

Erika Bachini Fonseca

**Avaliação dos Produtos de Degradação em Comprimidos de
Sinvastatina:
Estudos de Estabilidade e Validação de Métodos**

Rio de Janeiro

2012

Erika Bachini Fonseca

**Avaliação dos Produtos de Degradação em Comprimidos de Sinvastatina:
Estudo de Estabilidade e Validação de Método**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador : Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Rio de Janeiro
2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

F676a

Fonseca, Erika Bachini

Avaliação dos produtos de degradação em comprimidos de sinvastatina: estudo de estabilidade e validação de métodos. / Erika Bachini Fonseca – Rio de Janeiro, 2012.

XVIII, 87f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2012.

Bibliografia: f. 91-98

1. Estatinas hipercolesterolemia 2. Produtos de degradação. 3. Estabilidade. 4. Validação. I. Título.

CDD 615.1

Erika Bachini Fonseca

**Avaliação dos Produtos de Degradação em Comprimidos de Sinvastatina:
Estudo de Estabilidade e Validação de Método**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em 12 de dezembro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
Farmanguinhos/Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Erika Martins de Carvalho
Farmanguinhos/Fiocruz

Prof^a. Dr^a. Sheila Garcia
FF/UFRJ

Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva
Farmanguinhos/Fiocruz
Presidente da Comissão Examinadora

Rio de Janeiro
2012

Dedico a todos que buscam por esta oportunidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Leonardo Lucchett, por aceitar orientar-me e pelo tempo dedicado a isto.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Analítico, especialmente a Viviane Severini, pela disposição em ajudar-me, nos momentos em que precisei.

À Michele de Medeiros Rocha, Regina Célia S Nascimento e Isabel Cristina Sobrinho pelos ensinamentos obtidos ao longo da minha carreira e que foram essenciais para realização deste trabalho.

Aos meus pais Zilda de Lourdes Bachini e Ernani Fonseca e à minha avó Leir Martins Bachini por suas dedicações e esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Ao Christian Gripp Gibaja pela paciência e compreensão nos momentos difíceis durante a realização deste trabalho.

O saber, agente aprende com os mestres e com os livros.

A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

RESUMO

FONSECA, Erika B. *Avaliação dos Produtos de Degradação em Comprimidos de Sinvastatina: Estudo de Estabilidade e Validação de Método*. 115f. 2012. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

As estatinas são substâncias que reduzem os níveis lipídicos no sangue, sendo a hipercolesterolemia o fator causal da aterosclerose, doenças coronarianas dentre outras. Devido ao alto índice do distúrbio na população brasileira, as estatinas são usadas como tratamento de primeira escolha, por serem mais seguras e eficazes. Sendo que duas estatinas (a atorvastatina e a sinvastatina) fazem parte da RENAME e sinvastatina incluída no programa “Aqui tem farmácia popular”. Devido à ampla utilização da sinvastatina, faz-se necessária a avaliação da qualidade dos medicamentos, sendo relevante o conhecimento de sua estabilidade química e física até o fim de seu prazo de validade. O monitoramento de produtos de degradação faz parte desta avaliação e é necessária a implementação de metodologias analíticas validadas de pesquisa destas impurezas na rotina dos estudos de estabilidade. Além disso, é essencial o desenvolvimento contínuo de formulações melhoradas para garantir a disponibilidade, eficácia e segurança do fármaco. A maioria das técnicas descritas na literatura são usadas para quantificar o teor de sinvastatina e seus metabólitos no sangue. Os compêndios oficiais disponibilizam apenas metodologia para a quantificação de produtos de degradação na matéria-prima. O objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de produtos de degradação na formulação de comprimidos durante o prazo de validade. Para isto, foram propostas a adaptação e a validação da metodologia da Farmacopéia Americana da matéria-prima. O método proposto empregou coluna cromatográfica C18 e fase móvel constituída de de solução de ácido fosfórico e acetonitrila misturados por gradiente de eluição com tempo total de corrida de 13 minutos. O fluxo empregado foi de 3 mL/min. e detecção UV/VIS a 238 nm. A metodologia apresentou resultados satisfatórios de especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. O estudo de estabilidade foi conduzido numa condição controlada de temperatura e umidade (30°C, 75% U.R.) ao longo do prazo de validade e demonstrou que não há formação ou aumento dos níveis dos produtos de degradação na formulação de comprimidos.

Palavras chave: Estatinas. Hipercolesterolemia. Produtos de degradação. Estabilidade. Validação.

ABSTRACT

Statins are substances that reduce blood lipid levels, being hypercholesterolemia the causative factor of atherosclerosis, coronary heart disease among others. Due to the high rate of the disorder in the population, statins are used as first-line treatment because of their safety and effectiveness. Two statins (atorvastatin and simvastatin) are part of RENAME and simvastatin is included in the program "Here's pharmacy popular". Due to the wide use of simvastatin, it is necessary to evaluate the quality of drugs being relevant knowledge of their chemical and physical stability until the end of its shelf life. The monitoring of degradation products and is part of this assessment and it is necessary to implement validated analytical methodologies in the routine of stability studies. Furthermore, it is essential to continuing development of improved formulations for the availability, effectiveness and safety of the drug. Most techniques described in literature are used to quantify the amount of simvastatin and its metabolites in blood. The official compendia only provide methodology for quantification of degradation products in raw material. The aim of this study was to evaluate the formation of degradation products in tablet formulation during the shelf life. For this, was proposed adaptation and validation of the methodology of the American Pharmacopoeia of the raw material. The proposed method employed C18 chromatographic column and a mobile phase consisting of a phosphoric acid solution and acetonitrile mixed by gradient elution with a total run time of 13 minutes. The flow was 3 ml / min. and detection UV / VIS at 238 nm. The methodology presented satisfactory specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. The stability study was conducted in a controlled condition of temperature and humidity (30 ° C, 75% RH) during the shelf life and showed no training or increased levels of degradation products in tablet formulation.

Keywords: statins, hypercholesterolemia, degradation products, stability, validation

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

[α]	rotação específica
a	Coefficiente linear
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b	Coefficiente angular
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT	Colesterol total
DAD	Diod array
DNSP	Departamento Nacional de Saúde Pública
DP	Desvio-padrão
DPR	Desvio padrão relativo
Fcalculado	F estatístico de Snedecor
Ftabelado	F estatístico tabelado (Teste de F de Snedecor)
FDA	Food and Drug Administration
gl	Graus de liberdade
H0	Hipótese nula
H	Hipótese alternativa
HF	Hipercolesterolemia Familiar
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril coenzima A
IC	Intervalo de Confiança
k'	Fator de capacidade
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LDL	Low Density Lipoprotein
MQ	Média quadrática
N	Números de pratos teóricos
PA	Para análise
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVDF	Polivildilene Fluoride

r	Coeficiente de correlação
Res	Resolução (cromatografia)
R ²	Coeficiente de determinação
RC	Regenerated Cellulose
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
rpm	Rotacões por minuto
T	Fator de cauda ou assimetria
TR	Tempo de retenção
USP	United States Pharmacopeia
UV/VIS	Ultravioleta/visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sinvastatina nas formas lactona e β -hidroxiácido.....	23
Figura 2	Efeito das estatinas na biossíntese do colesterol.....	24
Figura 3	Cromatogramas hipotéticos do teste de estresse e dos estudos de estabilidade de longa duração ou acelerada.....	35
Figura 4	Estruturas dos produtos de degradação da sinvastatina.....	32
Figura 5	Cromatograma representativo da solução de adequação.....	64
Figura 6	Cromatogramas representativos das soluções-branco nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise/termólise, oxidação e umidade.....	65
Figura 7	Cromatogramas representativos das soluções-placebo nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise, oxidação, termólise e umidade.....	66
Figura 8	Cromatogramas representativos das soluções-amostra nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise, oxidação, termólise e umidade.....	68
Figura 9	Cromatogramas representativos das soluções da matéria-prima nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise, oxidação, termólise e umidade.....	69
Figura 10	Sobreposição da solução padrão nas condições normal, fluxo de 2,9mL/min. e fluxo de 3,1mL/min. temperatura de 49°C, temperatura de 51°C e variação da composição da fase móvel.....	82
Figura 11	Sobreposição das soluções amostra nas condições normal, fluxo de 2,9mL/min. e fluxo de 3,1mL/min. temperatura de 49°C, temperatura de 51°C e variação da composição da fase móvel.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipos e principais objetivos e finalidades dos estudos de estabilidade.....	29
Tabela 2	Protocolo para a condução dos testes de estresse.....	33
Tabela 3	Exemplo de variação nos fatores cromatográficos para a determinação da robustez.....	42
Tabela 4	Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	43
Tabela 5	Classificação das metodologias analíticas.....	43
Tabela 6	Gradiente de eluição do método de quantificação de produtos de degradação por CLAE.....	48
Tabela 7	Tempo de retenção relativo das impurezas.....	51
Tabela 8	Parâmetros do sistema de adequação.....	52
Tabela 9	Preparo das soluções para a avaliação do LQ.....	56
Tabela 10	Preparo das soluções para a avaliação da linearidade.....	57
Tabela 11	Preparo das soluções para a avaliação da exatidão.....	58
Tabela 12	Preparo das soluções para a avaliação da precisão intra-ensaio	59
Tabela 13	Preparo das soluções para a avaliação da precisão inter-ensaio	60
Tabela 14	Resultado para o teste de adequação do sistema.....	64
Tabela 15	Resumo dos produtos de degradação obtidos após os testes de degradação na formulação.....	69
Tabela 16	Resumo dos produtos de degradação obtidos após os testes de degradação na matéria prima de sinvastatina.....	70
Tabela 17	Resultados do teste de LD e LQ teóricos.....	73
Tabela 18	Dados das curvas 1, 2 e 3 para determinação dos LD e LQ.....	74
Tabela 19	Valores obtidos de LD e LQ.....	74
Tabela 20	Resultados obtidos da curva da linearidade da sinvastatina.....	75
Tabela 21	Dados das estatísticas de regressão da curva analítica da sinvastatina.....	76
Tabela 22	Resultados dos resíduos da curva analítica da sinvastatina.....	77
Tabela 23	Confirmação da linearidade por ANOVA.....	78
Tabela 24	Dados e resultados das amostras da exatidão.....	79
Tabela 25	Dados e resultados das amostras da precisão intra-ensaio.....	80

Tabela 26	Dados e resultados das amostras da precisão inter-corrída.....	81
Tabela 27	Resultado do teste F entre os analistas 1 e 2.....	81
Tabela 28	Resultados da estabilidade das soluções.....	84
Tabela 29	Áreas obtidas no teste de membrana da solução padrão.....	85
Tabela 30	Áreas obtidas no teste de membrana da solução amostra.....	85
Tabela 31	Teste T no teste de membrana da solução padrão.....	86
Tabela 32	Teste T no teste de membrana da solução padrão.....	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Pureza de pico da solução-amostra na condição normal.....	70
Gráfico 2	Pureza de pico da solução-amostra na condição de hidrólise ácida.....	71
Gráfico 3	Pureza de pico da solução-amostra na condição de hidrólise básica.....	71
Gráfico 4	Pureza de pico da solução-amostra na condição de termólise.....	71
Gráfico 5	Pureza de pico da solução-amostra na condição de oxidação....	72
Gráfico 6	Pureza de pico da solução-amostra na condição de fotólise.....	72
Gráfico 7	Pureza de pico da solução-amostra na condição de umidade.....	72
Gráfico 8	Linearidade da curva da sinvastatina.....	76
Gráfico 9	Gráfico dos resíduos.....	78
Gráfico 10	Resultados obtidos nos testes físicos de umidade e dureza ao longo do estudo de estabilidade.....	88
Gráfico 11	Resultados obtidos nos testes físicos de umidade e dureza ao longo do estudo de estabilidade.....	88
Gráfico 12	Resultados obtidos nos testes físico-químicos de teor e dissolução ao longo do estudo de estabilidade.....	89

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
1.1 Características farmacológicas da sinvastatina.....	24
1.1.1 Efeitos pleiotrópicos.....	24
1.2 Características físico-químicas.....	24
1.3 Estabilidade de medicamentos.....	25
1.3.1 RE 01/2005.....	27
1.4 Impurezas.....	30
1.5 Teste de estresse.....	31
1.6 Método indicativo de estabilidade.....	33
1.7 Metodologias para determinação dos produtos de degradação da sinvastatina.....	35
1.8 Validação.....	37
1.8.1 Especificidade e Seletividade	38
1.8.2 Linearidade.....	39
1.8.3 Sensibilidade.....	39
1.8.3.1 Limite de detecção.....	39
1.8.3.2 Limite de quantificação.....	39
1.8.4 Exatidão.....	40
1.8.5 Precisão.....	40
1.8.5.1 Repetitividade.....	41
1.8.5.2 Precisão intermediária.....	41
1.8.5.3 Reprodutibilidade.....	41
1.8.6 Robustez.....	41
1.8.7 RDC 899/2003.....	42
2. OBJETIVO.....	45
2.1 Geral.....	45
2.2 Específicos.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Material	46
3.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras.....	46
3.1.2 Materiais.....	46
3.1.3 Reagentes.....	47
3.1.4 Equipamentos.....	47
3.2 Método.....	48
3.2.1 Preparo das soluções.....	48
3.2.1.1 Solução de ácido fosfórico.....	48
3.2.1.2 Fase móvel.....	48
3.2.1.3 Solução diluente.....	48
3.2.1.4 Solução tampão.....	49
3.2.1.5 Líquido de lavagem da seringa.....	49
3.2.1.6 Preparo da solução de adequação.....	49
3.2.1.7 Preparo da solução padrão.....	49

3.2.1.8 Preparo da solução amostra.....	49
3.2.1.9 Preparo da solução placebo.....	50
3.2.2 Adequação do sistema.....	50
3.2.3 Procedimento para identificação e quantificação.....	50
3.2.3.1 Cálculo.....	51
3.3 Teste de adequação do sistema.....	51
3.4 Teste de estresse	52
3.4.1 Preparo das soluções branco, amostra, placebo e ativo na condição de oxidação.....	52
3.4.2 Preparo das soluções branco, amostra, placebo e ativo nas condições de hidrólise ácida e básica.....	53
3.4.2.1 Hidrólise ácida.....	53
3.4.2.2 Hidrólise básica.....	53
3.4.3 Preparo das soluções branco, amostra, placebo e ativo nas condições de umidade, exposição à radiação UV e aquecimento.....	54
3.4.3.1 Procedimento.....	54
3.5 Validação da metodologia proposta	54
3.5.1 Seletividade e especificidade.....	55
3.5.2 Limites de Detecção e de Quantificação.....	55
3.5.2.1 Teórico.....	55
3.5.2.2 Real.....	56
3.5.3 Linearidade.....	56
3.5.4 Exatidão.....	57
3.5.5 Precisão.....	58
3.5.5.1 Precisão intra-ensaio.....	58
3.5.5.2 Precisão inter-ensaio.....	59
3.5.6 Robustez.....	60
3.5.6.1 Estabilidade da solução.....	60
3.5.6.2 Variação da temperatura do forno.....	60
3.5.6.3 Variação no fluxo da fase móvel.....	61
3.5.6.4 Variação da composição da fase móvel.....	61
3.5.6.5 Variação do lote da coluna cromatográfica.....	61
3.5.7 Teste de membrana de filtração.....	61
3.6 Avaliação dos produtos de degradação na formulação ao longo do prazo de validade.....	62
4. RESULTADOS.....	64
4.1 Adequação do sistema.....	64
4.2 Teste de estresse e seletividade.....	65
4.3 Limites de Detecção e de Quantificação.....	73
4.3.1 Teórico.....	73
4.3.2 Real.....	73
4.4 Linearidade.....	74
4.5 Exatidão.....	79
4.6 Precisão.....	80

4.6.1 Precisão intra-ensaio.....	80
4.6.2 Precisão inter-ensaio.....	80
4.7 Intervalo.....	82
4.8 Robustez.....	82
4.9 Estabilidade das soluções	83
4.10 Teste de membrana de filtração.....	84
4.11 Avaliação dos produtos de degradação na formulação ao longo do prazo de validade.....	87
5. CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO.....	99

INTRODUÇÃO

O colesterol é uma molécula lipídica presente nas membranas celulares e possui um papel importante na síntese dos hormônios esteróides, dos sais biliares e da vitamina D (NELSON e COX, 2005). Para ser transportado, liga-se a proteínas sanguíneas classificadas de acordo com sua densidade: a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL). Entretanto, a elevação dos níveis plasmáticos de colesterol de baixa densidade (LDL-colesterol) (≥ 160 mg/dL), a redução dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-colesterol) (< 40 mg/dL) e também o aumento de triglicerídios (TG) (≥ 200 mg/dL) são fatores de risco para eventos cardiovasculares, sendo esta a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo (GOODMAN e GILMAN, 2003).

Em 2002, 16,7 milhões de pessoas morreram no mundo em decorrência de doenças cardiovasculares, sendo que as doenças cardíacas coronarianas foram as principais responsáveis por 7,2 milhões das mortes. Nos Estados Unidos, cerca de 215.000 pessoas morrem a cada ano de doença cardiovascular, além do surgimento de 650.000 novos casos de infarto do miocárdio (EXECUTIVE, 2001).

Em 2011, reconhece-se que as doenças cardiovasculares continuarão sendo a principal causa de morte no mundo, cerca de 7,3 milhões/ano, número que deverá superar 23,6 milhões até 2030 (WHO, 2011), especialmente na América Latina, onde cerca de 40% das mortes ocorrem durante os anos mais produtivos de vida (BRASIL, 2011).

No Brasil, as doenças não transmissíveis são responsáveis por 72% de mortes, sendo que as doenças cardiovasculares, como infarto, acidente vascular encefálico, insuficiências cardíaca e renal ou morte súbita, correspondem a 31,3% (300 mil casos/ano) deste total, contra 16,3% de mortes causadas por câncer. Estas doenças afetam indivíduos de todos os níveis socioeconômicos e, mais especificamente, aqueles que pertencem a grupos vulneráveis, como os idosos e as pessoas com baixo nível educacional e econômico (BRASIL, 2011).

Estima-se que a redução de 10% da taxa de mortalidade causada por doença isquêmica do coração e acidente vascular encefálico geraria uma economia estimada em US\$ 25 bilhões por ano para os países de baixa e média renda (LIM, 2007; SMITH, 2012).

A dislipidemia, hiperlipidemia ou hipercolesterolemia é a presença de níveis

elevados de lipídios no sangue e é resultado de um distúrbio na síntese e na degradação das lipoproteínas plasmáticas. A hiperlipidemia pode ser causada por fatores genéticos ou ambientais ou uma combinação destes, e é considerada fator causal da aterosclerose, doença cardíaca coronariana, doença cerebrovascular isquêmica e doença vascular periférica (CARVALHO e CAMPO, 2007).

Para todos os casos de pacientes hiperlipidêmicos, recomendam-se mudanças no estilo de vida, como dieta hipolipêmica, exercício físico, controle de peso, tabagismo e controle da pressão arterial. Entretanto, quando a mudança no estilo de vida não é suficiente e quando há mais fatores de risco associados, torna-se necessária a terapia medicamentosa (PICON, 2002).

Diante destes fatores, a indústria farmacêutica desenvolveu uma série de fármacos que reduzem o colesterol: os derivados do ácido fíbrico, derivados do ácido nicotínico, resinas biliares, inibidores da absorção do colesterol biliar e dietético (ezetimibe) e as estatinas. As estatinas são os agentes mais bem tolerados e mais efetivos para o tratamento da dislipidemia (GOODMAN e GILMAN, 2003).

As estatinas são inibidores competitivos da hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA), uma enzima presente no fígado que catalisa a principal etapa na biossíntese do colesterol. Atualmente, os agentes hipolipêmicos utilizados na prática clínica são a atorvastatina, a fluvastatina, a lovastatina, a pravastatina, a sinvastatina e a rosuvastatina (GOODMAN e GILMAN, 2003; CARVALHO e CAMPO, 2007).

Duas estatinas, a atorvastatina e a sinvastatina, fazem parte da lista de medicamentos considerados essenciais, presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME). Devido ao alto índice do distúrbio na população a partir do ano de 2002 o Ministério da Saúde estabeleceu o primeiro protocolo clínico para o tratamento de dislipidemias para pacientes de alto risco. Na revisão do protocolo, em 2010, os revisores concluíram que a sinvastatina e a pravastatina apresentaram melhores evidências na prevenção da mortalidade, apesar de outras estatinas apresentarem também uma série de outros benefícios. Como não há consenso acerca da superioridade terapêutica entre as estatinas na prevenção das doenças cardiovasculares ou na redução da mortalidade, foi feito um levantamento de preço dos medicamentos com a finalidade de mensurar os custos de tratamento. A diferença de custo pode chegar a 715% quando se compara a sinvastatina mais barata e a pravastatina mais cara (BOLETIM, 2011). Em abril de 2010 a sinvastatina foi incluída no programa “Aqui tem farmácia popular”, uma

parceria entre o Governo Federal e drogarias que vendem os medicamentos com descontos.

Devido à ampla utilização da sinvastatina como agente hipolipidêmico em pacientes com aterosclerose e patologias associadas a ela, faz-se necessária a avaliação da qualidade dos medicamentos comercializados, sendo relevante o conhecimento de sua estabilidade química e física até o fim de seu prazo de validade.

Diante desta realidade, cabe à Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA, exigir no momento do registro sanitário dos medicamentos estudos que sejam comprovadas a segurança, eficácia e qualidade dos produtos farmacêuticos e, após a avaliação pertinente, liberar sua produção, importação e/ou comercialização (BRASIL, 2010). A regulamentação sanitária estabelece que ao fabricante cabe a responsabilidade pela qualidade dos medicamentos por ele fabricados e a garantia de que são adequados aos fins aos quais se destinam, cumprem com os requisitos estabelecidos em seu registro e não colocam os pacientes em risco por apresentar segurança, qualidade ou eficácia inadequadas (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010).

Para se adequarem às exigências sanitárias, as indústrias farmacêuticas realizam estudos importantes durante a etapa de desenvolvimento do medicamento. Os estudos envolvem testes *in vitro* e em animais, os chamados pré-clínicos. Os estudos clínicos envolvem testes em seres humanos, como biodisponibilidade e bioequivalência, e os estudos não clínicos, realizados principalmente para a garantia da qualidade do produto, como estudos de estabilidade (CHOW e LIU, 1995).

Para o conhecimento da estabilidade do medicamento são realizados estudos onde são monitoradas as alterações químicas e físicas, ocorridas no medicamento acondicionado em sua embalagem primária e submetido às condições de temperatura e umidade definidas e monitoradas. Neste aspecto a qualidade está diretamente relacionada às características físicas e químicas do medicamento, enquanto a eficácia e segurança estão relacionadas principalmente com a dosagem terapêutica e a formação de produtos de degradação.

Para o conhecimento do perfil de degradação química do medicamento, assim como o desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade, são realizados alguns testes que forçam a degradação da substância ativa do medicamento. O ativo no medicamento está suscetível a várias fontes que podem

propiciar uma degradação, tais como temperatura, luz, umidade e interações da substância ativa com os excipientes da formulação e/ou embalagem primária são consideradas nestes estudos, chamados testes de degradação forçada.

A pesquisa de produtos de degradação é uma prática recente na indústria e vem ganhando força nas agências regulatórias nacional e internacionais que, cada vez mais, exigem a avaliação das impurezas nos produtos comercializados. Aos poucos os compêndios oficiais estrangeiros estão incluindo as metodologias de quantificação de impurezas (produtos de degradação) nas monografias dos produtos. Devido à exigência de pesquisa de impurezas em produtos farmacêuticos é necessária a implementação de metodologias analíticas validadas de pesquisa de impurezas na rotina dos estudos de estabilidade a fim de avaliar a qualidade dos produtos durante sua comercialização e prazo de validade. Além disso, é essencial o desenvolvimento contínuo de formulações melhoradas para garantir a disponibilidade, eficácia e segurança do fármaco.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Características farmacológicas da sinvastatina

As estatinas foram isoladas a partir de uma cultura da colônia *Penicillium citrinium*. A primeira estatina estudada foi a mevastatina, que demonstrou o potencial terapêutico dessa classe de fármacos (GOODMAN e GILMAN, 2003). Algumas estatinas são produtos naturais, isoladas a partir do metabolismo de fungos, como a mevastatina, a lovastatina, a pravastatina e a sinvastatina; outras são completamente sintéticas, como a atorvastatina, a cerivastatina e a fluvastatina (LAZZERINI, 2011).

A sinvastatina é um beta-hidroxiácido derivado semissintético a partir da lovastatina. A estrutura da estatina determina a propriedade farmacológica do fármaco e existe em duas formas: a lactona (inativa) e o β -hidroxiácido (ativa). O fármaco sinvastatina existe na forma inativa (lactona) e é hidrolisado no fígado à forma ativa (β -hidroxiácido). As estruturas químicas da sinvastatina são apresentadas na Figura 1.

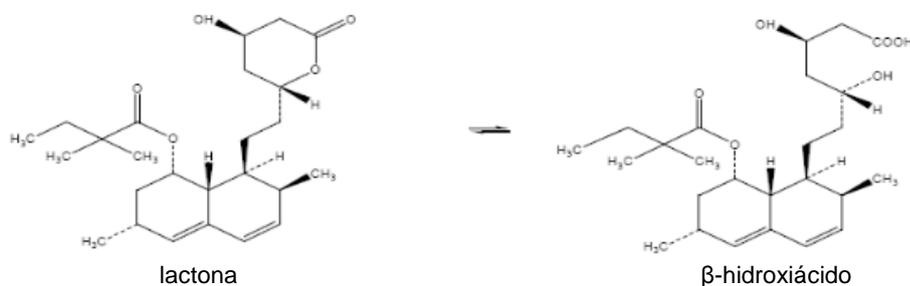


Figura 1- Sinvastatina nas formas lactona e β -hidroxiácido

A sinvastatina, depois da atorvastatina, é considerada a estatina mais potente e amplamente recomendada pela *Heart Association and the American College of Cardiology*. Fármacos desta classe atuam como inibidores competitivos muito potentes da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A-redutase que sintetiza o ácido mevalônico, uma substância precursora da biossíntese do colesterol, por meio de redução do substrato HMG-CoA. A afinidade das estatinas pela enzima é três vezes maior do que a afinidade do substrato natural, o HMG-CoA, pela enzima. A figura 2 representa a síntese de colesterol a partir do ácido mevalônico (CARVALHO e

CAMPO, 2007).

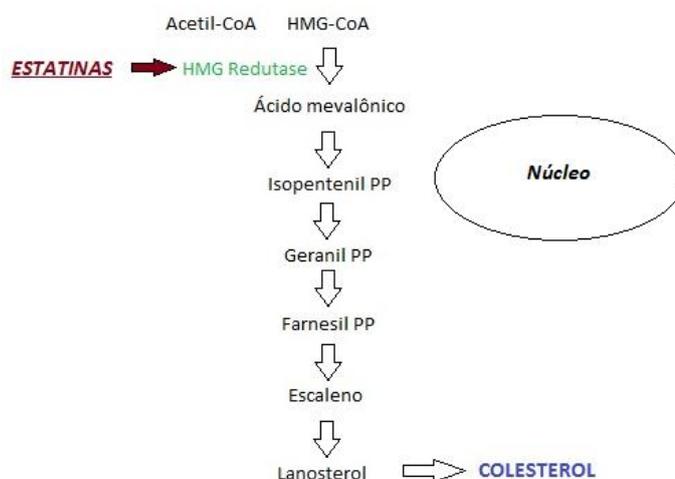


Figura 2- Efeito das estatinas na biossíntese do colesterol. Adaptado de LAZZERINI, 2011.

