

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARILENE LOPES ÂNGELO

**Análise químico-farmacêutica de
rosuvastatina cálcica comprimido e cápsula**

Alfenas/MG

2016

MARILENE LOPES ÂNGELO

**Análise químico-farmacêutica de
rosuvastatina cálcica comprimido e cápsula**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas-MG, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas
Orientadora: Prof^a Dr^a Magali Benjamim de Araújo

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Ângelo, Marilene Lopes.

Análise químico-farmacêutica de rosuvastatina cálcica comprimido e cápsula / Marilene Lopes Ângelo. – Alfenas - MG, 2017.
162 f.

Orientadora: Magali Benjamim de Araújo.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Rosuvastatina cálcica. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência.
3. Espectrofotometria. 4. Dissolução. 5. Polimorfismo (Cristalografia).
I. Araújo, Magali Benjamim de. II. Título.

CDD-615.19

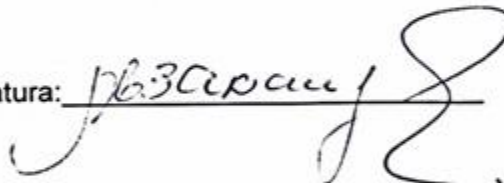
MARILENE LOPES ÂNGELO

“Análise químico-farmacêutica de rosuvastatina cálcica comprimido e cápsula”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 09 / 12 / 16

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

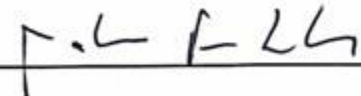
Prof. Dr. Marlus Chorilli
Instituição: UNESP

Assinatura: 

Profa. Dra. Edith Cristina Laignier Cazedey
Instituição: UFBA

Assinatura: 

Prof. Dr. Mateus Freire Leite
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meus passos e me dar forças para enfrentar todos os obstáculos encontrados durante este período.

À meus pais, pelo amor incondicional e por todo o apoio para a realização de mais um sonho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo, por todo o conhecimento compartilhado, confiança, paciência, disponibilidade em todos os momentos, e acima de tudo, pela compreensão de todas as dificuldades pelas quais passei, pelo fato de possuir outros compromissos com a vida profissional.

Ao amigo Prof. Dr. André Luís Morais Ruela pela amizade, paciência, motivação, disponibilidade e colaboração incondicional em todas as etapas realizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira pela disponibilidade na utilização de seus equipamentos.

À Profa. Dra. Lucélia Magalhães da Silva pela amizade, incentivo e colaboração neste trabalho.

Ao mestrando Gabriel José Silveira Lacerda pela paciência e apoio nas análises.

Ao Prof. Dr. Mateus Freire Leite e Prof. Dr. Marcelo Gárcia Trevisan por participarem da banca de qualificação e pelas observações pertinentes.

À todos os amigos e funcionários do Núcleo Controle de Qualidade/UNIFAL-MG, em especial à Gilmara, Sirléia e Ana por toda ajuda, apoio e muitas risadas.

À todos da Farmacologia e do Departamento de Patologia e Parasitologia pelo total apoio, incentivo e compreensão durante meu período de experimentos e redação de minha tese.

À Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques por disponibilizar o equipamento LC-MS e ao doutorando Henrique Dipe de Faria pelo auxílio nas análises.

À Olímpia Maria Martins Viana, Jennifer Tavares Jacon e Edeílson Vítor Gonzaga pelo auxílio nas análises de caracterização.

Aos alunos de Iniciação Científica Anna Clara Marques Ferreira e Marcus Vinicius de Fária Ramos pelo empenho e colaboração neste trabalho.

À Maria Ângela Rodrigues e a Cristina Martiniano Montanari pela amizade e incentivo, e ao amigo Matheus Pereira de Araújo pelos inúmeros desabafos e vitórias.

As Pós-doutorandas Mariane Gonçalves Santos e Lilian Pereira Franco pelo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade oferecida.

Aos órgãos de fomento CAPES e Fapemig, pelo apoio financeiro.

À todos, minha eterna gratidão.

RESUMO

Rosuvastatina cálcio é uma estatina sintética utilizada para tratar a hipercolesterolemia, inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase. No Brasil, este fármaco é amplamente comercializado como comprimidos e cápsulas manipuladas. Contudo, não há nenhum método descrito em compêndios oficiais para as formas de dosagem mencionadas. O presente trabalho propôs o desenvolvimento e validação de métodos de análise quantitativa de rosuvastatina cálcica (cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria) e ensaios de dissolução (também realizados em meio biorrelevante) para as formas farmacêuticas cápsulas e comprimidos. Foi avaliado também a estabilidade de rosuvastatina cálcica e o impacto do polimorfismo na liberação deste fármaco em formulações de cápsulas. Os métodos de análise quantitativos não apresentaram diferença estatística para o nível de significância de 5%. No estudo de degradação forçada de rosuvastatina cálcica, foi observada sua instabilidade frente às degradações ácida e fotolítica, com caracterização dos produtos formados, seguido de aplicação do método em amostras reais. Diferentes formulações de liberação imediata produzidas com matéria-prima comercial (sólido amorfo) foram analisadas para o desenvolvimento do ensaio de dissolução, empregando a forma cristalina M de rosuvastatina cálcica. Esta forma foi recristalizada em nosso laboratório e mostrou uma menor solubilidade aquosa quando comparada com a forma amorfa. A formulação com esta forma cristalina mostrou uma taxa de dissolução lenta que demonstra o impacto do polimorfismo nesta molécula quando utilizada a forma farmacêutica cápsula. Além de identificar diferentes formas sólidas, o ensaio discriminativo desenvolvido permitiu distinguir formulações com diferentes composições de excipientes. Um ensaio de dissolução foi desenvolvido e validado para a forma farmacêutica comprimido. Este ensaio foi utilizado para comparar produtos similares em relação ao produto referência. Os resultados mostraram que há características de liberação semelhantes para dois dos três produtos similares, em comparação com o produto referência Crestor®. Um estudo empregou como meio biorrelevante leite em pH = 6,4 nas mesmas condições de aparato e rotação definidos para cápsulas e comprimidos no ensaio discriminativo. Os resultados mostraram que ambas as formas farmacêuticas avaliadas apresentaram a mesma especificação sugerida para o meio utilizando tampão fosfato pH = 6,8. Assim, os métodos desenvolvidos neste trabalho contribuem para avaliação da qualidade, segurança e eficácia terapêutica de rosuvastatina cálcica, além de ampliar os conhecimentos científicos relacionados a esta estatina.

Palavras-chave: Rosuvastatina cálcica. Cromatografia líquida de alta eficiência. Espectrofotometria. Produtos de degradação. Dissolução. Polimorfismo.

