução.

A comparação foi realizada a partir do cálculo de ANOVA, utilizando a distribuição F, onde a hipótese nula é de que não há diferença estatisticamente significativa entre as áreas (OLIVEIRA, 2003).

3.4 Protocolo de Validação da Metodologia Analítica para Comprimidos de 40 mg

A metodologia empregada está classificada dentro da Categoria I, conforme descrito na Tabela 2. Os parâmetros a serem avaliados no protocolo de validação obedecem ao descrito na Tabela 3.

Os critérios para classificação da metodologia e estabelecimento dos parâmetros a serem avaliados durante o estudo de validação estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pela RE nº 899, de 23 de maio de 2003.

3.4.1. Avaliação da Especificidade

Foi pesada com exatidão quantidade de amostra do medicamento Lipitor® 40 mg equivalente a 25 mg de atorvastatina cálcica. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente. Retirou-se uma alíquota 10,0 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 µm.

Foram retiradas alíquotas de 5,0 mL desta solução para diferentes balões volumétricos contendo 5,0 mL das soluções de HCl 1 M, NaOH 1 M e H₂O₂ 3%.

Em outro tubo contendo 5,0 mL de água purificada, foi adicionada uma alíquota de 5,0 mL da solução preparada.

Os balões volumétricos foram agitados para homogeneização das soluções. Em seguida, permaneceram em banho-maria a 80 °C durante 2 horas.

Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente, os mesmos foram filtrados em membrana de 0,45 µm e injetou-se 10 µL de cada solução no sistema cromatográfico, cujas condições cromatográficas estão descritas no item 3.2, página 20.

A Tabela 8 mostra as condições que foram empregadas no teste de estresse.

Tabela 8 – Condições empregadas no teste de estresse (GOMES, 2008)

Hidrólise	Aquecimento banho-maria	Tempo (horas)	Diluyente
Meio Neutro	80 °C	2	Água purificada
Meio Oxidante	80 °C	2	H ₂ O ₂ 3%
Meio Ácido	80 °C	2	HCl 1 mol.L ⁻¹
Meio Alcalino	80 °C	2	NaOH 1 mol.L ⁻¹

Os cromatogramas foram avaliados quanto à interferência dos produtos de degradação, utilizando as mesmas condições cromatográficas. Não deve haver co-eluição com o sinal correspondente a atorvastatina cálcica.

A pureza espectral do sinal também foi avaliada através do detector com arranjo de diodos. Esta deve ser no mínimo igual a 0,99 (LÖWEN, 2003).

3.4.2. Avaliação de Linearidade

Foram pesados cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Adicionou-se quantidade suficiente de diluyente até a dissolução e completou-se o volume com a mesma solução.

Em seguida, transferiu-se alíquotas desta solução para balões volumétricos conforme descrito na Tabela 9.

Tabela 9 – Preparações das soluções para a avaliação da linearidade

Nível de concentração	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Alíquota (mL)	Balão volumétrico (mL)
50%	50,0	2,5	25
75%	75,0	3,0	20
100%	100,0	5,0	25
125%	125,0	5,0	20
150%	150,0	3,0	10

Através do método dos mínimos quadrados ordinários, foi determinado o coeficiente de correlação da reta (r), que deve ser no mínimo igual a 0,99, o coeficiente angular, a intersecção com o eixo Y.

Deve haver homocedasticidade dos resultados encontrados entre os diferentes níveis de concentração, conforme o teste de Cochran.

O coeficiente angular (b) da regressão ($y=a+bx$) deve ser diferente de zero, evidenciado pela análise de variância (ANOVA) a partir da distribuição F (LAPPONI, 2000).

As retas obtidas pelos valores de Y previstos e experimentais devem se sobrepor.

3.4.3. Avaliação de Exatidão

3.4.3.1. Determinação da concentração original

Foram pesados 20 comprimidos de Lipitor[®] 40 mg. Em seguida, foram triturados utilizando gral e pistilo de porcelana. Determinou-se o peso médio dessas unidades.

Posteriormente, foram pesadas, em triplicata, quantidade de amostra do medicamento Lipitor[®] 40 mg equivalente a 25 mg de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balões volumétricos de 50,0 mL.

Foi adicionado o diluente e a solução foi levada ao ultrassom por 5 minutos. Em seguida, completou-se o volume com o diluente. Foram transferidas alíquotas de

10,0 mL para balões volumétricos de 50,0 mL. Completou-se o volume com a solução diluente. As soluções obtidas foram filtradas em membrana 0,45 µm.

Paralelamente, foi preparada uma solução padrão de atorvastatina cálcica conforme descrito no item 3.2.4.

Aplicou-se 10 µL das soluções obtidas no equipamento, sob as condições cromatográficas descritas no item 3.2.1 e determinou-se a concentração original de atorvastatina cálcica na amostra de Lipitor[®] 40 mg.

3.4.3.2. Fortificação da amostra de Lipitor[®] 40 mg

Tendo sido determinado o peso médio dos comprimidos, foi pesada uma quantidade de amostra do medicamento Lipitor[®] 40 mg equivalente a 3,125 mg de atorvastatina cálcica e foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 mL.

Foram pesadas, em triplicata, quantidades de padrão de atorvastatina cálcica, conforme descrito na Tabela 10, e foram transferidas para o mesmo balão volumétrico de 50,0 mL.

Foi adicionado o diluente e a solução foi levada ao ultrassom por 5 minutos. Em seguida, completou-se o volume com o diluente. Foram transferidas alíquotas de 10 mL para balões volumétricos de 50,0 mL. Completou-se o volume com a solução diluente. As soluções obtidas foram filtradas em membrana 0,45 µm.

Paralelamente, foi preparada uma solução padrão de atorvastatina cálcica conforme descrito no item 3.2.4 e determinou-se a concentração original de atorvastatina cálcica na amostra de Lipitor[®] 40 mg.

Foram aplicados 10 µL das soluções obtidas no equipamento, sob as condições cromatográficas descritas no item 3.2.1 e determinou-se a concentração de atorvastatina cálcica na amostra de Lipitor[®] 40 mg após a adição (fortificação).

Os resultados de recuperação devem estar compreendidos entre 98 e 102%. A taxa de recuperação foi calculada pelo quociente da diferença entre a concentração obtida após a fortificação (concentração final) e a concentração original e concentração da adição, conforme Equação 2.

$$\text{Taxa de recuperação (\%)} = \frac{\text{Conc. final} - \text{Conc. original}}{\text{Conc. da adição}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Tabela 10 – Pesagem de amostras para estudos de exatidão do método

Nível de concentração	Quantidade de Padrão (mg)	Concentração de adição atorvastatina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
50%	12,5	50,0
100%	25,0	100,0
150%	37,5	150,0

3.4.4. Avaliação da Precisão

3.4.4.1. Repetitividade

3.4.4.1.1. Preparo da solução padrão

Foi pesada com exatidão cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,0, mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente. Retirou-se uma alíquota 10,0 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 μm .

3.4.4.1.2. Preparo da solução amostra

Foram pesados 20 comprimidos de Lipitor[®] 40 mg. Em seguida, foram triturados utilizando gral e pistilo de porcelana. Determinou-se o peso médio dessas unidades.

Pesou-se uma quantidade de amostra do medicamento Lipitor[®] 40 mg equivalente a 25 mg de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balões volumétricos de 50,0 mL.

Foi adicionado o diluente e a solução foi levada ao ultrassom por 5 minutos. Em seguida, completou-se o volume com o diluente. Foram transferidas alíquotas de

10,0 mL para balões volumétricos de 50,0 mL. Completou-se o volume com a solução diluente. As soluções obtidas foram filtradas em membrana 0,45 µm. Aplicou-se 10 µL das soluções obtidas no equipamento, sob as condições cromatográficas descritas no item 3.2.1. A solução obtida foi injetada por 6 (seis) vezes.

O desvio padrão relativo (%DPR) dos resultados encontrados deve ser no máximo igual a 2,0%.

3.4.4.2. Precisão Intermediária

Um segundo analista reproduziu o procedimento empregado nos subitens 3.4.4.1.1 e 3.4.4.1.2, em dias diferentes e em equipamentos diferentes.

Não deve haver diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos analistas conforme avaliado pelo teste de Snedecor.

3.4.5. Avaliação da robustez

3.4.5.1. Preparo da solução padrão

Foi pesada com exatidão cerca de 25 mg de padrão de atorvastatina cálcica. Transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 50,0 mL. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente. Retirou-se uma alíquota 10,0 mL desta solução e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 µm.

3.4.5.2. Preparo da solução amostra

Foram pesados 20 comprimidos de Lipitor[®] 40 mg. Em seguida, foram triturados utilizando gral e pistilo de porcelana. Determinou-se o peso médio dessas unidades.

Foi pesada com exatidão quantidade de amostra do medicamento Lipitor[®] 40 mg equivalente a 25 mg de atorvastatina cálcica. Dissolveu-se e completou-se o volume com o diluente. Retirou-se uma alíquota 10,0 mL desta solução e transferiu-

se para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com o diluente. A solução obtida foi filtrada em membrana 0,45 μm .

O parâmetro robustez foi avaliado variando-se os parâmetros pH da fase móvel (pH), composição da fase móvel (CFM), fluxo (FL) e temperatura da coluna (TC).

O planejamento dos experimentos seguiu o descrito no Quadro 1.

As soluções obtidas foram filtradas em membrana 0,45 μm . Aplicou-se 10 μL das soluções obtidas no equipamento, sob as condições cromatográficas descritas no Quadro 1 e foram determinadas as concentrações das amostras em cada teste.

A significância dos fatores controláveis foi avaliada através da análise de variância (ANOVA). Caso o valor de p-valor seja maior de 0,05 ($p\text{-valor} > \alpha$), o fator controlável não é considerado significativo (FL, CFM, TC e pH) (TEÓFILO e FERREIRA, 2006). Caso contrário ($p\text{-valor} < \alpha$), o fator controlável é significativo e deverá ser controlado.

4. Resultados e Discussão

A análise estatística dos dados foi realizada empregando o software Excel e o Software Statística[®] para a avaliação da robustez.

4.1 Metodologia de Teor para Insumo Farmacêutico Ativo (IFA)

O método empregado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e detecção por ultravioleta nas condições descritas no item 3.2.1.

A partir das metodologias obtidas da literatura e dos fornecedores, foi selecionada uma técnica para otimização. Alterações no pH, na composição da fase móvel e no fluxo foram realizados, sendo escolhido o método que apresentou os melhores resultados nos parâmetros de adequação do sistema.

Fatores como pressão do sistema e tempo de retenção também foram considerados. A Figura 8 representa o cromatograma obtido.

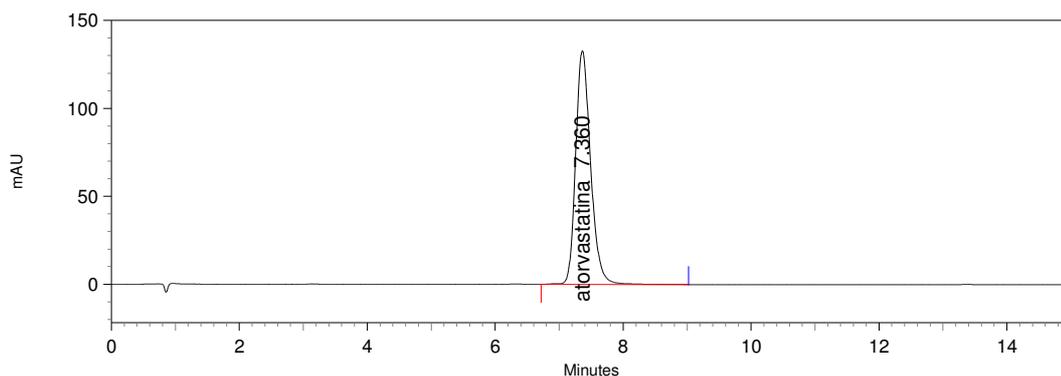


Figura 8 – Cromatograma obtido da solução padrão $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

O Gráfico 1 representa o espectro de varredura (190 a 400 nm) de uma solução padrão de atorvastatina cálcica a $0,02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, empregando-se como diluente uma mistura de água:acetonitrila (60:40). O valor de comprimento de onda onde há a máxima absorção é 248 nm, empregando-se uma cubeta de quartzo (caminho ótico 1 cm).