1.1.1 Efeitos pleiotrópicos

Alguns benefícios clínicos decorrentes da administração de estatinas foram relatados em vários estudos e ocorrem independentes da redução do colesterol e não estão restritos somente ao sistema cardiovascular: são os chamados efeitos pleiotrópicos. Esses efeitos incluem tratamento de doenças reumáticas, efeitos protetores contra a doença de Alzheimer, efeitos antitumorais, promoção de síntese de óxido nítrico endotelial, redução na produção de espécies reativas de oxigênio, estabilização das placas ateroscleróticas, redução no crescimento de células musculares lisas que ocorre no processo aterosclerótico e efeitos relacionados com atividade anti-inflamatória, dentre outros (FERRO; WIERZBICKI; POSTON, 2003).

1.2 Características físico-químicas

A sinvastatina é um pó branco com ponto de fusão na faixa de 135 a 138°C, insolúvel em água (0,03g/L) e ácido clorídrico 0,1M (0,06g/L) e solúvel em clorofórmio (610g/L), metanol (200g/L), etanol (160g/L), polietilenoglicol (70g/L) e

hidróxido de sódio 0,1M (70g/L). Possui poder rotatório igual a + 292 (0,51% em acetonitrila), coeficiente de *D* partição (octanol/água), log *P* igual a 4,68 e máximos de absorção na região do ultravioleta (UV_{máx}, acetonitrila) em 231, 238 e 247nm (BUDAVARI, 2006).

1.3 Estabilidade de medicamentos

Estabilidade farmacêutica é definida como a capacidade do produto farmacêutico manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (WHO, 1996).

As questões relacionadas à estabilidade afetam diversas áreas e estas questões são úteis na determinação de diversos fatores, tais como desenvolvimento de formulação e embalagem, desenvolvimento de métodos analíticos, determinação de condições apropriadas de estocagem, parâmetros de processo e manufatura, estudos de biocinética e de segurança/toxicidade e avaliação ambiental (BAERTSCHI, 2005).

O prazo de validade é a data limite para a utilização de um produto farmacêutico definida pelo fabricante, com base nos seus respectivos testes estabilidade, mantidas as condições de armazenamento e transporte estabelecidos (BRASIL, 2005).

Tanto a segurança quanto a eficácia de um produto podem ser avaliadas pelos estudos de estabilidade, pela avaliação do decaimento do teor do princípio ativo e pelo monitoramento da formação de produtos de degradação. Os estudos de estabilidade de medicamentos são conduzidos com a finalidade de garantir a manutenção das especificações química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e do produto farmacêutico sob determinadas condições e fatores (ANSEL, 2007).

A qualidade de um produto farmacêutico pode variar sob alguns fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e ar atmosférico. Outros fatores, como pH, polimorfismo, susceptibilidade à oxidação ou hidrólise, potencial de interação do fármaco e dos excipientes e/ou materiais de embalagem, processo de fabricação e outros também podem afetar a estabilidade farmacêutica e devem ser considerados

no planejamento do estudo de estabilidade (LACHMAN, 2001).

A primeira proposta de guia para testes de estabilidade foi regulamentada em 1985, pelo FDA, e continha procedimentos e recomendações sobre prazo de validade e estabilidade de produtos farmacêuticos (LEITE, 2006). Em 1991, foi criado o Comitê Internacional de Harmonização (ICH) dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso em Seres Humanos, formado pelas autoridades regulatórias da Europa, do Japão e dos EUA. No que diz respeito à qualidade de medicamentos, o ICH elaborou diretrizes para realização de estudos de estabilidade e fotoestabilidade, além de outros, para novos fármacos e medicamentos (ICH, 2003).

No Brasil, os princípios de estabilidade de medicamentos foram mencionados na Lei nº 6360, de 23 de setembro de 1976, que determinava a avaliação da estabilidade de medicamentos com a finalidade de verificar a qualidade das matérias-primas ou substâncias. Apenas no ano de 2002 veio a ser publicado o primeiro Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, através da RE nº 560 de 2 de abril de 2002, substituída posteriormente pela RE nº 398 de 12 de novembro de 2004, a fim de harmonizar as diretrizes nacionais com aquelas estabelecidas pelo ICH (BRASIL, 1976; BRASIL, 2002; BRASIL, 2004).

Após a revogação da RE nº 398, o Guia para Realização de Estudos de Estabilidade, a RE nº 01 de 29 de julho de 2005, passou a vigorar com o propósito de adequar as condições de armazenamento para condução dos estudos de estabilidade de longa duração às condições climáticas do país. Esta resolução apresenta também as diretrizes para realização de estudos de fotoestabilidade e introduz o conceito de “Plano de Estudo de Estabilidade Reduzido de Medicamentos”. Os testes de estabilidade podem ser divididos em (BRASIL, 2005):

a) Estudo de estabilidade de longa duração: estudo projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.

b) Estudo de estabilidade de acompanhamento: estudo realizado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas e biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.

c) Estudo de estabilidade acelerada: estudo projetado para acelerar a degradação química e/ou gerar mudanças físicas em um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados obtidos, juntamente com aqueles advindos dos estudos de longa duração, são usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte.

Para a realização e avaliação destes estudos de estabilidade são consideradas as zonas climáticas onde está inserido o país no qual o medicamento é produzido. A fim de possibilitar a comercialização mundial dos produtos farmacêuticos, o Comitê de Especialistas em Especificações para Preparações Farmacêuticas da OMS dividiu o mundo em quatro zonas climáticas baseadas na diversidade de temperatura e umidade existentes entre alguns países (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

1.3.1 RE 01/2005

Os estudos de estabilidade são executados com o produto farmacêutico em sua embalagem primária e acondicionados em câmaras climáticas qualificadas de acordo com as diretrizes estabelecidas neste guia, baseadas na zona climática onde o Brasil se encontra.

O prazo de validade de um produto deve ser determinado por um estudo de estabilidade de longa duração de acordo com os parâmetros definidos na norma. Os estudos de fotoestabilidade podem ser necessários para a comprovação da estabilidade de produtos farmacêuticos. A não apresentação de estudo de fotoestabilidade deve vir acompanhada de justificativa técnica com evidência científica de que o(s) ativos(s) não sofre(m) degradação em presença de luz ou de que a embalagem primária não permite a passagem de luz.

As informações abaixo descritas devem constar no relatório de estudo de estabilidade para todas as formas farmacêuticas. A ausência de qualquer uma dessas informações deve ser justificada tecnicamente:

- descrição do produto com respectiva especificação da embalagem primária;

- número do lote para cada lote envolvido no estudo;
- descrição do fabricante dos princípios ativos utilizados;
- aparência;
- plano de estudo: material, métodos (desenho) e cronograma;
- data de início do estudo;
- teor do princípio ativo e método analítico correspondente;
- quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente;
- limites microbianos.

Para fins de prazo de validade provisório de 24 meses será aprovado o relatório de estabilidade acelerada ou de longa duração de 12 meses que apresentar variação menor ou igual a 5,0% do valor de análise da liberação do lote, mantidas as demais especificações. O doseamento no momento zero não pode ultrapassar as especificações do produto de acordo com farmacopéias reconhecidas pela Anvisa ou, na ausência de informação farmacopeica, com método validado de acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Para fins de prazo de validade definitivo, somente será aprovado o relatório de estabilidade que apresentar a variação do doseamento dos princípios ativos dentro das especificações farmacopeicas.

Para fins de registro e alterações pós-registro, os estudos de estabilidade acelerado e longa duração são executados em um ou três lotes, devendo ser representativos do processo de fabricação, tanto em escala piloto quanto escala industrial.

As amostras são retiradas das câmaras climáticas e analisadas obedecendo uma frequência em função do tipo de estudo. As análises realizadas variam de acordo com a forma farmacêutica e incluem:

Estudo acelerado: 0, 3 e 6 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Para as demais provas apresentar estudo aos 6 meses comparativo ao momento zero.

Estudo de longa duração: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 meses (conforme o prazo de validade) para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Para as demais provas, apresentar estudo no prazo de validade requerido comparativo ao momento zero.

Estudo de acompanhamento: a cada 12 meses deverão ser realizados todos os testes de um relatório de estudo de estabilidade, que deve ser disponibilizado no momento da inspeção.

Esta Guia define alguns parâmetros farmacopeicos que devem ser avaliados durante a condução do estudo de estabilidade. O teor da substância ativa, a quantificação de produtos de degradação e os limites microbianos são exigências comuns a todas as formas farmacêuticas. Os testes de dureza e dissolução são exigidos para formas farmacêuticas sólidas. Para formas farmacêuticas líquidas e semissólidas os ensaios para determinação do pH, sedimentação pós agitação em suspensões, claridade em soluções, separação de fases em emulsões e cremes e perda de peso em produtos de base aquosa são exigidos. A não realização de qualquer um destes ensaios está condicionada à apresentação de justificativa técnica. A tabela 1, a seguir, lista os principais objetivos e finalidades destes estudos.

Tabela 1 - Tipos e principais objetivos e finalidades dos estudos de estabilidade.

Tipo de estudo	Objetivo	Finalidade
Estresse	Identificar produtos de degradação e validar metodologia analítica	Desenvolvimento do Produto/Documentação de Registro
Acelerado	Determinar prazo de validade provisório e condições de armazenamento	Desenvolvimento do Produto/Documentação de Registro
Longa duração	Comprovar o prazo de validade e as condições de armazenamento estabelecidas pelo estudo de estabilidade acelerada	Documentação de Registro
Acompanhamento	Verificar se não foi introduzida nenhuma mudança na formulação ou no processo de fabricação que possa afetar adversamente a estabilidade do produto	Garantia da Qualidade / Controle de Qualidade

1.4 Impurezas

A decisão para aprovar, prescrever e consumir medicamentos envolve riscos e benefícios. Neste caso, as impurezas presentes nos medicamentos podem oferecer riscos, pois várias reações químicas podem gerar a degradação do princípio ativo e dos excipientes.

Algumas alterações na estrutura do princípio ativo podem resultar na redução da atividade terapêutica e no aparecimento de efeitos indesejados, devido à formação de produtos tóxicos. Portanto, a segurança clínica de um produto farmacêutico não é dependente somente das propriedades toxicológicas do ingrediente ativo por si só, mas também pela presença de impurezas. Desta maneira, a identificação, quantificação e o controle de impurezas nas matérias-primas e nos produtos são partes essenciais do desenvolvimento de um produto e da avaliação regulatória (CARVALHO, 2005; BASAK, 2007).

Impurezas são substâncias químicas não desejadas que afetam a pureza de ingredientes ativos e das formulações farmacêuticas. A presença destes produtos químicos não desejados, mesmo em quantidades-traço, pode influenciar na eficácia e a segurança de produtos farmacêuticos.

A natureza e a quantidade das impurezas são governadas por uma série de fatores, tais como rota sintética do princípio ativo (qualidade dos materiais de partida, condições das reações, reagentes e solventes e etapas de purificação), excipientes, processo de manufatura do produto farmacêutico, embalagem, transporte e armazenamento.

De acordo com o ICH, as impurezas são classificadas como:

- Orgânicas;
- Inorgânicas;
- Solventes residuais.

As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de manufatura ou estocagem do princípio ativo e podem ser identificadas ou não, voláteis ou não e incluem:

- Materiais de partida;
- Co-produtos;
- Intermediários;
- Produtos de degradação;

- Reagentes, ligantes e catalisadores.

As impurezas inorgânicas podem resultar do processo de síntese e normalmente são conhecidas e identificadas:

- Reagentes, ligantes e catalisadores;

- Metais pesados e outros metais residuais;

- Sais inorgânicos;

- Outros materiais, como agentes filtrantes ou carvão ativado.

A pesquisa envolvendo produtos de degradação está prevista desde a publicação da RE 560/2002 e se mantém até a norma em vigor, a RE 01/2005. Sem ela, os registros estão sujeitos ao atendimento a exigências técnicas ou até mesmo o indeferimento. Para a detecção e a quantificação dos produtos de degradação faz-se necessário o uso de métodos validados capazes detectar e quantificar os produtos de degradação na presença de outros interferentes, tais como o princípio ativo, excipientes e outras impurezas presentes (BAERTSCHI, 2006). No entanto, poucas monografias farmacopeicas possuem metodologia analítica para a análise de produtos de degradação e poucos fabricantes desenvolvem metodologias para detecção e quantificação destes produtos. Para o desenvolvimento e validação das metodologias para a avaliação dos produtos de degradação, as indústrias farmacêuticas estão desenvolvendo estratégias como o teste de estresse.

1.5 Teste de estresse

O teste de estresse ou teste de degradação forçada é uma ferramenta utilizada principalmente para elucidar a estabilidade intrínseca do fármaco e é considerado como parte integrante da estratégia de desenvolvimento de um medicamento.

Atualmente, os testes de degradação forçada do ativo e das formulações são realizados para prever problemas de estabilidade, desenvolver metodologias analíticas e identificar os produtos de degradação bem como sua formação (BAERTSCHI, 2005)

O teste de degradação forçada possui caráter de previsão, isto é, os produtos da degradação formados sob as condições extremas podem ou não ser relevantes às condições reais de armazenamento do fármaco e/ou medicamento. Esta

realidade é refletida na definição de ICH sobre o teste de degradação forçada, onde indica que “o exame dos produtos de degradação obtidos sob circunstâncias de estresse é útil para estabelecer os caminhos de degradação e obter métodos analíticos validados. Entretanto, tal exame não é necessário para determinados produtos da degradação que se formam durante os estudos de estabilidade acelerada ou de longa duração.” (ICH, 1996).

Conseqüentemente, os produtos da degradação formados durante o teste de estresse podem ser considerados como produtos potenciais de degradação e, idealmente, deveriam conduzir à formação de todos os produtos potenciais da degradação. Contudo, nem todos os produtos de degradação previstos no teste de estresse se formarão nas condições de armazenamento ou transporte. Estas condições são previstas nos estudos de estabilidade e os produtos de degradação formados nestas condições são considerados produtos de degradação significativos. Estes conceitos são ilustrados na figura 3.

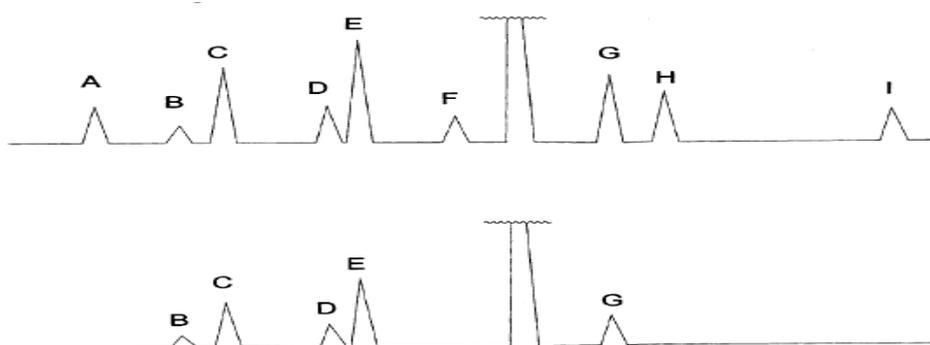


Figura 3- Cromatogramas hipotéticos do teste de estresse (acima) e dos estudos de estabilidade de longa duração ou acelerada (abaixo) (BAERTSCHI, 2005).

Os estudos de degradação forçada são realizados em um lote do material em condições mais severas que os estudos de estabilidade acelerada e contemplam diferentes mecanismos de degradação tais como: hidrolítica, termolítica, oxidativa e fotolítica (BAERTSCHI, 2005). Esses mecanismos são alcançados através da exposição do princípio ativo a condições extremas de temperatura, umidade, fotoestresse e condições oxidativas e aquosas. Os produtos de degradação que não são formados durante os estudos de estabilidade não precisam ser isolados e identificados. De acordo com os guias já discutidos, o objetivo do teste de degradação é degradar 5 a 20% do ativo. As condições específicas como

intensidade ou duração depende das características químicas do fármaco. O estudo é conduzido no princípio ativo isolado, na formulação e no placebo e devem ser comparadas com amostras não degradadas (controle) e com o branco. O composto não necessariamente irá degradar em qualquer condição; nestes casos, não é preciso aumentar a condição (BAERTSCHI, 2005). Os estudos devem ser repetidos quando o método ou a formulação ou o processo mudarem. A tabela 2 resume um protocolo geral de testes e condições para realizar os estudos de degradação forçada.

Tabela 2- Protocolo para a condução dos testes de estresse

Condição	Fármaco		Produto	
	Sólido	Solução ou suspensão	Sólido (comprimidos, cápsulas, misturas)	Solução (intravenosa, suspensão oral)
Hidrólise ácida - básica		+		0
Oxidação	0	+	+	+
Fotólise	+	0	+	+
Termólise	+		+	+
Umidade	+		+	

+ = recomendado 0= opcional, sugestão para alguns compostos (BAERTSCHI, 2005).

O guia do ICH fornece muito pouca informação sobre as estratégias e os princípios para a condução dos testes de degradação forçada tais como problemas relacionados a baixa solubilidade de fármacos e compostos pouco estáveis. Além disso, não descreve especificamente o quanto de degradação é adequada. Uma degradação muito extrema pode levar a um perfil de degradação não representativo, podendo haver degradação dos produtos de degradação formados. As condições de estresse devem ser realísticas e não excessivas de modo que a degradação inicial que é importante e não sua extensão, além do mais alguns compostos não apresentam degradação significativa após exposição à determinada condição.

1.6 Método indicativo de estabilidade

Para que se avalie a estabilidade de um composto, é necessário desenvolver um método adequado. O desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade,

particularmente um que pretenda determinar impurezas, é um tanto problemático, uma vez que não se tem necessariamente o conhecimento qualitativo e/ou quantitativo daquilo que será formado. O teste de estresse pode auxiliar nesta questão pois, ao degradar o composto principal através de condições de estresse, amostras contendo os produtos de degradação podem ser geradas e, com isso, colaborar no desenvolvimento de métodos adequados para a pesquisa de impurezas. Os produtos formados são classificados como produtos de degradação potenciais que poderão, ou não, se formar durante o tempo de validade do produto se este for estocado sob condições ideais de armazenamento. Porém, vale ressaltar que nem todos os produtos de degradação relevantes podem se formar sob as condições de estresse. Para isso, ambos os estudos de estabilidade, o de longa duração e acelerada, são conduzidos para determinar quais são os produtos potenciais de degradação que irão se formar sob condições normais e, assim, consegue-se determinar quais são relevantes nestas condições.

Os métodos indicativos de estabilidade são procedimentos analíticos quantitativos utilizados para detectar o decaimento da quantidade do fármaco devido à degradação. De acordo com os guias da FDA, o método indicativo de estabilidade é definido como um procedimento analítico que quantifica com precisão e exatidão o fármaco na presença de outras substâncias como produtos de degradação, impurezas de processo, excipientes e outras impurezas e a FDA recomenda que todos os métodos de teor para estudos de estabilidade sejam indicativos de estabilidade (O'DONNEL, 2005). Durante os estudos de estabilidade, a cromatografia líquida é rotineiramente utilizada para separar e quantificar os analitos de interesse. São necessários três componentes para estabelecer o método indicativo de estabilidade: geração da amostra, desenvolvimento do método e a validação.

O método indicativo de estabilidade, geralmente, é desenvolvido através de amostras degradadas sob condições que excedam as condições aceleradas usadas nos estudos de estabilidade, como já descrito anteriormente. O objetivo é promover uma degradação de 10-20% do fármaco. Acima desta faixa os produtos de degradação relevantes são destruídos e formam-se outros produtos secundários que, provavelmente, não irão se formar durante os estudos formais de estabilidade; abaixo desta faixa, produtos de degradação importantes podem ser omitidos. Os testes de degradação forçada são realizados no placebo, para avaliar os produtos

de degradação oriundos da formulação, no fármaco isolado e na formulação a fim de verificar a incompatibilidade entre o fármaco e os excipientes e obter rotas de degradação que auxiliarão no processo produtivo e armazenamento. Depois de degradada, a amostra é usada no desenvolvimento do método.

1.7 Metodologias para determinação dos produtos de degradação da sinvastatina

Os métodos cromatográficos para a determinação do teor de sinvastatina isolada, como matéria-prima, ou em formulação são descritos na literatura e utilizam várias técnicas de detecção como espectrofotometria de UV, fluorescência, espectrometria de massas, cromatografia gasosa e outras técnicas (ALVAREZ, 2005).

As impurezas relacionadas de sinvastatina (produtos de degradação) têm sido estudadas por LC-MS e descritas na literatura, como demonstrado na figura 4 (WANG; ZHAO; Wu, 2001; PLUMB; et al,), porém a maioria dos estudos publicados são métodos quantitativos para a determinação de sinvastatina e sinvastatina hidroxilado em fluidos biológicos ou biomatrizes (JEMAL e OUYANG, 2000; ZHAO; et al, 2000; SIRINIVASU; RAJU; REDDY, 2002; ZHANG; et al, 2004).

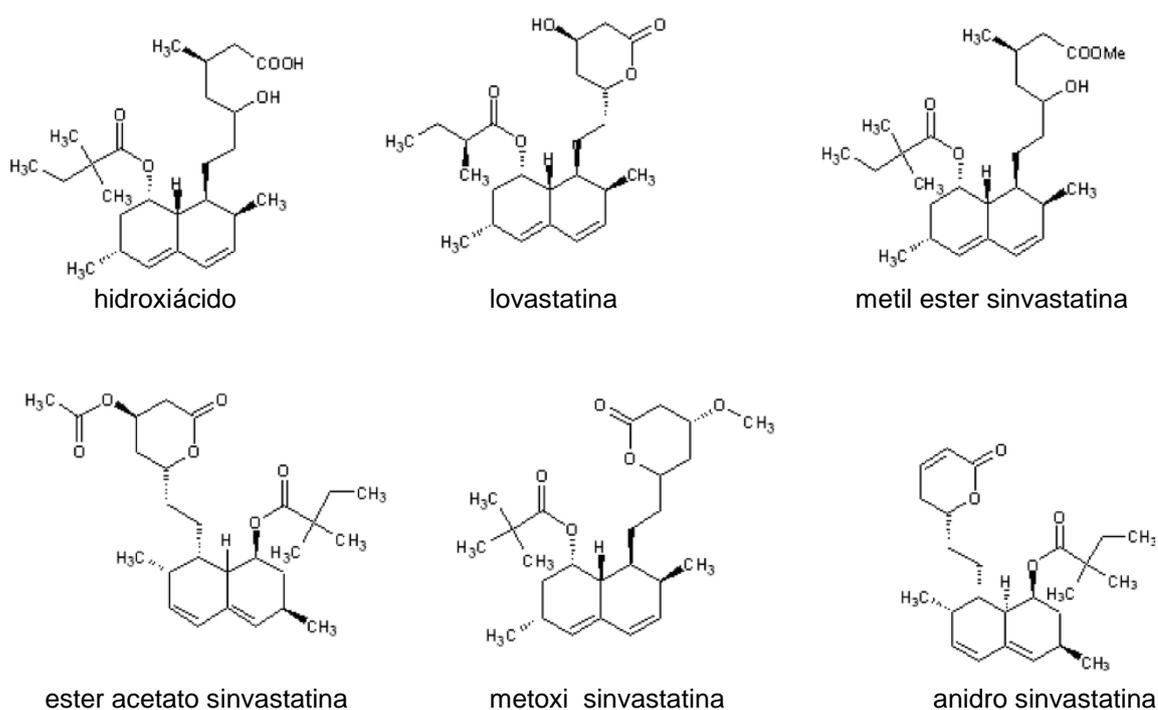


Figura 4- Estruturas dos produtos de degradação da sinvastatina

As metodologias descritas nos principais compêndios, apresentam metodologia para a determinação de produtos de degradação apenas na matéria-prima, por exemplo, as farmacopéias Americana, Britânica e Européia (UNITED, 2011; BRITISH, 2011; EUROPEAN, 2011).

Alguns métodos foram desenvolvidos para avaliar o comportamento da sinvastatina frente a diferentes condições de pH e temperatura (ALVAREZ, 2005) e para definir o perfil de degradação da sinvastatina por cromatografia líquida de microemulsão (MALENOVIC´; et al, 2010). Krishna e colaboradores desenvolveram um método para a determinação das substâncias relacionadas da sinvastatina, uma vez que o método descrito na monografia da sinvastatina da Farmacopéia Americana (UNITED, 2011) não é capaz de separar impurezas resultantes do processo de síntese ou materiais de partida (KRISHNA; et al, 2010).

Um estudo de degradação forçada da sinvastatina foi conduzido por Seshukumar et al, para o desenvolvimento de metodologia indicativa de estabilidade por CLAE para uma formulação contendo a sinvastatina em associação com a ezetimiba (SESHUKUMAR; et al, 2012).

Verificou-se que os métodos avaliados na literatura possuem cromatografia de longa duração e utilizam diversos sais e solventes, o que contribui para a oneração da análise e conseqüentemente, do produto.

Gomes e colaboradores desenvolveram uma metodologia de indicação de estabilidade por CLAE para determinação de sinvastatina em comprimidos com curto tempo de análise e que utiliza solventes comuns, de fácil aquisição e de baixo custo. Porém, nesta metodologia as impurezas da sinvastatina não foram identificadas.

Diante dos fatores apontados, a metodologia descrita na Farmacopéia Americana, para determinação de impurezas na matéria-prima, foi estudada e avaliada quanto à sua adequação para análise do produto, uma vez que apresenta curto tempo de análise, utiliza poucos solventes e os tempos de retenção das principais impurezas já foram estudadas, Estes fatores são convenientes para a rotina da empresa.

1.7 Validação

A validação pode ser definida como a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (NBR ISO 9000). Os requisitos baseiam-se nos limites de aceitação da especificação do produto, são valores fixos, frequentemente baseados em estudos de eficácia e segurança, regulamentos, considerações estatísticas e experiência (ERMER; MILLER, 2005).

A validação em si não se refere somente a métodos analíticos, mas também a “softwares”, dados, amostragem, processo, equipamentos e utilidades, dentre outros. No que se refere à produção de medicamentos, a validação é uma parte essencial das Boas Práticas de Fabricação, sendo um elemento da garantia da qualidade associado a um produto ou processo particular (BRASIL, 2010).

Segundo a ISO 8402, que trata dos vocabulários da Garantia e Gerenciamento da Qualidade, a definição de validação de metodologia é dada por:

“Estabelecimento, mediante estudos sistemáticos de laboratório, que as características de um respectivo método cumprem as especificações relativas ao uso previsto dos resultados analíticos.”

A validação é, naturalmente, um requisito básico para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados analíticos para todas as aplicações (MILLER; MILLER, 2005). Os métodos de controle de qualidade devem ser validados antes de serem adotados na rotina, levando-se em consideração as instalações e equipamentos disponíveis (BRASIL, 2010).

Os métodos compendiais não requerem validação; entretanto, antes de sua implementação, devem existir evidências documentadas de sua adequabilidade nas condições do laboratório (BRASIL, 2010). De acordo com o FDA, os seguintes parâmetros dos métodos normalizados devem ser verificados: especificidade, estabilidade da solução amostra e precisão intermediária (UNITED, 1994). A aplicabilidade dos métodos analíticos deve ser verificada sob condições reais de uso tais como: métodos cromatográficos, titulometria, espectrofotometria, colorimetria, eletroforese etc. Os testes gerais, como perda por dessecação, resíduo de ignição, pH, metais pesados, não necessitam de validação (UNITED, 2011).