ABSTRACT

Rosuvastatin calcium is a synthetic statin used to treat hypercholesterolemia, inhibiting 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase. In Brazil, this drug is widely marketed as tablets and compounded capsules. However, there is no method described in official compendia for the mentioned dosage forms. This work proposed the development and validation of methods for quantitative analysis of rosuvastatin calcium (high performance liquid chromatography and spectrophotometry) and dissolution tests (also performed in biorelevant medium) for capsules and tablets forms. The stability of rosuvastatin calcium and the impact of polymorphism on the release of this drug in capsule formulations were also evaluated. The methods of quantitative analysis didn't present statistical difference for the significance level of 5%. In the study of forced degradation of rosuvastatin calcium, it was observed its instability against acid and photolytic degradations. The products of degradation generated by the stress conditions were characterized. After, the method was used in order to evaluate real samples. Different formulations for immediate release were produced with commercial raw material (amorphous solid). The obtained formulations were analyzed for the development of dissolution tests using the crystalline form M of rosuvastatin calcium. This form were recrystallized in our laboratory and showed a lower aqueous solubility when compared to the amorphous form. The formulation with this crystalline form also showed a slow dissolution rate that demonstrates the impact of the polymorphism on this molecule when prepared as capsule form. In addition to identifying different solid forms, the discriminant test developed was able to discriminate formulations with different compositions of excipients. A dissolution test was developed and validated for the tablets form. This method was used to comparison of similar products related to the reference. The results proved that there is similar release characteristics for two of three similar products, in comparison with the reference product Crestor®. A study using milk at pH = 6.4, as biorelevant medium, was conducted by using the same apparatus and rotation conditions of the discriminatory assay. The results showed that both evaluated pharmaceutical forms presented the same specification suggested for the medium using phosphate buffer pH = 6.8. Thus, the developed methods contribute to quality, therapeutic safety and efficacy evaluation of rosuvastatin calcium, and to expand the scientific knowledge related to this statin.

Key words: Rosuvastatin calcium. High performance liquid chromatography. Spectrophotometry. Degradation products. Dissolution. Polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEPT	Proteínas de transferência de éster de colesterol
CHD	Coronary Heart Disease
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAC	Doença arterial coronariana
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCA	Doença cardiovascular aterosclerótica
DCV	Doenças cardiovasculares
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Differential scanning calorimetry
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-Coenzima A
ICH	International Conference on Harmonization
IFA	Insumo Farmacêutico ativo
INMETRO	Instituto Internacional de Metrologia
ISO	International Standard Organization)
IV	Infravermelho
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas <i>in tandem</i>
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LSS	Lauril sulfato de sódio
mg	Miligramas
mm	Milímetros
mL	Mililitros
MTP	Proteína de transferência microsomal
m/v	Massa por volume
nm	Nanômetros
OATP	Polipeptídeo transportador de ânions orgânicos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCSK9	Proteína convertase subtilisina/ kexin tipo 9
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROSC	Rosuvastatina cálcica
rpm	Rotação por minuto
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
TG	Termogravimetria
TGI	Trato gastrointestinal
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometros
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O efeito das estatinas na via do mevalonato.....	23
Figura 2 - Estrutura química das estatinas.....	25
Figura 3 - Estrutura química da rosuvastatina cálcica.....	26
Figura 4 - Representação esquemática das formas sólidas de compostos farmacêuticos.....	30
Figura 5 - Espectro de absorção de rosuvastatina cálcica padrão de referência e padrão de trabalho, na concentração de 10 µg mL ⁻¹ , utilizando metanol como solvente.....	82
Figura 6 - Espectros de infravermelho de rosuvastatina cálcica forma amorfa e cristalina M.....	83
Figura 7 - Difratograma de rosuvastatina cálcica matéria-prima.....	84
Figura 8 - Difratograma de rosuvastatina cálcica forma cristalina M.....	85
Figura 9 - DSC e TG de rosuvastatina cálcica forma amorfa.....	87
Figura 10 - DSC e TG de rosuvastatina cálcica forma cristalina M.....	87
Figura 11 - Difratograma (A) e DSC (B) da amostra cristalina M submetida ao aquecimento em temperatura de 105 °C por duas horas.....	88
Figura 12 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de cápsulas diluída em diferentes soluções para avaliação da seletividade.....	90
Figura 13 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de comprimidos diluída em diferentes soluções para avaliação da seletividade.....	90
Figura 14 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de padrão de referência e padrão de trabalho (10 µg mL ⁻¹), utilizando metanol como solvente (1 ^a e 2 ^a diluição), para determinação do melhor comprimento de onda.....	91
Figura 15 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método espectrofotométrico.....	92
Figura 16 - Solução padrão de rosuvastatina cálcica a 20 µg mL ⁻¹ , utilizando fase móvel metanol:água com ajuste de pH= 3,0 com ácido fosfórico (65:35, v/v).....	97

Figura 17 - Cromatogramas do estudo de seletividade de rosuvastatina cálcica, A) seletividade pela mistura de excipientes, B) perfil de impurezas, C) degradação ácida, D) degradação alcalina, E) degradação oxidativa e F) degradação fotolítica, com amostras a 20 µg mL ⁻¹ , utilizando fase móvel metanol:água com ajuste de pH= 3,0 com ácido fosfórico (65:35, v/v).....	99
Figura 18 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método CLAE.....	100
Figura 19 - Cromatograma obtido por LC-MS/MS em modo TIC (+) da solução padrão de rosuvastatina 5 µg mL ⁻¹ (A) e espectro de massa do íon precursor de rosuvastatina, obtido no modo de operação <i>Product Ion Scan</i> (B).....	108
Figura 20 - Cromatograma obtido por LC-MS/MS em modo TIC(+) da solução submetida ao estudo degradação ácida (A) e espectros de massas dos íons precursores de PD1 (B), obtido no modo de operação <i>Product Ion Scan</i>	108
Figura 21 - Cromatograma obtido por LC-MS/MS em modo TIC(+) da solução submetida ao estudo degradação fotolítica (A) e espectros de massas dos íons precursores de PD2 (B) e PD3 (C), obtido no modo de operação <i>Product Ion Scan</i>	109
Figura 22 - Estrutura que representa o PD2 e PD3.....	110
Figura 23 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método LC-MS/MS.....	111
Figura 24 - Gráfico comparativo da solubilidade da forma amorfa e forma cristalina M nos meios aquosos testados.....	116
Figura 25 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local. As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão fosfato pH= 6,8, aparato cesta e pá*, com velocidade de rotação 50 rpm e volume de 500 mL. *Aparato pá utilizado na formulação C.....	118
Figura 26 - Perfis de dissolução de cápsulas manipuladas em laboratório (n= 6). As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão fosfato pH= 6,8, aparato cesta e pá*, com velocidade de rotação 50 rpm e volume de 500 mL. *Aparato pá utilizado na formulação G-2.....	119
Figura 27 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local e cápsulas manipuladas em nosso laboratório (D, E e F). As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão fosfato pH= 6,8, aparato, com velocidade de rotação 100 rpm e volume de 500 mL.....	121