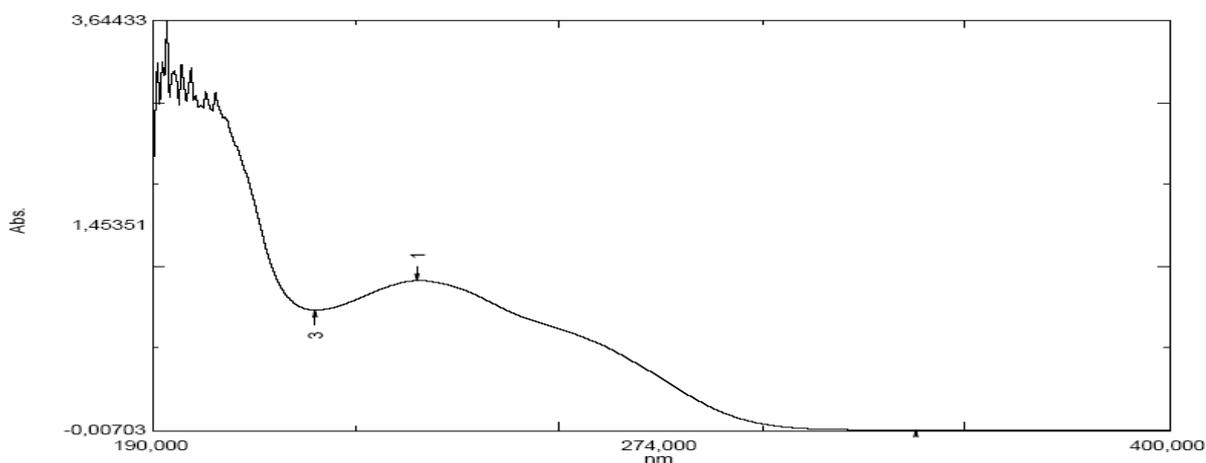


Gráfico 1 – Espectro de varredura da solução padrão atorvastatina $0,02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (190 a 400 nm)

4.1.1. Adequação do sistema

Os resultados de adequação do sistema estão representados pela Tabela 11.

Tabela 11 – Resultado para o teste de adequação do sistema para o método de análise do teor de atorvastatina cálcica

Nome	TR	k'	T	N
Atorvastatina	7,36	8,68	1,25	4217

Observamos que os resultados obtidos estão de acordo com o proposto por SHABIR (2003), ver item 3.2.6.

4.1.2. Especificidade

Os cromatogramas obtidos com as amostras, submetidas às condições de estresse descritas na Tabela 5, estão representados a seguir nas Figuras 9 a 12.

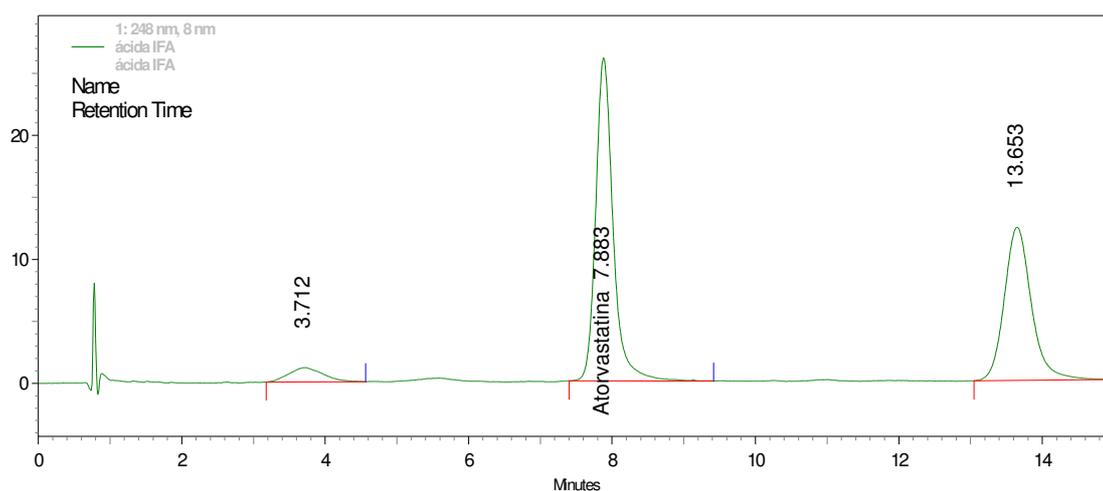


Figura 9 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse com HCl 1 mol.L⁻¹ a 80 °C por 2h, nas condições experimentais descritas no item 3.2.1 .

Verificou-se, analisando-se a Figura 9, que a amostra de atorvastatina cálcica não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela degradação ácida, empregando-se HCl 1 mol.L⁻¹ a 80°C por 2h.

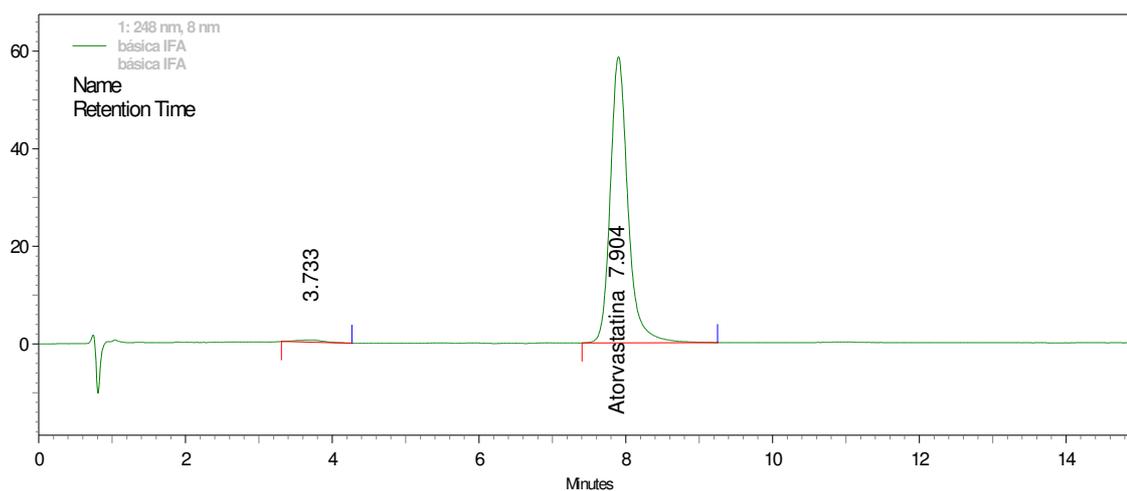


Figura 10 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse com NaOH 1 mol.L⁻¹ a 80 °C por 2h, nas condições experimentais descritas no item 3.2.1 .

Observa-se, analisando-se a Figura 10, que a amostra de atorvastatina cálcica não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela degradação alcalina, empregando-se NaOH 1 mol.L⁻¹ a 80°C por 2h.

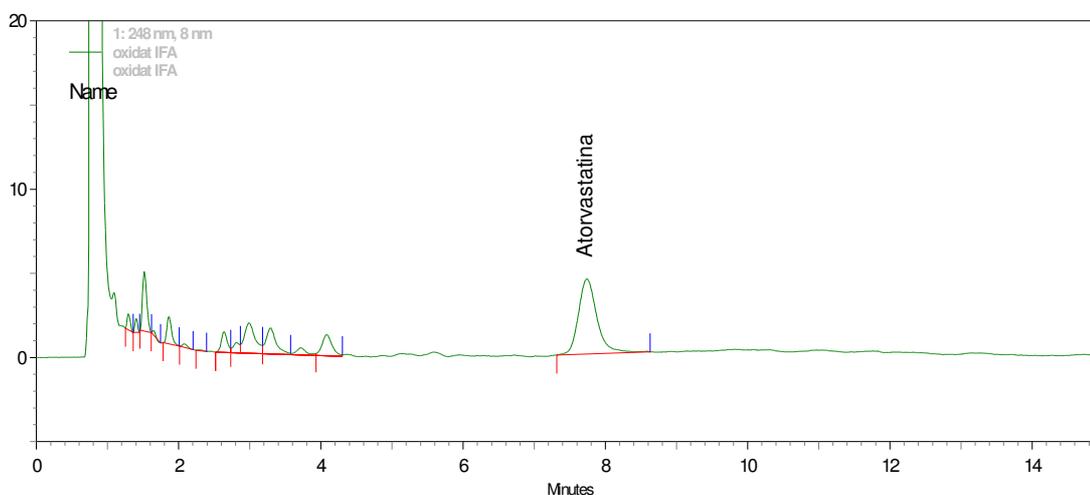


Figura 11 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse com H₂O₂ 3% a 80 °C por 2h, nas condições experimentais descritas no item 3.2.1 .

Observa-se, analisando-se a Figura 11, que a amostra de atorvastatina cálcica não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela estresse oxidativo, empregando-se H₂O₂ 3% a 80°C por 2h.

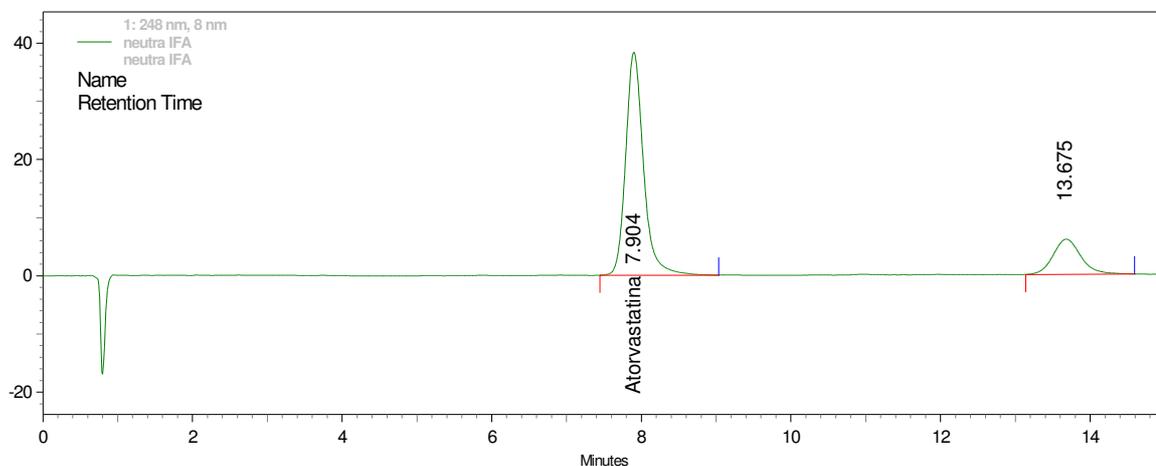


Figura 12 – Amostra de atorvastatina cálcica, padrão secundário, submetida a estresse a 80 °C por 2h, nas condições experimentais descritas no item 3.2.1 .

Observa-se, analisando-se a Figura 12, que a amostra de atorvastatina cálcica não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela hidrólise em meio neutro a 80°C por 2h.

A pureza espectral do sinal de atorvastatina cálcica também foi avaliada em cada condição do teste de estresse. Considera-se aceitável um valor de índice de pureza de sinal (*peak purity*) de 0,99 (LÖWEN, 2003). Conforme podemos observar na Tabela 12, os valores obtidos são satisfatórios.