Assim, para se efetuar uma validação, alguns parâmetros básicos são avaliados:

1.8.1 Especificidade e Seletividade

"É a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que podem estar presentes. Tipicamente, estes podem incluir impurezas, produtos de degradação, matriz, etc" (ICH, 1994). Porém, em contraste com o ICH, esses termos geralmente são utilizados em conjunto e estão relacionados com a resposta da detecção, ou seja, um método que é capaz de medir a resposta de um analito é chamado de específico e o método é considerado seletivo quando distingue a resposta de um analito na presença de outros (INSTITUTO, 2003).

Através desta etapa da validação é possível verificar se os reagentes utilizados e a matriz da amostra (placebo), por exemplo, causam alguma interferência na sensibilidade do detector e conseqüentemente alteram a medição da resposta. Contudo, a especificidade do método analítico é determinada durante o desenvolvimento (BAKSHI, 2002).

A investigação da especificidade deve ser avaliada a partir da análise do analito isolado e na presença dos principais interferentes como, matriz (placebo), reagentes (branco), matérias primas, impurezas e produtos de degradação. Porém, nem sempre estes materiais estão disponíveis, sendo então necessária a realização dos testes de degradação forçada de todos os componentes. Portanto, o teste de degradação forçada é uma ferramenta essencial para se avaliar a especificidade/seletividade do método analítico.

Em alguns casos não é possível demonstrar a especificidade de um analito em particular, e desta maneira, é recomendado o uso combinado de diversos procedimentos analíticos para alcançar um nível necessário de discriminação (ICH, 1994).

Em técnicas cromatográficas, a especificidade/seletividade é avaliada através das comparações de resultado dos cromatogramas, da análise da pureza de sinal, do cálculo estatístico e de alguns parâmetros cromatográficos, tais como: resolução, retenção relativa, fator de capacidade e fator de simetria.

1.8.2 Linearidade

É a habilidade de um método analítico em obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em um dado intervalo de concentração.

A linearidade é determinada através do gráfico das respostas obtidas em função da concentração ou conteúdo ou calculada pela equação da regressão linear a partir do método dos mínimos quadrados. A avaliação da linearidade é dada pelo cálculo do coeficiente de correlação, determinação do y-intercepto, inclinação da reta e cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os calculados.

1.8.3 Sensibilidade

A sensibilidade demonstra a resposta do analito em função da sua concentração. É expressa pela inclinação da curva de regressão linear e depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada.

1.8.3.1 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) do equipamento é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento ou como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LD é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito.

1.8.3.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Na prática, corresponde

normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias.

1.8.4 Exatidão

Expressa quanto os valores medidos se encontram próximos do valor de referência e é calculada a partir da porcentagem de recuperação da concentração conhecida do analito em amostras fortificadas, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, estabelecidas dentro dos intervalos de confiança. Assim, a exatidão está relacionada aos erros sistemáticos da medição, logo um método exato é um método que não apresenta erro sistemático.

A exatidão é avaliada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada.

1.8.5 Precisão

É a dispersão dos resultados repetidos e medidos independentemente em condições definidas de trabalho. A precisão é caracterizada estatisticamente como desvio padrão ou desvio padrão relativo, ambos determinados a partir de ensaios de repetitividade e reprodutibilidade. A precisão deve ser, preferencialmente, obtida a partir de amostras autênticas.

A partir dos testes de precisão é possível avaliar se os erros aleatórios envolvidos no método interferem nos resultados obtidos. São exemplos de erros aleatórios de um método cromatográfico, os erros obtidos do injetor, detector, coluna, vidraria, entre outros.

Para avaliar os erros atribuídos a determinações, amostras e analistas são realizados os seguintes ensaios, preferencialmente, obtida a partir de amostras autênticas que serão usadas na rotina:

1.8.5.1 Repetitividade

A repetitividade ou precisão intra-corrída é o grau de concordância entre os resultados obtidos a partir de medições sucessivas de um mesmo analista sob as mesmas condições analíticas em um curto espaço de tempo.

A repetitividade do método é avaliada por:

- Mínimo de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada; ou
- Mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

1.8.5.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária ou inter-corrídas é avaliada através da concordância dos resultados obtidos sobre a mesma amostra do mesmo laboratório, utilizando a mesma metodologia, obtidos em dias diferentes (mínimo 2) e com equipamentos e/ou analistas diferentes.

1.8.5.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial expressa a precisão entre laboratórios, obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

1.8.6 Robustez

A robustez também é um parâmetro que deve ser avaliado durante o desenvolvimento do método e comprovado na validação. Significa o quanto o método analítico resiste a pequenas variações das condições analíticas durante os

procedimentos de rotina.

Este parâmetro pode ser avaliado pela comparação dos resultados obtidos em condições analíticas normais em relação aos resultados obtidos em condições variáveis. Outra maneira de se determinar a robustez do método é através do teste de Youden, que também indica a influência de cada variação. A tabela 3 demonstra os exemplos de variação dos fatores para ensaios analíticos.

Tabela 3- Exemplo de variação nos fatores cromatográficos para a determinação da robustez

Exemplos de variação	Variantes
Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> · Estabilidade das soluções analíticas · Tempo de extração
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> · Variação do pH da solução · Temperatura · Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> · Variação do pH da fase móvel · Variação na composição da fase móvel · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Velocidade do gás de arraste

1.8.7 RDC 899

Em 2003, foi publicado o “Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”, onde são definidas as diretrizes para a realização dos estudos de validação de metodologias analíticas, em âmbito nacional.

Os métodos analíticos descritos em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, são considerados validados. Caso contrário, determinados parâmetros específicos deverão ser avaliados para que a metodologia seja considerada validada.

O guia, além de definir os parâmetros supracitados, classifica as metodologias analíticas em quatro categorias diferentes (tabela 4) e determina quais

parâmetros de validação devem ser avaliados de acordo com a categoria a qual o método está inserido, ver tabela 5.

Tabela 4- Classificação dos testes, segundo sua finalidade

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 5- Classificação das metodologias analíticas

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 através da utilização de substâncias de referência oficializadas pela Farmacopeia Brasileira ou, na ausência destas, por outros órgãos autorizados pela legislação vigente. É admitido o uso de padrões de trabalho devidamente caracterizados e com pureza conhecida na inexistência das substâncias de referência. A metodologia analítica deverá ser revalidada quando houver mudanças na síntese da substância ativa, na composição do produto acabado e no procedimento analítico, além de outras dependendo da natureza das mudanças.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Avaliar a formação dos produtos de degradação na formulação ao longo do prazo de validade.
- Propor e validar um método cromatográfico para quantificação de produtos de degradação em comprimidos revestidos de sinvastatina;

2.2 Específicos

- Adaptar o método da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) volume 34 da matéria-prima para quantificação de produtos de degradação de sinvastatina na formulação de comprimidos;
- Realizar o teste de degradação da formulação proposta para avaliação de produtos de degradação;
- Validar o método proposto;
- Realizar os estudos de estabilidade de longa duração da formulação proposta para avaliação de produtos de degradação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras

- sinvastatina, matéria-prima lote B09683, teor 98,3% declarado pelo fabricante Zhejiang Hisun Pharmaceutical (Taizhou, China).
- sinvastatina, padrão de trabalho lote B18607, teor 99,91% declarado pela Merck (Rio de Janeiro, Brasil).
- sinvastatina, substância de referência lote I1H070, teor 99,4% declarado pela Farmacopeia dos Estados Unidos.
- Placebo lote 08G201 fabricado pela Merck (Rio de Janeiro, Brasil).

3.1.2 Material

- Pipetas graduadas (Brand, Alemanha);
- Pipetas volumétricas (Brand, Alemanha);
- Balões volumétricos (Brand, Alemanha);
- Provetas (Brand, Alemanha);
- Coluna cromatográfica de fase reversa Purospher[®]Star RP-18e (55mm x 4mm, 3 µm de tamanho de partícula, Merck KgaA, Alemanha);
- Filtros de seringa de 47mm de diâmetro com membrana de PVDF 0,45µm de tamanho de poro (Whatman, Alemanha);
- Filtros de seringa de 47mm de diâmetro com membrana de RC 0,45µm de tamanho de poro (Whatman, Alemanha).

3.1.3 Reagentes

- Água purificada por osmose reversa (Milli-Q Millipore, EUA);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck KgAa, Alemanha);

- Ácido fosfórico 85 % P.A. (Merck KgAa, Alemanha);
- Fosfato de potássio monobásico (Merck KgAa, Alemanha);
- Soluções de hidróxido de sódio 0,01M e 1,0M;
- Soluções de ácido clorídrico 0,01M e 1,0M;
- Solução de peróxido de hidrogênio 10%.

3.1.4 Equipamentos

- Banho ultrassônico (Branson, EUA);
- Balança analítica AG 245 (Mettler Toledo, Goettingen, Alemanha);
- Centrífuga Rotina 38R (Hettich, Alemanha);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência LaChrom[®] Elite equipado com desgaseificador, bomba quaternária, forno, injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) (Merck, Alemanha);
- Estufa a vácuo 1400E (VWR, Alemanha);
- Potenciômetro medidor de pH 330 SET-1 (WTW, Alemanha);
- Câmara de fotoestabilidade 5210 (Branson, EUA);
- Câmara climática Coel (Mecallor, Brasil).

3.2 Método

A partir do método descrito na monografia para determinação da pureza cromatográfica de matéria-prima de sinvastatina da USP 34 (USP, 2011), foi proposto um método de quantificação de produtos de degradação da sinvastatina. Utilizou-se a coluna C18, temperatura do forno controlada em 30°C, eluição por gradiente conforme tabela abaixo, fase móvel conforme item 4.4, fluxo de 3,0mL/min, volume de injeção de 5µL e detecção na região do ultravioleta em 238nm. A tabela 6, a seguir, mostra o gradiente de eluição utilizado neste trabalho. O tamanho da coluna foi alterado para atender aos critérios de adequação do sistema e possibilitar a identificação das impurezas através do tempo de retenção relativo já que só a impureza lovastatina está disponível como padrão de referência

Tabela 6 - Gradiente de eluição do método de quantificação de produtos de degradação por CLAE.

Tempo (minutos)	Solução A (%)	Solução B (%)	Eluição
0 – 4,5	100	0	Isocrático
4,5 - 4,6	100→95	0→5	Gradiente linear
4,6 - 8,0	95→25	5→75	Gradiente linear
8,0 - 11,5	25	75	Isocrático
11,5 - 11,6	25→100	75→0	Gradiente linear
11,6 - 13	100	0	Re-equilíbrio

Solução A: ACN: Solução ácido fosfórico (50:50) e solução B: Solução ácido fosfórico

3.2.1 Preparo das soluções

3.2.1.1 Solução de ácido fosfórico

Transferir 1,0mL de ácido fosfórico 85% para balão volumétrico de 1000mL, diluir e completar o volume com água purificada.

3.2.1.2 Fase móvel

Solução A: Transferir 500ml de acetonitrila para recipiente contendo 500ml da solução de ácido fosfórico.

Solução B: Transferir 1,0mL de ácido fosfórico 85% para balão volumétrico de 1000mL, diluir e completar o volume com acetonitrila.

3.2.1.3 Solução diluente

Preparar uma mistura de acetonitrila e solução tampão pH 4,0 (60:40).

3.2.1.4 Solução tampão

Pesar aproximadamente cerca de 1,4g de fosfato de potássio monobásico para balão volumétrico de 1000 mL e ajustar o pH para 4,0 com ácido fosfórico.

3.2.1.5 Líquido de lavagem da seringa

Misturar água purificada e acetonitrila na proporção de 75:25 (V/V).

3.2.1.6 Preparo da solução de adequação

Pesar e transferir quantitativamente, para balão volumétrico de 100mL, cerca de 15,0mg de lovastatina (substância de referência). Dissolver, avolumar com solução diluente e homogeneizar. Pesar e transferir quantitativamente, para balão volumétrico de 50mL, 75,0mg de sinvastatina (padrão de trabalho ou substância de referência), adicionar 5,0mL da solução de lovastatina, dissolver e avolumar com solução diluente. Centrifugar. Concentração final: 0,015mg/ml de lovastatina e 1,5mg/ml de sinvastatina.

3.2.1.7 Preparo da solução padrão

Pesar acuradamente cerca de 15,0mg de sinvastatina (padrão de trabalho ou substância de referência) e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100mL. Dissolver, avolumar com solução diluente e homogeneizar. Transferir 5,0mL desta solução para balão volumétrico de 50mL, dissolver e avolumar com diluente. Centrifugar. Concentração final: 0,015mg/ml.

3.2.1.8 Preparo da solução amostra

Pesar o equivalente a 75mg de sinvastatina do pó recém triturado para balão

volumétrico de 50mL, dissolver e completar o volume com solução diluente. Centrifugar. Concentração final:1,5mg/mL.

3.2.1.9 Preparo da solução placebo

Pesar a quantidade de placebo equivalente a 75mg de sinvastatina para balão volumétrico de 50mL, dissolver e completar o volume com solução diluente. Centrifugar.

3.2.2 Adequação do sistema

- Injetar as soluções branco, placebo, solução de adequação, solução padrão e solução amostra.
- A resolução entre os picos de lovastatina e sinvastatina deve ser $\geq 4,0$;
- A razão sinal/ruído para o pico de sinvastatina na solução diluída deve ser ≥ 10 para a primeira injeção. Se este não for cumprido, injetar a solução em triplicata: a relação sinal-ruído deve ser superior a 3 com um desvio padrão relativo das áreas inferior a 25%.

3.2.3 Procedimento para identificação e quantificação

-Identificar as impurezas conhecidas através do tempo de retenção relativo de acordo com a tabela 7.

Tabela 7- Tempo de retenção relativo das impurezas

Impureza	Tempo de retenção relativo
A (Sinvastatina hidróxiácido)	0,51
E+F (Epilovastatina+Lovastatina)*	0,68
G (sinvastatina metileno)	0,82
B (acetilsinvastatina)	2,06
C (sinvastatina anidra)	2,08
D (dímero sinvastatina)	3,05

*Se presentes, a lovastatina e a epilovastatina não são separadas pelo método. Esses sinais são integrados e reportados em conjunto.

3.2.3.1 Cálculo

$$\% = \left(\frac{A_{am}}{A_{pd}} \right) \times \left(\frac{P_{pd}}{100} \right) \times \left(\frac{5}{50} \right) \times \left(\frac{T_{pd}}{100} \right) \times \left(\frac{50}{P_{am}} \right) \times \left(\frac{100}{TD} \right) \times PM \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

A_{am} = Área dos sinais das impurezas na solução amostra;

A_{pd} = Área do sinal de sinvastatina solução padrão;

P_{pd} = Massa do padrão de sinvastatina (mg);

T_{pd} = Teor do padrão de sinvastatina (%);

P_{am} = Peso da amostra (mg);

TD = Teor declarado de sinvastatina (mg/comp);

PM = Peso médio dos comprimidos (mg/comp).

3.3 Teste de adequação do sistema

O teste de adequação do sistema foi conduzido antes de cada experimento da validação e/ou análise das amostras. Através deste teste foi possível verificar se o sistema operou com o desempenho esperado e respondeu aos critérios estabelecidos para o método garantindo, no momento do ensaio, resultados de

exatidão e precisão aceitáveis (MILLER; MILLER, 2010). A tabela 8, abaixo, sumariza os parâmetros avaliados.

Tabela 8 – Parâmetros do sistema de adequação (FDA, 1994)

Parâmetros	Recomendação
Fator de retenção	$K > 2$
Repetitividade	$RSD < 1\%$
Resolução	$R_s > 2$
Fator de cauda	$T < 2$
Número de pratos teóricos	> 2000

3.4 Teste de estresse

O teste de degradação forçada da sinvastatina foi realizado para conhecer o comportamento químico desta estatina sob diferentes condições e, principalmente, para avaliar a seletividade do método de quantificação de impurezas (BAKSHI ; SINGH, 2002). As amostras foram submetidas às condições de estresse por hidrólises neutra, ácida e básica, calor seco, exposição à luz UV e por oxidação e posterior análise pelo método por CLAE.

De acordo com Reynolds, o teste de degradação forçada é conduzido para demonstrar a especificidade de métodos indicativos de estabilidade, particularmente quando há pouca informação disponível sobre potenciais produtos de degradação. (REYNOLDS, 2002).

Todas as amostras submetidas às diferentes condições de estresse foram analisadas pelo método proposto de acordo com o item 3.2.

3.4.1 Preparo das soluções branco, amostra, placebo e ativo na condição de oxidação

Foram pesados e transferidos exatamente cerca de 405mg do pó recém triturado dos comprimidos (aproximadamente 75mg de sinvastatina), cerca de

330mg do placebo e 75mg de sinvastatina, para balões volumétricos distintos de 50mL. Foram adicionados 5mL da solução de peróxido de hidrogênio a 10% em cada balão e levados ao banho ultrassônico por 10 minutos. Após atingida a temperatura ambiente, foram adicionados 5mL de solução de tiosulfato de sódio a 10% em cada balão e os volumes foram completados com a solução diluente. As soluções foram centrifugadas a 4000rpm por 15 minutos e depois injetadas.

A solução branco foi preparada de acordo com o procedimento acima, porém sem a adição de nenhum componente da formulação.

3.4.2 Preparo das soluções branco, amostra, placebo e ativo nas condições de hidrólise ácida e básica

3.4.2.1 Hidrólise ácida

Foram pesados e transferidos exatamente cerca de 405mg do pó recém triturado dos comprimidos (aproximadamente 75mg de sinvastatina), cerca de 330mg do placebo e 75mg de sinvastatina, para balões volumétricos distintos de 50mL. Foram adicionados 5mL da solução de ácido clorídrico 1M em cada balão e levados ao banho ultrassônico com aquecimento a 80°C por 30 minutos. Após atingida a temperatura ambiente, o meio foi neutralizado e os volumes foram completados com a solução diluente. As soluções foram centrifugadas a 4000rpm por 15 minutos e depois injetadas.

A solução branco foi preparada de acordo com o procedimento acima, porém sem a adição de nenhum componente da formulação.

3.4.2.2 Hidrólise básica

Foram pesados e transferidos exatamente cerca de 405mg do pó recém triturado dos comprimidos (aproximadamente 75mg de sinvastatina), cerca de 330mg do placebo e 75mg de sinvastatina, para balões volumétricos distintos de 50mL. Foram adicionados 5mL da solução de hidróxido de sódio 1M em cada balão e levados ao banho ultrassônico com aquecimento a 80°C por 30 minutos. Após

atingida a temperatura ambiente, o meio foi neutralizado e os volumes foram completados com a solução diluente. As soluções foram centrifugadas a 4000rpm por 15 minutos e depois injetadas.

A solução branco foi preparada de acordo com o procedimento acima, porém sem a adição de nenhum componente da formulação.

3.4.3 Preparo das soluções branco, amostra, placebo e ativo nas condições de umidade, exposição à radiação UV e aquecimento

Foram pesados e transferidos exatamente cerca de 405mg do pó recém triturado dos comprimidos (equivalente a 75mg de sinvastatina), 330mg do placebo e 75mg de sinvastatina para três frascos de vidro transparentes.

3.4.3.1 Procedimento

Para o teste de umidade, os frascos contendo a amostra, o placebo e o ativo foram acondicionados em câmara climática a 40°C e 75%U.R. Após 7 dias de exposição as amostras foram preparadas seguindo o procedimento descrito no item 3.2.

Para o teste de fotólise, os frascos contendo a amostra, o placebo e o ativo foram acondicionados em câmara de fotoestabilidade e a emissão da radiação foi medida no momento inicial da exposição e o tempo de exposição foi calculado totalizando 3600000 lux, ou seja, 3 vezes o valor de luz preconizado pelo ICH para estudos de fotoestabilidade (BAKSHI, 2002). Após 7 dias de exposição as amostras foram preparadas seguindo o procedimento descrito no item 7.2.

Para o teste de aquecimento, os frascos contendo a amostra, o placebo e o ativo foram acondicionados em estufa a 80°C. Após 5 dias de exposição as amostras foram preparadas seguindo o procedimento descrito no item 7.2.

3.5 Validação da metodologia proposta

O método analítico por CLAE para quantificação de produtos de degradação foi validado com base na Resolução RE nº 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003) e

foi classificado dentro da Categoria II, conforme descrito na Tabela 5. Os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: seletividade, linearidade, precisão intra-ensaio e inter-ensaio, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez. A validação do método para a quantificação de produtos de degradação foi realizada utilizando a sinvastatina como referência, assumindo o fator de resposta igual a 1. A validação completa faz-se necessária pois a metodologia farmacopeica proposta faz parte da monografia da matéria-prima de sinvastatina enquanto a mesma será utilizada na forma farmacêutica de comprimidos.

3.5.1 Seletividade e especificidade

A seletividade foi avaliada pela presença dos produtos de degradação e excipientes por meio da CLAE. Para esta finalidade, foram utilizadas as soluções branco, amostra, placebo e do princípio ativo (sinvastatina) submetidas às condições de degradação forçada descritas no item 3.3 e as soluções branco, amostra, placebo e do princípio ativo em condições normais.

A seletividade e a especificidade foram demonstradas através da separação de todos potenciais compostos interferentes em relação ao pico de interesse com uma resolução adequada (geralmente, $R \geq 2$) obtidos nos cromatogramas (SNYDER, 1997). Foram avaliadas as purezas dos sinais de interesse por meio de detector UV/DAD e esta deve ser no mínimo igual a 0,99 (LÖWEN, 2003).

3.5.2 Limites de Detecção e de Quantificação

3.5.2.1 Teórico

Foram preparadas uma solução na concentração de 1,5µg/ml e uma solução contendo 6,6 mg/ml de placebo. As soluções foram injetadas alternadamente por 10 vezes. Ao final, foi calculada a concentração da solução injetada corrigida pelo valor do ruído do sistema. Os valores de LD e LQ teóricos obtidos foram calculados a partir de 3 vezes a concentração para a determinação do LD e 10 vezes a concentração para a determinação do LQ.

3.5.2.2 Real

Foram preparadas três soluções estoque na concentração de 27,5µg/ml de sinvastatina em solução diluente. As diluições foram preparadas conforme a tabela 9 e os volumes foram completados com solução diluente. As soluções foram centrifugadas 4000rpm por 15 minutos. O primeiro ponto das curvas foi correspondente ao valor do LQ teórico. A tabela 9, abaixo, indica os pontos.

Tabela 9 - Preparo das soluções para a avaliação do LQ

Alíquota (mL)	Diluição final (mL)
2,0	100,0
2,0	50,0
3,0	50,0
4,0	50,0
5,0	50,0

As soluções foram injetadas em triplicata conforme as condições cromatográficas descritas no item 4.2. As áreas dos sinais foram medidas para a construção da curva analítica.

O LD e LQ reais foram determinados por meio da equação que correlaciona o desvio padrão da resposta e a inclinação da curva (BRASIL, 2003). Os valores de LD e LQ devem estar abaixo do limite de notificação para produtos de degradação desconhecidos em medicamentos de acordo com as especificações de 0,1% e 0,05%, dependendo da dose máxima diária, estabelecidos pelo ICH (ICH 2006).

3.5.3 Linearidade

Foi preparada uma solução estoque na concentração de 0,38mg/mL sinvastatina em solução diluente. As diluições foram preparadas conforme a tabela 10 e os volumes foram completados com solução diluente. As soluções foram centrifugadas 4000rpm por 15 minutos.

Tabela 10 – Preparo das soluções para a avaliação da linearidade

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota (mL)	Volume (mL)	Alíquota (mL)	Diluição Final (mL)
0,76	1,0	100,0	4,0	20,0
3,80	-	-	1,0	100,0
7,60	-	-	2,0	100,0
11,40	-	-	3,0	100,0
15,20	-	-	4,0	100,0
22,80	-	-	6,0	100,0

As soluções foram injetadas em triplicata conforme as condições cromatográficas descritas no item 4.2. As áreas dos sinais foram medidas para a construção da curva analítica. A regressão linear foi verificada por meio do método dos mínimos quadrados e por análise estatística (ANOVA) utilizando o programa computacional Microsoft Excel® 2003. O coeficiente correlação (r) foi determinado e este deve ser, no mínimo, igual a 0,99. Os fatores de resposta e a distribuição dos resíduos foram avaliados por meio do teste de Ryan-Joiner.

3.5.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração (LQ, 15 e 22,5 $\mu\text{g/mL}$) com adição de placebo às matérias-primas.

Foram preparadas nove soluções estoques conforme a tabela 11 e os volumes foram completados com solução diluente. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 rotações por minuto (rpm). Para a quantificação das amostras, foi preparada uma solução, utilizando substância de referência, a 100% da concentração de trabalho do mesmo modo que as soluções amostras, exceto para a adição de placebo.

Tabela 11 – Preparo das soluções para a avaliação da exatidão

Massa de sinvastatina (mg)	Volume (mL)	Alíquota (mL)	Diluição (mL)	Alíquota (mL)	Diluição final (mL)
38,1					
37,8	100,0	5,0	50,0	1,0	50,0
38,5					
38,4					
38,6	100,0	-	-	2,0	50,0
38,7					
38,4					
38,3	100,0	-	-	3,0	50,0
38,4					

As soluções foram injetadas em duplicata conforme as condições cromatográficas descritas no item 4.2.

A taxa de recuperação foi calculada através do quociente da concentração real pela concentração teórica, conforme a equação 2. Os resultados de recuperação devem estar compreendidos entre 95 e 105%.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração real } (\mu\text{g/mL}) \times 100}{\text{Concentração teórica } (\mu\text{g/mL)}} \text{ (Equação 2)}$$

3.5.5 Precisão

3.5.5.1 Precisão intra-ensaio

A avaliação da precisão intra-ensaio foi realizada no nível de 100% da concentração de trabalho (15 μ g/mL). Foram preparadas seis soluções conforme a tabela 12 e os volumes foram completados com solução diluente. À diluição final foram adicionados 660mg de placebo. As soluções foram centrifugadas a 4000rpm por 15 minutos.

Tabela 12 – Preparo das soluções para a avaliação da precisão intra-ensaio

Massa sinvastatina (mg)	Volume (mL)	Alíquota (mL)	Diluição final (mL)
38,4			
38,6			
38,7			
38,4	100,0	2,0	50,0
38,3			
38,7			

As soluções foram injetadas em duplicata conforme as condições cromatográficas descritas no item 4.2. Para a quantificação das amostras, foi preparada uma solução utilizando substância de referência, na mesma concentração e do mesmo modo que as soluções amostras, exceto para a adição de placebo.

A taxa de recuperação foi calculada através do quociente da concentração real pela concentração teórica, conforme a equação 2 do item precisão intra-ensaio.

O desvio padrão relativo (% DPR) foi calculado e deve ser no máximo igual a 2,0%.

3.5.5.2 Precisão inter-ensaio

Para a determinação da precisão inter-ensaio, foi realizado o mesmo procedimento descrito para a precisão intra-ensaio, no dia seguinte por um segundo analista. A taxa de recuperação e o DPR foram calculados e a diferença entre os analistas 1 e 2 foi avaliada pelo teste F. A tabela 13 relaciona as soluções utilizadas para este teste.