Figura 28 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local. As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão acetato de sódio pH= 4,5, aparato cesta, com velocidade de rotação 100 rpm e volume de 500 mL.....	121
Figura 29 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local e cápsulas manipuladas em nosso laboratório (D, E e F). As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão acetato de sódio pH= 4,5 adicionado de LSS, aparato cesta, com velocidade de rotação 100 rpm e volume de 500 mL.....	122
Figura 30 - Eficiência de dissolução avaliada com as diferentes formulações em diferentes meios de dissolução.....	123
Figura 31 - Perfis de dissolução de comprimidos Crestor [®] (n= 6) utilizando tampão fosfato pH 6,8, aparato pá, com velocidade de 50 rpm e volume de 500 mL.....	125
Figura 32 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método CLAE para dissolução.....	127
Figura 33 - Perfis de dissolução de comprimidos Crestor [®] e similares (n= 6) utilizando tampão fosfato pH 6,8, aparato pá, com velocidade de 50 rpm e volume de 500 mL.....	131
Figura 34 - Eficiência de dissolução avaliada com o comprimido referência Crestor [®] e similares.....	131
Figura 35 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de cápsulas, diluídas em diferentes soluções para avaliação da seletividade do método de dissolução.....	134
Figura 36 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de comprimidos, diluídas em diferentes soluções para avaliação da seletividade do método de dissolução.....	135
Figura 37 - Perfis de dissolução com cápsulas da formulação E (A) e comprimidos (B), utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH = 6,8 (500 mL) e leite pH = 6,4 (500 mL), aparato cesta a 100 rpm (Figura A) e aparato pá a 50 rpm (Figura B).....	136
Figura 38 - Eficiência de dissolução avaliada com cápsulas da formulação E (A) e comprimidos (B), utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH = 6,8 e leite pH = 6,4, aparato cesta a 100 rpm (cápsulas) e aparato pá a 50 rpm (comprimidos).....	137
Figura 39 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método CLAE para dissolução biorrelevante.....	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das formulações de rosuvastatina cálcica cápsulas, obtidas do comércio local.....	46
Tabela 2 - Composição das formulações de rosuvastatina cálcica (forma amorfa e cristalina), manipuladas no laboratório de Tecnologia Farmacêutica.....	46
Tabela 3 - Soluções de padrão e amostra de placebo de cápsulas ou comprimidos em metanol, utilizadas no ensaio de exatidão.....	56
Tabela 4 - Parâmetros avaliados no ensaio de robustez por espectrofotometria.....	57
Tabela 5 - Composição dos meios para simular conteúdo gástrico no estado alimentado.....	76
Tabela 6 - Valores obtidos a partir da determinação do ponto de fusão de rosuvastatina cálcica matéria-prima e forma recristalizada.....	81
Tabela 7 - Bandas de absorção de rosuvastatina cálcica nos espectros de infravermelho.....	83
Tabela 8 - Valores da determinação da precisão intradia (repetibilidade) e interdia (reprodutibilidade) do método para rosuvastatina cálcica, utilizando como solvente metanol. Leitura em espectrofotômetro UV a 242 nm.....	92
Tabela 9 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica nas amostras de placebo (cápsula e comprimido), pelo método de análise espectrofotometria UV.....	93
Tabela 10 - Valores obtidos no teste de robustez para avaliação do comprimento de onda, marca do solvente, e diferentes equipamentos em relação a amostra de cápsulas.....	94
Tabela 11 - Valores obtidos no teste de robustez para avaliação do comprimento de onda, marca do solvente, e diferentes equipamentos em relação a amostra de comprimidos.....	95
Tabela 12 - Valores obtidos da recuperação do fármaco após a degradação forçada (n=3).....	98
Tabela 13 - Valores obtidos para avaliação da precisão do método de análise por CLAE.....	101
Tabela 14 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica nas amostras de cápsula, pelo método de análise por CLAE.....	102
Tabela 15 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica nas amostras de comprimidos, pelo método de análise por CLAE.....	102

Tabela 16 - Valores obtidos para avaliação da robustez do método analítico das amostras de cápsulas de rosuvastatina cálcica por CLAE.....	103
Tabela 17 - Valores obtidos para avaliação da robustez do método analítico das amostras de comprimidos de rosuvastatina cálcica por CLAE.....	103
Tabela 18 - Valores do teor de rosuvastatina cálcica e parâmetros cromatográficos das amostras de cápsulas e comprimidos (6).....	104
Tabela 19 - Valores obtidos da comparação estatística entre as determinações por CLAE e espectrofotometria UV.....	106
Tabela 20 - Valores obtidos para avaliação da precisão do método de análise por LC-MS/MS.....	112
Tabela 21 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica, pelo método de análise LC-MS/MS.....	112
Tabela 22 - Valores de teor obtidos a partir do teste de doseamento por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, de amostras reais (comprimidos com prazo de validade expirado).....	114
Tabela 23 - Valores obtidos do estudo de solubilidade para a forma amorfa e para a forma recristalizada.....	114
Tabela 24 - Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de cápsulas de rosuvastatina cálcica.....	127
Tabela 25 - Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de comprimidos de rosuvastatina cálcica.....	127
Tabela 26 - Valores obtidos no teste de recuperação de rosuvastatina após realização de ensaio de dissolução.....	128
Tabela 27 - Valores obtidos do teste de robustez do ensaio de dissolução cápsulas.....	129
Tabela 28 - Valores obtidos do teste de robustez do ensaio de dissolução comprimidos.....	129
Tabela 29 - Resultados obtidos nos testes de peso médio, dureza, friabilidade e desintegração de rosuvastatina cálcica 20 mg.....	132
Tabela 30 - Resultados obtidos nos testes de doseamento e uniformidade de rosuvastatina cálcica 20 mg.....	132
Tabela 31 - Valores obtidos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método de dissolução biorrelevante para rosuvastatina cálcica.....	139
Tabela 32 - Valores médios de recuperação do método de dissolução biorrelevante para rosuvastatina cálcica.....	140

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	ANTILIPÊMICOS.....	21
2.2	ESTATINAS.....	22
2.3	ROSUVASTATINA CÁLCICA.....	25
2.4	POLISMORFISMO.....	29
2.5	ESTABILIDADE: ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	31
2.6	SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA.....	34
2.7	TESTE DE DISSOLUÇÃO.....	37
2.7.1	Meios biorrelevantes	39
2.8	VALIDAÇÃO.....	40
3	OBJETIVOS	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA, PADRÃO DE TRABALHO E MEDICAMENTOS.....	45
4.2	SOLVENTES E REAGENTES.....	47
4.3	EQUIPAMENTOS.....	47
4.4	RECRISTALIZAÇÃO DE ROSUVASTATINA CÁLCICA.....	49
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E AMOSTRA RECRISTALIZADA.....	50
4.5.1	Determinação do ponto de fusão	50
4.5.2	Espectrofotometria no ultravioleta	50
4.5.3	Espectroscopia de absorção no infravermelho com refletância total atenuada	51
4.5.4	Análise por difração de raios-X	51
4.5.5	Análises térmicas (DSC e TG)	52
4.6	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA PARA ROSUVASTATINA C.....	52
4.6.1	Preparo da solução de excipientes	52
4.6.2	Preparo da solução padrão	53
4.6.3	Preparo das soluções amostras	53

4.6.4	Validação do método de espectrofotometria na região UV.....	54
4.6.4.1	<i>Seletividade e determinação do comprimento de onda.....</i>	54
4.6.4.2	<i>Linearidade.....</i>	54
4.6.4.3	<i>Precisão.....</i>	55
4.6.4.4	<i>Exatidão.....</i>	55
4.6.4.5	<i>Limite de detecção e de quantificação.....</i>	56
4.6.4.6	<i>Robustez.....</i>	57
4.7	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA POR CLAE- UV/DAD.....	57
4.7.1	Condições cromatográficas.....	58
4.7.2	Preparo da solução padrão.....	58
4.7.3	Preparo da solução placebo.....	58
4.7.4	Preparo das soluções amostra.....	59
4.7.5	Estudo de degradação forçada.....	60
4.7.6	Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência..	61
4.7.6.1	<i>Seletividade.....</i>	62
4.7.6.2	<i>Linearidade.....</i>	62
4.7.6.3	<i>Precisão.....</i>	62
4.7.6.4	<i>Exatidão.....</i>	63
4.7.6.5	<i>Limite de detecção e quantificação.....</i>	63
4.7.6.6	<i>Robustez.....</i>	63
4.8	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA.....	64
4.8.1	Condições cromatográficas.....	64
4.8.2	Preparo da solução padrão.....	64
4.8.3	Preparo das soluções amostra para o teste de degradação forçada.....	65
4.8.4	Validação do método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para rosuvastatina cálcica.....	65
4.8.4.1	<i>Seletividade.....</i>	66
4.8.4.2	<i>Linearidade.....</i>	66
4.8.4.3	<i>Precisão.....</i>	66