Tabela 12 – Índices de pureza de sinal obtidos no teste de estresse

Hidrólise	Diluyente	Índice de Pureza Obtido	Critério de aceitação
Meio Neutro	Água purificada	1.00000	> 0,99
Meio Oxidante	H ₂ O ₂ 3%	1.00000	
Meio Ácido	HCl 1 mol.L ⁻¹	1.00000	
Meio Alcalino	NaOH 1 mol.L ⁻¹	1.00000	

Analisando a Tabela 12, podemos afirmar que não há interferência dos produtos de degradação no sinal da atorvastatina, pois os valores obtidos são maiores que 0,99.

Segundo SHAH, KUMAR e SINGH (2007), a degradação da atorvastatina é mais significativa em meio ácido do que em neutro ou alcalino, e o principal produto de degradação gerada em função do estresse ácido é a atorvastatina lactona desidratada, cuja fórmula e peso molecular são iguais a $C_{33}H_{31}FN_2O_3$ e 520, respectivamente.

Observando as Figuras 9 e 12, podemos constatar a formação significativa de um produto de degradação nas condições de estresse em meio ácido e neutro, respectivamente. A caracterização de tal substância foi realizada pela técnica de CLAE acoplada a espectrômetro de massas.

Os parâmetros cromatográficos empregados encontram-se descritos no item 3.2.1. O espectro de massas correspondente ao sinal gerado pelo produto de degradação obtido encontra-se representado na Figura 13.

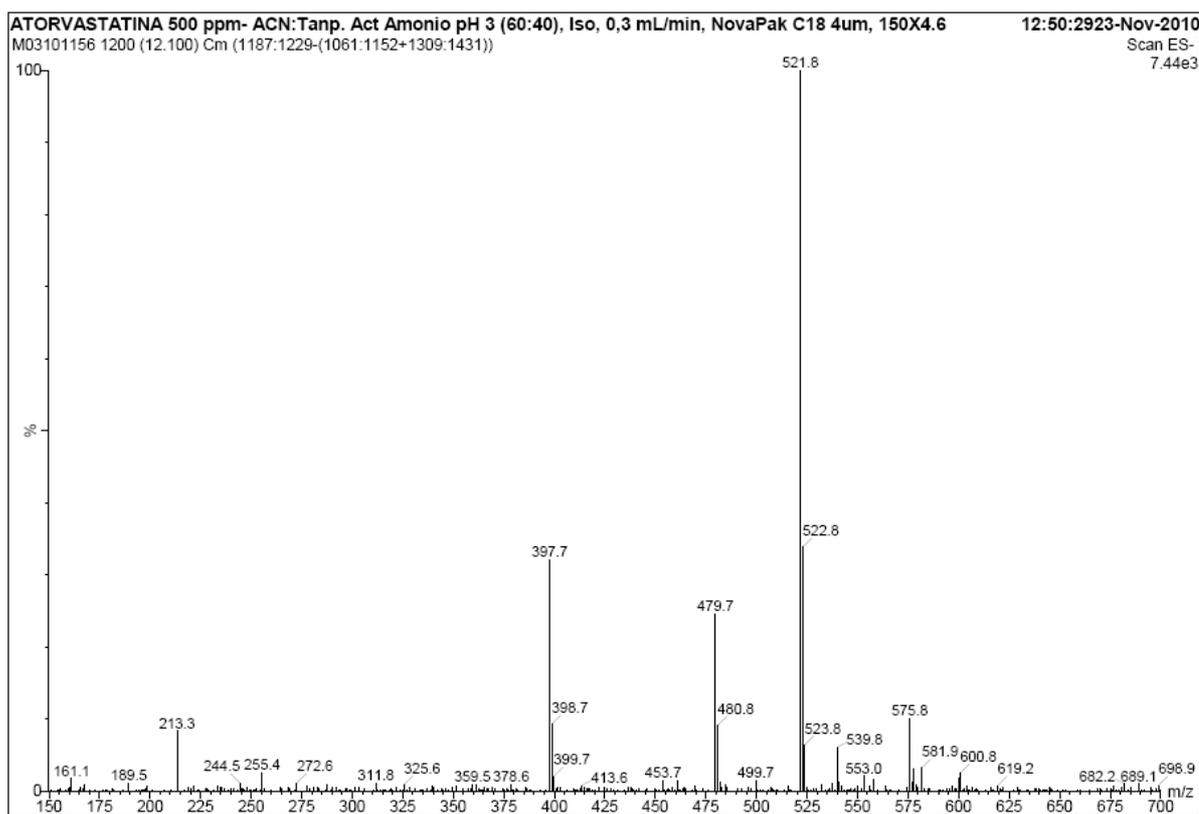


Figura 13 – Espectro de massas obtido referente ao produto de degradação formado em meio ácido e neutro, nas condições cromatográficas descritas no item 3.2.1.

Podemos observar que a massa correspondente é equivalente ao descrito para a atorvastatina lactona desidratada conforme relatado na literatura. Desta maneira, deduzimos que a substância em questão é a atorvastatina lactona, em sua forma desidratada.

4.1.3. Linearidade

A verificação da linearidade foi realizada através da obtenção da curva analítica (gráfico das respostas, eixo y, em função das concentrações, eixo x), onde x corresponde à concentração de atorvastatina cálcica na solução padrão e y representa a área obtida no cromatograma relativo a uma determinada concentração. As concentrações empregadas foram 50% (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 75% (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 100% (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 125% (125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 150% (150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação à concentração teórica do teste.

Os resultados obtidos para as referidas concentrações estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados obtidos para a avaliação da linearidade

Amostra	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	1	2	3	Média	DP	DPR
Am.1- 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	54,94	55,03	55,01	54,99	0,05	0,09
Am.2 -75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	82,11	82,23	82,13	82,16	0,06	0,08
Am.3 -100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	109,19	109,24	109,22	109,22	0,03	0,02
Am.4 -125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	138,60	138,33	138,53	138,49	0,14	0,10
Am.5 -150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	163,95	164,22	164,01	164,06	0,14	0,09

A homocedasticidade do método, isto é, a independência das respostas em relação à variância da concentração do analito, foi avaliada através do teste de Cochran.

Os dados para a verificação da homocedasticidade do método estão organizados na Tabela 14.

Tabela 14 – Dados para a verificação da homocedasticidade do método

Injeção	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
1	54,94	82,11	109,19	138,60	163,95
2	55,03	82,23	109,24	138,33	164,22
3	55,01	82,13	109,22	138,53	164,01
Média	54,99	82,16	109,22	138,49	164,06
Variância	0,0022	0,0041	0,0006	0,0196	0,0201

s^2 = variância

$$C = \frac{s^2_{\text{maior}}}{\sum s^2_j}, \quad \text{onde } s^2 = \text{maior variância}$$

$\sum s^2_j$ = somatório das variâncias

Se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$, o método é considerado homocedástico.

Se $C_{\text{calculado}} > C_{\text{crítico}}$, o método não é considerado homocedástico.

Para os resultados apresentados na Tabela 14, o valor da maior variância é 0,020 e o somatório das variâncias é igual a 0,0466. O $C_{\text{crítico}}$ é igual a **0,684**. Assim, o valor de $C_{\text{calculado}}$ será:

$$C_{\text{calculado}} = \frac{0,0201}{0,0466} = \mathbf{0,4313}$$

Como o valor de $C_{\text{calculado}}$ é menor do que o de $C_{\text{crítico}}$, podemos dizer que o método é homocedástico. Sendo assim, é possível determinar a equação pelo método dos mínimos quadrados.

A representação gráfica da reta assim como a descrição de sua equação estão presentes no Gráfico 2.

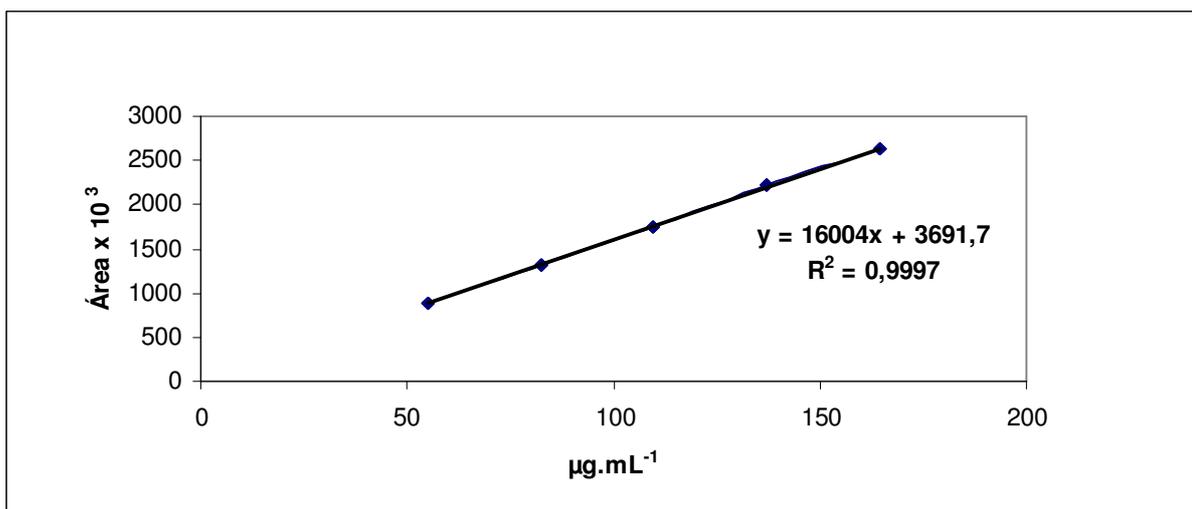


Gráfico 2 – Curva Analítica da atorvastatina cálcica nas concentrações 50, 75, 100, 125 e 150 µg.mL⁻¹ (condições experimentais descritas no item 3.2.1).

A equação obtida é representada pela função $y = 16004x + 3691,7$ e o seu coeficiente de correlação (r) foi calculado através do software Excel[®], sendo igual a 0,9998.

De acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o valor mínimo aceitável para o coeficiente de correlação é 0,999. Podemos constatar que o valor encontrado é satisfatório (BRASIL, 2003).

Torna-se necessário, uma vez evidenciada a existência de uma relação linear, confirmar a linearidade proposta pela equação da reta estabelecida pela regressão. Iremos testar a hipótese de que o coeficiente angular da reta (b) é igual a 0 (zero). Esta será a hipótese nula (H_0). A hipótese alternativa será a de que o coeficiente angular da reta (b) é diferente de 0 (zero). A análise de variância (ANOVA), a partir de uma distribuição F, é a ferramenta estatística utilizada para este objetivo.

A regressão poderá ser confirmada e aceita caso a hipótese nula seja rejeitada e a hipótese alternativa aceita, ou seja, o valor de $F_{\text{calculado}}$ seja maior que o $F_{\text{crítico}}$.

Os dados relativos a ANOVA para a confirmação da linearidade são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Confirmação da linearidade por ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	5787898344462	5787898344462	41863.1	3.4239880920304E-24
Resíduo	13	1797349426	138257648		
Total	14	5789695693889			

Gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática; F = F calculado; E = exponencial.

Podemos então dizer que o método é linear no intervalo de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, pois o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior do que o $F_{\text{crítico}}$ (LAPPONI, 2000).

Determinou-se também os coeficientes reta e os seus valores máximo e mínimo para um nível de significância (α) igual a 0,05%, a partir dos quais foram calculados os intervalos de confiança para os coeficientes da reta.

$$\text{IC}(a) = 23368,5 - 3691,7 = 19676,8$$

$$\text{IC}(b) = 16173,3 - 16004 = 169,3$$

Os dados para o cálculo do intervalo de confiança dos coeficientes da reta estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados para o cálculo do intervalo de confiança dos coeficientes da reta

	Coeficientes	95% inferiores	95% superiores
Interseção	3691,7	-15985,2	23368,5
Variável X	16004	15835,3	16173,3

Os resíduos foram calculados e a partir destes valores procedeu-se a plotagem dessa distribuição pelos níveis de concentração, conforme representados na Tabela 17 e no Gráfico 3. A população dos resíduos normalmente distribuídos apresenta média igual a zero (MILLER, 1988).