Tabela 13 – Preparo das soluções para a avaliação da precisão inter-ensaio

Massa sinvastatina (mg)	Volume (mL)	Alíquota (mL)	Diluição final (mL)
38,7			
38,4			
38,1			
38,8	100,0	2,0	50,0
38,0			
38,7			

3.5.6 Robustez

3.5.6.1 Estabilidade da solução

Foi avaliada a partir do monitoramento das injeções das soluções padrão e amostras recém-preparadas, por um período de 24 horas.

Foram preparadas a solução padrão e a da amostra, conforme os itens 3.2.1.7 e 3.2.1.8, respectivamente. As soluções foram injetadas em duplicata por um período de 24 horas, conforme o procedimento descrito no item 3.2 e a variação percentual das áreas referente à sinvastatina entre as injeções de cada solução foi avaliada e esta deve ser igual ou menor a 5%. A variação percentual da área média do pico referente à sinvastatina no instante testado foi calculada em relação à área média no tempo zero.

3.5.6.2 Variação da temperatura do forno

Foi avaliada pela comparação entre o perfil cromatográfico da solução padrão e solução amostra, analisadas com a temperatura do forno de 29 e 31°C e o perfil cromatográfico da solução analisada com a temperatura estabelecida pelo método em estudo (30°C).

3.5.6.3 Variação no fluxo da fase móvel

Foi avaliada pela comparação entre o perfil cromatográfico da solução padrão e da solução amostra, analisadas com o fluxo de 2,9 e 3,1mL/min e o perfil cromatográfico da solução analisada com o fluxo estabelecido pelo método em estudo (3,0 mL/min).

3.5.6.4 Variação da composição da fase móvel

Foi avaliada em função da comparação entre o perfil cromatográfico das soluções padrão e amostra analisadas com fase móvel estabelecida pelo método em estudo (fase A e fase B) e o perfil cromatográfico das soluções analisadas com a fase A (acetonitrila: solução ácido fosfórico (55:45) e a fase B.

3.5.6.5 Variação do lote da coluna cromatográfica

Foi avaliada pela comparação entre o perfil cromatográfico da solução amostra e da solução padrão, analisadas com colunas cromatográficas de diferentes lotes no teste da precisão inter-corridas.

3.5.7 Teste de membrana de filtração

Foi avaliada pela comparação entre amostras filtradas em dois tipos diferentes de material filtrante e a solução obtida após a centrifugação.

3.6 **Avaliação da estabilidade da formulação ao longo do prazo de validade**

A estabilidade da sinvastatina, como substância ativa, e também o aumento/formação dos produtos de degradação, em três lotes da formulação de comprimidos revestidos, ao longo do prazo de estabilidade proposto de 24 meses, foram avaliados. Os testes físicos (aspecto, umidade e dureza), físico-químicos (teor e dissolução) e microbiológicos (contagem total de fungos/leveduras e

ausência de patógenos) foram realizados a fim de avaliar a manutenção destas propriedades ao longo do estudo.

3.6.1 Avaliação dos produtos de degradação

A pesquisa de produtos de degradação na formulação foi realizada nas condições de armazenamento de 30°C de temperatura e 75% de umidade relativa. As amostras foram analisadas periodicamente (0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses) de acordo com a Guia para realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005), seguindo a metodologia proposta no item 3.2.

3.6.2 Avaliação das propriedades físicas, físico-químicas e microbiológicas

3.6.2.1 Avaliação das propriedades físicas

As avaliações das propriedades físicas tais como aspecto, umidade e dureza foram realizadas nas condições de armazenamento de 30°C de temperatura e 75% de umidade relativa. As amostras foram analisadas periodicamente (0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses) de acordo com a Guia para realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

O teste do aspecto foi realizado por metodologia visual seguindo a especificação da descrição do aspecto inicial. Os testes de umidade e dureza foram realizados através de metodologias descritas nos capítulos gerais de perda por dessecação (5.2.9) e dureza (5.1.3.1) na Farmacopéia Brasileira versão 05, em anexo (BRASIL, 2010).

3.6.2.2 Avaliação das propriedades físico-químicas

As avaliações do teor e do percentual de dissolução da sinvastatina na formulação foram realizadas nas condições de armazenamento de 30°C de temperatura e 75% de umidade relativa. As amostras foram analisadas

periodicamente (0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses) de acordo com a Guia para realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

Os testes de teor e dissolução de sinvastatina na formulação foram realizados através de metodologias descritas na monografia de sinvastatina comprimidos na Farmacopéia Americana versão 34, em anexo (UNITED, 2011).

3.6.2.3 Avaliação das propriedades microbiológicas

A contagem total de micro-organismos aeróbios, a contagem total de fungos e leveduras e ausência de patógenos (*P. Aeroginosa*, *E. Coli*, *Salmonella sp.* e *S. aureus*) na formulação foram realizadas ao longo do prazo de validade proposto de 24 meses, nas condições de armazenamento de 30°C de temperatura e 75% de umidade relativa. As amostras foram analisadas nos pontos inicial e final do estudo de acordo com a Guia para realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

Os testes microbiológicos foram realizados através de metodologia descrita no capítulo geral (5.5.3) da Farmacopéia Brasileira versão 05, em anexo (BRASIL, 2010).

4. RESULTADOS

4.1 Adequação do sistema

Os resultados de adequação do sistema estão representados pela tabela 14. Os valores de tempo de retenção e resolução estiveram de acordo com a especificação da farmacopéia americana e o valores de fator de capacidade e assimetria também apresentaram resultados satisfatórios de acordo com a faixa recomendada de $k' > 2$ para o fator de capacidade e fator de cauda (T) menor que 2 (USP, 2011 e FDA, 1994). O valor de número de pratos teóricos em geral deve ser maior que 2000 (SHABIR, 2003). A figura 5 mostra o cromatograma obtido no teste de adequação da linearidade.

Tabela 14– Resultado para o teste de adequação do sistema

Nome	TR	k'	T	N	Res
Sinvastatina	3,3	15,7	1,2	47195	4,8

TR= tempo de retenção relativo k' =fator de capacidade T=fator de cauda N=pratos teóricos Res= resolução

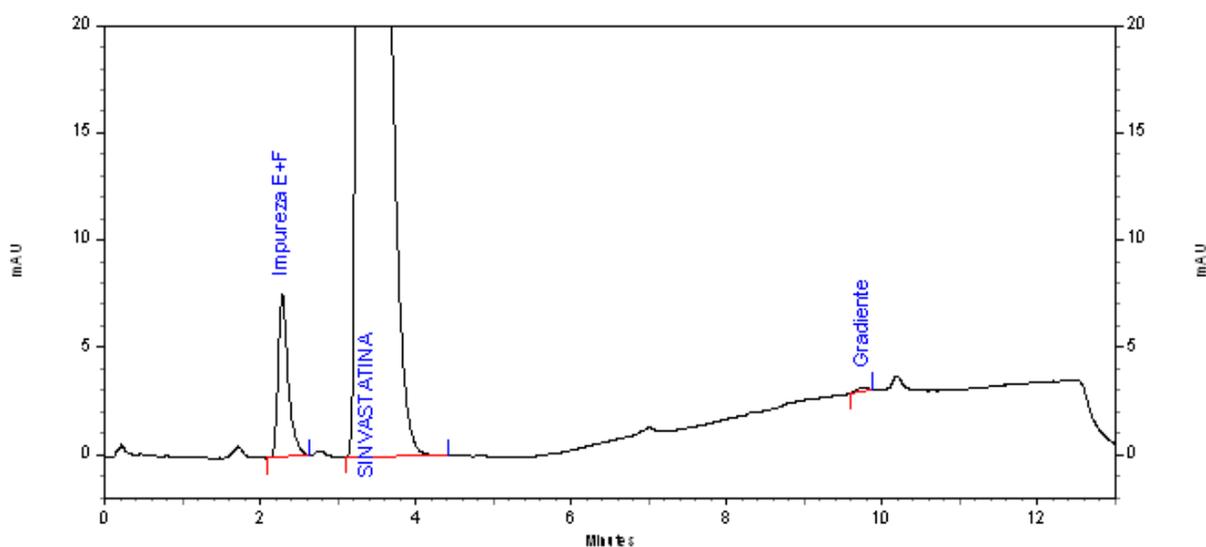


Figura 5- Cromatograma representativo da solução de adequação

4.2 Teste de estresse e seletividade

Os cromatogramas obtidos no teste de estresse estão representados a seguir nas figuras 6 a 9.

As soluções-branco foram injetadas para verificar se os diluentes utilizados nas amostras, sofreram degradação e/ou possuem algum interferente no mesmo tempo de retenção dos compostos (sinvastatina e impurezas) em estudo. Foi observado um sinal em 9,5 minutos oriundo da condição cromatográfica do gradiente. Nas condições de hidrólise ácida e oxidação há sinais (TR=0,18 minutos e TR=0,27 minutos, respectivamente) referentes aos reagentes utilizados na degradação (HCl 1M e peróxido de hidrogênio 10%, respectivamente). Através da figura abaixo foi verificado que não há interferentes do branco nas condições de degradação.

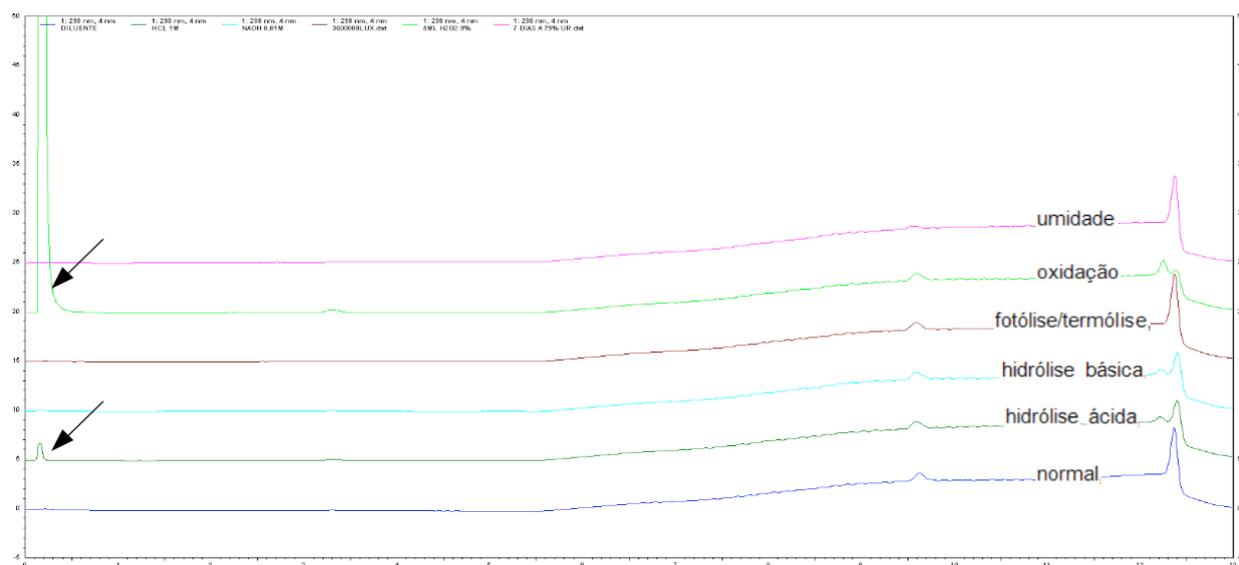


Figura 6- Cromatogramas representativos das soluções-branco nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise/termólise, oxidação e umidade (de baixo para cima).

Nas soluções do placebo não foram observadas degradações, somente os sinais referentes ao placebo nos tempos de retenção de 0,3, 0,6 e 0,8 minutos, aproximadamente. Observou-se, também, o pico relativo ao gradiente no tempo de 9,5 minutos. A figura abaixo apresenta as soluções-placebo nas condições normal e nas condições de degradação.

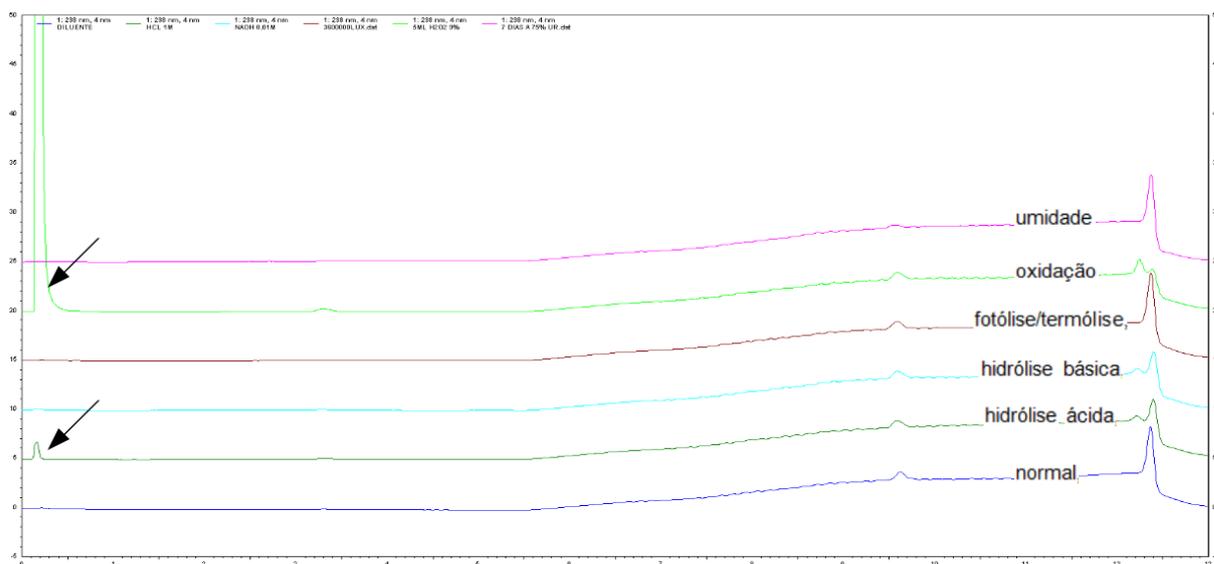


Figura 7- Cromatogramas representativos das soluções-placebo nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise, oxidação, termólise e umidade (de baixo para cima).

Foi verificado que a formulação é susceptível às degradações ácida e básica, obtendo-se resultados significativos de degradação (Figura 8). O mesmo foi observado no teste de estresse realizado na matéria-prima utilizando as mesmas condições de degradação (Figura 9).

De acordo com a tabela 15 foi observado que a impureza A (TR= 0,7) é um potencial produto de degradação oriundo das degradações por hidrólise ácida e básica, pois houve um aumento significativo da concentração desta impureza no produto de, aproximadamente, 63% e 16% respectivamente, contra 0,7% da condição controle (inicial). O mesmo comportamento foi observado na matéria-prima quando foram submetidas as mesmas condições de estresse. Foi observado um aumento significativo da impureza A correspondendo à uma concentração aproximada de 46% (hidrólise ácida) e 15% (hidrólise básica) contra 0,3% da condição controle (inicial).

Zhao e colaboradores concluíram que o produto formado após a submissão da sinvastatina às condições de hidrólise, corresponde à forma hidroxilada da lactona (ZHAO; et al, 2000). Alvarez e colaboradores demonstraram que esta conversão obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem que aumenta com a temperatura e é pH-dependente sendo potencializada em condições alcalinas (ALVAREZ, 2005).

Nos estudos conduzidos por Yang e Hwang e Gomes e colaboradores foi verificada a conversão completa da estatina para a forma hidroxiácido em condições alcalinas (YANG e HWANG, 2006; GOMES, 2009). No estudo de Gomes e colaboradores as amostras foram degradadas diretamente nas soluções de HCl e NaOH 1,0M, mantidas a 80° C por quatro horas (GOMES, 2009). Yang e Hwang verificaram que ocorre uma conversão de 28% da lactona para a forma hidroxiácida quando dissolvida em água mantida a 100°C por uma hora (YANG e HWANG, 2006). Quando mantida em solução contendo 70% de acetonitrila a 25°C, após igual período, esta conversão é de apenas 9%. Esta diferença ocorre devido a solubilidade da sinvastatina em água ser menor que em acetonitrila (YANG e HWANG, 2006). Yang e Hwang demonstraram que esta conversão pode ser retardada pela adição de pequena quantidade de ácido acético na solução retificando a conclusão encontrada por Alvarez e colaboradores (ALVAREZ, 2005; YANG e HWANG, 2006). Verificaram também que a conversão total ocorre em soluções alcalinas de NaOH 0,1M ou KOH 0,05M preparadas com 25% ou 50% de acetonitrila em água após 24 horas de exposição à temperatura ambiente (YANG e HWANG, 2006). Em soluções alcalinas metanólicas, preparadas com 25-90% de metanol em água a conversão foi total mas posteriormente a forma hidroxiácida foi convertida para a forma estermetílico potencializada pela adição de metanol que atua como nucleófilo da reação (YANG e HWANG, 2006).

Diante destes achados, as condições de hidrólise para a realização deste trabalho foram mais brandas (adição de 5mL da solução de NaOH 1M por 30 minutos a 80°C e depois neutralização) afim de se evitar a conversão total da sinvastatina e formação do produto de degradação da impureza A.

A matéria-prima é pouco susceptível à degradação por oxidação apresentando apenas 1,77% de degradação contra 0,17% do total de impurezas desconhecidas, o que não foi observado no produto, provavelmente, devido à presença de agentes anti-oxidantes como o ácido ascórbico e o butilidroxianisol (BHA) presentes na formulação do produto. Não foi observado um aumento da concentração de impurezas conhecidas.

A matéria-prima não sofreu degradação fotolítica, observado em pequena proporção no produto através de um ligeiro aumento da impureza E+F.

Tanto o produto quanto a matéria-prima são pouco suscetíveis ao calor. Foi verificado um pequeno aumento das concentrações de impurezas desconhecidas e

decaimento do teor de sinvastatina.

O produto sofreu degradação não significativa quando exposto à umidade. Não foi observado o mesmo na matéria-prima.

A impureza [E+F] (lovastatina) é susceptível à hidrólise ácida e básica e também à oxidação conforme verificado no estudo de Yang e Hwang (YANG e HWANG, 2006), pois foi observado o seu decaimento após as condições de degradação.

Não se observou degradação do placebo em qualquer condição de estresse.

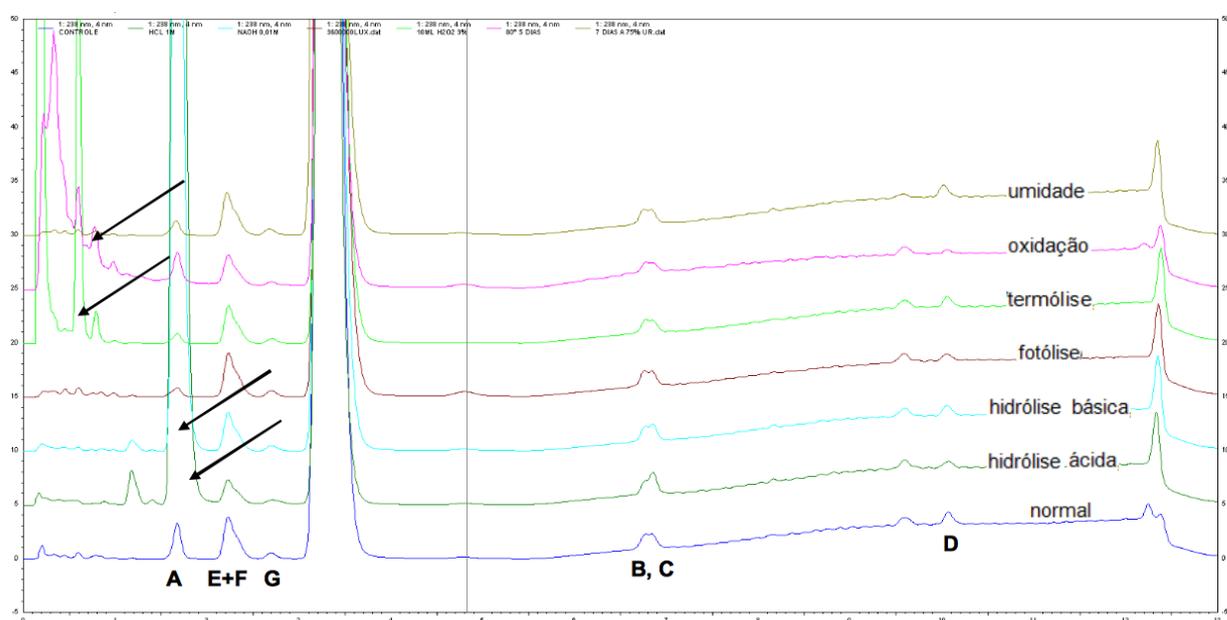


Figura 8- Cromatogramas representativos das soluções-amostra nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise, oxidação, termólise e umidade (de baixo para cima).

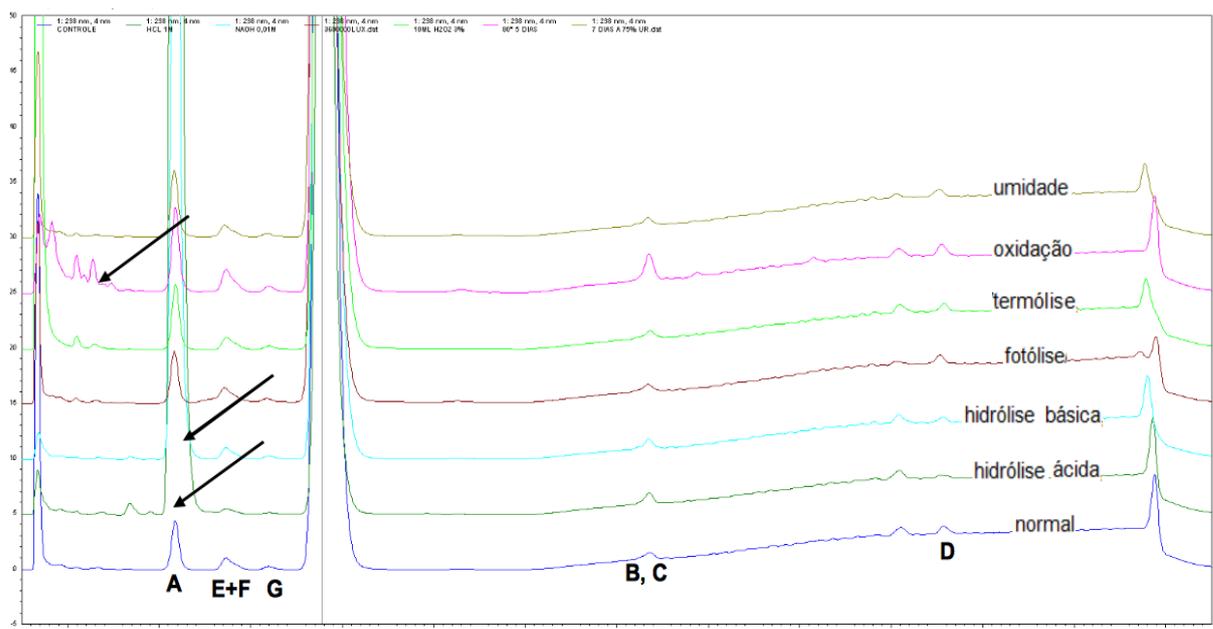


Figura 9- Cromatogramas representativos das soluções da matéria-prima nas condições normal, hidrólise ácida, hidrólise básica, fotólise, oxidação, termólise e umidade (de baixo para cima).

As tabelas 15 e 16 resumem os percentuais de degradação na formulação e na matéria-prima após os testes de estresse.

Tabela 15 - Resumo dos produtos de degradação obtidos após os testes de degradação na formulação

Condições	% Total desconhecido	Impureza A %	Impureza B %	Impureza C %	Impureza D %	Impureza [E+F] %	Impureza G %
Inicial	0,08	0,71	0,02	0,10	0,13	0,27	0,07
Hidrólise ácida	1,58	62,87	0,01	0,15	0,06	0,09	0,05
Hidrólise básica	0,08	15,50	0,02	0,14	0,09	0,23	0,07
Oxidação	0,10	0,92	0,03	0,12	0,10	0,27	0,07
Fotólise	0,09	0,76	0,03	0,12	0,10	0,43	0,06
Termólise	0,15	0,60	0,02	0,20	0,10	0,25	0,06
Umidade	0,08	0,95	0,03	0,12	0,12	0,27	0,06

Tabela 16 - Resumo dos produtos de degradação obtidos após os testes de degradação na matéria prima de sinvastatina

Condições	% Total desconhecido	Impureza A %	Impureza B %	Impureza C %	Impureza D %	Impureza [E+F] %	Impureza G %
Inicial	0,17	0,27	0,10	0,10	0,08	0,49	0,06
Hidrólise ácida	0,29	46,06	0,06	0,16	0,06	0,25	0,04
Hidrólise básica	0,14	15,46	0,10	0,11	0,09	0,43	0,06
Oxidação	1,77	0,09	0,10	0,09	0,08	0,45	0,05
Fotólise	0,17	0,08	0,10	0,09	0,06	0,51	0,06
Termólise	0,45	0,21	0,06	0,07	0,02	0,33	0,03
Umidade	0,08	0,13	0,10	0,09	0,09	0,51	0,06

A pureza dos picos de sinvastatina foi avaliada por análise espectral em cada condição do teste de estresse. O valor de 0,99 é considerado como valor aceitável de pureza de sinal (LOWEN, 2003). Nos gráficos 1 a 7 foram demonstrados que os valores obtidos são satisfatórios.