4.8.4.4	<i>Exatidão</i>	67
4.8.4.5	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	67
4.8.5	Aplicação do método em amostras reais	67
4.9	Desenvolvimento do ensaio de dissolução.....	68
4.9.1	Preparo dos meios de dissolução	68
4.9.2	Estudos de solubilidade	69
4.9.3	Preparo das soluções padrão	69
4.9.4	Preparo das soluções amostras	70
4.9.5	Condições cromatográficas	70
4.9.6	Formulações	70
4.9.7	Ensaio de dissolução para cápsulas e comprimidos	71
4.9.8	Validação do ensaio de dissolução	72
4.9.8.1	<i>Seletividade</i>	72
4.9.8.2	<i>Linearidade</i>	72
4.9.8.3	<i>Precisão</i>	73
4.9.8.4	<i>Exatidão</i>	73
4.9.8.5	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	74
4.9.8.6	<i>Robustez</i>	74
4.9.9	Aplicação do ensaio de dissolução para avaliação da equivalência farmacêutica	74
4.10	DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO UTILIZANDO MEIOS BIORRELEVANTES.....	75
4.10.1	Otimização do ensaio de dissolução com meio biorrelevante	75
4.10.2	Preparo das soluções padrão	76
4.10.3	Preparo das soluções amostras	77
4.10.4	Validação do ensaio de dissolução empregando meio biorrelevante	77
4.10.4.1	<i>Seletividade</i>	78
4.10.4.2	<i>Linearidade</i>	78
4.10.4.3	<i>Precisão e exatidão</i>	78
4.10.4.4	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1	RECRISTALIZAÇÃO DE ROSUVASTATINA CÁLCICA.....	80

5.2	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E AMOSTRA RECRISTALIZADA.....	80
5.2.1	Ponto de fusão.....	80
5.2.2	Espectrofotometria no ultravioleta.....	81
5.2.3	Espectroscopia de absorção no infravermelho com reflectância total atenuada.....	82
5.2.4	Análise por difração de raio X pó (DRXP).....	84
5.2.5	Análises térmicas (DSC e TG).....	85
5.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA PARA ROSC.....	89
5.3.1	Seletividade e determinação do comprimento de onda.....	89
5.3.2	Linearidade.....	91
5.3.3	Precisão.....	92
5.3.4	Exatidão.....	93
5.3.6	Limite de Detecção e de Quantificação.....	94
5.3.5	Robustez.....	94
5.4	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO CROMATOGRÁFICO INDICADOR DE ESTABILIDADE PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA.....	90
5.4.1	Otimização das condições cromatográficas.....	96
5.4.2	Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência..	97
5.4.2.1	<i>Estudo de degradação e seletividade.....</i>	97
5.4.2.2	<i>Linearidade.....</i>	100
5.4.2.3	<i>Precisão.....</i>	101
5.4.2.4	<i>Exatidão.....</i>	101
5.4.2.5	<i>Limite de detecção e quantificação.....</i>	102
5.4.2.6	<i>Robustez.....</i>	103
5.4.3	Aplicação do método às formas farmacêuticas.....	104
5.4.4	Comparação dos métodos de determinação de rosuvastatina cálcica por CLAE e espectrofotometria no UV.....	105
5.5	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA.....	106
5.5.1	Otimização das condições cromatográficas do LC-MS/MS.....	106
5.5.2	Identificação dos produtos de degradação.....	107

5.5.3	Validação do método de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas	110
5.5.3.1	<i>Seletividade</i>	110
5.5.3.2	<i>Linearidade</i>	111
5.5.3.3	<i>Precisão</i>	111
5.5.3.4	<i>Exatidão</i>	112
5.5.3.5	<i>Limite de quantificação e detecção</i>	113
5.5.4	Aplicação do método às amostras reais (comprimidos com prazo de validade expirado)	113
5.6	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	114
5.6.1	Solubilidade	114
5.6.2	Otimização do ensaio de dissolução para cápsulas e comprimidos	117
5.6.3	Validação do método de dissolução	126
5.6.3.1	<i>Seletividade</i>	126
5.6.3.2	<i>Linearidade</i>	126
5.6.3.3	<i>Precisão</i>	127
5.6.3.4	<i>Exatidão</i>	128
5.6.3.5	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	128
5.6.3.6	<i>Robustez</i>	129
5.6.4	Aplicação do ensaio de dissolução para avaliação do perfil comparativo com medicamentos similares	130
5.7	DETERMINAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO POR ESPECTROFOMETRIA.....	132
5.8	DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO UTILIZANDO MEIOS BIORRELEVANTES.....	134
5.8.1	Otimização e aplicação do meio de dissolução biorrelevante	134
5.8.2	Validação do método de dissolução biorrelevante	138
5.8.2.1	<i>Seletividade</i>	138
5.8.2.2	<i>Linearidade</i>	138
5.8.2.3	<i>Precisão e exatidão</i>	139
5.8.2.4	<i>Limite de detecção e quantificação</i>	140
6	CONCLUSÕES	141

BIBLIOGRAFIA.....	143
ANEXOS.....	157

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no mundo. Dados recentes apontam que ataques cardíacos e derrames cerebrais, tiram a vida de 17,3 milhões de pessoas todos os anos e uma estimativa é de que este número poderá atingir 25 milhões de pessoas até 2030. Estudos apresentados nas últimas três décadas têm indicado que a tendência de eventos cardiovasculares vem aumentando na presença de fatores de riscos estabelecidos pela aterosclerose, sendo assim a doença cardiovascular aterosclerótica (DCA) é a maior causa de morbidade e mortalidade em adultos de nações industrializadas e em desenvolvimento como o Brasil (BOZZA et al., 2012; GAZOLLA et al., 2014; MAHMOOD; JAHAN; HABIBULLAH, 2015).

Diversos estudos epidemiológicos envolvendo pacientes hiperlipêmicos têm mostrado relação direta entre o risco de desenvolvimento de doença arterial coronariana (DAC) ("Coronary Heart Disease", CHD) e lesões ateroscleróticas, devido aos altos níveis de lipídios sanguíneos, geralmente na forma de lipoproteínas. Dentre as principais classes de substâncias utilizadas para o tratamento de tais patologias, tem-se as estatinas, os fibratos, resinas de ligação de ácidos biliares, ezetimiba, niacina e ácidos graxos ômega-3 (CAMPO, 2007; RANG, 2012; SPOSITO et al., 2007; XAVIER et al., 2013).