Tabela 17 – Resíduos obtidos

Observação	Y previsto	Resíduo
1	882167,4991	835,5008733
2	882167,4991	2264,500873
3	882167,4991	1912,500873
4	1321485,433	-3594,433415
5	1321485,433	-1722,433415
6	1321485,433	-3338,433415
7	1760643,325	-9529,324741
8	1760643,325	-8655,324741
9	1760643,325	-8935,324741
10	2199961,259	21846,74097
11	2199961,259	17536,74097
12	2199961,259	20781,74097
13	2639119,15	-11602,15035
14	2639119,15	-7236,150355
15	2639119,15	-10564,15035

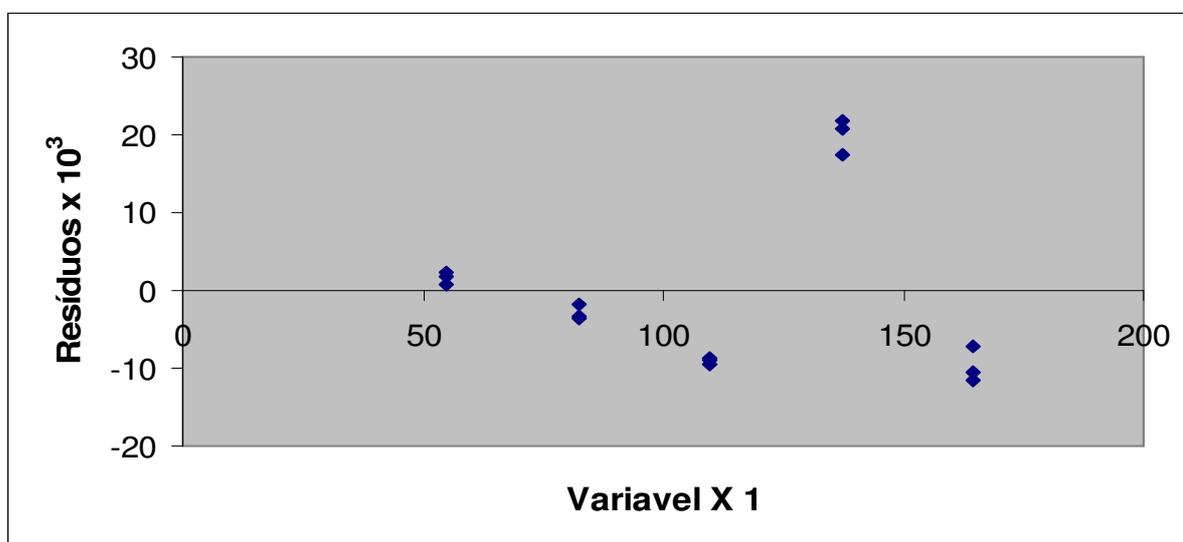


Gráfico 3 – Plotagem de resíduos da Curva Analítica apresentada no Gráfico 2.

O gráfico de ajuste de linha também foi construído para avaliação da sobreposição das curvas de Y previsto e Y experimental, conforme Gráfico 4.

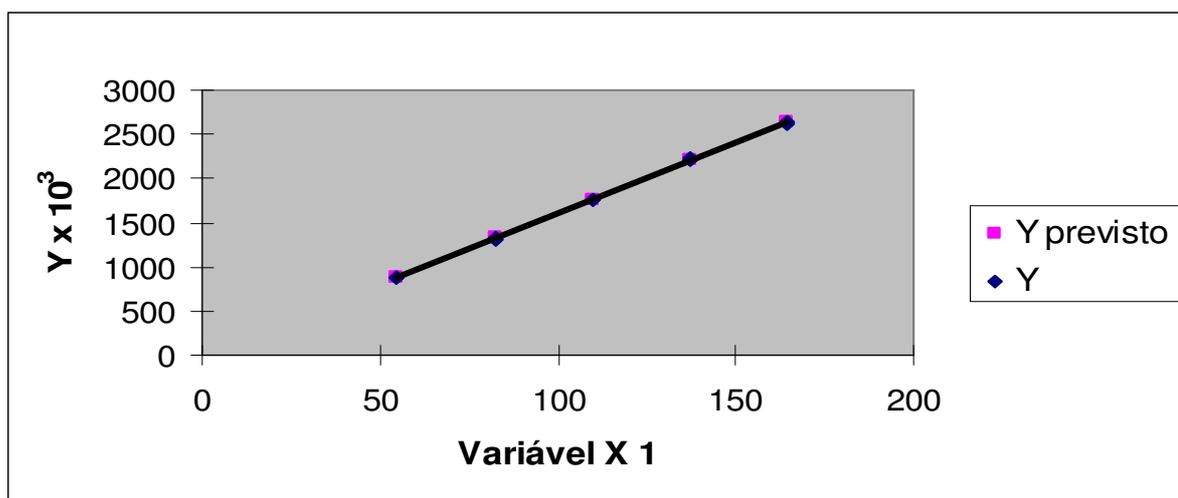


Gráfico 4 – Plotagem de ajuste de linha

4.1.4. Exatidão

Cada nível de concentração foi analisado em triplicata. Foi determinado o percentual recuperado pelo método (taxa de recuperação), ou seja, a relação percentual entre a concentração de Atorvastatina, a cada nível de concentração, e a concentração esperada (conforme fórmula descrita no item 3.3.3.2).

Tabela 18 – Resultados da Exatidão (percentual recuperado)

Concentração da amostra	50%	100%	150%
Replicata A1	99,62	99,16	100,13
Replicata A2	100,31	99,17	99,71
Replicata A3	99,76	99,78	99,60
Replicata B1	99,80	100,41	100,24
Replicata B2	99,74	100,10	100,16
Replicata B3	99,63	100,58	100,25
Replicata C1	98,89	100,00	99,60
Replicata C2	99,21	99,62	101,33
Replicata C3	99,68	100,00	100,77
Média	99,63	99,74	100,20
DP	0,40	0,51	0,57
DPR	0,40	0,51	0,57
% Recuperação	99,63	99,74	100,20
IC	0,27	0,36	0,39

Analisando a Tabela 18, podemos verificar que os valores obtidos encontram-se em conformidade com o estabelecido pela bibliografia (SHABIR, 2003). Tais valores devem estar compreendidos entre 98,0% e 102,0%.

4.1.5. Precisão

O parâmetro precisão foi avaliado em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária.

4.1.5.1. Repetitividade

A verificação da repetitividade foi realizada através da injeção da solução padrão correspondente ao nível de concentração 100% por 6 (seis) vezes. Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 19.

Tabela 19 – Resultados obtidos para a avaliação da repetitividade

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração das seis injeções de padrão a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%)
Injeção A	109,19
Injeção B	109,24
Injeção C	109,22
Injeção D	109,00
Injeção E	109,07
Injeção F	109,14
Média	109,14
DP	0,09
DPR	0,09

O desvio padrão relativo das 6 (seis) injeções (0,09%) foi considerado satisfatório, pois é recomendado um valor máximo de 1,0% quando realiza-se cinco ou mais injeções de uma mesma solução (SHABIR, 2003).

4.1.5.2. Precisão Intermediária

A avaliação da precisão intermediária foi realizada variando-se o analista e o dia de análise.

Os resultados obtidos foram avaliados através da comparação das variâncias dos mesmos, empregando-se o teste F de Snedecor. A hipótese nula (H_0) é de que não há diferença estatisticamente significativa entre as variâncias, indicando que não há diferença as análises realizadas pelos analistas. Os resultados encontrados estão representados na Tabela 20.

Tabela 20 – Resultados da avaliação de precisão intermediária

Amostras	Analista 1 – Dia 1	Analista 2 – Dia 2
A	99,16	100,15
B	99,17	100,42
C	99,78	100,24
D	100,41	100,47
E	100,10	100,24
F	100,58	100,24
G	100,00	99,73
H	99,62	99,66
I	100,00	99,54
Média	99,74	100,11
DP	0,51	0,34
DPR	0,51	0,34

Tabela 21 – Resultados do teste F de Snedecor entre os analistas 1 e 2

Teste F: duas amostras para variâncias		
	Variável 1 = Analista 1	Variável 2 = Analista 2
Média	99,74	100,11
Variância	0,26	0,12
Observações	9	9
gl	8	8
F		0,45
F crítico bi-caudal		3,43

gl = graus de liberdade; F = F estatístico calculado

Analisando a Tabela 21, podemos verificar que o valor de F (0,45) é menor do que o valor de F crítico bi-caudal (3,43). Logo, a hipótese nula (H_0) é aceita e é um indicativo de que não diferença entre os resultados dos analistas 1 e 2.

4.1.6. Robustez

O parâmetro robustez foi avaliado variando-se os parâmetros pH da fase móvel (pH), composição da fase móvel (CFM), fluxo (FL) e temperatura da coluna (TC), conforme Quadro 1.

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 22.

Tabela 22- Resultados obtidos no ensaio de robustez, avaliando os parâmetros pH da fase móvel, composição da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna

FL	CFM (% ACN)	TC = 35 °C		TC = 25 °C	
		pH = 2,9	pH = 3,1	pH = 2,9	pH = 3,1
1,2 mL.min ⁻¹	38%	100,26	100,60	100,31	100,23
	42%	100,38	100,74	100,01	100,14
1,4 mL.min ⁻¹	38%	100,28	100,42	100,44	100,42
	42%	100,67	100,44	100,32	100,64

Tais resultados foram submetidos à análise de variância para identificar quais parâmetros de análise são significativos e, conseqüentemente, deverão ser controlados.

A estatística empregada foi ANOVA, através do Software Statistica[®]. Os resultados derivados desta análise estão representados na Tabela 23.

Tabela 23- Resultados de ANOVA do ensaio de robustez

Fator	p-valor individual	p-valor simultâneo
Temperatura	0,1875	0,9005
Fluxo	0,2984	0,9934
pH	0,2984	0,9934
Fase Móvel	0,7260	1,0000
Fluxo*Fase Móvel	0,5315	1,0000
pH*Fase Móvel	0,8524	1,0000
Fluxo*pH	0,6172	1,0000
Temperatura*Fase Móvel	0,2984	0,9934
Temperatura*Fluxo	0,1804	0,8918
pH* Temperatura	0,8096	1,0000
Fase Móvel* Fluxo* pH	0,2661	0,9821
Fase Móvel* Fluxo*Temperatura	0,7528	1,0000
Fase Móvel* pH*Temperatura	0,3280	0,9977
Fluxo* pH* Temperatura	0,8096	1,0000
Temperatura*Fluxo*pH*Fase Móvel	0,6302	1,0000

Os valores de p-valor para os fatores individualmente e simultaneamente são maiores do que 0,05 ($p\text{-valor} > \alpha$), logo não são significativos. Então podemos dizer que o método é robusto mediante as variações empregadas (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

4.1.7. Estabilidade da solução padrão

A solução demonstrou ser estável pelo período de 4 horas. A avaliação foi realizada através da comparação das áreas a partir do cálculo de ANOVA, utilizando a distribuição F, onde a hipótese nula é a de que não haja diferença estatisticamente significativa entre as áreas. Para que a hipótese nula seja aceita, o valor $F_{\text{calculado}}$ deve ser menor que o valor de $F_{\text{crítico}}$. As áreas obtidas estão representadas na Tabela 24 e o cálculo de ANOVA na Tabela 25.