PurityReport

All named detected peaks between 3,00 and 4,00 minutes

Multi-Chrom 1 (1: 238 nm, 4 nm)

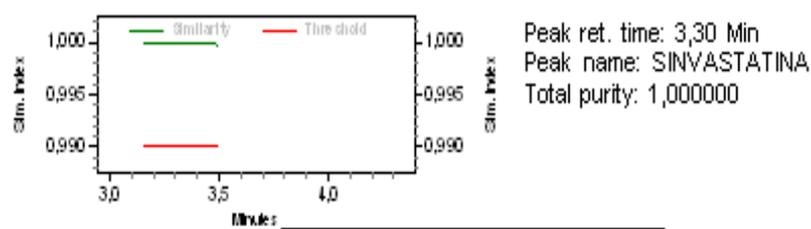


Gráfico 1 – Pureza de pico da solução-amostra na condição normal

Purity Report

All named detected peaks between 3,00 and 4,00 minutes

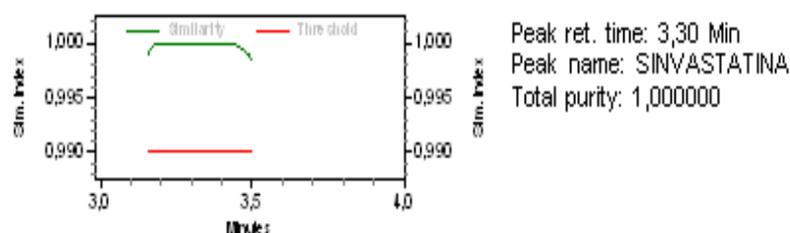
Multi-Chrom 1 (1: 238 nm, 4 nm)

Gráfico 2 – Pureza de pico da solução-amostra na condição de hidrólise ácida

Purity Report

All named detected peaks between 3,00 and 4,00 minutes

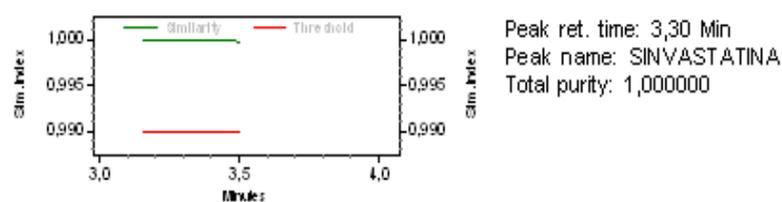
Multi-Chrom 1 (1: 238 nm, 4 nm)

Gráfico 3 – Pureza de pico da solução-amostra na condição de hidrólise básica

Purity Report

All named detected peaks between 3,00 and 4,00 minutes

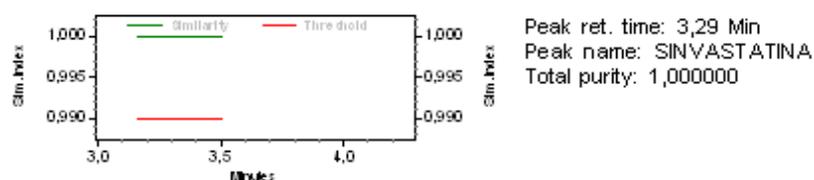
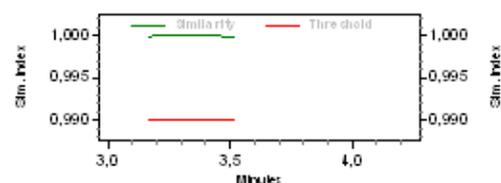
Multi-Chrom 1 (1: 238 nm, 4 nm)

Gráfico 4 - Pureza de pico da solução-amostra na condição de termólise

Purity Report

All named detected peaks between 3,00 and 4,00 minutes

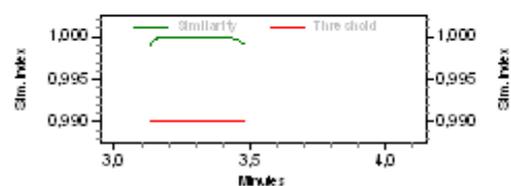
Multi-Chrom 1 (1: 238 nm, 4 nm)

Peak ret. time: 3,31 Min
Peak name: SINVASTATINA
Total purity: 1,000000

Gráfico 5 - Pureza de pico da solução-amostra na condição de oxidação

Purity Report

All named detected peaks between 3,00 and 4,00 minutes

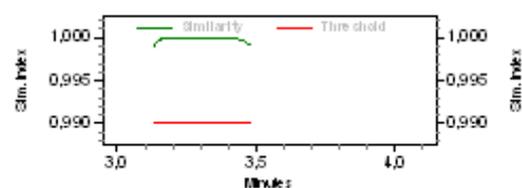
Multi-Chrom 1 (1: 238 nm, 4 nm)

Peak ret. time: 3,27 Min
Peak name: SINVASTATINA
Total purity: 1,000000

Gráfico 6 - Pureza de pico da solução-amostra na condição de fotólise

Purity Report

All named detected peaks between 3,00 and 4,00 minutes

Multi-Chrom 1 (1: 238 nm, 4 nm)

Peak ret. time: 3,27 Min
Peak name: SINVASTATINA
Total purity: 1,000000

Gráfico 7 - Pureza de pico da solução-amostra na condição de umidade

4.3 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

4.3.1 Teórico

Os valores de LD e LQ teóricos obtidos foram 0,17 µg/ml e 0,55 µg/ml, respectivamente. A concentração da solução (equação 3) do ativo utilizada foi corrigida pelo sinal obtido e também pelo valor de ruído do placebo. A tabela 17 apresenta os resultados obtidos do sistema.

Tabela 17 - Resultados do teste de LD e LQ teóricos

Sinal do ativo	Ruído do sistema (placebo)	Valor do sinal corrigido (ativo)	Concentração da solução (µg/ml)
959,566	33,985	925,581	1,5

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/mL}) = \frac{\text{Média do valor do ruído} \times \text{Conc. da solução}}{\text{Valor do sinal corrigido}} \text{ (equação 3)}$$

4.3.2 Real

A determinação do LD e do LQ reais foi realizada por meio das equações a seguir:

$$\text{LD} = 3 \times \frac{Sa}{b} \text{ (equação 4) e } \text{LQ} = 10 \times \frac{Sa}{b} \text{ (equação 5)}$$

Onde: sa , desvio padrão do intercepto com o eixo y ; b , inclinação da curva analítica (BRASIL, 2003).

Tabela 18 – Dados das curvas 1, 2 e 3 para determinação dos LD e LQ

Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área curva 1	Área curva 2	Área curva 3
0,55	10956	10974	10259
0,55	10933	10808	10630
1,10	22853	21850	21459
1,10	22430	21995	21449
1,65	33820	33083	33699
1,65	33709	33128	33487
2,20	44081	44599	44232
2,20	44130	44195	44622
2,75	56320	55343	55139
2,75	56116	55616	55475
r=	0,9997	1,0000	0,9998
a	20384	20319	20509
b	-68,5	-336,4	-389,7

Tabela 19 – Valores obtidos de LD e LQ

Media de a	DPb	LD	LQ
20404	351	0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Os valores de LD e LQ apresentaram-se abaixo da concentração de descarte, ou seja, abaixo do nível notificação. (ICH, 2006)

4.4 Linearidade

A linearidade foi verificada através da obtenção do gráfico das respostas (área) em função da concentração. A linearidade foi avaliada na faixa de 0,05% a 1,5% que contempla a faixa de concentração da especificação máxima da impureza e o nível de notificação.

Os dados das áreas obtidas foram lançados em uma planilha de Excel (tabela 20) para o cálculo da regressão linear através do método dos mínimos quadrados e

obteve-se a equação da reta representada pela função $y=18508+530,83x$ de coeficiente de correlação igual a 1,0000. Através do método dos mínimos quadrados foi possível determinar a reta que mais se ajusta através de um conjunto de pontos dispersos e que não estão localizados exatamente sobre uma linha reta (HARRIS, 2008).

Tabela 20 – Resultados obtidos da curva da linearidade da sinvastatina

Concentração real ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Área média	Desvio	DPR%
0,75	13727			
0,75	13516	13631	87,18	0,64
0,75	13650			
3,74	70470			
3,74	70436	70407	66,52	0,09
3,74	70315			
7,47	139929			
7,47	139277	139807	392,53	0,28
7,47	140215			
11,21	203987			
11,21	207640	206245	1611,35	0,78
11,21	207108			
14,94	278135			
14,94	277160	277857	496,20	0,18
14,94	278276			
22,41	415324			
22,41	414122	415232	871,96	0,21
22,41	416252			

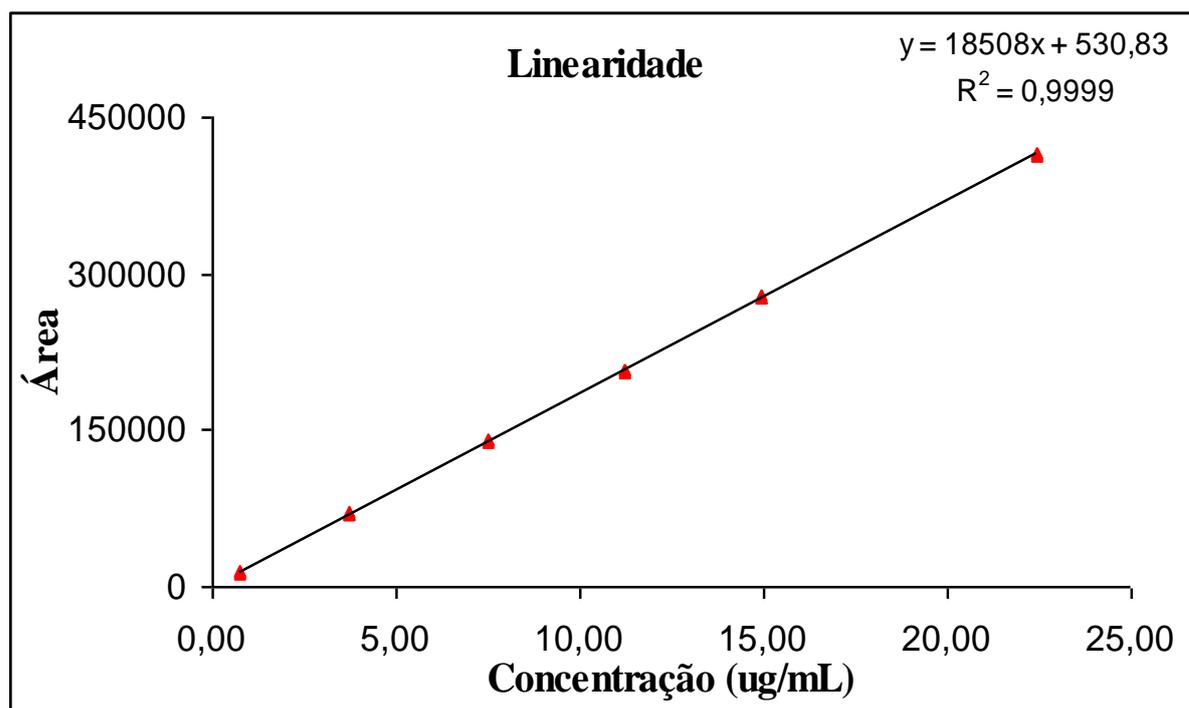


Gráfico 8 – Linearidade da curva da sinvastatina

Os resíduos foram calculados pela análise estatística do Excel conforme representados nas tabelas 21 e 22 e no Gráfico 9.

Tabela 21 – Dados das estatísticas de regressão da curva analítica da sinvastatina

Parâmetro	Resultado
R múltiplo	1,0000
R-Quadrado	0,9999
R-quadrado ajustado	0,9999
Erro padrão	1323,90
2x erro padrão	2647,79
Observações	18

Tabela 22 - Resultados dos resíduos da curva analítica da sinvastatina

Observação	Y previsto	Resíduos	Resíduos padrão
1	14358	-631	-0,49
2	14358	-842	-0,66
3	14358	-708	-0,55
4	69666	804	0,63
5	69666	770	0,60
6	69666	649	0,51
7	138802	1127	0,88
8	138802	475	0,37
9	138802	1413	1,10
10	207937	-3950	-3,08
11	207937	-297	-0,23
12	207937	-829	-0,65
13	277073	1062	0,83
14	277073	87	0,07
15	277073	1203	0,94
16	413909	1415	0,6701
17	413909	213	0,1007
18	413909	2343	1,1096

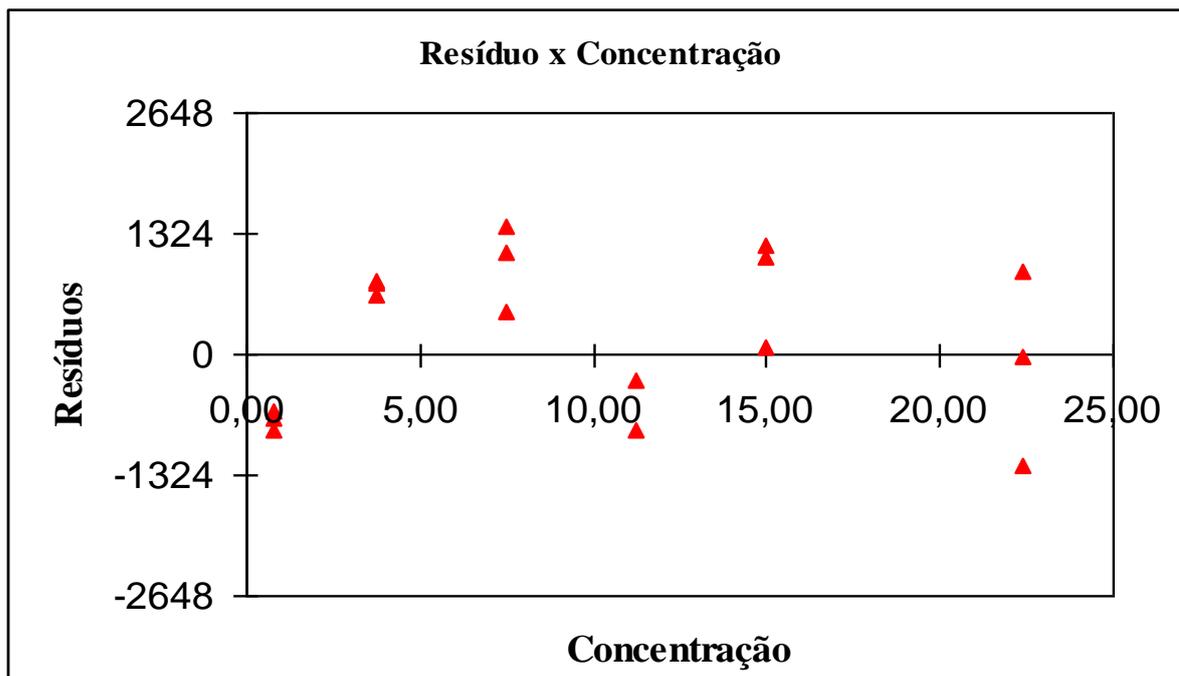


Gráfico 9 – Gráfico dos resíduos

A linearidade foi considerada satisfatória pois o valor mínimo aceitável para o coeficiente de correlação foi alcançado, de acordo com a RE no 899, de 29 de maio de 2003, publicada pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Os resíduos seguiram à distribuição normal no intervalo de ± 2 vezes o erro padrão. A população dos resíduos normalmente distribuídos apresenta média igual a zero (MILLER; MILLER, 2010).

A linearidade proposta pela equação da reta estabelecida foi confirmada através da análise estatística de variância (ANOVA). Os dados obtidos do teste de ANOVA estão apresentados na tabela 23.

Tabela 23 - Confirmação da linearidade por ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	3,19763E+11	3,1976E+11	182439,906	6,86771E-34
Resíduo	16	28043238,66	1752702,42		
Total	17	3,19791E+11			

gl=graus de liberdade, SQ=soma quadrática, MQ= média quadrática, F=F calculado, E=exponencial

Foi testada a hipótese de que o coeficiente angular da reta (b) é igual a zero

(hipótese nula (H0)) e de que o coeficiente angular da reta (b) é diferente de 0 (hipótese alternativa).

O método proposto é linear no intervalo de 0,75 µg/mL a 22,5 µg/mL, pois o valor de F calculado é maior do que o F crítico, indicando que a hipótese nula foi aceita, ou seja, o coeficiente angular da reta (b) é igual a zero (MILLER; MILLER 2010).

4.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela % de recuperação do método analítico em cada nível de concentração 0,05%, 100%, e 120% da concentração de trabalho, através da adição conhecida de sinvastatina ao placebo. A % de recuperação foi calculada por meio da razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica. A tabela 24 apresenta os resultados obtidos para exatidão do método proposto.

Tabela 24 – Dados e resultados das amostras da exatidão

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%)
0,75	0,74	98,67
0,74	0,74	100,00
0,76	0,75	98,68
15,36	15,22	99,09
15,44	15,34	99,35
15,48	15,32	98,97
23,04	23,08	100,17
22,98	22,95	99,87
23,04	23,00	99,83
	Média	99,34

Os valores obtidos encontram-se em conformidade com o critério de aceitação estabelecido. Tais valores devem estar compreendidos entre 90% e 110% (ERMER; MILLER, 2005).

4.6 Precisão

4.6.1 Precisão intra-ensaio

A precisão intra-ensaio do método foi avaliada no nível de 100% da concentração de trabalho (15,00µg/mL). A tabela 25 apresenta o valor de DPR% para precisão intra-ensaio.

Tabela 25 – Dados e resultados das amostras da precisão intra-ensaio

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%)
15,10	14,84	98,29
15,18	15,17	99,98
15,22	14,90	97,94
15,10	14,80	97,99
15,06	14,82	98,44
15,22	15,15	99,56
	Média =	98,70
	Desvio =	0,86
	DPR% =	0,87

O desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação (DPR% = 0,87) das seis amostras foi considerado satisfatório, pois o valor obtido foi menor que o estabelecido pelo critério de aceitação (DPR% ≤ 10%) (ERMER; MILLER, 2005).

4.6.2 Precisão inter-ensaio

A precisão inter-ensaio do método foi avaliada no nível de 100% da concentração de trabalho por outro analista em outro dia diferente. Os resultados estão apresentados na tabela 26.

Tabela 26 – Dados e resultados das amostras da precisão inter-corrída

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração real (mg/mL)	Recuperação (%)
15,22	14,66	96,34
15,10	14,69	97,32
14,98	14,39	96,07
15,26	15,12	99,10
14,94	14,45	96,69
15,22	15,02	98,69
	Média =	97,37
	Desvio =	1,26
	DPR% =	1,30

O desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação (DPR%=1,27) das doze amostras foi considerado satisfatório, pois o valor obtido foi menor que o estabelecido pelo critério de aceitação (DPR% \leq 10) (ERMER; MILLER, 2005).

A precisão intercorrida foi confirmada através da comparação das variâncias entre os analistas (teste F). Os resultados das variâncias estão demonstrados na tabela 27.

Tabela 27- Resultado do teste F entre os analistas 1 e 2

	Analista 1	Analista 2
Média	98,8	97,2
Variância	1,2	0,7
Observação	5	5
gl	4	4
F	1,71	
P (F \leq f) uni-caudal	0,31	
P crítico uni-caudal	6,39	

gl=graus de liberdade, F= f calculado

A hipótese nula (H0) é de que não há diferença estatisticamente significativa entre as variâncias, ou seja, de que não há diferença entre os resultados obtidos pelos analistas 1 e 2. O valor de F (1,71) é menor do que o valor de F crítico (6,39). Ou seja, a hipótese nula (H0) foi aceita, indicando de que não diferença entre os resultados dos analistas 1 e 2 (MILLER; MILLER, 2010).

4.7 Intervalo

Para a avaliação deste parâmetro, foram utilizados os dados obtidos nos itens 4.4, 4.5 e 4.6 onde foram comprovadas a linearidade, a exatidão e a precisão do método, quando aplicado às amostras de sinvastatina. O intervalo estabelecido foi considerado satisfatório, pois o método apresentou precisão, exatidão e linearidade adequadas quando aplicado a quantificação de impurezas em amostras de formulação contendo sinvastatina.

4.8 Robustez

A capacidade do método de resistir a pequenas alterações nos parâmetros analíticos que, eventualmente, possam ocorrer na rotina foi verificada alterando-se a proporção de fase móvel ($\pm 2\%$ modificador orgânico), o fluxo da fase móvel ($\pm 0,1$ unidade), a temperatura do forno ($\pm 1^\circ\text{C}$) e verificando-se a influência dessas alterações nos perfis cromatográficos. Os resultados estão apresentados nas figuras 10 e 11.

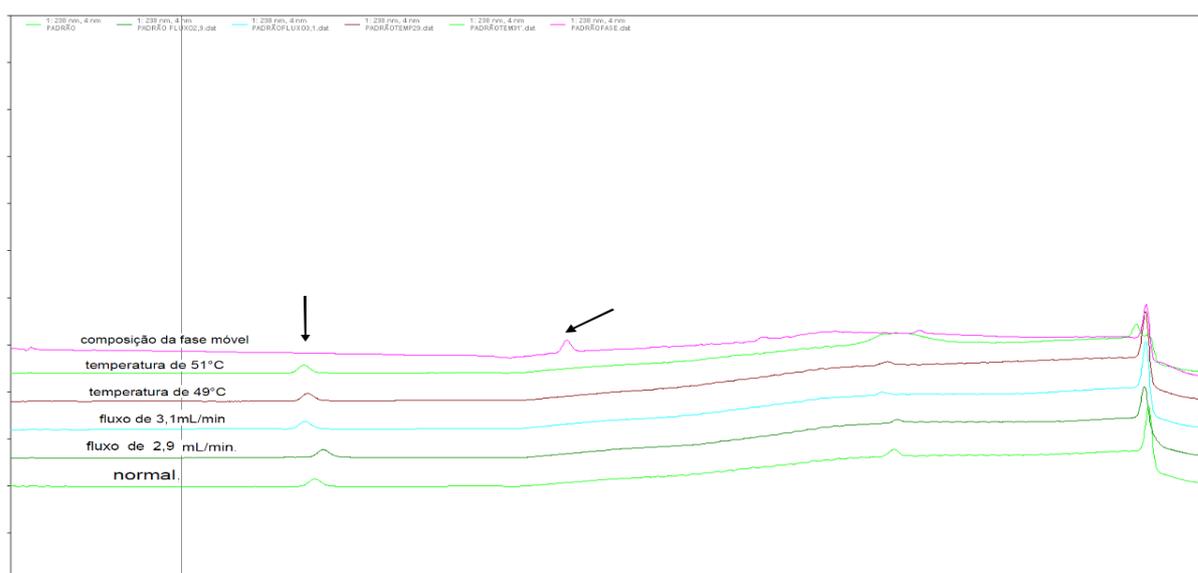


Figura 10- Sobreposição da solução padrão nas condições normal, fluxo de 2,9 mL/min. e fluxo de 3,1 mL/min. temperatura de 49°C, temperatura de 51°C e variação da composição da fase móvel (de baixo para cima)

Foi verificado nas figuras 10 e 11 que a sinvastatina sofreu variação significativa do tempo de retenção quando a composição da fase móvel foi alterada passando de 3,3 minutos para 6,1 minutos.

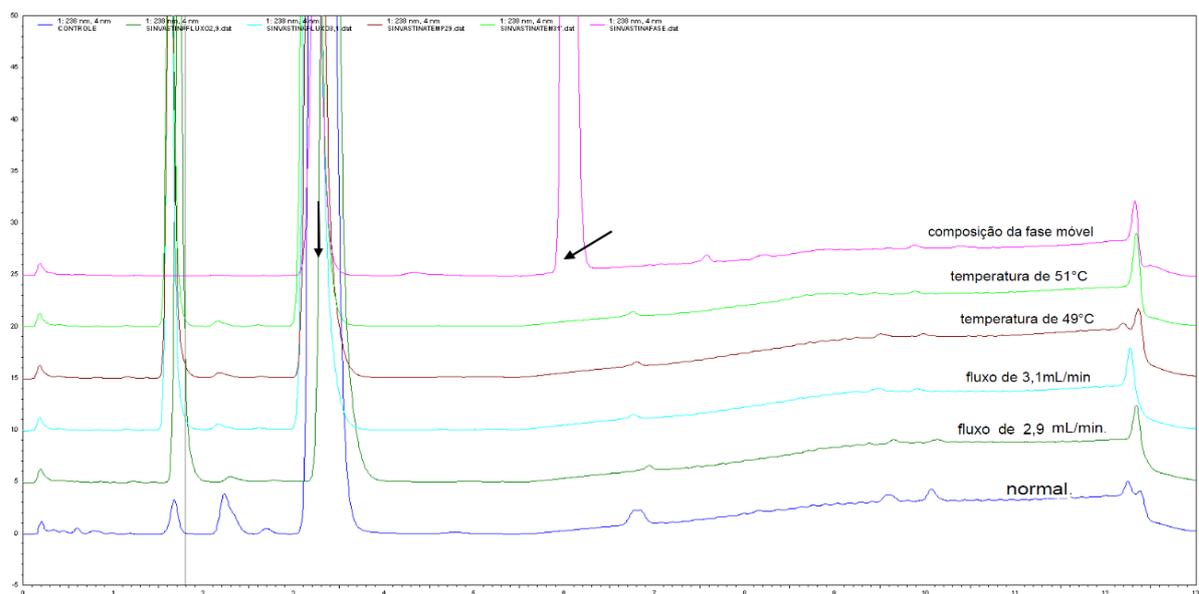


Figura 11- Sobreposição das soluções amostra nas condições normal, fluxo de 2,9 e fluxo de 3,1 temperatura de 49°C, temperatura de 51°C e variação da composição da fase móvel (de baixo para cima)

O método foi considerado robusto às variações realizadas, pois o perfil cromatográfico não sofreu alterações, com exceção da condição da condição de mudança de fase móvel, pois esta apresentou uma variação brusca do tempo de retenção da sinvastatina quando comparado à condição normal.

4.9 Estabilidade das soluções

A solução do padrão foi considerada estável, até o tempo de 24 horas em que a variação percentual da área média do pico referente à sinvastatina no instante testado em relação à área média no tempo zero, foi de $\pm 5\%$. Verificou-se que ocorre um aumento da área da impureza hidróxiácido na solução amostra (1,5 mg/mL) durante o teste de estabilidade, pois esta impureza é um produto de hidrólise, sendo assim a solução amostra foi considerada estável por um período de 3 horas na condição ambiente. Torna-se necessária a avaliação da estabilidade da

solução em equipamento de HPLC com sistema de injeção refrigerada a fim de prolongar o tempo de análise para garantir o preparo de um número maior de amostras durante as análises de rotina do controle de qualidade.

Tabela 28 – Resultados da estabilidade das soluções

Tempo	padrão		amostra		hidroxiácido	
	Área Média	Variação (%)	Área Média	Variação (%)	Área Média	Variação (%)
0	31281	NA	15704234	NA	106731	NA
2	31770	1,56	15741841	0,24	109947	3,01
5	31556	0,88	15760720	0,36	112821	5,71
10	31310	0,09	15769457	0,42	115862	8,56
24	31506	0,72	15730064	0,16	125073	17,19

4.10 Teste de membrana de filtração

Os filtros de seringa podem ser utilizados para assegurar a remoção de contaminantes particulados, oferecer proteção aos componentes dos instrumentos analíticos e também auxiliar na agilidade das análises. Os tipos de membrana de filtração foram escolhidas de acordo com a compatibilidade química entre solvente e o material da membrana.

As soluções padrão e amostra foram filtradas em dois diferentes tipos de membrana, RC e PVDF, ambas com 0,45 μ m de tamanho de poro, e comparadas com as mesmas soluções centrifugadas por 15 minutos à 4500rpm. Os resultados estão apresentados nas tabelas 29 e 30.

Tabela 29 – Áreas de sinvastatina obtidas no teste de membrana da solução padrão

	Centrifugada	RC 0,45 µm	PVDF 0,45µm
1	31173	31129	31275
2	31423	31574	30953
3	31303	31328	31248
4	31871	30395	32314
5	31600	30576	31134
6	31062	31727	30997
7	31662	31242	31775
8	31036	31328	30535
9	31235	31393	31365
10	31555	30336	31040
Média	31392	31103	31264
DP	262,55	467,32	462,68
DPR%	0,84	1,50	1,48

Tabela 30 – Áreas de sinvastatina obtidas no teste de membrana da solução amostra

	Centrifugada	RC 0,45 µm	PVDF 0,45 µm
1	19513343	19728725	19753698
2	19639208	19460177	19479937
3	19490137	19526319	19597708
4	19511908	19526748	19608724
5	19442335	19379150	19652530
6	19552835	19351880	19662260
7	19529468	19549075	19618005
8	19686419	19622836	19655345
9	19519481	19692745	19565038
10	19485377	19556127	19623350
Média	19537051	19539378	19621660
DP	69569,16	115820,93	67244,88
DPR%	0,36	0,59	0,34

Tabela 31 - Teste T no teste de membranas da solução padrão

	Centrifugada	RC	Centrifugada	PVDF
Média	31416,33333	31099,88889	31416,3333	31262,33333
Variância	79501,5	272885,3611	79501,5	267572,5
Observações	9	9	9	9
Correlação de Pearson	-0,740480165		0,77244508	
Hipótese da diferença	0		0	
gl	8		8	
t Stat	1,256849793		1,32405539	
P(T<=t) bi-caudal	0,244261789		0,22206353	
t crítico bi-caudal	2,306004133		2,30600413	

gl=grau de liberdade, t Stat= t calculado

Tabela 32- Teste T no teste de membranas da solução amostra

	Centrifugada	RC	Centrifugada	PVDF
Média	19539685,33	19518339,67	19539685,3	19606988,56
Variância	5971769111	11788637101	5971769111	3230930966
Observações	9	9	9	9
Correlação de Pearson	0,214337355		-0,25604722	
Hipótese da diferença	0		0	
gl	8		8	
t Stat	0,538075733		-1,88675136	
P(T<=t) bi-caudal	0,605166986		0,09590421	
t crítico bi-caudal	2,306004133		2,30600413	

gl=grau de liberdade, t Stat= t calculado

Verifica-se através do teste T (tabelas 31 e 32) que não há diferenças entre a utilização dos filtros de seringa com os dois tipos de membrana. A hipótese nula (H_0) é aceita e indica que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias, ou seja, de que não há diferença entre os resultados obtidos. O valor de T (RC=0,54 e PVDF= -1,89) é menor do que o valor de T crítico (2,31). Ou seja, a hipótese nula (H_0) foi aceita, indicando de que não diferença entre os resultados das amostras centrifugadas com as amostras filtradas.