As estatinas são fármacos que estão se tornando indispensáveis na prevenção primária e secundária da doença arterial coronariana (DAC), devido ao seu importante propósito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir os riscos desta doença. Estes efeitos são resultantes da atividade inibidora das estatinas sobre a enzima HMG-CoA redutase (hidroximetilglutaril-CoA redutase), com a propriedade de bloquear a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, inibindo os primeiros passos da biossíntese de colesterol. Estas substâncias, capazes de mimetizar o substrato natural, podem ser divididas em naturais e sintéticas e diferem fundamentalmente em termos de potência, perfil farmacocinético, interação

farmacológica e efeito indesejado relacionado à miotoxicidade. Além do seu efeito hipolipemiante, efeitos pleiotrópicos, também são relatados na literatura (CAMPO, 2007; PAPAGEORGIOU et al., 2016)

A rosuvastatina cálcica, fármaco sintético, representa uma das mais recentes estatinas lançadas no mercado em 2003. É um dos fármacos mais potentes na inibição da enzima 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA), a qual está envolvida na síntese do colesterol. O principal efeito deste fármaco está na redução do colesterol, mas há dados na literatura que mencionam, que além desta propriedade, a rosuvastatina apresenta outras funções relacionadas a efeitos anti-inflamatórios, antioxidante e imunomoduladora ((BARREIRO, FRAGA, 2015; ŠTERK et al., 2016).

O controle de qualidade na indústria farmacêutica, para determinação do teor de princípio ativo, estudo das características físicas e químicas do fármaco, estudos de estabilidade, solubilidade e dissolução, é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto final. Em função de tais efeitos benéficos citados anteriormente e apesar da comprovada eficácia clínica e segurança no tratamento com rosuvastatina, há um interesse no desenvolvimento de métodos analíticos, pois até então, não existe monografia farmacopeica para formas farmacêuticas sólidas em compêndios oficiais.

Considerando a importância do controle de qualidade na avaliação da qualidade e segurança da matéria-prima até o produto final, este trabalho propôs desenvolver e validar métodos de determinação e liberação de formas farmacêuticas cápsulas e comprimidos de rosuvastatina cálcica, e avaliar a influência do polimorfismo na molécula do fármaco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Foram revisados a seguir assuntos da literatura relacionados ao trabalho desenvolvido, como: antilipêmicos, estatinas, rosuvastatina cálcica, polimorfismo, estabilidade, sistema de classificação biofarmacêutica, teste de dissolução, meios biorrelevantes e validação.

2.1 ANTILIPÊMICOS

A mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) tem diminuído significativamente, no entanto o número de pacientes com estas patologias associada a dislipidemia vem aumentando com o avançar da idade (GOBAL; MEHTA, 2010).

A dislipidemia, conhecida também como hiperlipidemia, esta relacionada com o aumento dos níveis de triglicérides e / ou aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL). Esta condição associada a fatores de risco como tabagismo, sedentarismo, obesidade, entre outros fatores estão envolvidos com a formação de placa aterosclerótica (GONZALEZ; HELKIN; GAHTAN, 2016; LIU; LI, 2015; XAVIER et al., 2013).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que se inicia com agressão do endotélio vascular, acometendo a camada íntima das artérias, associada aos riscos constitucionais e riscos modificáveis. A placa de ateroma forma-se em função do aumento da permeabilidade da íntima para lipoproteínas plasmáticas e as lesões ateroscleróticas tornam-se progressivamente numerosas e difusas com o progresso da doença (XAVIER et al., 2013).

O tratamento farmacológico das dislipidemias envolve hipolipemiantes agrupados nas seguintes classes: estatinas, resinas e ezetimiba, fibratos niacina, ácidos graxos ômega 3 e novos fármacos como os inibidores da proteína de transferência de éster de

colesterol (CETP), inibidor da proteína de transferência microssomal (MTP), inibidores do pró-proteína convertase subtilisina/ kexin tipo 9 (PCSK9) e inibidores da síntese de apolipoproteína B (XAVIER et al., 2013).

As estatinas são potentes agentes de diminuição de lípidos, sendo utilizadas na prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares e produzem reduções significativas, tanto na morbidade como na mortalidade. Seu uso está relacionado a redução do LDL colesterol por inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase e esta classe de medicamentos continua sendo a terapia mais reconhecida por estudos clínicos na redução de eventos cardiovasculares e sua ação pode influenciar todo o conjunto das lipoproteínas circulantes que interagem com a LDL colesterol como VLDL e remanescentes de quilomícrons (MOREIRA et al., 2006; RODRIGUES, 2008; XAVIER et al., 2013).

2.2 ESTATINAS

Existem atualmente várias classes de medicamentos empregadas no tratamento das dislipidemias, sendo as estatinas cada vez mais utilizadas na prática clínica para a prevenção primária e secundária das DCV. Estes fármacos tornaram-se os redutores de lípidos mais amplamente prescritos na maioria dos países. A classe das estatinas compreende fármacos que possuem semelhança com a molécula 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), a qual é substrato da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima-A Redutase (HMG-CoA redutase), envolvida na formação do colesterol (NIETO-RAMIREZ et al., 2013; SIRTORI, 2014).

O mecanismo de ação destas substâncias envolve a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima-A Redutase (HMG-CoA redutase), responsável por aumentar a velocidade de síntese do colesterol nas células hepáticas. Esta enzima catalisa a conversão da HMG-CoA em ácido mevalônico, um dos intermediários na formação do

colesterol (Figura1) (BONETTI et al., 2003; LINARELLI, 2008; SHITARA, 2006, PORTELA et al., 2014).

A subsequente redução na síntese hepática de colesterol provocada pela inibição da enzima HMG-CoA redutase resulta em aumento da síntese dos receptores de superfície específicos de LDL (Low-Density Lipoprotein), que podem se ligar à LDL circulante e, portanto, aumentar a depuração das LDL. Por conseguinte, o principal efeito bioquímico das estatinas consiste em reduzir as concentrações plasmáticas de LDL-colesterol. Além disso, as estatinas reduzem os triglicerídios plasmáticos e aumentam o HDL-colesterol (LINARELLI, 2008; PORTELA et al., 2014; RANG, 2012; SHITARA, 2006).