Tabela 24- Áreas obtidas em diferentes períodos de tempo - estabilidade

Injeções	Área	Área	Área
	0:00 h	2:00 h	4:00 h
1 ^a	1709357	1705648	1699752
2 ^a	1711009	1711963	1709854
3 ^a	1718268	1713264	1712368
% DPR	0,27	0,24	0,39

Tabela 25- Cálculo da ANOVA - estabilidade

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	F _{crítico}
Entre grupos	46331720	2	23165860	0,83	5,14
Dentro dos grupos	167312481	6	27885413		
Total	213644201	8			

Analisando a Tabela 25, podemos verificar que o valor de F (calculado) é menor do que o $F_{crítico}$, logo podemos aceitar a hipótese nula. Portanto, não há diferença estatisticamente significativa entre as amostras, ou seja, a solução padrão é estável por 4 horas.

4.2 Metodologia de Teor para Comprimidos de 40 mg

O método empregado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e detecção por ultravioleta nas condições descritas no item 3.2.1.

A partir das metodologias obtidas na literatura e nos fornecedores, foi selecionada uma técnica para otimização. Alterações no pH, na composição da fase móvel e no fluxo foram realizados, sendo escolhido o método que apresentou os melhores resultados nos parâmetros de adequação do sistema.

Fatores como pressão do sistema e tempo de retenção também foram considerados.

O cromatograma obtido encontra-se representado na Figura 14.

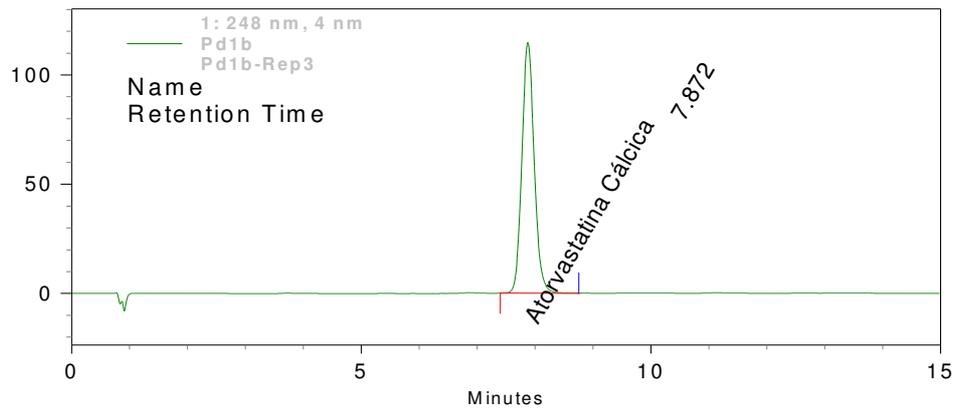


Figura 14 – Cromatograma obtido da solução padrão ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$).

O Gráfico 5 representa o espectro de varredura da atorvastatina cálcica de uma solução padrão de atorvastatina cálcica a $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$. O valor de comprimento de onda onde há a máxima absorção é 248 nm.

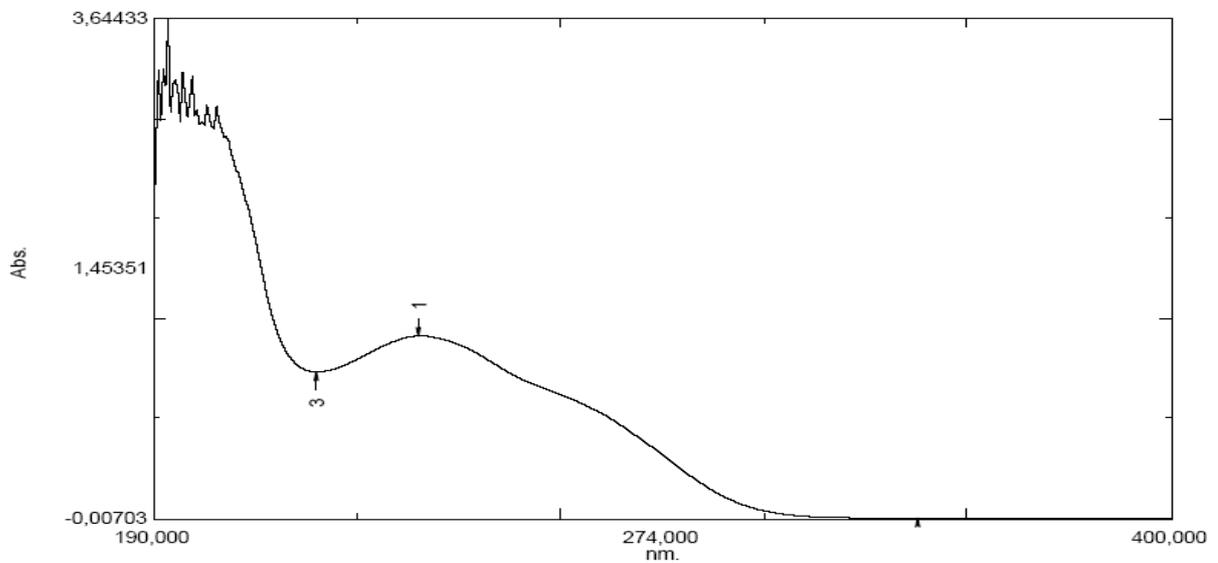


Gráfico 5 – Espectro de varredura da solução padrão atorvastatina $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$

4.2.1 Adequação do sistema

Os resultados de adequação do sistema devem atender aos requisitos descritos no item 3.2.6 e estão descritos na Tabela 26.

Tabela 26 – Resultado para o teste de adequação do sistema para o método de análise do teor de Atorvastatina em Comprimidos de 40 mg

Nome	TR	k'	T	N
Atorvastatina	7,8	8,70	1,13	6413

4.2.2 Especificidade

Os cromatogramas obtidos com as amostras submetidas às condições de estresse descritas na Tabela 8 estão representados a seguir nas Figuras 14 a 17.

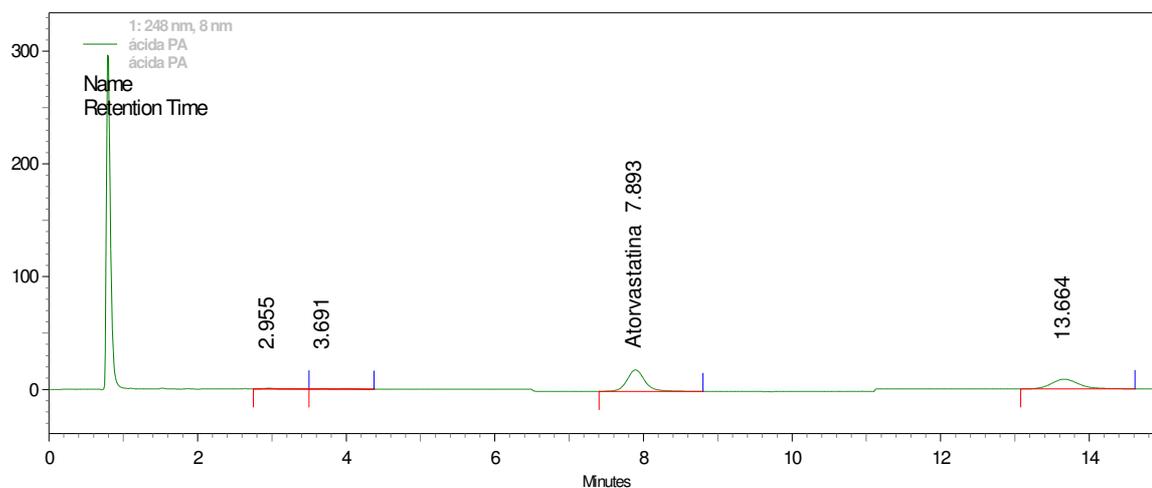


Figura 15 – Amostra de Lipitor[®] 40 mg, submetida a estresse com HCl 1 mol.L⁻¹ a 80 °C por 2h.

Analisando-se a Figura 15, verificou-se que a amostra de Lipitor[®] 40 mg não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela degradação ácida, empregando-se HCl 1 mol.L⁻¹ a 80°C por 2h.

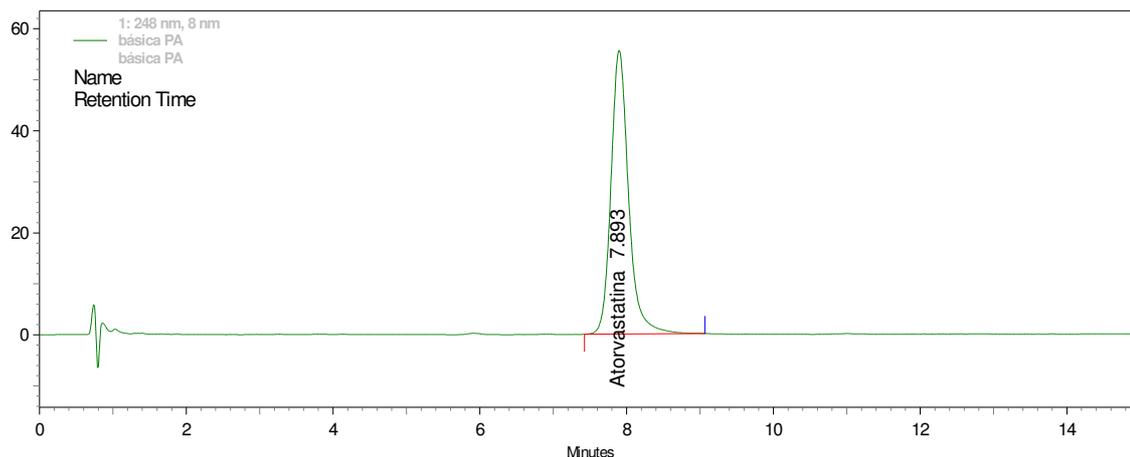


Figura 16 – Amostra de Lipitor® 40 mg, submetida a estresse com NaOH 1 mol.L⁻¹ a 80 °C por 2h.

Observa-se, analisando-se a Figura 16, que a amostra de Lipitor® 40 mg não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela degradação alcalina, empregado-se NaOH 1 mol.L⁻¹ a 80°C por 2h.

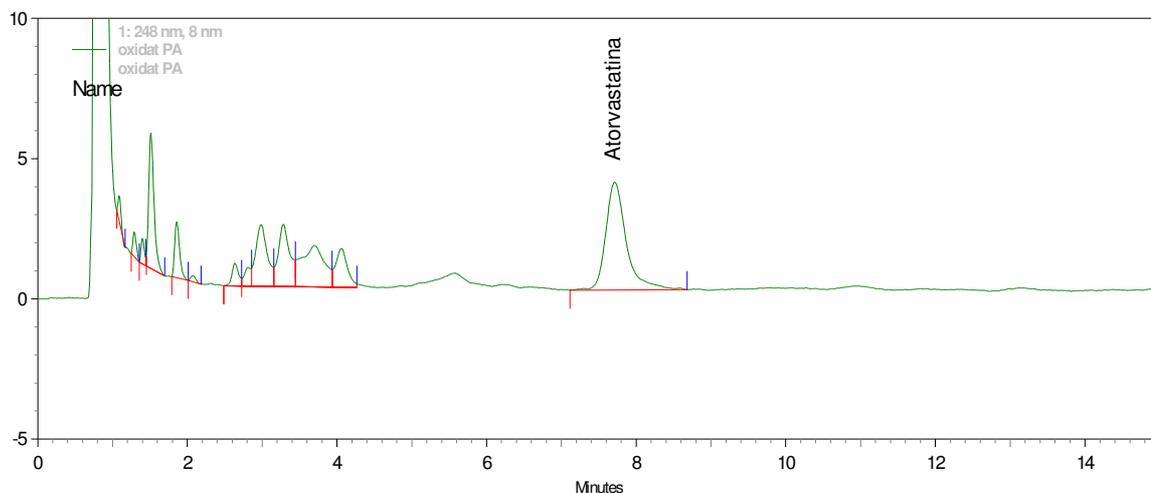


Figura 17 – Amostra de Lipitor® 40 mg, submetida a estresse com H₂O₂ 3% a 80 °C por 2h.