De acordo com os resultados obtidos, ambos os filtros podem ser utilizados durante as análises de rotina.

4.11 Avaliação da estabilidade da formulação ao longo do prazo de validade

A estabilidade da formulação foi verificada ao longo do prazo de validade através da avaliação dos produtos de degradação e das propriedades físicas, físico-químicas e microbiológicas. O estudo de estabilidade de longa duração foi conduzido para a obtenção de conclusões sobre o comportamento químico e o perfil de degradação da sinvastatina na formulação.

4.11.1 Avaliação dos produtos de degradação

Neste estudo foram observados se houve formação de produtos de degradação bem como o aumento quantitativo dos produtos presentes no ponto inicial. As amostras foram analisadas seguindo a metodologia proposta no item 3.2. O sistema de adequação foi monitorado durante todo o estudo e os resultados obtidos mantiveram-se dentro da especificação (Res > 4 e razão sinal/ruído > 10). Os produtos de degradação conhecidos foram identificados pelos respectivos tempos de retenção relativo visto que foi demonstrada a adequação do sistema cromatográfico em cada análise.

Nas três formulações foi verificada a presença de impurezas conhecidas e desconhecidas no ponto inicial. Estas impurezas podem ser oriundas da matéria-prima ou formadas durante o processo de manufatura do produto.

Não foi verificado um aumento da impureza A (hidroxiácido) como observado no teste de estresse realizado nas condições de hidrólise ácida/básica, o que corrobora com o exposto pelo ICH e por Baertschi de que nem todos os produtos de degradação determinados do teste de estresse se formarão ao longo do prazo de validade do produto. Nos pontos de 6 e 12 meses foi observado um decaimento oriundo de variações analíticas, porém não significativo devido ao resultado obtido ser um valor baixo. Estas variações são esperadas ao longo do estudo de estabilidade (O` DONNEL, 2005).

Para as demais impurezas G, B, C, D não foram observadas variações dos resultados.

No gráfico 10 estão apresentados os resultados obtidos nas análises de pesquisa de produtos de degradação nos lotes A, B e C respectivamente. Pelos

resultados obtidos foi verificado que o produto é estável quanto à formação de produtos de degradação. As impurezas desconhecidas não atingiram 0,1% portanto não foram reportadas (ICH, 2006).

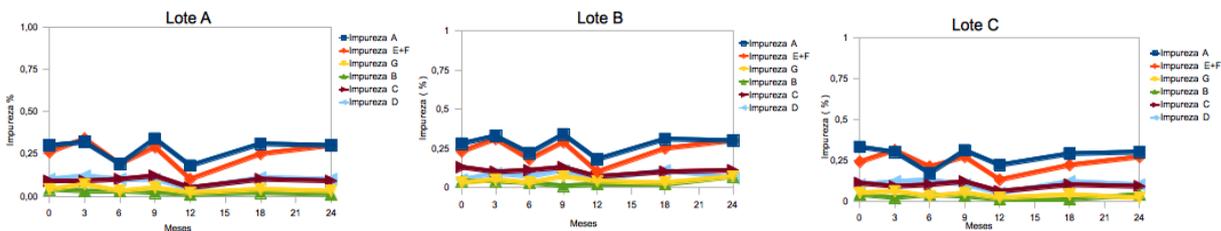


Gráfico 10 - Resultados obtidos nos testes físicos de umidade e dureza ao longo do estudo de estabilidade

4.11.2 Avaliação das propriedades físicas, físico-químicas e microbiológicas

4.11.2.1 Avaliação das propriedades físicas

O aspecto, umidade e dureza foram avaliados para verificar a manutenção das propriedades físicas das três formulações.

Foi observada uma alteração do aspecto dos comprimidos destacada pelo aparecimento de manchas de cor marrom nos três lotes analisados a partir do 9º mês até o final do estudo (24º mês).

Não foi observado um aumento da quantidade de água na formulação ao longo do estudo. Foi detectado um resultado atípico no 6º mês que pode ser desconsiderado pela tendência dos demais pontos. O teste de dureza apresentou resultados satisfatórios (não menos que 3Kp) ao longo do período avaliado. Os resultados estão apresentados no gráfico 11.

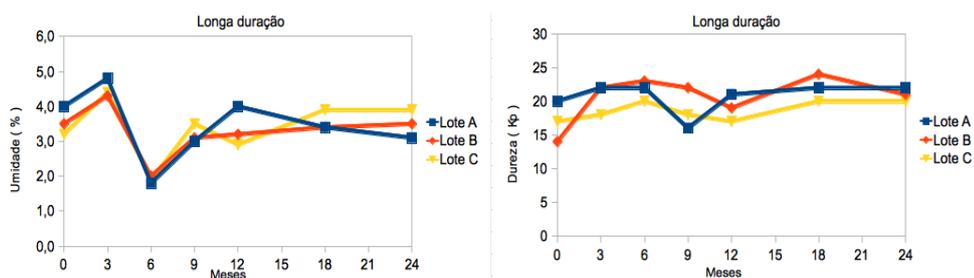


Gráfico 11-Resultados obtidos nos testes físicos de umidade e dureza ao longo do estudo de estabilidade

4.11.2.2 Avaliação das propriedades físico-químicas

Os testes de teor e dissolução de sinvastatina na formulação foram realizados para avaliar o decaimento e a performance do produto quanto a porcentagem de liberação da substância ativa.

Através dos resultados apresentados no gráfico 12 foi verificado que não houve decaimento do teor da substância ativa nos três lotes analisados (não menos que 10%). Foi observada uma queda não significativa dos percentuais de dissolução ao final do estudo, porém os resultados mantiveram-se acima da especificação ($Q > 80\%$).

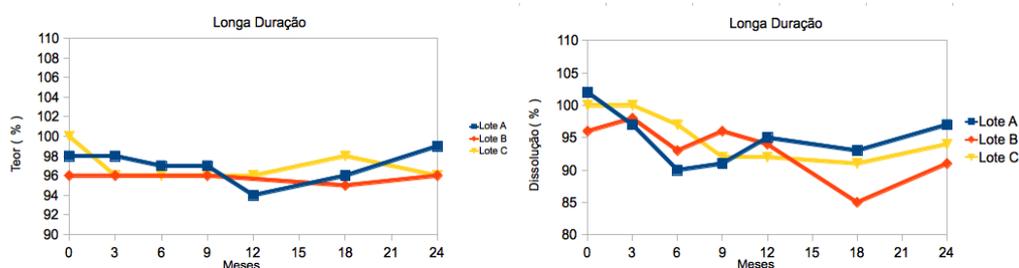


Gráfico 12-Resultados obtidos nos testes físico-químicos de teor e dissolução ao longo do estudo de estabilidade

4.11.2.3 Avaliação das propriedades microbiológicas

A contagem total de micro-organismos aeróbios e a contagem total de fungos e leveduras foram mantidas menores que 1000 UFC/g e foi verificada a ausência de patógenos (*P. Aeruginosa*, *E. Coli*, *Salmonella sp.* e *S. Aurus*) no 24^o mês indicando a manutenção desta característica ao final do estudo.

5. CONCLUSÃO

O método analítico da matéria-prima de sinvastatina da Farmacopéia Americana demonstrou que pode ser utilizado para avaliar a estabilidade dos comprimidos de sinvastatina, pois não há interferências dos produtos de degradação, quando submetidas a condições de degradação forçada (oxidação, hidrólise ácida, básica, umidade, exposição à luz e calor seco).

A utilização de coluna cromatográfica de maior comprimento (55mm ao invés de 33mm) possibilitou uma melhoria da resolução entre os sinais da impureza E+F (lovastatina) e a sinvastatina e bem como a manutenção dos demais parâmetros de adequação do sistema, proporcionando a identificação das impurezas conhecidas pelos tempos de retenção relativos uma vez que somente a lovastatina está disponível para aquisição.

O método proposto apresentou especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez na faixa de trabalho.

O principal produto de degradação gerado no teste de estresse foi a sinvastatina hidroxíácido nas condições de hidrólise ácida e básica. A degradação foi verificada significativamente tanto na matéria-prima quanto na formulação de comprimidos.

A metodologia proposta pode ser empregada na rotina para o controle de qualidade da sinvastatina em comprimidos por ser capaz de gerar resultados confiáveis. A determinação de produtos de degradação da sinvastatina em 13 minutos de cromatografia permite a obtenção de resultados mais rápidos além da economia no consumo de solventes.

O estudo de estabilidade ao longo do prazo de validade proposto dos comprimidos demonstrou através da metodologia proposta que não houve formação e/ou de produtos de degradação já presentes na matéria-prima. Verificou-se que o principais produtos de degradação formados no teste de estresse não se formaram significativamente como observado neste teste.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro 2002.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 10520**: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro 2002.

ALVAREZ, L.A. et al. Stability study of simvastatin under hydrolytic conditions assessed by liquid chromatography. **J AOAC Int**, v. 88, p. 1631-6, 2005

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G; ALLEN, L.V. **Farmacotécnica**: Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007. p. 130-131.

BAKSHI, M.; SINGH, S.; Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p.1011–1040, 2002.

BAERTSCHI, S.W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 758-767, 2006.

BAERTSCHI, SW. **Pharmaceutical Stress Testing**: Predicting Drug Degradation. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2005. 469p.

BASAK, A. K. et al. Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 64-72, 2007.

BRASIL. Lei 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União, Poder executivo**, Brasília, DF, 1976.

BRASIL. Resolução nº 560, de 02 de abril de 2002. Determina a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] União, Poder executivo**, Brasília, DF, 2002.

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

BRASIL. Resolução nº 398, de 12 de novembro de 2004. Determina a publicação do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] União, Poder executivo**, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] União, Poder executivo**, Brasília, 01 ago. 2005.

BRASIL. Resolução nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] União, Poder executivo**, Brasília, DF, 19 abr. 2010.

BRASIL. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Ministério da Saúde, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_dcnt_pequena_portugues_espanhol.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2012.

BOLETIM saúde e economia. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, ano 3, ed. 6, out. 2011.

BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 2011.

BUDAVARI, S (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14a ed. New Jersey: Merck Research Laboratories, 2006. p. 143, 722, 968, 1325, 1471.

CARVALHO, I.; CAMPO, L. V. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CARVALHO, J.P. et al. Estabilidade de medicamentos no âmbito da farmacovigilância. **Revista Fármacos e Medicamentos**. v. 34, n. 6, p. 22-27, 2005.

CHOW, S.; LIU, J. **Statistical Design and Analysis in Pharmaceutical Science: validation, process controls, and stability**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995.

ERMER, J; MILLER, J.H.M. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2005

European Pharmacopeia. Supplement 6.4 to the 6a ed. France: Directorate of Quality of medicines of the Council Europe, 2009.

EXECUTIVE Summary of the Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. **Adult Treatment Panel III**. JAMA 2001;285:2486-97.

FARMACOPÉIA Brasileira 5a e. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERRO, A.; WIERZBICKI, A.S.; POSTON, R. The lipid and non-lipid effects of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, p. 95-112, 2003.

GOMES, F. P. Et al. UV-Derivative Spectrophotometric and Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Methods for Determination of Simvastatin in Tablets. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28(2), p. 261-269, 2009.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p. 739-744.

HARRIS, D. C.; **Análise química quantitativa**. 7A ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation – ICH. Stability Testing of new drug

substance and products Q1A (R2). IFPMA, Geneva, 2003. Disponível em <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 14 set. 2011.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation – ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). IFPMA, Geneva, 2005. Disponível em <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 14 set. 2011.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation – ICH. Impurities in New Drug Products Q3B(R2). IFPMA, Geneva, 2006. Disponível em <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 14 set. 2011.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation – ICH. Guideline for residual solvents Q3C(R5). IFPMA, Geneva, 2011. Disponível em <<http://www.ich.org>>. Acesso em: 14 set. 2011.

INSTITUTO Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO. DOQ - CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasil, 2003. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em 10 set. 2011.

JEMAL, M.; OUYANG, Z. The need for chromatographic and mass resolution in liquid chromatography/tandem mass spectrometric methods used for quantitation of lactones and corresponding hydroxy acids in biological samples. **Rapid Commun Mass Spectrom.** v. 14(19), p.1757-1765, 2000.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES C. T. Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.

KRISHNA, S. R. et al. A Stability-Indicating RP-LC method for the Determination of Related Substances in Simvastatin. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 2, n. 1, p. 91-99, 2010.

LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H. A. e KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 1. ed. Lisboa: Fundação Galouste Guldenkian, 2001. Vol. II. 1017 p.

LAZZERINI, P. E. et al. Statins and the Joint: Multiple Targets for a Global Protection. **Seminars Arthritis Rheumatism**, v. 40, p. 430-446, 2011.

LEITE, G.L. **ESTABILIDADE: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LIM, S.S. et al. Prevention of cardiovascular disease in high-risk individuals in low-income and middle-income countries: health effects and costs. **Lancet**, v. 370, p. 2054-2062, 2007.

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.

MALENOVIC, A. et al. Forced degradation studies of simvastatin using microemulsion liquid chromatography. **J. Liq .Chrom. & Rel. Tech.**, v. 33, p.536-547, 2010.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for Analytical Chemistry**. 6 ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4a ed. New York: W. H. Freeman, 2005.

O' DONNEL, P. In Remington: The science and practice of Pharmacy. **Stability of Pharmaceutical Products**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 21 ed. 2005.

PICON, P.D. et al. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares. Protocolo Clínico e

Diretrizes Terapêuticas Dislipidemias em pacientes de alto risco de desenvolver eventos cardiovasculares. **Consulta Pública SAS/MS nº 13, de 12 de novembro de 2002.** Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dislip_pcdt.pdf>. Acesso em : 18 jun. 2011.

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

REYNOLDS, D.W., et al. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 2, p. 48-54, 2002.

SESHUKUMAR, D. et al. Development and Validation of Stability Indicating RP-UPLC Method for Simultaneous Determination in Fixed Dose Combination of Ezetimibe and Simvastatin. **J Chromat Separation Techniq**, v. 3, n. 3, p. 1-7, 2012.

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, p. 57- 66, 2003.

SILVA, K.E.R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciência Básica Aplicada**, v. 30, n.2, p. 129-135, 2009.

SMITH, S.C.Jr. et al. Our time: a call to save preventable deaths from cardiovascular disease (heart disease and stroke). Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/content/early/2012/09/17/CIR.0b013e318267e99f>>. Acesso em: 4 nov. 2012.

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2a ed., New York: John Wiley & Sons, 1997.

SPARK, P.A.; LAWS, P.E.; FITRIDGE, R.A. The Role of Statins in Vascular Disease.

Eur J Vasc Endovasc Surg, v. 27, p. 6–16, 2004.

SRINAIVASU, M.K.; RAJU, A.N.; REDDY, G.M. Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC . **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 29, p. 715–721, 2002.

UNITED States Pharmacopeia. 34 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Conventions; 2011.

UNITED States Food and Drug Administration - FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer guidance validation of chromatographic methods. Rockville, 1994. Disponível em <<http://www.fda.gov/cder>>. Acesso em: 06 out 2012.

WANG, H.; WU, Y.; ZHAO, Z. Wu, Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electro-spray ionization tandem mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.** v. 36, p. 58–70, 2001.

WHO. International Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. Annex 5, **WHO Technical Report Series**. 863, 1996.

WHO. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control: policies, strategies, and interventions. World Heart Federation, World Stroke Organization. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/>. Acesso em: 27 nov. 2012.

YANG, D.; HWANG, L. S. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxyl acid forms and their determination in Pu-Erh tea. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 277-284, 2006.

ZHANG, N. et al. Quantitative analysis of simvastatin and its β -hydroxy acid in human plasma using automated liquid–liquid extraction based on 96-well plate format and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34(1), p. 175–187, 2004.

ZHAO, J. et al. Quantitation of simvastatin and its beta-hydroxy acid in human plasma by liquid- liquid cartridge extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **J. Mass. Spectrom**, v. 35, p. 1133–1143, 2000.

ANEXO – Monografia de simvastatina comprimidos da Farmacopéia Americana

4229 Simvastatin / Official Monographs

USP 34

for all the peaks. Calculate the percentage of each impurity in the portion of Simvastatin taken by the formula:

$$100(r_i / r_s)$$

In which r_i is the peak area for each impurity; and r_s is the sum of the areas of all the peaks. Reporting level for impurities is 0.05%.

Table 1

Name	Relative Retention Time	Limit %
Simvastatin hydroxyacid ¹	0.45	0.4
Epilovastatin ² and Lovastatin	0.60	1.0 ^a
Methylene simvastatin ⁴	0.80	0.4
Simvastatin	1.0	n/a
Acetyl simvastatin ⁵	2.38	0.4
Anhydro simvastatin ⁶	2.42	0.4
Simvastatin dimer ⁷	3.80	0.4
Any other individual impurity	—	0.1
Total impurities other than lovastatin and epilovastatin	—	1.0

¹ (3R,5R)-7-[(1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-Dimethylbutanoyloxy)-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoic acid.

² (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[(2R,4R)-4-Hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl (2R)-2-methylbutanoate.

³ If present, lovastatin and epilovastatin may not be completely resolved by the method. These peaks are integrated together to determine conformance.

⁴ (1S,7S,8S,8aR)-8-[(2R,4R)-4-Hydroxy-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethylbut-3-enoate.

⁵ (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[(2R,4R)-4-(Acetyloxy)-6-oxotetrahydro-2H-pyran-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoate.

⁶ (1S,3R,7S,8S,8aR)-3,7-Dimethyl-8-[(2R)-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl]ethyl]-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl 2,2-dimethylbutanoate.

⁷ (2R,4R)-2-[[[(1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-Dimethylbutanoyloxy)-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]ethyl]-6-oxotetrahydro-2H-pyran-4-yl](3R,5R)-7-[(1S,2S,6R,8S,8aR)-8-[(2,2-dimethylbutanoyloxy)-2,6-dimethyl-1,2,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanoate.

Assay—[NOTE—The Simvastatin solutions are stable for up to 3 days when stored at 4°. Without refrigeration, they should be injected immediately after preparation.]

Dilute phosphoric acid—Transfer 1 mL of phosphoric acid to a 1-L volumetric flask, and dilute with water to volume.

Solution A—Prepare a mixture of acetonitrile and *Dilute phosphoric acid* (50:50).

Solution B—Transfer 1 mL of phosphoric acid to a 1-L volumetric flask, and dilute with acetonitrile to volume.

Mobile phase—Use variable mixtures of *Solution A* and *Solution B*, as directed for *Chromatographic system*. Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Buffer solution—Prepare a solution containing 1.4 g of monobasic potassium phosphate per L, and adjust with phosphoric acid to a pH of 4.0.

Diluent—Prepare a mixture of acetonitrile and *Buffer solution* (3:2).

System suitability preparation—Dissolve accurately weighed quantities of USP Simvastatin RS and USP Lovastatin RS in *Diluent*, and dilute quantitatively, and stepwise if necessary, with *Diluent* to obtain a solution having known concentrations of about 1.5 mg per mL of USP Simvastatin RS and 0.015 mg per mL of USP Lovastatin RS.

Standard preparation—Dissolve an accurately weighed quantity of USP Simvastatin RS in *Diluent* to obtain a solution having a known concentration of about 1.5 mg per mL.

Assay preparation—Transfer about 75 mg of Simvastatin, accurately weighed, to a 50-mL volumetric flask, dissolve in and dilute with *Diluent* to volume, and mix.

Chromatographic system (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 238-nm detector and a 4.6- × 33-mm column that contains packing L1. The flow rate is about 3.0 mL per minute. The chromatograph is programmed as follows.

Time (minutes)	Solution A (%)	Solution B (%)	Elution
0–4.5	100	0	isocratic
4.5–4.6	100→95	0→5	linear gradient
4.6–8.0	95→25	5→75	linear gradient
8.0–11.5	25	75	isocratic
11.5–11.6	25→100	75→0	linear gradient
11.6–13	100	0	re-equilibration

Chromatograph the *System suitability preparation*, and record the peak responses as directed for *Procedure*: the relative retention times are about 0.60 for lovastatin and 1.0 for simvastatin; and the resolution, R , between simvastatin and lovastatin is greater than 3. Chromatograph the *Standard preparation*, and record the peak responses as directed for *Procedure*: the relative standard deviation for replicate injections is not more than 1.0%.

Procedure—Separately inject equal volumes (about 5 μ L) of the *Standard preparation* and the *Assay preparation* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the areas for the major peaks. Calculate the quantity, in mg, of $C_{25}H_{38}O_5$ in the portion of Simvastatin taken by the formula:

$$VC(r_u / r_s)$$

In which V is the volume, in mL, of the *Assay preparation*; C is the concentration, in mg per mL, of USP Simvastatin RS in the *Standard preparation*; and r_u and r_s are the responses of the simvastatin peak obtained from the *Assay preparation* and the *Standard preparation*, respectively.

Simvastatin Tablets

» Simvastatin Tablets contain not less than 90.0 percent and not more than 110.0 percent of the labeled amount of simvastatin ($C_{25}H_{38}O_5$).

Packaging and storage—Preserve in tight containers.

USP Reference standards (11)—

USP Simvastatin RS

Identification—The retention time of the major peak in the chromatogram of the *Assay preparation* corresponds to that in the chromatogram of the *Standard preparation*, as obtained in the *Assay*.

Dissolution (711)—

Medium: pH 7.0 buffer solution containing 0.5% sodium dodecyl sulfate in 0.01 M sodium phosphate prepared by dissolving 30 g of sodium dodecyl sulfate and 8.28 g of monobasic sodium phosphate in 6000 mL of water, and adjusting with 50% (w/v) sodium hydroxide solution to a pH of 7.0; 900 mL.

Apparatus 2: 50 rpm.

Time: 30 minutes.

Prewashed manganese dioxide—Transfer 10 g of manganese dioxide to a suitable container, and treat as follows. Add 50 mL of *Dissolution Medium*, and shake vigorously for 5 minutes. Centrifuge, decant the supernatant layer, and

ANEXO – Monografia de simvastatina comprimidos da Farmacopéia Americana

discard. Repeat twice, first with *Dissolution Medium* and then with water. Dry the solid at 100° for 1 hour before use.

Test solution—Transfer a filtered portion of the solution under test to a centrifuge tube containing about 10 mg of *Prewashed manganese dioxide* per mL of transferred solution under test, and mix. Allow the mixture to stand for 30 minutes with occasional shaking, centrifuge, and use a portion of the clear supernatant as the *Test solution*.

Blank—Proceed as directed for *Test solution*, except to use the *Dissolution Medium*.

Procedure—Determine the amount of $C_{25}H_{38}O_5$ dissolved from the difference between the UV absorbances at the wavelengths of maximum and minimum absorbance at about 247 nm and 257 nm, respectively, on filtered portions of the *Test solution*, in comparison with a *Standard solution* having a known concentration of USP Simvastatin RS in the same *Medium* treated in the same way as the solution under test, each solution corrected for the *Blank*.

Tolerances—Not less than 75% (Q) of the labeled amount of $C_{25}H_{38}O_5$ is dissolved in 30 minutes.

Uniformity of dosage units (905): meet the requirements.

Assay—

Diluting solution—Add 3.0 mL of glacial acetic acid to 900 mL of water. Adjust with 5 N sodium hydroxide to a pH of 4.0, and dilute with water to 1000 mL. To 200 mL of this solution, add 800 mL of acetonitrile, and mix.

Buffer solution—Dissolve 3.9 g of monobasic sodium phosphate in 900 mL of water. Adjust, if necessary, with either 50% sodium hydroxide or 85% phosphoric acid to a pH of 4.5, dilute with water to 1000 mL, and mix.

Mobile phase—Prepare a filtered and degassed mixture of acetonitrile and *Buffer solution* (65:35). Make adjustments if necessary (see *System Suitability* under *Chromatography* (621)).

Standard preparation—Dissolve an accurately weighed quantity of USP Simvastatin RS in *Diluting solution*, and dilute quantitatively, and stepwise if necessary, with *Diluting solution* to obtain a solution having a known concentration of about 0.1 mg per mL.

Assay preparation—Transfer 10 Tablets to a 250-mL volumetric flask. Add a small volume of water (not more than 10 mL), and swirl to disintegrate the Tablets. Dilute with *Diluting solution* to volume, sonicate for 15 minutes, and cool to room temperature. If necessary, dilute with *Diluting solution* to volume. Centrifuge a portion of the mixture, and dilute a portion of the clear supernatant with *Diluting solution* to obtain a solution having a concentration of about 0.1 mg of simvastatin per mL.

Chromatographic system (see *Chromatography* (621))—The liquid chromatograph is equipped with a 238-nm detector and a 4.6-mm × 25-cm column containing packing L1 and maintained at a temperature of 45°. The flow rate is about 1.5 mL per minute. Chromatograph the *Standard preparation*, and record the peak responses as directed for *Procedure*: the capacity factor, *k'*, is not less than 3.0; the column efficiency is not less than 4500 theoretical plates; the tailing factor is not more than 2.0; and the relative standard deviation for replicate injections is not more than 2.0%.

Procedure—Separately inject equal volumes (about 10 µL) of the *Standard preparation* and the *Assay preparation* into the chromatograph, record the chromatograms, and measure the areas of the major peaks. Calculate the quantity, in mg, of simvastatin ($C_{25}H_{38}O_5$) in each Tablet taken by the formula:

$$(L/D)C(r_U/r_S)$$

In which *L* is the labeled quantity, in mg, of simvastatin in each Tablet; *D* is the concentration, in mg per mL, of simvastatin in the *Assay preparation*; *C* is the concentration, in mg per mL, of USP Simvastatin RS in the *Standard preparation*;

and *r_U* and *r_S* are the peak areas of simvastatin obtained from the *Assay preparation* and the *Standard preparation*, respectively.

Sisomicin Sulfate



$(C_{19}H_{37}N_5O_7)_2 \cdot 5H_2SO_4$ 1385.45

D-Streptamine, (2*S*-*cis*)-4-O-[3-amino-6-(aminomethyl)-3,4-dihydro-2*H*-pyran-2-yl]-2-deoxy-6-O-[3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-β-L-arabinopyranosyl]-, sulfate (2:5)(salt).
O-3-Deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-β-L-arabinopyranosyl-(1→4)-O-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy-α-D-glycero-hex-4-enopyranosyl-(1→6)]-2-deoxy-L-streptamine sulfate (2:5)(salt) [53179-09-2].

» Sisomicin Sulfate has a potency equivalent to not less than 580 µg of sisomicin ($C_{19}H_{37}N_5O_7$) per mg, calculated on the dried basis.

Packaging and storage—Preserve in tight containers.