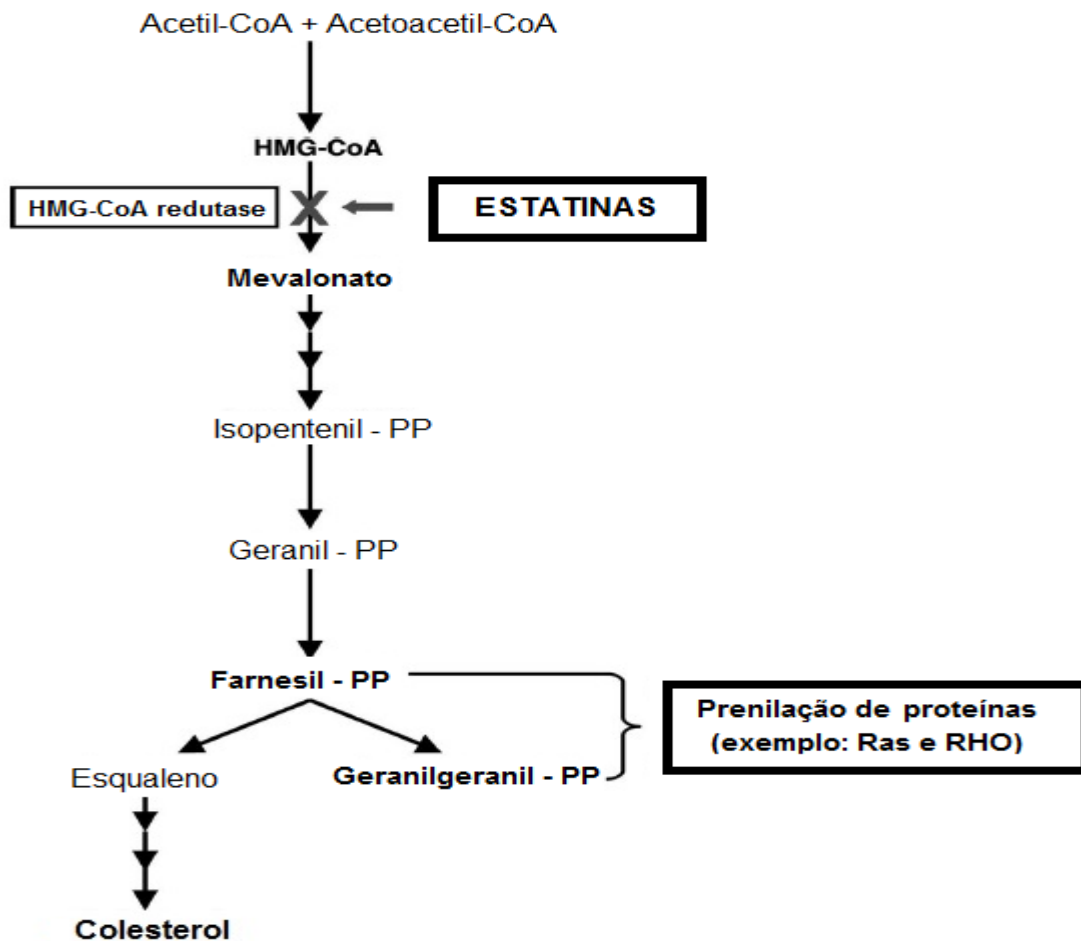


Figura 1- O efeito das estatinas na via do mevalonato.

Fonte: Traduzido de BONETTI et al., 2003.

Em 1971, a primeira estatina foi descoberta e isolada pelo bioquímico japonês Akira Endo, obtida a partir do fungo *Penicillium citrinum*, sendo chamada de mevastatina. No entanto, a primeira aplicação clínica de uma estatina foi realizada pela Merck & Co (Kenilworth, Nova Jersey), a qual foi isolada a partir do fungo *Aspergillus terreus* em 1976, denominada de lovastatina, sendo aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1987 e comercializada em como Mevacor[®] (ENDO, 2008; NIETO-RAMIREZ et al., 2013).

As estatinas (Figura 2) mevastatina e lovastatina foram protótipos das estatinas semi-sintéticas pravastatina e sinvastatina, respectivamente. Para posteriormente, mais cinco novas moléculas serem desenvolvidas e comercializadas, são elas as estatinas sintéticas: fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, rosuvastatina e pitavastatina. No entanto, a cerivastatina foi retirada do mercado em 2001, pois estudos determinaram que sua utilização produzia rabdomiólise (ENDO, 2008; NIETO-RAMIREZ et al., 2013).

Quimicamente, consistem em sistema anelar hexaidronaftalênico ligados a dois grupamentos: um éster metilbutirato e um hidroxiácido que pode formar uma lactona de seis membros. Quanto a origem, podem ser divididas em três grupos: metabólitos fúngicos (lovastatina e pravastatina), compostos sintéticos (atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina, pitavastatina) e compostos semi - sintéticos (sinvastatina) (KOROLKOVAS, 2012; NIETO-RAMIREZ et al., 2013).

No momento, seis estatinas são empregadas clinicamente no Brasil (Figura 2): lovastatina, sinvastatina, pravastatina que são semi - sintéticas, a fluvastatina que é o primeiro agente totalmente sintético, derivado da mevalonolactona, sendo produzido na forma racêmica e a nova geração de estatinas sintéticas, representada pela atorvastatina (Lipitor[®]) e rosuvastatina (Crestor[®]) (CAMPO, 2007; XAVIER et al., 2013).

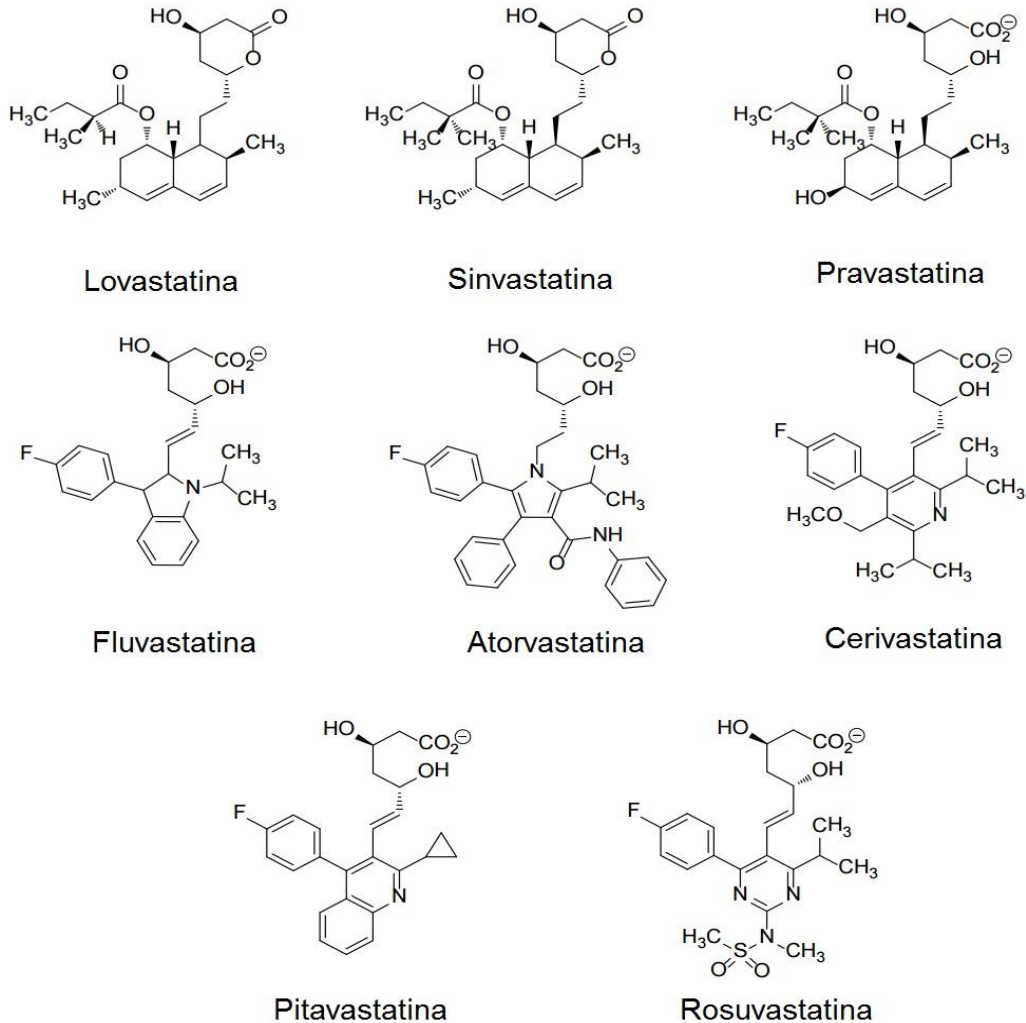


Figura 2 - Estrutura química das estatinas.
 Fonte: Adaptado de QU; JIANG; KONG, 2014.