Observa-se, analisando-se a Figura 17, que a amostra de Lipitor® 40 mg não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela degradação oxidativa, empregado-se H₂O₂ 3% a 80°C por 2h.

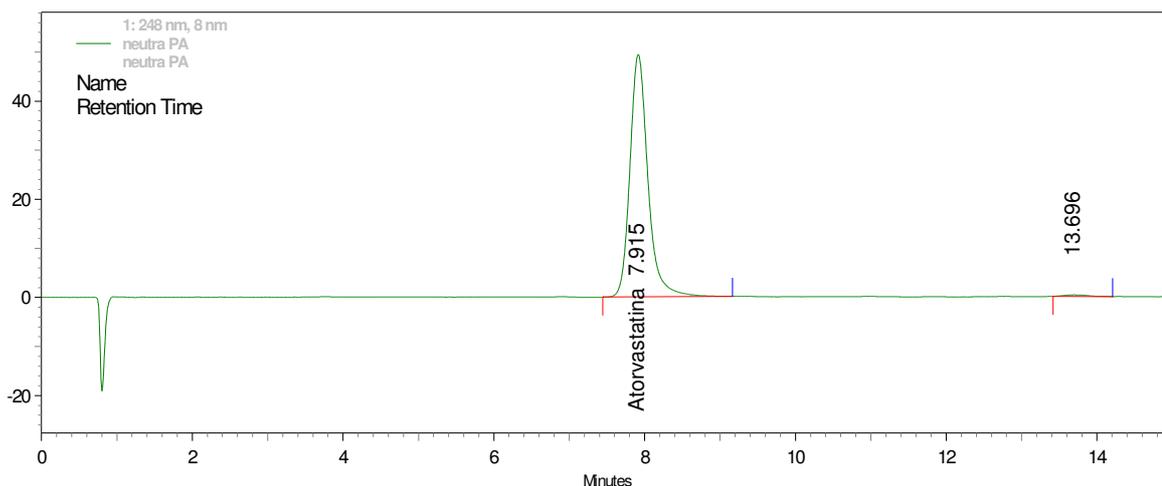


Figura 18 – Amostra de Lipitor® 40 mg, submetida a estresse a 80 °C por 2h.

Observa-se, analisando-se a Figura 18, que a amostra de Lipitor® 40 mg não sofre interferência dos produtos de degradação gerados pela degradação térmica a 80°C por 2h.

Podemos verificar a degradação da atorvastatina cálcica na amostra de Lipitor® 40 mg em meio ácido. O sinal cromatográfico do produto gerado é equivalente àquele identificado na Figura 9.

É possível deduzir que a substância em questão é a atorvastatina lactona, em sua forma desidratada, em função da evidência evidenciado pelo espectro de massas representado pela Figura 13.

A pureza espectral do sinal de atorvastatina cálcica também foi avaliada em cada condição do teste de estresse. Considera-se aceitável um valor de índice de pureza de sinal (*peak purity*) de 0,99 (LÖWEN, 2003). Conforme podemos observar na Tabela 27, os valores obtidos são satisfatórios.

Tabela 27 – Índices de pureza de sinal obtidos no teste de estresse

Hidrólise	Diluyente	Índice de Pureza Obtido	Critério de aceitação
Meio Neutro	Água purificada	1,00000	> 0,99
Meio Oxidante	H ₂ O ₂ 3%	1,00000	
Meio Ácido	HCl 1 mol.L ⁻¹	1,00000	
Meio Alcalino	NaOH 1 mol.L ⁻¹	1,00000	

Analisando a Tabela 27, podemos afirmar que não há interferência dos produtos de degradação no sinal da atorvastatina, pois os valores obtidos são maiores que 0,99.

4.2.3 Linearidade

A verificação da linearidade foi realizada através da obtenção da curva analítica (gráfico das respostas, eixo y, em função das concentrações, eixo x), onde x corresponde à concentração de atorvastatina na solução padrão e y representa a área obtida no cromatograma relativo a uma determinada concentração. As concentrações empregadas foram 50% ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 75% ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 100% ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 125% ($125 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 150% ($150 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em relação à concentração teórica do teste.

Os resultados obtidos para as referidas concentrações estão dispostos na Tabela 28.

Tabela 28 – Resultados obtidos para a avaliação da linearidade

Amostra	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)					
	1	2	3	Média	DP	DPR
Am.1- $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	52,44	52,40	52,27	52,37	0,09	0,18
Am.2 - $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$	77,92	78,04	77,95	77,97	0,06	0,08
Am.3 - $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$	103,62	103,61	103,66	103,63	0,03	0,03
Am.4 - $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$	131,56	131,61	131,65	131,60	0,04	0,03
Am.5 - $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$	156,01	155,89	155,88	155,93	0,07	0,05

A homocedasticidade do método, isto é, a independência das respostas em relação à variância da concentração do analito, foi avaliada através do teste de Cochran.

Os dados para a verificação da homocedasticidade do método estão organizados na Tabela 29.

Tabela 29 – Dados para a verificação da homocedasticidade do método

Injeção	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
1	52,44	77,92	103,62	131,56	156,01
2	52,40	78,04	103,61	131,61	155,89
3	52,27	77,95	103,66	131,65	155,88
Média	52,37	77,97	103,63	131,60	155,93
Variância	0,0085	0,0041	0,0007	0,0020	0,0050

s^2 = variância

$$C = \frac{s^2_{\text{maior}}}{\sum s^2_j}, \quad \text{onde } s^2 = \text{maior variância}$$

$\sum s^2_j$ = somatório das variâncias

Se $C_{\text{calculado}} < C_{\text{crítico}}$, o método é considerado homocedástico.

Se $C_{\text{calculado}} > C_{\text{crítico}}$, o método não é considerado homocedástico.

Para os resultados apresentados na Tabela 14, o valor da maior variância é 0,020 e o somatório das variâncias é igual a 0,0203. O $C_{\text{crítico}}$ é igual a **0,684**. Assim, o valor de $C_{\text{calculado}}$ será:

$$C_{\text{calculado}} = \frac{0,00850}{0,0203} = \mathbf{0,4187}$$

Como o valor de $C_{\text{calculado}}$ é menor do que o de $C_{\text{crítico}}$, podemos dizer que o método é homocedástico. Sendo assim, é possível determinar a equação pelo método dos mínimos quadrados.

A representação gráfica da reta assim como a descrição de sua equação estão presentes no Gráfico 6.

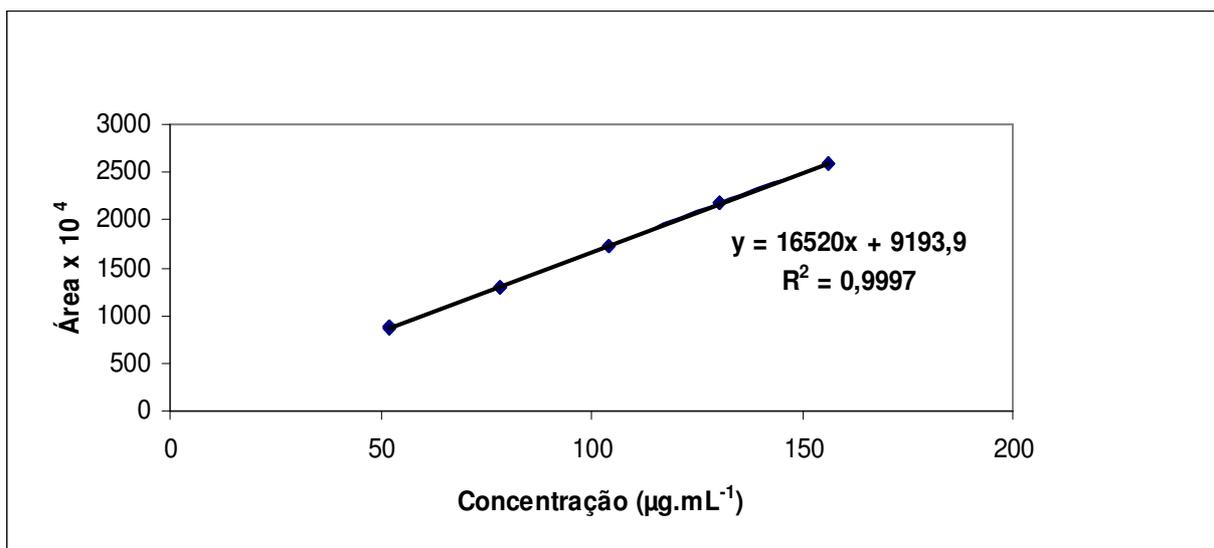


Gráfico 6 – Curva Analítica da atorvastatina cálcica nas concentrações 50, 75, 100, 125 e 150 µg.mL⁻¹ (condições experimentais descritas no item 3.2.1).

A equação obtida é representada pela função $y = 16520x + 9193,9$ e o seu coeficiente de correlação (r) foi calculado pelo software Excel[®] sendo igual a 0,9998.

De acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o valor mínimo aceitável para o coeficiente de correlação é 0,999. Podemos constatar que o valor encontrado é satisfatório (BRASIL, 2003).

Torna-se necessário, uma vez evidenciada a existência de uma relação linear, confirmar a linearidade proposta pela equação da reta estabelecida pela regressão. Iremos testar a hipótese de que o coeficiente angular da reta (b) é igual a 0 (zero). Esta será a hipótese nula (H_0). A hipótese alternativa será a de que o coeficiente angular da reta (b) é diferente de 0 (zero). A análise de variância (ANOVA), a partir de uma distribuição F, é a ferramenta estatística utilizada para este objetivo.

A regressão poderá ser confirmada e aceita caso a hipótese nula seja rejeitada e a hipótese alternativa aceita, ou seja, o valor de $F_{\text{calculado}}$ seja maior que o $F_{\text{crítico}}$.

Os dados relativos a ANOVA para a confirmação da linearidade são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Confirmação da linearidade por ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	5566436856528,84	5566436856528,84	37559,1	6,92943592E-24
Resíduo	13	1926662901,55773	148204838,581364		
Total	14	5568363519430,4			

Gl = graus de liberdade; SQ = soma quadrática; MQ = média quadrática; F = F calculado; E = exponencial.

Podemos então dizer que o método é linear no intervalo de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$, pois o valor de $F_{\text{calculado}}$ é maior do que o $F_{\text{crítico}}$.

Determinou-se também os coeficientes reta e os seus valores máximo e mínimo para um nível de significância (α) igual a 0,05%, a partir dos quais foram calculados os intervalos de confiança para os coeficientes da reta.

$$IC(a) = 29566,3 - 9193,9 = 20372,4$$

$$IC(b) = 16703,9 - 16519,8 = 184,1$$

Os dados para o cálculo do intervalo de confiança dos coeficientes da reta estão descritos na Tabela 31.

Tabela 31 - Dados para o cálculo do intervalo de confiança dos coeficientes da reta

	Coeficientes	95% inferiores	95% superiores
Interseção	9193,9	-11178,5	29566,3
Variável X	16519,8	16335,6	16703,9

Os resíduos foram calculados e a partir destes valores procedeu-se a plotagem dessa distribuição pelos níveis de concentração, conforme representados na Tabela 32 e no Gráfico 7. A população dos resíduos normalmente distribuídos apresenta média igual a zero (MILLER, 1988).