USP Reference standards (11)—

USP Sisomicin Sulfate RS

Identification—

A: Prepare a solution containing 10 mg of sisomicin per mL. Apply 5 µL of this solution, 5 µL of a solution of USP Sisomicin Sulfate RS containing 10 mg of sisomicin per mL, and 5 µL of a mixture of the two solutions (1:1) to a suitable thin-layer chromatographic plate (see *Chromatography* (621)) coated with a 0.25-mm layer of chromatographic silica gel mixture. Allow the spots to dry, place the plate in a developing chamber fitted for continuous-flow thin-layer chromatography, and develop the chromatogram in a solvent system consisting of a mixture of methanol, ammonium hydroxide, and chloroform (60:30:25) for 3 hours. Remove the plate from the developing chamber, allow the solvent to evaporate, and heat the plate at 110° for 15 minutes. Spray the plate with a 1 in 100 solution of ninhydrin in butanol to which 1 mL of pyridine has been added: sisomicin appears as a brown spot, and the spots obtained from the test solution and from the mixture of test solution and *Standard solution*, respectively, correspond in distance from the origin to that of the spot from the *Standard solution*.

B: It responds to the tests for *Sulfate* (191).

Specific rotation (781S): between +100° and +110°.

Test solution: 10 mg per mL, in water.

pH (791): between 3.5 and 5.5, in a solution containing 40 mg of sisomicin per mL.

Loss on drying (731)—Dry about 100 mg in vacuum at a pressure not exceeding 5 mm of mercury at 110° for 3 hours: it loses not more than 15.0% of its weight.

Residue on ignition (281): not more than 1.0%, the charred residue being moistened with 2 mL of nitric acid and 5 drops of sulfuric acid.

Assay—Proceed as directed under *Antibiotics—Microbial Assays* (81).

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de umidade por perda por dessecação da Farmacopéia Brasileira

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição 91

O poder rotatório das soluções deve ser determinado dentro de 30 minutos após a preparação. Nos casos nos quais ocorre racemização ou mutarrotação todas as condições devem ser padronizadas desde o tempo de preparo da solução e o de medida no polarímetro.

O poder rotatório e o poder rotatório específico referem-se à substância seca, anidra ou isenta de solvente em todas as monografias em que se fornecem os valores da umidade, perda por dessecação ou conteúdo de solvente.

5.2.9 DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO

Esse ensaio se destina a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia. No caso de ser a água a única substância volátil, basta determinar seu teor segundo um dos métodos descritos em *Determinação de água* (5.2.20).

Para os demais casos, o procedimento adotado é o descrito abaixo, sendo o método a ser adotado especificado nas monografias.

PROCEDIMENTO

Método Gravimétrico

Reduzir a substância a pó fino, caso se apresente na forma de cristais volumosos. Pesar, exatamente, cerca de 1 a 2 g e transferir para pesa-filtro chato previamente dessecado durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Após resfriamento em dessecador, pesar o pesa-filtro, tampado, contendo a amostra. Agitar o pesa-filtro brandamente para distribuir a amostra da maneira mais uniforme possível, a uma altura ideal de 5 mm. Colocar o pesa-filtro na estufa, retirar a tampa, deixando-a também na estufa. Secar a amostra (geralmente a 105 °C) e por um determinado prazo (geralmente 2 horas) especificado na monografia. Esfriar até temperatura ambiente em dessecador. Pesar. Repetir a operação até peso constante.

Observação: No caso de a substância fundir a uma temperatura mais baixa que a especificada para a determinação, manter o pesa-filtro com seu conteúdo por 1 a 2 horas à temperatura de 5 a 10 °C abaixo do ponto de fusão, antes de secá-la à temperatura especificada. Quando a substância se decompõe a temperatura de 105 °C, ela deve ser dessecada em uma temperatura mais baixa. Em ambos os casos, pode-se realizar a secagem à pressão reduzida, em dessecador.

A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação

$$\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

em que

Pa = peso da amostra,

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação,

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

Balança por infravermelho ou utilizando lâmpada halogenada

O procedimento deve ser realizado como a seguir.

- Retirar a umidade do equipamento;
- pesar cerca de 1g da substância a ser analisada e distribuir o material uniformemente no coletor de alumínio contido dentro do aparelho;
- definir o tempo e temperatura de secagem segundo descrito na monografia da respectiva substância. Na maioria das vezes, utiliza-se um (1) minuto a 105 °C.
- acionar o aparelho e anotar o valor da umidade, em percentual, que aparecerá no *display* do aparelho.

Termogravimetria

Proceder conforme descrito em *Análise Térmica* (5.2.27).

5.2.10 DETERMINAÇÃO DE CINZAS SULFATADAS (RESÍDUO POR INCINERAÇÃO)

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico, conforme a técnica especificada. Em geral, o ensaio visa a determinar o teor de constituintes ou impurezas inorgânicas contidos em substâncias orgânicas. Também se destina à determinação de componentes inorgânicos em misturas e da quantidade de impurezas contidas em substâncias inorgânicas termolábeis.

PROCEDIMENTO

Pesar exatamente de 1 a 2 g (ou a quantidade especificada na monografia) de substância pulverizada, transferir para cadinho (como exemplo: platina, porcelana, sílica, quartzo) previamente calcinado, esfriado em dessecador e tarado, e adicionar cerca de 1 mL de ácido sulfúrico. Aquecer brandamente até carbonização em temperatura não superior a 600 °C ± 50 °C. Esfriar e adicionar lentamente cerca de 1 mL de ácido sulfúrico para umedecer o resíduo, carbonizar e incinerar com aquecimento gradativo até 600 °C ± 50 °C. Esfriar, pesar novamente e incinerar por mais 30 minutos. Repita este procedimento até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não seja maior que 0,5 mg. Um equipamento calibrado, por exemplo mufia, deve ser utilizado para o controle da temperatura. Calcular a

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de dureza da Farmacopéia Brasileira

62 Farmacopéia Brasileira, 5ª edição

número 21 com não menos que 2,5 cm de comprimento. Eliminar bolhas eventualmente existentes na agulha e na seringa e transferir o conteúdo da seringa, sem esvaziar a agulha, para proveta seca calibrada de capacidade que não exceda 2,5 vezes o volume a ser medido. Alternativamente, o conteúdo da seringa pode ser transferido para bquer seco tarado, sendo o volume calculado pelo peso do líquido, em gramas, dividido pela sua densidade. Para recipientes com volume declarado de 2 mL ou menos, os conteúdos dos recipientes podem ser reunidos para obter o volume necessário para a medição, devendo-se utilizar seringas e agulhas secas separadas para cada recipiente. O conteúdo de recipientes com volume declarado de 10 mL ou mais pode ser determinado esvaziando-se o conteúdo de cada recipiente diretamente em provetas calibradas ou béqueres tarados.

O volume de cada recipiente examinado não é inferior ao volume declarado. No caso de recipientes com volume declarado de 2 mL ou menos, o volume dos conteúdos reunidos não é inferior à soma dos volumes declarados dos recipientes utilizados no teste.

5

Para injetáveis em recipientes para doses múltiplas rotulados para conter um número específico de doses de um determinado volume, selecionar uma unidade e proceder conforme descrito para injetáveis em recipientes para dose única, utilizando número de seringas e agulhas separadas equivalente ao número de doses especificadas no rótulo. O volume dispensado por cada seringa não é inferior ao volume declarado por dose.

Para injetáveis em cartuchos ou seringas pré-carregadas, testar uma unidade se o volume declarado é igual ou superior a 10 mL, 3 unidades se o volume declarado é superior a 3 mL e inferior a 10 mL ou 5 unidades se o volume declarado é igual ou inferior a 3 mL. Ajustar aos recipientes os acessórios necessários para sua utilização (agulha, êmbolo, corpo de seringa), quando for o caso, e transferir o conteúdo de cada recipiente, sem esvaziar a agulha, para bquer seco tarado, empurrando o êmbolo lenta e regularmente. Calcular o volume, em mililitros, dividindo o peso do líquido, em gramas, pela sua densidade. O volume de cada recipiente não é inferior ao volume declarado.

Para preparações injetáveis de grande volume (infusões parenterais), selecionar duas unidades e transferir o conteúdo de cada recipiente para provetas secas calibradas de capacidade que não exceda 2,5 vezes o volume a ser medido. O volume de cada recipiente não é inferior ao volume declarado.

5.1.3 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA EM COMPRIMIDOS

Os testes de resistência mecânica, tais como dureza e friabilidade, são considerados oficiais dentro do contexto legal desta Farmacopéia, constituindo-se em elementos úteis na avaliação da qualidade integral dos comprimidos. Estes testes visam demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por quedas ou fricção.

5.1.3.1 TESTE DE DUREZA

O teste de dureza permite determinar a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. A dureza de um comprimido é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade. O teste se aplica, principalmente, a comprimidos não revestidos.

O teste consiste em submeter o comprimido à ação de um aparelho que meça a força, aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. A força é medida em newtons (N).

APARELHAGEM

Podem ser utilizados diferentes tipos de aparelhos, os quais diferem basicamente quanto ao mecanismo empregado para exercer a pressão. A força pode ser exercida manualmente ou mecanicamente. À medida que a pressão aumenta, um êmbolo, uma placa ou um pistão aplica determinada força sobre o comprimido, apoiado em base fixa. O aparelho é calibrado com precisão de 1 N.

PROCEDIMENTO

O teste é realizado com 10 comprimidos, eliminando qualquer resíduo superficial antes de cada determinação. Os comprimidos são testados, individualmente, obedecendo sempre à mesma orientação (considerar a forma, presença de ranhura e gravação). Expressar o resultado como a média dos valores obtidos nas determinações. O resultado do teste é informativo.

5.1.3.2 TESTE DE FRIABILIDADE

O teste de friabilidade permite determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica. O teste se aplica, unicamente, a comprimidos não revestidos.

O teste consiste em pesar com exatidão um número determinado de comprimidos, submetê-los à ação do aparelho e retirá-los depois de efetuadas 100 rotações. Após remover qualquer resíduo de pó dos comprimidos, eles são novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o final representa a friabilidade, medida em função da porcentagem de pó perdido.

APARELHAGEM

O aparelho (Figura 1) consiste de um cilindro rotativo, com $287,0 \pm 4,0$ mm de diâmetro e $38,0 \pm 2,0$ mm de profundidade, constituído de polímero sintético transparente com faces internas polidas de baixa atividade estática, o qual gira em torno de seu eixo a uma velocidade de 25 ± 1 rotações por minuto. Uma das faces do cilindro é removível. Os comprimidos são recolhidos a cada volta do cilindro por uma projeção curva com raio interno de $80,5 \pm 5,0$ mm que se estende do centro à parede externa do cilindro, e levados a uma altura de $156,0 \pm 2,0$ mm, de onde caem repetidamente.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira

236 Farmacopéia Brasileira, 5ª edição

sob teste e dose padrão de referência maior. Caso contrário, realizar o teste para substâncias vasodepressoras.

Solução nutritiva (preparar no momento da utilização)

Solução A*	50 mL
Sulfato de atropina	0,5 mg
Bicarbonato de Sódio	1,0 g
Dextrose anidra (para uso parenteral)	0,5 g
Água para injetáveis suficiente para	1000 mL

Solução A

Cloreto de sódio	160,0 g
Cloreto de potássio	4,0 g
Cloreto de cálcio anidro	2,0 g
Cloreto de magnésio anidro	1,0 g
Fosfato de sódio dibásico	0,05 g
Água para injetáveis suficiente para	1000 mL

5.5.2.6 SUBSTÂNCIAS VASODEPRESSORAS

Preparação do padrão de referência

Empregar dicloridrato de histamina, conservando em frasco hermético e opaco, dessecado sobre sílica-gel durante duas horas, antes do uso.

Solução padrão de referência

Dissolver, em água para injetável estéril, quantidade suficiente e exatamente pesada de dicloridrato de histamina para obter solução contendo o equivalente a 1 mg/mL de histamina (base livre). Conservar sob refrigeração em recipiente de vidro âmbar dotado de tampa esmerilhada, ao abrigo da luz, durante um mês. No dia do teste, preparar solução padrão de referência contendo o equivalente a 1 µg/mL de histamina (base livre), em solução fisiológica.

Solução de amostra

Preparar a solução de amostra conforme a especificação da monografia respectiva.

Método sugerido

Realizar o teste usando um gato com peso mínimo de 2 kg (pesar gato adulto e sadio) (no caso de fêmeas, que não estejam prenhes) e anestesiá-lo por meio de injeção de cloralose ou barbitúrico que possibilite a manutenção de pressão arterial uniforme. Imobilizar o animal e protegê-lo para prevenir perda de calor corporal, fazer o monitoramento retal da temperatura para manutenção dos limites fisiológicos.

Dissecar a veia femoral, ou jugular, preparando-a por inserção de cânula repleta de heparina (1000 unidades/mL

de solução fisiológica) para a administração das soluções padrão de referência e amostra.

Expor, cirurgicamente, a artéria carótida, dissecando-a completamente das estruturas circundantes, inclusive o nervo vago. Inserir uma cânula conectando-a diretamente ao manômetro de mercúrio ou outro dispositivo apropriado para o registro contínuo de pressão arterial.

Avaliar a sensibilidade do gato a histamina, injetando em intervalos uniformes de, no mínimo cinco minutos, doses correspondentes a 0,05 µg (dose A); 0,10 µg (dose B) e 0,15 µg (dose C) de histamina (base livre) por quilograma de peso corporal. Após cada administração, lavar imediatamente a cânula por injeção de aproximadamente 0,5 mL de solução fisiológica, para remover atividade residual. Repetir três vezes a administração da dose B a fim de observar a uniformidade de resposta à mesma dose. O animal é considerado apto à realização do teste se as respostas aos três níveis de dosagem forem nitidamente diferenciadas e as respostas à sequência de doses B forem aproximadamente similares, correspondendo a quedas de pressão arterial não inferiores a 2,7 kPa (20 mm de mercúrio).

Injetar duas séries de quatro doses, consistindo cada série de duas injeções da dose especificada na monografia da amostra, intercaladas com a dose B, sempre com intervalo uniforme de, no mínimo, cinco minutos.

Medir a alteração da pressão arterial após cada uma das injeções. Na análise dos resultados, considera-se que a amostra cumpre os requisitos do teste se a média de suas respostas depressoras for inferior àquela da dose B.

Terminar o teste administrando uma dose C do padrão para comprovar que a resposta se mantém superior à dose B: caso isto não ocorra, o teste não é válido.

O animal pode ser usado enquanto permanecer estável e responder, adequadamente, à administração da solução padrão de referência.

5.5.3 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

5.5.3.1 ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUTOS NÃO ESTÉREIS

A contaminação microbiana de um produto pode acarretar alterações em suas propriedades físicas e químicas e ainda caracteriza risco de infecção para o usuário. Assim, produtos farmacêuticos de uso oral e tópico (cápsulas, comprimidos, suspensões, cremes, adesivos, etc.) que não têm como requerimento serem estéreis devem estar sujeitos ao controle de contaminação microbiana.

A garantia da qualidade e o controle de fabricação previstos nas boas práticas devem garantir que o produto cumpra as especificações determinadas, isto é, que atendam além

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição 237

de outros parâmetros, aos limites aceitáveis para micro-organismos.

Para a realização do teste devem ser considerados os limites microbianos, o tipo de contaminação mais provável nas diferentes categorias de produtos e a via de administração.

A natureza e a frequência do teste variam de acordo com o produto. Certas categorias devem ser testadas rotineiramente quanto à contaminação total microbiana, tais como: produtos de origem vegetal, mineral e/ou animal assim como produtos com elevado teor de água (soluções orais aquosas, cremes, etc). Para as demais categorias como comprimidos, pós, cápsulas, produtos líquidos não aquosos, pomadas e supositórios, a frequência do teste pode ser estabelecida com base em dados históricos dos testes de monitoramento microbiológico tanto o ambiental quanto o de equipamentos. Outros critérios a serem considerados seriam a carga microbiana da matéria-prima, o processo de fabricação, a formulação do produto e os resultados de determinação da atividade de água, quando aplicável. Resultados de baixa atividade de água (igual ou inferior a 0,75 medidos à 25 °C), assim como baixo ou alto pH, ausência de nutrientes e adição de conservantes ajudam a prevenir a contaminação microbiana.

5.5.3.1.1 Condições gerais

Para os ensaios microbiológicos em produtos não estéreis, deve-se utilizar técnicas assépticas na amostragem e na execução do teste. O teste deve ser realizado, preferencialmente, em capela de fluxo laminar e empregar, quando possível, a técnica de filtração por membrana.

Se a amostra possuir atividade antimicrobiana, essa deve ser convenientemente removida ou neutralizada.

A eficácia e a ausência de toxicidade do agente inativante para os micro-organismos considerados deve ser demonstrada. Se usar substâncias tensoativas na preparação da amostra, também, deve ser demonstrada a ausência de toxicidade para os micro-organismos e compatibilidade com o agente inativante, conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2).

SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

As soluções e os meios de culturas descritos são considerados satisfatórios para realizar os ensaios limite de contaminação microbiana prescritos. No entanto, podem ser utilizados outros meios que possuam propriedades nutritivas e seletivas similares para as espécies microbianas pesquisadas.

Solução Tampão cloreto de sódio-peptona, pH 7,0

Fosfato de potássio monobásico	3,6 g
Fosfato dissódico diidratado	7,2 g
Cloreto de sódio	4,3 g
Peptona (carne ou caseína)	1,0 g
Água purificada	1000 mL

Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Tampão Fosfato pH 7,2 – Solução estoque

Fosfato de potássio monobásico	34,0 g
Hidróxido de sódio 4% Adicionar aproximadamente	175 mL
Água purificada	1000 mL

Dissolver o fosfato de potássio monobásico em 500 mL de água, acertar o pH para 7,2 \pm 0,2 com hidróxido de sódio 4%. Completar o volume com água, esterilizar e conservar sob refrigeração. Quando da utilização diluir a solução estoque com água na proporção de 1 para 800 (v/v) e esterilizar.

Fluido de lavagem

Peptona de carne digestão péptica	1,0 g
Polissorbato 80	1,0 g (se necessário)
Água	1000 mL

Pesar e dissolver o ingrediente na água destilada agitando constantemente. Aquecer se necessário. Ajustar o pH de forma que seja 7,1 \pm 0,2. Esterilização em autoclave usando ciclo validado.

Diluyente Universal

Fosfato de potássio monobásico	3,6 g
Fosfato dissódico Diidratado	7,2 g
Cloreto de sódio	4,3 g
Peptona de carne ou de caseína	1,0 g
Lecitina de gema de ovo	3,0 g
L-histidina	1,0 g
Polissorbato 80	30,0 g
Água purificada	1000 mL

Pesar e dissolver os ingredientes na água destilada agitando constantemente. Aquecer se necessário. Ajustar o pH de forma que seja 6,8 \pm 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

238 Farmacopéia Brasileira, 5ª edição

Caldo neutralizante DEY-ENGLEY

Caseína enzimática hidrolisada	5,0 g
Púrpura Bromocresol	20,0 mg
Extrato de Levedura	2,50 g
Tiosulfato de Sódio	6,00 g
Tioglicolato de Sódio	1,0 g
Bissulfito de sódio	2,50 g
Polissorbato 80	5,00 g
Dextrose	10,0 g
Lecitina	7,0 g
Água	1000 mL

Pesar e dissolver os ingredientes na água destilada agitando constantemente. Aquecer se necessário. Ajustar o pH de forma que seja $7,6 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Caldo Caseína-soja

Peptona de Caseína pancreática	17,0 g
Farinha de soja obtida por digestão papáinica	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Glicose monoidratada	2,5 g
Água purificada	1000 mL

pH $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar Caseína-soja

Peptona de caseína pancreática	15,0 g
Farinha de soja obtida por digestão papáinica	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	15,0 g
Água purificada	1000 mL

pH $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar Violeta Vermelho Neutro Glicose

Extrato de levedura	3,0 g
Peptona de gelatina pancreática	7,0 g
Sais Biliares	1,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Glicose monoidratada	10,0 g
Agar	15,0 g
Vermelho neutro	30,0 mg
Cristal violeta	2,0 mg
Água purificada	1000 mL

pH $7,4 \pm 0,2$. Aquecer até ebulição. Não esterilizar em autoclave.

Caldo de Enriquecimento para Enterobactérias Mossel

Hidrolisado de pancreático de gelatina	10,0 g
Glicose monoidratada	5,0 g
Bile de boi desidratada	20,0 g
Fosfato de potássico monobásico	2,0 g
Fosfato dissódico didratado	8,0 g
Verde brilhante	15,0 mg
Água purificada	1000 mL

pH $7,2 \pm 0,2$. Aquecer a 100°C durante 30 minutos. Esfriar imediatamente.

Caldo MacConkey

Hidrolisado de pancreático de gelatina	20,0 g
Lactose monoidratada	10,0 g
Bile de boi desidratada	5,0 g
Púrpura de bromocresol	10,0 mg
Água purificada	1000 mL

pH $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar MacConkey

Hidrolisado de pancreático de gelatina	17,0 g
Peptona (carne ou caseína)	3,0 g
Lactose monoidratada	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Bile de boi desidratada	1,5 g
Vermelho neutro	30,0 mg
Cristal violeta	1,0 mg
Agar	13,5 g
Água purificada	1000 mL

pH $7,1 \pm 0,2$. Ferver 1 minuto com constante agitação. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar Xilose, Lisina, Desoxicolato

Xilose	3,5 g
L-Lisina	5,0 g
Lactose monoidratada	7,5 g
Sacarose	7,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Vermelho fenol	80,0 mg
Agar	13,5 g

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição 239

Desoxicolato de sódio	2,5 g	Agar	15,0 g
Citrato de amônio férrico	0,8 g	Água purificada	1000 mL
Tiosulfato de sódio	6,8 g	Suspender 39 g em 1000 mL de água. pH 5,6 ± 0,2.	
Água purificada	1000 mL	Esterilizar em autoclave usando ciclo validado. Se pretende	
Ajustar de forma que após aquecimento seja pH 7,4 ± 0,2.		pH 3,5, adicionar aproximadamente 14 mL de solução	
Aquecer até a ebulição. Não esterilizar em autoclave.		estéril de ácido tartárico 10% (p/v) ao meio arrefecido a	
		45-50 °C.	

Caldo Enriquecimento Salmonella Rappaport Vassiliadis

Peptona de soja	4,5 g
Cloreto de magnésio hexaidratado	29,0 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Fosfato de potássio dibásico	0,4 g
Fosfato de potássio monobásico	0,6 g
Verde malaquita	36,0 mg
Água purificada	1000 mL

pH 5,2 ± 0,2. Esterilizar em autoclave em temperatura que não exceda a 115 °C.

Ágar Cetrimida

Hidrolisado de pancreático de gelatina	20,0 g
Cloreto de magnésio	1,4 g
Sulfato dipotássico	10,0 g
Cetrimida	0,3 g
Agar	13,6 g
Água purificada	1000 mL
Glicerol	10,0 mL

Ferver 1 minuto com constante agitação. Ajustar o pH de forma que seja 7,2 ± 0,2. Esterilização em autoclave usando ciclo validado.

Ágar Sal Manitol

Hidrolisado de pancreático de caseína	5,0 g
Peptona péptica de tecido animal	5,0 g
Extrato de carne	1,0 g
D-manitol	10,0 g
Cloreto de sódio	75,0 g
Agar	15,0 g
Vermelho fenol	25,0 mg
Água purificada	1000 mL

Ferver 1 minuto com constante agitação. Ajustar o pH de forma que seja 7,4 ± 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar Batata-dextrose

Infusão de batata	200,0 g
Dextrose	20,0 g

Ágar Sabouraud-dextrose 4%

Dextrose	40,0 g
Peptonas	10,0 g
Agar	15,0 g
Água purificada	1000 mL
pH 5,6 ± 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo	
validado.	

Caldo Sabouraud-dextrose

Dextrose	20,0 g
Peptonas	10,0 g
Água purificada	1000 mL
pH 5,6 ± 0,2. Esterilizar em autoclave usando ciclo	
validado.	

Ágar Seletivo para Candida segundo Nickerson

Extrato de levedura	1,0 g
Peptona farinha de soja	2,0 g
Glicina	10,0 g
Glicose	10,0 g
Indicador bismuto-sulfito	2,0 g
Agar	15,0 g
Água purificada	1000 mL
Dissolver 40 g em 1000 mL de água. pH 6,5 ± 0,2.	
Esterilizar sob vapor fluyente.	

Meio Reforçado para Clostridium

Extrato de carne	10,0 g
Peptona	10,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Amido solúvel	1,0 g
Glicose monoidratado	5,0 g
Cloridrato de cisteína	0,5 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Acetato de sódio	3,0 g
Agar	0,5 g
Água purificada	1000 mL
Deixar intumescer o Agar e dissolver aquecendo à ebulição,	
agitando constantemente. Se necessário ajustar o pH de	

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

240 Farmacopéia Brasileira, 5ª edição

forma que seja $6,8 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado.

Ágar Columbia

Hidrolisado de pancreático de caseína	10,0 g
Peptona de carne digestão	5,0 g
Digesto pancreático de coração	3,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Amido de milho	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar, de acordo com o poder gelificante	10,0 - 15,0 g
Água purificada	1000 mL

Deixar intumescer o ágar e dissolver aquecendo até ebulição, agitando constantemente. Se necessário ajustar o pH de forma que seja $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar em autoclave usando ciclo validado. Esfriar para 45 a 50 °C e adicionar, se necessário, sulfato de gentamicina correspondente a 20 mg de gentamicina base, verter em placas de Petri.

5

5.5.3.1.2 Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos

Com esse teste é possível determinar o número total de bactérias mesófilas e fungos em produtos e matérias-primas não estéreis e é aplicado para determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas farmacopeicas. Quando usado para esse propósito, deve-se seguir as indicações dadas, incluindo o número de amostras tomadas e interpretação dos resultados. O teste não é aplicado para produtos que contêm micro-organismos viáveis como ingrediente ativo.

Esse teste consiste na contagem da população de micro-organismos que apresentam crescimento visível, em até 5 dias, em Ágar caseína-soja a $32,5$ °C \pm $2,5$ °C e em até 7 dias, em Ágar Sabouraud-dextrose a $22,5$ °C \pm $2,5$ °C.

Métodos microbiológicos alternativos, inclusive os automatizados, podem ser utilizados desde que sua equivalência com o método farmacopeico tenha sido devidamente validada.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Produtos hidrossolúveis

Transferir 10 g ou 10 mL da mistura de amostra para 90 mL de solução tampão cloreto de sódio-peptona - pH 7,0 ou solução tampão fosfato - pH 7,2, Caldo Caseína-soja ou outro diluente adequado. Se necessário, ajustar o pH para 6,0 a 8,0 com solução HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente.

Produtos de natureza não lipídica insolúveis em água

Preparar uma suspensão de 10 g ou 10 mL da mistura de amostra em solução tampão cloreto de sódio-peptona,

pH 7,0 ou caldo de caseína-soja ou um outro diluente adequado. Em geral, a proporção de diluente e amostra é de 10:1, mas as características do produto podem exigir que seja alterada essa relação. Pode ser adicionado agente tensoativo como polissorbato 80, na concentração de 1 g/L, para facilitar a dispersão. Se necessário, ajustar o pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente.