2.3 ROSUVASTATINA CÁLCICA

Rosuvastatina cálcica é uma estatina sintética, lançada em 2003 e representa uma das mais recentes estatinas. É administrada por via oral sob a forma de comprimidos ou cápsulas. A forma farmacêutica comprimido apresenta como medicamento referência o Crestor[®], medicamento que atingiu em 2013 vendas de 8,2

bilhões e desde o seu lançamento pela indústria Astra Zeneca já foi arrecadado mais de US\$ 50 bilhões. De acordo com dados relatados pela empresa IMS Health, este fármaco foi considerado o mais prescrito entre os produtos farmacêuticos globais em 2014, para tratamento de hipercolesterolemia, doença metabólica de lipídios no sangue e prevenção de doenças coronarianas, alcançando um grande destaque no mercado farmacêutico, em função de sua potente inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase (BARREIRO, FRAGA, 2015; SCHACHTER, 2005; ŠTERK et al., 2016)

A rosuvastatina cálcica (Figura 3), possui fórmula molecular $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2Ca$, peso molecular de 1001,14, com as seguintes características físico-química: pKa 4,6, logD em pH= 7,4 de -0,33, levemente solúvel em água e solúvel em metanol, clorofórmio e DMSO. Apresenta-se como um pó branco amorfo, o qual é estável e vem sendo utilizado comercialmente para a produção de formas farmacêuticas sólidas na indústria farmacêutica. Há relatos na literatura de diferentes formas cristalinas deste fármaco (BALAKUMAR; RAGHAVAN, SELVAN, 2013; LITVIĆ et al., 2013; SIRTORI, 2014).

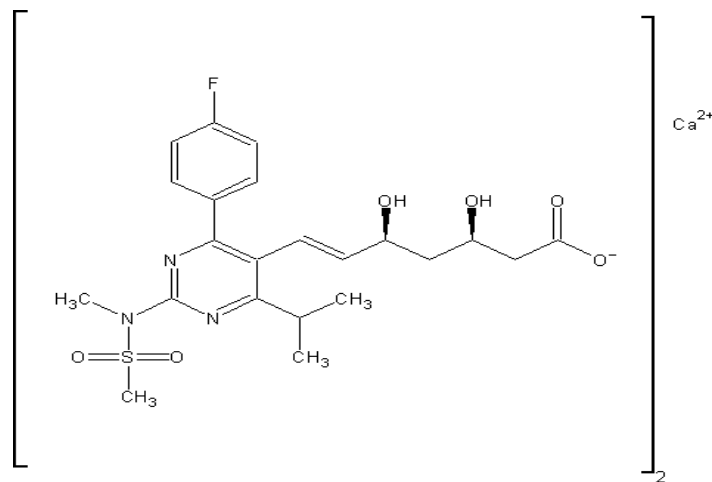


Figura 3 - Estrutura química da rosuvastatina cálcica
Fonte: REDDY et al., 2011.

Em relação a farmacocinética, a rosuvastatina cálcica é um fármaco que possui 20 % de biodisponibilidade absoluta, com pico de concentração plasmática de 3 a 5

horas após administração e uma meia vida de eliminação de aproximadamente 20 horas. Sua estrutura química possui o grupo metilsulfonamida, que confere a este fármaco propriedade hidrofílica, que justifica a sua baixa permeabilidade em membranas biológicas, limitando sua absorção e distribuição aos tecidos. No entanto, a rosuvastatina é seletiva para hepatócitos, quando comparada aos demais tecidos, em função de sua alta afinidade pela proteína transportadora da família do polipeptídeo transportador de ânions orgânicos (OATP) específica do fígado (SIRTORI, 2014; VARMA et al., 2011).

Aproximadamente 90 % da rosuvastatina cálcica liga-se às proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. Este fármaco sofre metabolismo de primeira passagem no fígado (mínima metabolização CYP2C9/2C19), que é o local primário da síntese de colesterol e da depuração de LDL-C. Apresenta metabolismo limitado (aproximadamente 10 %), principalmente para a forma N-desmetila, e 90% são eliminados como fármaco inalterado nas fezes, sendo o restante excretado na urina (SCHACHTER, 2005; NAZIR et al., 2015).

É uma molécula de caráter ácido, apresentando um pKa de 4,6 e como a taxa de absorção no intestino é maior, em função de uma superfície mais ampla e de vilosidades para facilitar este processo, supõe-se que absorção deste fármaco se dê nos segmentos iniciais do intestino. Estudos realizados por VARMA e colaboradores relata que a permeabilidade de rosuvastatina avaliada em células Caco-2 e células com transportador OATP2B1 apresentou uma dependência significativa do pH, demonstrando que no pH=7,4 houve uma permeabilidade de baixa a moderada e em pH=5,5 uma permeabilidade elevada, sugerindo-se assim, que nos segmentos iniciais do intestino delgado (pH 3,0 a 6,0) ocorre uma melhor absorção deste fármaco (NIETO-RAMIREZ et al., 2013; SCHACHTER, 2005; VARMA et al., 2011).

A rosuvastatina cálcica é um seletivo e potente inibidor competitivo da HMG-CoA redutase, a enzima que limita a taxa de conversão da 3-hidroxi-3-metilglutaril co-enzima A para mevalonato, um precursor do colesterol. Apesar da importância deste mecanismo de redução de colesterol, a rosuvastatina também induz o aumento de receptores LDL, onde a lipoproteína LDL se fixa no tecido hepático, ocorrendo

depuração de partículas com apo B-100, por endocitose. Desta forma, este fármaco exerce seus efeitos modificadores de lipídios de duas maneiras: aumentando o número de receptores LDL hepáticos na superfície celular, aumentando a captação e o catabolismo do LDL circulantes, e diminuem a biossíntese de colesterol (CAMPO; CARVALHO, 2007; SHITARA; SUGIYAMA, 2006).

A literatura registra artigos envolvendo estudos na determinação do fármaco em comprimidos, matéria-prima e em matrizes biológicas, principalmente por cromatografia e espectrofotometria. A análise por CLAE foi relatada na determinação de rosuvastatina cálcica em plasma (AKKAM et al., 2013; BERGMAN et al., 2006; JEMNITZ et al., 2010; KUMAR et al., 2006; NASIR et al., 2011; NAZIR; IQBAL; NASIR, 2015; SHAH et al., 2011; SULTANA; ARAYNE; IFTIKHAR, 2008) e por CLAE acoplada a detector de espectrometria de massas (MACHADO et al., 2015; SEGALIN et al., 2015). Matéria-prima e comprimidos foram determinados por CLAE (ASHFAQ et al., 2014; BADAWY et al., 2011; BELUDARI; PRAKASH; MOHAN, 2013; CHEN et al., 2014; GOMES et al., 2009; HAZRA; COUNCIL; SCI, 2016; LITVIĆ et al., 2013; MACHADO et al., 2015; NARAPUSETTI et al., 2014; RAJ et al., 2009; RAJENDRA, 2015; REDDY et al., 2011; SEGALIN et al., 2015; SREE JANARDHANAN; MANAVALAN; VALLIAPPAN, 2012; SULTANA, 2012; TALAY et al., 2015; TRIVEDI; PATEL, 2012)

Alguns trabalhos relatam a quantificação de rosuvastatina cálcica matéria-prima e na forma farmacêutica comprimidos, por espectrometria UV. (AFROZ, 2011; SANKAR, 2009; BINAL, 2012; SEVDA, 2011; GUPTA, 2009; UYAR, 2009; BORBA et al., 2013).

Na Farmacopeia Europeia há registro da monografia para matéria-prima, entretanto, nos demais compêndios oficiais não há registros de monografia para rosuvastatina cálcica nas formas farmacêuticas cápsula e comprimido (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2015).