Tabela 32 – Resíduos obtidos

Observação	Y previsto	Resíduo
1	870699,346921253	4869,65307874721
2	870699,346921253	4162,65307874721
3	870699,346921253	1943,65307874721
4	1301534,65249522	-5102,65249522379
5	1301534,65249522	-3074,65249522379
6	1301534,65249522	-4626,65249522379
7	1732204,7604827	-11196,7604827017
8	1732204,7604827	-11404,7604827017
9	1732204,7604827	-10539,7604827017
10	2163040,06605667	19519,9339433275
11	2163040,06605667	20301,9339433275
12	2163040,06605667	20977,9339433275
13	2593710,17404415	-7258,17404414992
14	2593710,17404415	-9224,17404414992
15	2593710,17404415	-9348,17404414992

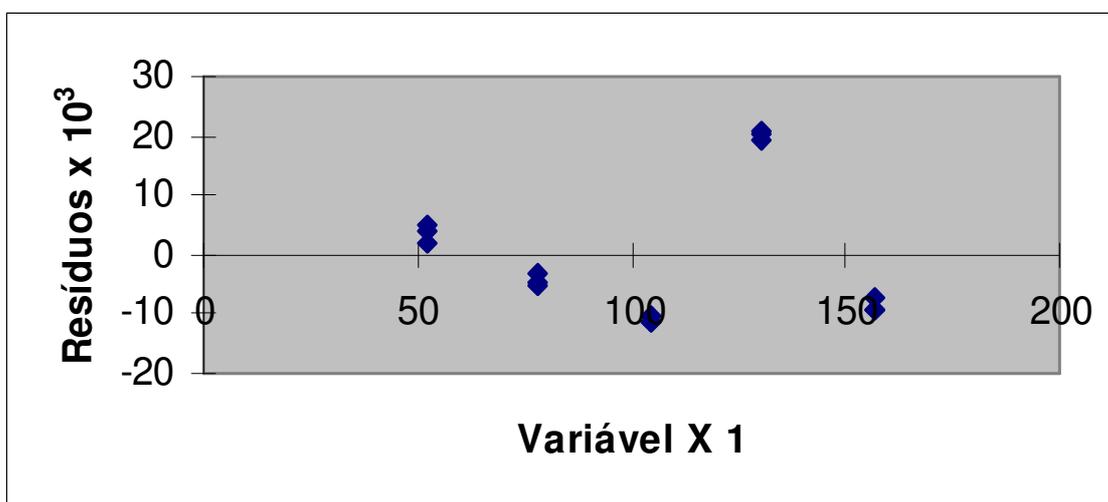


Gráfico 7 – Plotagem de resíduos da Curva Analítica apresentada no Gráfico 6

O gráfico de ajuste de linha também foi construído para avaliação da sobreposição das curvas de Y previsto e Y experimental, conforme Gráfico 8.

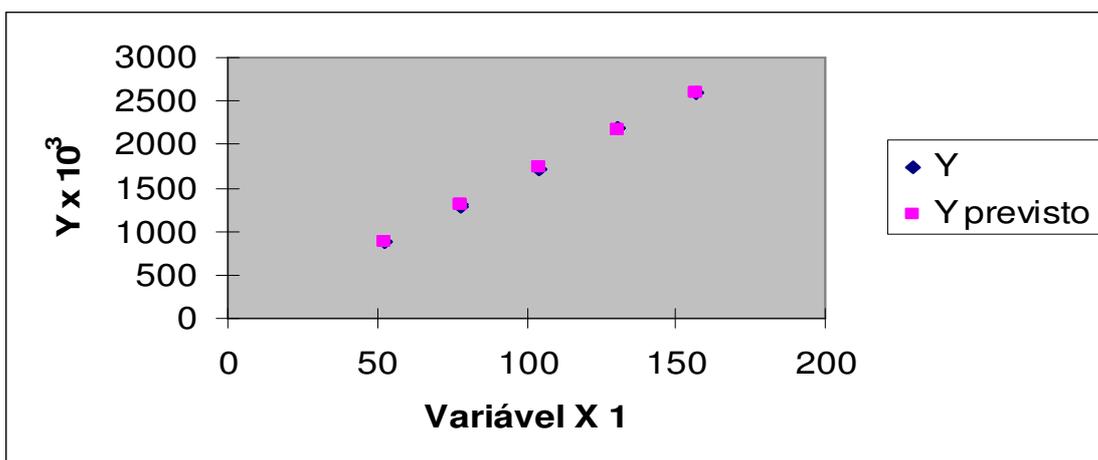


Gráfico 8 – Plotagem de ajuste de linha

4.2.4 Exatidão

Cada nível de concentração foi analisado em triplicata. Foi determinado o percentual recuperado pelo método (taxa de recuperação), ou seja, a relação percentual entre a concentração de atorvastatina, a cada nível de concentração, e a concentração esperada (conforme fórmula descrita no item 3.4.3).

Tabela 33 – Resultados da Exatidão (percentual recuperado)

Concentração da amostra	50%	100%	150%
Replicata A1	98,76	99,92	100,05
Replicata A2	98,90	99,84	99,94
Replicata A3	99,02	100,02	99,60
Replicata B1	99,10	100,10	100,15
Replicata B2	99,74	100,10	100,22
Replicata B3	99,67	99,93	100,18
Replicata C1	99,79	100,00	100,04
Replicata C2	99,84	100,04	100,08
Replicata C3	99,75	100,13	100,20
Média	99,40	100,00	100,05
DP	0,44	0,09	0,19
DPR	0,44	0,09	0,19
% Recuperação	99,40	100,00	100,05
IC	0,31	0,06	0,13

Analisando a Tabela 33, podemos verificar que os valores obtidos encontram-se em conformidade com o estabelecido pela bibliografia (SHABIR, 2003). Tais valores devem estar compreendidos entre 98,0% e 102,0%.

4.2.5 Precisão

O parâmetro precisão foi avaliado em dois níveis: repetitividade e precisão intermediária.

4.2.5.1. Repetitividade

A verificação da repetitividade foi realizada através da injeção da solução padrão correspondente ao nível de concentração 100% por 6 (seis) vezes.

Os resultados encontrados estão descritos na Tabela 34.

Tabela 34 – Resultados obtidos para a avaliação da repetitividade

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração das seis injeções de padrão a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (100%)
Injeção A	103,62
Injeção B	103,61
Injeção C	103,66
Injeção D	103,50
Injeção E	103,63
Injeção F	103,57
Média	103,60
DP	0,06
DPR	0,05

O desvio padrão relativo das 6 (seis) injeções (0,05%) foi considerado satisfatório, pois é recomendado um valor máximo de 1,0% quando realiza-se cinco ou mais injeções de uma mesma solução (SHABIR, 2003).

4.2.5.2. Precisão Intermediária

A avaliação da precisão intermediária foi realizada variando-se o analista e o dia de análise.

Os resultados obtidos foram avaliados através da comparação das variâncias dos mesmos, empregando-se o teste F de Snedecor. A hipótese nula (H_0) é de que não há diferença estatisticamente significativa entre as variâncias, indicando que não há diferença entre as análises realizadas pelos analistas. Os resultados obtidos estão representados na Tabela 35.

Tabela 35 – Resultados da avaliação de precisão intermediária

Amostras	Analista 1 – Dia 1	Analista 2 – Dia 2
A	99,60	99,45
B	101,43	101,23
C	101,43	100,95
D	99,82	100,31
E	100,87	99,95
F	101,17	101,17
G	98,74	101,60
H	100,77	100,39
I	100,75	100,34
Média	100,73	100,60
DP	1,19	0,69
DPR	1,18	0,69

Tabela 36 – Resultados do teste F de Snedecor entre os analistas 1 e 2

Teste F: duas amostras para variâncias		
	Variável 1 = Analista 1	Variável 2 = Analista 2
Média	100,73	100,11
Variância	0,26	0,12
Observações	9	9
gl	8	8
F		2,97
F crítico bi-caudal		3,43

gl = graus de liberdade; F = F estatístico calculado

Analisando a Tabela 36, podemos verificar que o valor de F (2,97) é menor do que o valor de F crítico bi-caudal (3,43). Logo, a hipótese nula (H_0) é aceita e é um indicativo de que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos Analistas 1 e 2.

4.2.6 Robustez

O parâmetro robustez foi avaliado variando-se os parâmetros pH da fase móvel (pH), composição da fase móvel (CFM), fluxo (FL) e temperatura da coluna (TC), conforme Quadro 1.

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 37.

Tabela 37 – Resultados obtidos no ensaio de robustez, avaliando os parâmetros pH da fase móvel, composição da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna.

FL	CFM (% ACN)	TC = 35 °C		TC = 25 °C	
		pH = 2,9	pH = 3,1	pH = 2,9	pH = 3,1
1,2 mL.min ⁻¹	38%	100,29	100,49	100,19	100,26
	42%	100,41	100,80	100,31	100,21
1,4 mL.min ⁻¹	38%	100,29	100,59	100,50	100,43
	42%	100,61	100,50	100,43	100,70

Tais resultados foram submetidos à análise de variância para identificar que parâmetros de análise são significativos e, conseqüentemente, deverão ser controlados. A estatística empregada foi a ANOVA ($\alpha = 0,05$). Os resultados derivados desse teste estão representados na Tabela 38.

Tabela 38- Resultados de ANOVA do ensaio de robustez

Fator	p-valor individual	p-valor simultâneo
Fase Móvel	0,1923	0,9207
Fluxo	0,2878	0,9943
pH	0,3530	0,9995
Temperatura	0,3655	0,9999
Fluxo*Fase Móvel	0,9005	1,0000
pH*Fase Móvel	0,8689	1,0000
Fluxo*pH	0,7065	1,0000
Temperatura*Fase Móvel	0,5315	1,0000
Temperatura*Fluxo	0,1382	0,8079
pH* Temperatura	0,6610	1,0000
Fase Móvel* Fluxo* pH	0,9005	1,0000
Fase Móvel* Fluxo*Temperatura	0,8856	1,0000
Fase Móvel* pH*Temperatura	0,8521	1,0000
Fluxo* pH* Temperatura	0,3190	1,0000
Temperatura*Fluxo*pH*Fase Móvel	0,2789	1,0000

Os valores de p-valor para os fatores individualmente e simultaneamente são maiores do que 0,05 ($p\text{-valor} > \alpha$), logo não são significativos. Então podemos dizer que o método é robusto mediante as variações empregadas (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

4.3 Comparação entre o método proposto e o método de melhor desempenho encontrado na literatura

A metodologia desenvolvida por SONAWANE et al. (2006) para determinação de Atorvastatina Cálcica em comprimidos foi considerada, para fins de comparação, a de melhor desempenho tendo como critério a avaliação dos parâmetros de linearidade (R^2), precisão (%RSD) e exatidão (% recuperado).

Quanto maior a linearidade apresentada, ou seja, um valor para o fator de correlação (R^2) mais próximo de 1; quanto mais preciso os resultados, ou seja, menor dispersão ou mais baixos valores de %RSD; e quanto mais exato, ou seja, mais próximo de 100% for o valor do percentual recuperado, melhor será a performance da metodologia analítica.

O método proposto possui vantagens em relação ao descrito por SONAWANE et al. (2006). O fato de não empregar um padrão interno e nem o reagente trietilamina confere a metodologia proposta um menor custo.

5. Conclusão

A metodologia proposta foi desenvolvida para o insumo farmacêutico ativo e comprimido, sendo estabelecidos os parâmetros cromatográficos de análise.

A fase móvel é composta de uma mistura de solução tampão de acetato de amônio 0,02 M pH 3,0 e acetonitrila (60:40 %v/v), o fluxo igual a 1,3 mL.min⁻¹, detecção UV-Vis a 248 nm e coluna Novapak[®] C18 150 x 4,6 mm, 4 µm.

Tal metodologia foi validada e demonstrou linearidade no intervalo de concentração de 50 a 150 µg.mL⁻¹, por apresentar um coeficiente de determinação maior que 0,99, conforme estabelecido pela Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Demonstrou ter precisão satisfatória ao apresentar desvio padrão relativo percentual inferior a 2% e ao não exibir diferença estatística entre os resultados apresentados por analistas diferentes em dias diferentes.

Apresentou exatidão adequada ao fornecer taxas de recuperação entre 98% e 102%.

O método demonstrou ser seletivo para a quantificação de atorvastatina em insumo farmacêutico ativo e em comprimidos de 40 mg. Os excipientes e os produtos de degradação gerados não interferem nas análises por não haver co-eluição destes com a atorvastatina.