Produtos de natureza lipídica

Método de filtração por membrana - Dissolver 1 g ou 1 mL da mistura de amostra em 100 mL de miristato de isopropila esterilizado por filtração em membrana (e seu extrato aquoso deve apresentar pH não inferior a 6,5) e aquecido a 40 - 45 °C. Pode ser utilizado polissorbato 80 estéril ou outro agente tensoativo não inibitório;

Método de contagem em placa - Transferir 10 g ou 10 mL da mistura de amostra para frasco contendo não mais que 5 g de polissorbato 20 ou 80 estéril ou outro agente tensoativo não inibitório. Aquecer se necessário, a uma temperatura entre 40 - 45 °C.

Homogeneizar, cuidadosamente, mantendo, se necessário, a temperatura 40 - 45 °C. Adicionar diluente adequado dentre os apresentados em 5.5.3.1.1 - Soluções e Meios de Cultura, previamente aquecido, na quantidade necessária para obter uma diluição a 1:10 do produto inicial.

Misturar, cuidadosamente, mantendo a temperatura máxima de 40 - 45 °C durante o tempo necessário para a formação de uma emulsão, em qualquer caso não mais que 30 minutos. Se necessário, ajustar o pH para 6,5 - 7,5. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente acrescido de polissorbato 20 ou 80.

Crems e pomadas insolúveis em miristato de isopropila

Transferir 10 g da mistura de amostra para obter uma diluição a 1:10 em caldo caseína-soja contendo 0,1 de tetradecilsulfato de sódio, aquecido a 40 - 45 °C. Agitar até mistura homogênea.

Misturar, cuidadosamente, mantendo sempre a temperatura durante o tempo mínimo necessário para a formação de uma emulsão, em qualquer caso não mais que 30 minutos. Se necessário, ajustar o pH para 6,5 - 7,5. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente acrescido de 0,1% de tetradecilsulfato de sódio.

Aerossóis

Resfriar pelo menos 10 recipientes do produto em mistura de álcool e gelo seco durante uma hora. Abrir os recipientes e deixá-los à temperatura ambiente para que o propelente seja eliminado. Retirar 10 g ou 10 mL dos recipientes e transferir o produto para equipamento de filtração ou para frasco contendo solução tampão fosfato pH 7,2 ou outro diluente adequado para obter diluição 1:10. Se necessário, ajustar o pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição 241

Cápsulas vazias

Transferir 10 g de cápsulas vazias para 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 aquecido a 40 - 45 °C e agitar no máximo durante 30 minutos. Completar o volume para 100 mL (diluição 5:10). Se necessário, ajustar o pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente.

Gelatinas

Transferir 10 g da mistura de amostra para frasco contendo água estéril aquecida a 40 - 45 °C e deixar em repouso durante uma hora (diluição 1:10). Em seguida transferir o frasco para banho-maria a 45 °C, agitando vigorosamente a intervalos frequentes. Se necessário, ajustar o pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluições decimais sucessivas em água estéril.

Dispositivo transdérmico

Com pinças estéreis, retirar a película protetora de 10 dispositivos transdérmicos e colocá-los com a face adesiva para cima, em placas estéreis e cobrir a face adesiva com gaze esterilizada. Transferir os 10 dispositivos para 500 mL, no mínimo, de solução tampão cloreto de sódio-peptona - pH 7,0 contendo agente inativante apropriado como polissorbatato 80 ou lecitina de soja. Agitar vigorosamente durante no máximo de 30 minutos.

Correlatos

Algodão e gaze – transferir três porções de 3,3 g das partes mais internas das amostras para solução tampão cloreto de sódio-peptona - pH 7,0 contendo agente inativante apropriado. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente.

Outros correlatos – transferir 10 unidades cuja forma e dimensão permita sua fragmentação ou imersão total em não mais que 1000 mL de solução tampão cloreto de sódio-peptona - pH 7,0 ou outro diluente adequado. Deixar em contato entre 10 - 30 minutos. Preparar diluições decimais sucessivas com o mesmo diluente. Para aqueles que não podem ser fragmentados ou imersos, introduzir assepticamente, no recipiente 100 mL de solução tampão cloreto de sódio-peptona - pH 7,0. Agitar. Utilizar método de filtração por membrana de 0,45 µm.

O método para preparação depende das características físicas do produto a ser testado. Se nenhum dos procedimentos descritos demonstrarem satisfatório, desenvolver um procedimento adequado.¹

¹ Alguns produtos podem requerer um aquecimento maior na preparação da amostra, mas esta não deve ultrapassar 48 °C.

ANÁLISE DO PRODUTO

Quantidade de amostra

Salvo indicação em contrário, utilizar mistura de amostras contendo 10 g ou 10 mL do produto a examinar. Tomar 10 unidades para aerossol – forma líquida ou sólida e para dispositivos transdérmicos.

A quantidade a ser testada poderá ser reduzida no caso de substâncias ativas que são formuladas nas seguintes condições: a quantidade por dose unitária (exemplo: comprimido, cápsula) é menor ou igual a 1 mg. Nesse caso, a quantidade de amostra a ser testada não deve ser menor que a quantidade presente em 10 doses unitárias.

Para produtos em que o tamanho do lote é extremamente pequeno (isso é, menor que 1000 mL ou 1000 g), a quantidade a ser testada deve ser 1% do lote ou menor quando justificado ou autorizado.

Para produtos onde o número total de unidades no lote é menor que 200, usar duas unidades ou uma unidade se o lote for menor ou igual a 100 unidades.

Na amostragem de produtos em processamento, coletar 3 amostras do início, 4 do meio e 3 do fim do processo. Executar o teste na mistura dessas amostras.

PROCEDIMENTOS

A determinação pode ser efetuada pelo Método de filtração por membrana, Método em placa ou Método dos Tubos Múltiplos (MNP). Esse último é reservado para as determinações bacterianas que não possam ser realizadas por um dos outros métodos e quando se espera que o produto apresente baixa densidade bacteriana.

A escolha do método é determinada por fatores tais como a natureza do produto e o número esperado de micro-organismos. Qualquer método escolhido deve ser devidamente validado.

Filtração por membrana

Utilizar equipamento de filtração que possibilite a transferência da membrana para os meios de cultura. As membranas de nitrato de celulose, por exemplo, podem ser utilizadas para soluções aquosas, oleosas ou fracamente alcoólicas e as membranas de acetato de celulose para soluções fortemente alcoólicas. Preparar a amostra usando método mais adequado previamente determinado.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

242 Farmacopeia Brasileira, 5ª edição

Transferir 10 mL, ou a quantidade de diluição que represente 1 g ou 1 mL da amostra a ser testada, para duas membranas e filtrar imediatamente. Se necessário, diluir a amostra de forma a obter contagem de colônias entre 10 e 100 UFC. Lavar as membranas pelo menos três vezes com aproximadamente 100 mL do fluido de lavagem adequado. Transferir uma das membranas para a superfície de uma placa contendo ágar caseína-soja, incubar a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3-5 dias, para determinação do número de micro-organismos aeróbicos totais. Transferir a outra membrana para a superfície de uma placa contendo ágar Sabouraud-dextrose e incubar a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5-7 dias, para a determinação de bolores e leveduras.

Calcular o número de UFC por grama ou mililitro do produto.

Quando analisar dispositivos transdérmicos e produtos médicos, filtrar, separadamente, 10% do volume da preparação, conforme procedimento de adequação do produto, e proceder à lavagem e incubação conforme descrito anteriormente.

5

Contagem em placa

Método de profundidade - Adicionar 1 mL da amostra preparada como descrito em *Preparação das amostras*, em placa de Petri e verter, separadamente, 15 - 20 mL de ágar caseína soja e, ágar Sabouraud-dextrose mantidos a 45 - 50 °C. Utilizar duas placas para cada meio e diluição. Incubar as placas contendo ágar caseína-soja a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 - 5 dias e as placas contendo ágar Sabouraud-dextrose a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5-7 dias para determinação do número de micro-organismos aeróbicos totais e bolores e leveduras, respectivamente. Somente as placas que apresentarem número de colônias inferior a 250 (bactérias) e 50 (bolores e leveduras) por placa deverão ser consideradas para o registro dos resultados. Tomar a média aritmética das placas de cada meio e calcular o número de UFC por grama ou mL do produto.

Método de superfície - adicionar em placas de Petri, separadamente, 15 - 20 mL de ágar caseína soja e ágar Sabouraud-dextrose e deixar solidificar. Secar as placas. Adicionar à superfície de cada meio de cultura, 0,1 mL da amostra preparada como descrito em *Preparação das amostras*. Incubar as placas contendo ágar caseína-soja a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3-5 dias e as placas contendo ágar Sabouraud-dextrose a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5 - 7 dias para determinação do número de micro-organismos aeróbicos totais e bolores e leveduras, respectivamente. Tomar a média aritmética das placas de cada meio e calcular o número de UFC por grama ou mL do produto.

Exemplo de cálculo:

Diluição	Colônias por placas	UFC/g, ou mL
1:100	293	2,93 x 10 ⁴
1:100	100	1,00 x 10 ⁴
1:1000	41	4,10 x 10 ⁴
1:1000	12	1,20 x 10 ⁴

$$\text{Média} = \frac{(2,93 + 1,00 + 4,10 + 1,20)}{4} \times 10^4 = 2,30 \times 10^4$$

Número Mais Provável

Preparar a amostra conforme procedimentos de adequação do produto. Preparar diluições 1:10; 1:100; 1:1000. Transferir 1 mL de cada uma das diluições, para 3 tubos, contendo cada um, 9 mL de caldo caseína-soja. Incubar todos os tubos a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 - 5 dias. Anotar o número de tubos positivos e o número de tubos negativos.

Se a natureza da amostra tornar a leitura difícil, como, por exemplo, uma suspensão, efetuar subcultura para o mesmo caldo ou para ágar caseína-soja por 2 dias na mesma temperatura.

Determinar o número mais provável de micro-organismos viáveis por grama ou mililitro do produto, de acordo com as informações descritas na **Tabela 1**.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição 243

Tabela 1 – Valor do Número Mais Provável de Micro-organismos - NMP.

Número de tubos positivos			NMP por g, ou mL do produto	Limite de confiança a 95%
Número de g, ou mL do produto por tubo				
10^{-1} (0,1)	10^{-2} (0,01)	10^{-3} (0,001)		
0	0	0	<3	0,0 – 9,4
0	0	1	3	0,1 – 9,5
0	1	0	3	0,1 – 10
0	1	1	6,1	1,2 – 17
0	2	0	6,2	1,2 – 17
0	3	0	9,4	3,5 – 35
1	0	0	3,6	0,2 – 17
1	0	1	7,2	1,2 – 17
1	0	2	11	04 – 35
1	1	0	7,4	1,3 – 20
1	1	1	11	04 – 35
1	2	0	11	04 – 35
1	2	1	15	05 – 38
1	3	0	16	05 – 38
2	0	0	9,2	1,5 – 35
2	0	1	14	04 – 35
2	0	2	20	05 – 38
2	1	0	15	04 – 38
2	1	1	20	05 – 38
2	1	2	27	09 – 94
2	2	0	21	05 – 40
2	2	1	28	09 – 94
2	2	2	35	09 – 94
2	3	0	29	09 – 94
2	3	1	36	09 – 94
3	0	0	23	05 – 94
3	0	1	38	09 – 104
3	0	2	64	16 – 181
3	1	0	43	09 – 181
3	1	1	75	17 – 199
3	1	2	120	30 – 360
3	1	3	160	30 – 380
3	2	0	93	18 – 360
3	2	1	150	30 – 380
3	2	2	210	30 – 400
3	2	3	290	90 – 990
3	3	0	240	40 – 990
3	3	1	460	90 – 1980
3	3	2	1100	200 – 4000
3	3	3	>1100	

5.5.3.1.3 Pesquisa de micro-organismos patogênicos

Esse método possibilita verificar a presença ou a ausência de micro-organismos específicos em meios seletivos. Os procedimentos experimentais devem incluir etapas de pré-enriquecimento para garantir a recuperação dos micro-organismos, se presentes no produto.

Métodos microbiológicos alternativos, inclusive os automatizados, podem ser utilizados desde que sua

equivalência ao método farmacopeico tenha sido devidamente validada.

PROCEDIMENTO

Bactérias gram-negativas bile tolerantes

Preparo da amostra e pré-incubação - Preparar a amostra usando a diluição 1:10 de não menos que 1 g ou 1 mL do produto a ser testado, conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2),

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

244 Farmacopéia Brasileira, 5ª edição

usando caldo caseína-soja (Diluição A) como diluente. Homogeneizar e incubar a $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas e não mais que 5 horas (tempo necessário para reativar a bactéria, mas não o suficiente para estimular a multiplicação do micro-organismo).

Teste de ausência - Homogeneizar a Diluição A e transferir volume correspondente a 1 g ou 1 mL do produto para o Caldo de Enriquecimento de Enterobactérias segundo Mossel (*Aeromonas* e *Pseudomonas* também podem crescer neste meio, bem como outros tipos de bactérias). Incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 horas. Preparar subcultura em placas contendo Ágar Violeta Vermelho Neutro Bile Glicose. Incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas. O produto cumpre o teste se não houver crescimento de colônias.

Teste quantitativo (seleção e subcultura) - Diluir quantidade apropriada da Diluição A para o Caldo de Enriquecimento de Enterobactérias segundo Mossel, de modo a obter diluições contendo 0,1; 0,01 e 0,001 g (ou 0,1; 0,01 e 0,001 mL) do produto a ser testado. Incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas. Para cada tubo positivo, realizar subculturas em Ágar Violeta Vermelho Neutro Bile Glicose. Incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

Interpretação - O crescimento de colônias bem desenvolvidas de bactérias Gram-negativas, geralmente vermelhas ou avermelhadas, indica contaminação (resultado positivo). Anotar os resultados positivos e negativos. Determinar o número mais provável de bactérias por grama ou mililitro do produto segundo Tabela 1.

Tabela 1 - Interpretação dos resultados do teste quantitativo para bactérias gram-negativas bile tolerantes.

Resultados para quantidade de produto de			Número provável de bactérias por grama, ou mililitro do produto
0,1 g, ou 0,1 mL	0,01 g, ou 0,01 mL	0,001 g, ou 0,001 mL	
+	+	+	Mais de 10^3
+	+	-	Menos de 10^3 e mais de 10^2
+	-	-	Menos de 10^2 e mais de 10
-	-	-	Menos de 10

Escherichia coli

Preparo da amostra e pré-incubação - Preparar a amostra usando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinado conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2).

Utilizar 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo de Enriquecimento (Caldo Caseína-soja), ou quantidade correspondente a 1 g ou 1 mL. Homogeneizar e incubar $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

Seleção e subcultura - Agitar e transferir 1 mL da amostra enriquecida para 100 mL de Caldo MacConkey. Incubar a $43\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 – 48 horas. Realizar subcultura

em placa de Ágar MacConkey e incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 72 horas.

Interpretação - O crescimento de colônias vermelhas, geralmente não mucosas, com micromorfologia característica de bacilo Gram-negativo, indica presença provável de *E.coli* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de tais colônias ou se as provas microbianas forem negativas.

Salmonella

Preparação da amostra e pré-incubação - Preparar a amostra usando a diluição 1:10 de não menos que 10 g, ou 10 mL do produto a ser examinado, conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2). Homogeneizar e incubar $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

Seleção e subcultura - Agitar e transferir 0,1 mL do conteúdo para 10 mL de Caldo Enriquecimento Salmonella Rappaport Vassiliadis. Incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas. Realizar subcultura em placa contendo Ágar Xilose Lisina Desoxicolato e incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 48 horas.

Interpretação - O crescimento de colônias bem desenvolvidas, vermelhas com ou sem centro negro indica presença provável de *Salmonella* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de tais colônias ou se as provas microbianas forem negativas.

Pseudomonas aeruginosa

Preparação da amostra e pré-incubação - Preparar a amostra usando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinado, conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2). Utilizar 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo de Caseína-soja ou quantidade correspondente a 1 g ou 1 mL. Homogeneizar e incubar $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

Quando testar o dispositivo transdérmico, filtrar 50 mL de Caldo Caseína-soja por membrana estéril e transferir a membrana para 100 mL de Caldo Caseína-soja. Incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24 horas.

Seleção e subcultura - Agitar e transferir uma alça para placa contendo Ágar Cetrimida. Incubar a $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 – 72 horas. O crescimento de colônias indica presença provável de *Pseudomonas aeruginosa* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de tais colônias ou se as provas de identificação forem negativas.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

Staphylococcus aureus

Preparação da amostra e pré-incubação - Preparar a amostra usando a diluição 1:10 de não menos que 1 g do produto a ser examinada conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2). Utilizar 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo de Enriquecimento (Caldo Caseína-soja) ou quantidade correspondente a 1 g ou 1 mL. Homogeneizar e incubar a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas.

Quando testar o dispositivo transdérmico, filtrar 50 mL de Caldo de Enriquecimento por membrana estéril e transferir a membrana para 100 mL de Caldo Caseína-soja. Incubar a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas.

Seleção e subcultura - Agitar e transferir uma alça para placa contendo Agar Sal Manitol. Incubar a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 – 72 horas.

Interpretação - O crescimento de colônias amarelas ou brancas rodeada por uma zona amarela indica presença provável de *S. aureus* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana.

O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de tais colônias ou se as provas de identificação foram negativas.

Clostridium

Preparação da amostra e pré-incubação - Preparar a amostra conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2). Utilizar duas frações iguais correspondentes a não menos que 1 g ou mL do produto a ser examinado. Aquecer uma das porções a 80 °C durante 10 minutos e esfriar imediatamente. Inocular 10 mL de cada fração homogeneizada em 2 frascos contendo 100 mL de meio Caldo Reforçado para *Clostridium*. Incubar em anaerobiose a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 48 horas.

Seleção e subcultura - Transferir uma alça de cada frasco para placa contendo Agar Columbia. Incubar em anaerobiose a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 48 horas.

Interpretação - O crescimento de colônias catalase-negativas, com micromorfologia de bacilo Gram-positivo (com ou sem endósporos) indica presença provável de *Clostridium*. O produto cumpre o teste se não for observado crescimento de micro-organismo anaeróbico ou se o teste de catalase for negativo.

Candida albicans

Preparação da amostra e pré-incubação - Preparar a amostra usando a diluição 1:10 de não menos que 1 g, ou mL do produto a ser examinada conforme descrito em *Contagem do número total de micro-organismos mesofílicos* (5.5.3.1.2). Utilizar 10 mL da diluição para 90 mL de Caldo Sabouraud Dextrose. Incubar a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 a 5 dias.

Seleção e subcultura - Transferir uma alça para placa contendo Agar Sabouraud Dextrose ou Agar Nickerson. Incubar a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 24 – 48 horas.

Interpretação - O crescimento de colônias brancas em Agar Sabouraud ou colônias marrom/preta em Agar Nickerson indica presença provável de *C. albicans* que deve ser confirmada por testes de identificação microbiana. O produto cumpre o teste se não for observado o crescimento das colônias.

5.5.3.1.4 Adequação dos métodos farmacopeicos

Para adequação dos métodos farmacopeicos aos produtos não estéreis deve ser demonstrada a eliminação de qualquer propriedade antimicrobiana antes da verificação da existência de contaminação microbiana nos produtos.

O protocolo do teste de adequação deve mimetizar o teste de limite microbiano – preparação da amostra, tipo de meio de cultura e soluções tampão, número e tipo da solução de lavagens das membranas bem como as condições de incubação. Esse protocolo requer o uso de micro-organismos para o teste de recuperação microbiana.

Durante a adequação, demonstrar que a escolha do método para estimativa qualitativa e/ou quantitativa dos micro-organismos viáveis é sensível, exato e confiável e que é capaz eliminar qualquer interferência ou inibição durante a recuperação dos micro-organismos viáveis.

Revalidar o método de adequação se forem modificadas as condições de ensaio e/ou ocorrerem alterações no produto que possam afetá-lo.

Com a finalidade de indicação, foram listados os micro-organismos disponíveis na ATCC. Os mesmos micro-organismos podem, também, ser obtidos de outras fontes: INCQS, CIP, NBRC, NCIMB, NCPF, NCTC, NCYC, DMI e IP. A correspondência entre os micro-organismos e os endereços das entidades que os fornecem encontra-se indicada em *Micro-organismos empregados em testes e ensaios* (5.5.3.5).

CONTAGEM DO NÚMERO TOTAL DE MICRO-ORGANISMOS MESOFÍLICOS

Manutenção e preparação dos micro-organismos teste

As culturas liofilizadas devem ser reidratadas de acordo com as instruções de fornecedores e mantidas por transferências para meios de cultura recém preparados ou por processo de congelamento ou de refrigeração por período de estocagem que mantenha as características originais da cultura.

Usar suspensões padronizadas dos micro-organismos conforme estabelecido a seguir. Utilizar técnica de manutenção de forma que o inóculo não ultrapasse 5 passagens da cultura original. Realizar subculturas de cada micro-organismo (bactéria e fungo) separadamente como descrito na **Tabela 1**.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

246 Farmacopéia Brasileira, 5ª edição

Tabela 1- Preparação e uso dos micro-organismos.

Micro-organismo	Meios de cultura para manutenção	Meios de cultura para enriquecimento		Meios de cultura para adequação do método de contagem na presença do produto	
		Contagem total de bactérias aeróbicas	Contagem total de bolores e leveduras	Contagem Total de bactérias aeróbicas	Contagem total de bolores e leveduras
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	Agar Caseína-soja ou Caldo de Caseína-soja 32,5 °C ± 2,5 °C, 18-24 horas	Agar Caseína-soja e Caldo de Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 dias	-	Agar Caseína-soja /MNP Caldo de Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 dias	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Agar Caseína-soja ou Caldo de Caseína-soja 32,5 °C ± 2,5 °C, 18-24 horas	Ágar Caseína-soja e Caldo de Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 dias	-	Agar Caseína-soja /MNP Caldo de Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 dias	-
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	Agar Caseína-soja ou Caldo de Caseína-soja 32,5 °C ± 2,5 °C, 18-24 horas	Ágar Caseína-soja e Caldo de Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 dias	-	Ágar Caseína-soja /MNP Caldo de Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 dias	-
<i>Cândida albicans</i> (ATCC 10231)	Ágar Sabouraud-dextrose ou Caldo Sabouraud 22,5 °C ± 2,5 °C 2-3 dias	Ágar Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias	Ágar Sabouraud-dextrose ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias	Ágar Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias NMP: não se aplica	Ágar Sabouraud-dextrose ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	Ágar Sabouraud-dextrose ou Ágar Batata-dextrose 22,5 °C ± 2,5 °C 5-7 dias, ou até esporulação evidente	Ágar Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias	Ágar Sabouraud-dextrose ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias	Ágar Caseína-soja ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias NMP: não se aplica	Agar Sabouraud-dextrose ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 dias

Usar solução tampão cloreto de sódio-peptona pH - 7,0 ou solução tampão fosfato pH 7,2 para preparar as suspensões. Ao preparar a suspensão de esporos de *A. brasiliensis*, adicionar à solução tampão 0,05% de polissorbato 80. Usar as suspensões dentro de 2 horas ou dentro de 24 horas se mantidas à temperatura de 2- 8 °C. Tempos maiores poderão ser utilizados desde que validados.

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

250 Farmacopéia Brasileira, 5ª edição

Tabela 3 – Promoção do crescimento, propriedades inibitórias e indicativas do meio de cultura.

Meio de cultura	Propriedade	Micro-organismo teste
Bactéria Gram-negativa bile tolerante		
Caldo de Enriquecimento de Enterobacterias segundo Mossel	Promoção de crescimento	<i>Escherichia coli</i>
Ágar Bile, Violeta, Vermelho e Glicose	Inibitória	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Crescimento presuntivo	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
<i>Escherichia coli</i>		
Caldo MacConkey	Promoção de crescimento	<i>E. coli</i>
Agar MacConkey	Inibitória	<i>S. aureus</i>
	Crescimento presuntivo	<i>E. coli</i>
<i>Salmonella</i>		
Caldo Enriquecimento Salmonella, segundo Rappaport Vassiliadis	Promoção de crescimento	<i>Salmonella enterica</i> ssp sorotipo typhimurium
Agar Xilose Lisina Desoxicolato	Inibitória	ou <i>S. entérica</i> ssp sorotipo abony
	Crescimento presuntivo	<i>S. aureus</i> <i>S. enterica</i> ssp sorotipo typhimurium ou <i>S. entérica</i> ssp sorotipo abony
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Agar Cetrimida	Crescimento presuntivo	<i>P. aeruginosa</i>
Agar Sal Manitol	Inibitória	<i>E. coli</i>
	Crescimento presuntivo	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
<i>Clostridium</i>		
Meio Reforçado para <i>Clostridium</i>	Promoção de crescimento	<i>Clostridium sporogenes</i>
Agar Columbia	Promoção de crescimento	<i>C. sporogenes</i>
<i>Candida albicans</i>		
Caldo Sabouraud	Promoção de crescimento	<i>Candida albicans</i>
Agar Sabouraud-dextrose	Crescimento Presuntivo	<i>C. albicans</i>
Agar Nickerson	Crescimento Presuntivo	<i>C. albicans</i>

5

Recuperação dos micro-organismos no produto

Para cada produto a ser analisado realize o teste conforme descrito em *Procedimento*, em *Método geral para pesquisa de micro-organismos patogênicos* (5.5.3.1.3).

Ao homogeneizar, adicionar cada cepa descrita na promoção de crescimento. Inocular os micro-organismos individualmente em inóculos contendo não mais que 100 UFC. A realização do teste deve ocorrer no menor período de tempo.

Os micro-organismos devem ser detectados pelas reações indicadas nos parágrafos correspondentes, descritos em *Procedimento*, em *Método geral para pesquisa de micro-organismos patogênicos* (5.5.3.1.3).

Se o produto possuir atividade antimicrobiana e for necessário modificar a metodologia proceda como em *Neutralização/remoção de atividade antimicrobiana* deste capítulo utilizando Caldo de Caseína-soja como diluente

5.5.3.1.5 Limites microbianos

A contaminação microbiana de um produto não estéril (especialidade e matéria-prima farmacêutica) pode conduzir não somente à sua deterioração, com as mudanças físicas e químicas associadas, mas também, ao risco de infecção para o usuário. Conseqüentemente, os produtos farmacêuticos orais e tópicos (cápsulas, comprimidos, suspensões, cremes, etc.), que não são estéreis, devem ser submetidos aos controles da contaminação microbiana.

A garantia de qualidade e os controles de produção devem ser tais que os micro-organismos capazes de proliferar e contaminar o produto, estejam dentro dos limites. Os limites microbianos devem ser adequados às várias categorias de produtos que refletem o tipo de contaminação mais provável introduzida durante a fabricação, bem como a via de administração, o consumidor final (neonatos, crianças, idosos, debilitados), o uso de agentes imunossupressores, corticosteróides e outros fatores. Ao avaliar os resultados

ANEXO – Capítulo geral de determinação do teste de ensaios microbiológicos da Farmacopéia Brasileira - continuação

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição 251

dos testes microbiológicos, o número e os tipos de micro-organismos presentes devem ser considerados no contexto do uso do produto proposto.

O teste microbiológico de produtos não estéreis e de matéria-prima para uso farmacêutico é realizado segundo a metodologia descrita em *Ensaio microbiológicos para produtos não estéreis* (5.5.3.1).

Os limites de aceitação estão descritos na **Tabela 1** e são interpretados do seguinte modo:

- 10^1 UFC: valor máximo aceitável = 20

- 10^2 UFC: valor máximo aceitável = 200

- 10^3 UFC: valor máximo aceitável = 2000 e, assim sucessivamente