O método exibiu robustez ao não apresentar diferença estatisticamente significativa entre os resultados gerados a partir de pequenas e deliberadas variações nos diferentes parâmetros das condições cromatográficas.

O principal produto de degradação gerado no teste de estresse foi a atorvastatina lactona, em sua forma desidratada. A degradação da atorvastatina foi mais significativa nos meios ácido e neutro e mais pronunciada no insumo farmacêutico ativo do que nos comprimidos.

A metodologia proposta pode ser empregada em laboratórios para o controle de controle de qualidade da atorvastatina em comprimidos e em insumo farmacêutico ativo por ser capaz de gerar resultados confiáveis, demonstrado através do estudo de validação.

Comparando-se com a metodologia de melhor desempenho descrita na literatura, a metodologia proposta apresenta um menor custo.

Em virtude da inexistência de monografias, descritas em compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA, para o controle de qualidade da atorvastatina em comprimidos de 40 mg e em insumo farmacêutico ativo, a metodologia descrita pode ser sugerida para inclusão na Farmacopéia Brasileira.

Podemos, desta maneira, contribuir para as atividades de monitoramento do controle de qualidade de produtos e insumos sujeitos à Vigilância Sanitária, desenvolvendo metodologias analíticas confiáveis, confirmadas pelo processo de validação.

6. Referências

ARAUJO, D. V.; BAHIA, L.; SOUZA C.P.R.; PAVÃO, A.L.B. Cost-effectiveness and budget impact analysis of rosuvastatin and atorvastatin for LDL-cholesterol and cardiovascular events lowering within the SUS scenario. **The International Journal of Atherosclerosis**, n.2, v.3, p.189-194, Sep. 2007.

BAHRAMI, G.; MOHAMMADI, B.; MIRZAEI, S.; KIANI, A. Determination of atorvastatin in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography B**, n.826, p.41-45, Nov. 2005.

BAUMANN, K.L.; BUTLER, D.E.; DEERING, C.F.; MENNEN, K.E.; MILLAR, A.; NANNINGA, T.N.; PALMER, C.W.; ROTH, B.D. The Convergent Synthesis of CI-981, an Optically Active, Highly Potent, Tissue Selective Inhibitor of HMG-CoA Reductase. **Tetrahedron Letters**, v.33, n.17, p.2283-2284, Apr. 1992.

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

BRASIL. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Brasileiro de Avaliação em Tecnologias em Saúde. Boletim nº 9, setembro de 2009. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/ct/pdf/brats2009_n9.pdf. Acesso em 13/07/2010.

BULLEN, W.W.; MILLER, R.A; HAYES, R.N. Development and validation of a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for atorvastatin, orto-hydroxy atorvastatin, and para-hydroxy atorvastatin in human, dog, and rat plasma. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v.10, n.1, p.55-66, Jan. 1999.

CAMPO, V.L. ; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, São Paulo, 30(2), p.425-430, mar. 2007.

CARMO, E.H; BARRETO, M.L.; DA SILVA JR., J.B. Mudanças nos padrões de morbimortalidade da população brasileira: os desafios para um novo século. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 12(2), 63-75, jun.2003.

CASS; Q.B; DEGANI, A.L.G; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, 7, p.21-25, mai. 1998.

CHAUDARI, B.G.; PATEL, N.M. ; SHAH, P.B.; PATEL, L.J.; PATEL, V.P. Stability-indicating reversed-phase liquid chromatographic method for simultaneous determination of atorvastatin and ezetimibe from their combination drug products. **Journal of AOAC International**, v.90, n.6, p.1539-1553, Nov. 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia à Líquido de Alto Desempenho HPLC**. São Paulo: Edgard Blücher, 2000. p.8.

COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde**. São Paulo: Hucitec/Sobravime, 1999.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Conhecendo a Vigilância Sanitária. Disponível em: http://ibict.metodista.br/tedeSimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=1437. Acesso em 13/04/2009.

DOWNS J.R.; CLEARFIELD, M.; WEIS, S.; WHITNEY, E.; SHAPIRO, D.R.; BEERE, P.A.; LANGENDORFER, A.; STEIN, E.A.; KRUYER, W.; GOTTO, A.M. Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: Results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. **JAMA**, v.279, n.20, p.1615-1622, May 1998.

ENDO, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. **Journal of Lipid Research**, v.33, n.11, p. 1569-1582, Nov. 1992.

ERTÜRK, S; SEVINÇ AKTAS, E.; ERSOY, L.; FIÇICIOĞLU, S. An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drugs and tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.33, n.5, p.1017-1023, Dec. 2003.

GIL, E.S. **Controle de Qualidade Físico-químico de Medicamentos**. São Paulo: Pharmabooks, 2010. p.413; p.420-421; p.424.

GOMES, F. P. **Validação de métodos de análise de estatinas em medicamentos**. São Paulo: USP, 2008. 172p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

HERMANN, M.; CHRISTENSEN, H.; REUBSAET, J.L.E. Determination of atorvastatin and metabolites in human plasma with solid-phase extraction followed by LC-tandem MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.382, n.5, p. 1003-1015, Jul. 2005.

JAIN, N.; RAGHUWANSHI, R.; JAIN, D. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of Atorvastatin Calcium and Fenofibrate in tablets dosage forms. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n.2, p.263-265. Mar.-Apr. 2008.

KHEDR, A. Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay of atorvastatin with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v.90, n.6, p.1547-1553, Nov. 2007.

LAPPONI, J.C. **Estatística usando o Excel**. São Paulo: Lapponi treinamento e editora, 2000.

LEE, S.H.; CHUNG, N.; KWAN, J.; KIM,D.I.; KIM, W.H.; KIM, C.J.; KIM, H.S.; PARK, S.H.; SEO, H.S.; SHIN. D.G.; SHIN, Y.W.; SHIM, W.J.; AHN, T.H.; HO YUN, K; YOON, M.H.; CHA, K.S.; CHOI, S.W.; HAN, S.W.; HYON, M.S. Comparison of the efficacy and tolerability of pitavastatin and atorvastatin: an 8-week, multicenter, randomized, open-label, dose-titration study in Korean patients with hypercholesterolemia. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n.11, p.2365-2373, Nov.2007.

LENNERNÄS, H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n.13, p. 1141-1160, 2003.

LIMA, W.A.; GLANER, M.F. Principais fatores de risco relacionados às doenças cardiovasculares. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desenvolvimento Humano**, Florianópolis, v.8, n.1, p.96-104, abr. 2006.

LÖWEN, T. C. R. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de lamivudina e do ensaio limite do enantiômero (+)BCH-189 em comprimidos de lamivudina**. Rio de Janeiro: INCQS, 2003. 105p. il. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro.

LUCCHESI, G. Vigilância Sanitária: o elo perdido. **Divulgação em Saúde para Debate**, Londrina, n. 7, p. 48-52, mai.1992.

MALINOWSKI, J.M. Atorvastatin: a hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. **American Journal of Health System Pharmacy**, v.55, n.21, p.2253-2267, Nov. 1998.

MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantification of Atorvastatin Calcium in tablets by FT-Raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 49, n.1, p.168-172. Jan. 2009

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**. 2 ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1988.

MOHAMMADI, A.; REZANOUR, N.; ANSARI DOGAHEH, M.; GHORBANI, BIDKORBEH, F.; WALKER, R.B. A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. **Journal of Chromatography B**, v.846, n.1-2, p.215-221, Feb. 2007.

NEUMAM, C. Dois dos 20 remédios mais vendidos no Brasil têm patente ameaçada. **R7 notícias**, Rio de Janeiro, Abr. 2010. Disponível em <http://noticias.r7.com/saude/noticias/dois-dos-20-remedios-mais-vendidosno-brasil-tem-patente-ameacada-20100412.html> . Acesso em 23 jul. 2010.

NOVAKOVA, L.; SATINSKY, D.; SOLICH, P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. **Trends in Analytical Chemistry**, v.27, n.4, p.352-367, Apr. 2008.

NOVAKOVA, L.; VLCKOVA, H.; SATINSKY, D.; SADILEK, P.; SOLICHOVA, D.; BLAHA, M.; BLAHA, V.; SOLICH, P. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin. **Journal of Chromatography B**, v.887, p.2093-2183, Jul. 2009.

OLIVEIRA, A. M. C. **A experiência de um laboratório oficial e desenvolvimento e validação de uma metodologia para análise de teor de didanosina comprimido: ferramenta para as boas práticas de fabricação**. Rio de Janeiro: INCQS, 2003. 82p. il. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro.

QUTAB, S.S.; RAZZAQ, S.N.; KHAN, I.U. Simultaneous determination of atorvastatin calcium and ezetimibe in pharmaceutical formulations by liquid chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.15, n.2, p.139-144, Feb. 2007.

SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **Lancet**, n.344, v.8934, p.1383-1389, Nov. 1994.

SCHACHTER, M. Chemical, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.19, n.1, p.117-125, Feb. 2005.

SHABIR, G.A. Validation of high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v.987, n.1-2, p. 57-66, Feb. 2003.

SHAH, R.P.; KUMAR, V.; SINGH, S. LC-MS/MS Studies on Identification and Characterization of Hydrolytic Products of Atorvastatin. In: ISMAS-WS, 12, 2007, Goa. Disponível em: <http://www.nio.org/userfiles/file/events/RSP-7%20Ravishah.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2010.

SHEPHERD J.; COBBE, S.M.; FORD, I.; ISLES, C.G.; LORIMER, A.R.; MACFARLANE, P.W.; MCKILLOP, J.H.; PACKARD, C.J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. **The New England Journal of Medicine**, v.333, n.20, p.1301-1307, Nov. 1995.

SILVA, A.C.P. O Laboratório oficial na avaliação analítica. In: ROZENFELD, S. (org.). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2001.

SOLER, A.; DEIG, E.; GUIL, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍN, M.; GUEJAR, A.; PEDROL, E. Effectiveness and tolerance of atorvastatin for antiretroviral therapy-secondary dyslipemia. *Med. Clin. Barc.*, v. 127, n. 7, p.250-252, Jul. 2006.

SONAWANE, S.S.; SHIRKHEDKAR, A.A.; FURSULE, R.A.; SURANA, S.J. Application of UV-spectrophotometry and RP-HPLC for simultaneous determination

of Atorvastatin Calcium and Ezetimibe in pharmaceutical dosage form. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v.1, n.1, p.31-41, Sep.2006.

STANCU, C.; SIMA, A. Statin: mechanism of action and effects. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.5, n.4, p.378-387, Oct-Dec. 2001.

STANISZ, B.; KANIA, L. Validation of HPLC method for determination of atorvastatin in tablets and for monitoring stability in solid phase. **Drug Research**, v.63, n.6, p.471-476, Jun. 2006.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.C. Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v.29, n.2, p.338-350, Mar./Abr. 2006.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F; COLLINS, C.H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLA-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p.616-623, jul. 2002.

VORA, D.N.; KADAV, A.A. Stability-indicating UPLC method for simultaneous determination of atorvastatin, fenofibrate and their degradation products in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.48, p.120-126, Sep. 2008.

YOKOTE, K.; BUJO, H.; HANAOKA, H.; SHINOMIYA, M.; MIKAMI, K.; MIYASHITA, Y.; NISHIKAWA, T.; KODAMA, T.; TADA, N.; SAITO, Y. Multicenter collaborative parallel group comparative study of pitavastatin and atorvastatin in japanese hypercholesterolemic patients collaborative study on hypercholesterolemia drug intervention and their benefits for arteriosclerosis prevention (CHIBA study). **Atherosclerosis**, v. 201, p.345-352, Dec. 2008.

ZAHEER, Z.; FAROOQUI, M.N.; MANGLE, A.A.; NIKALJE, A.G. Stability-indicating high performance liquid chromatographic determination of atorvastatin calcium in pharmaceutical dosage form. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.2, n.10, p.204-210, Nov.2008.