2.4 POLIMORFISMO

Os fármacos ou insumos farmacêuticos ativos (IFAs) comercializados são frequentemente apresentados no estado sólido e compõem as formas farmacêuticas como comprimidos e cápsulas. No entanto, estes fármacos podem existir em várias formas sólidas, tais como polimorfos, pseudopolimorfos (solvatos e hidratos), sais, co-cristais e sólidos amorfos (BLAGDEN et al., 2007; DE ARAUJO et al., 2012; MORISSETTE et al., 2004)

O termo polimorfismo é definido como a propriedade que uma substância possui de existir no estado sólido em mais de um arranjo cristalino (MCCRONE, 1969). Na indústria farmacêutica atualmente, o termo polimorfismo é utilizado de maneira mais ampla, incluindo tanto as formas cristalinas quanto as formas amorfas (DE ARAUJO et al., 2012).

Os IFAs podem apresentar inúmeras formas no estado sólido (Figura 4), podendo exibir diferentes propriedades físico-químicas, tais como cor, morfologia, estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade. Dentre essas formas, destacam-se os polimorfos (IFAs com diferenças estruturais no empacotamento das redes cristalinas), os solvatos (moléculas de solventes ligam-se à superfície ou à rede do sólido por meio de interações intermoleculares com as IFAs), os sais (IFAs cristalizados com ácidos ou bases), os co-cristais (IFAs cristalizados com outras substâncias sólidas e neutras em condições ambientes, inclusive cristalizados com outros IFAs) e os amorfos (IFAs com arranjo de moléculas não organizadas) (LU; ROHANI, 2009; VAN EERDENBRUGH et al., 2014).

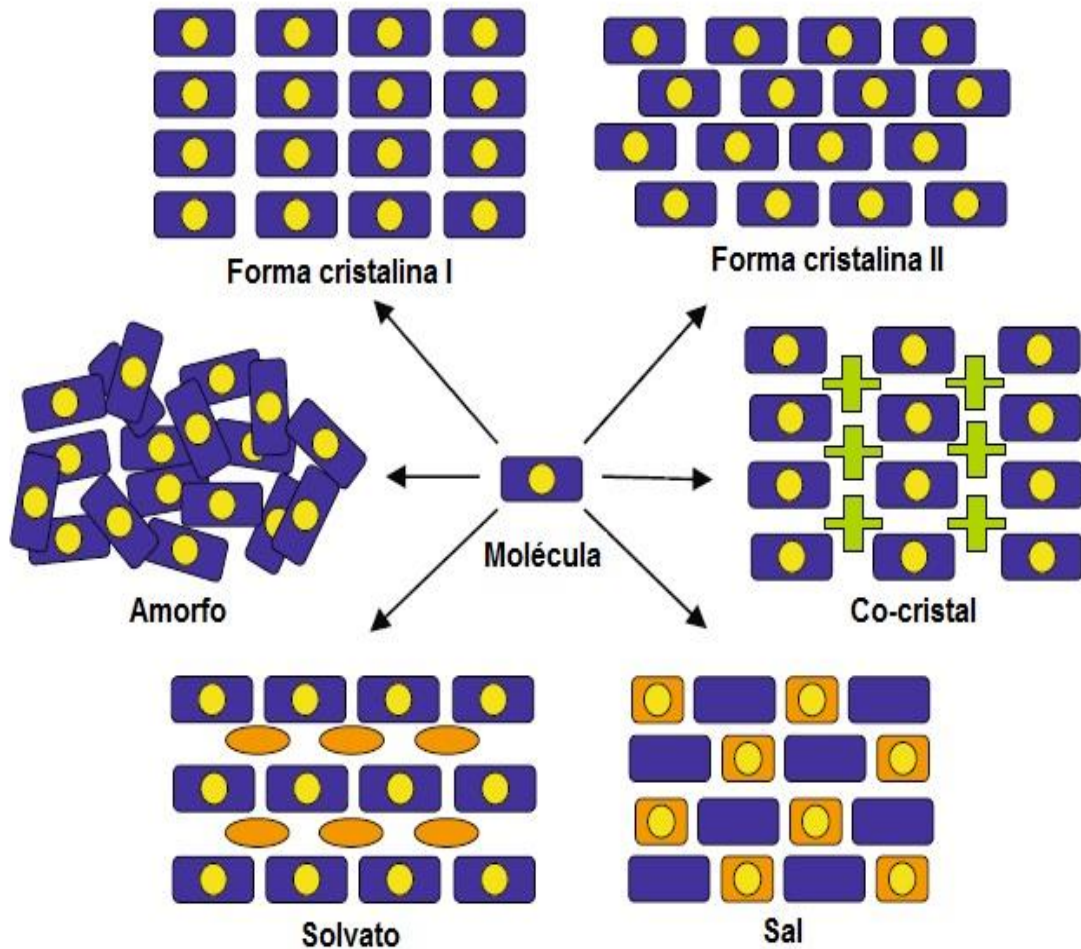


Figura 4 - Representação esquemática das formas sólidas de compostos farmacêuticos
 Fonte: Adaptado de Braga et al., 2009.

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) busca a classificação dos fármacos com base em sua solubilidade aquosa e permeabilidade através das membranas biológicas. Entre as quatro categorias do SCB estão os fármacos de classe I (alta solubilidade, permeabilidade elevada), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade) (AMIDON et al., 1995; PARR et al., 2016).

Dentre as moléculas candidatas a fármacos, muitas pertencem a classe II, III e IV do SCB, onde a biodisponibilidade pode ser limitada, ou pela solubilidade ou pela permeabilidade. Nesse sentido, a utilização de estratégias para aumentar a

biodisponibilidade como o emprego de co-solventes, complexação com ciclodextrinas, estratégias de pró-fármaco, redução no tamanho de partícula e a utilização do fármaco como sólido amorfo, podem ser inseridas. O estado amorfo apresenta uma maior solubilidade (maior energia livre), no entanto, um fator que deve ser levado em consideração é sua instabilidade que surge em função da variação na estabilidade termodinâmica relativa ao estado cristalino e uma maior mobilidade molecular, levando a taxas mais elevadas de degradação química e possibilidade de recristalização espontânea (NAGAPUDI; JONA, 2008; VAN EERDENBRUGH et al., 2014).

Algumas variações nas propriedades físico-químicas das formas polimorfas como estabilidade química, diferentes ponto de fusão, higroscopicidade, viscosidade, solubilidade, forma do cristal, alterações físicas durante a armazenagem, processamento do medicamento, podem ocasionar alterações do perfil de degradação, homogeneidade do fármaco, variações na ação farmacológica e na toxicidade (DE ARAUJO et al., 2012).

Na literatura são relatadas diferentes formas polimorfas de rosuvastatina cálcica, como a amorfa, cristalina, sais, solvatos e co-cristais, e dentre as principais formas cristalinas já descritas estão as formas A, B, B1, C, M, R, S, and TW1 (BLATTER, SCHAAF, SZELAGIEWICZ, 2006; BOOTH et al., 2009; NISHIGUCH, INAKOSHI, 2013; SAHADEVA et al, 2011; SETHI et al., 2010 SZELAGIEWICZ et al., 2012; TAYLOR, 1999).

2.5 ESTABILIDADE: ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

A estabilidade de produtos farmacêuticos refere-se à capacidade do produto ou matéria-prima em manter as mesmas condições e características, como identidade, potência e pureza, durante todo o período de estocagem e uso. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre a fabricação do produto até o momento em que sua potência está reduzida a não mais que 10%, desde que os

produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e com efeitos previamente relatados (SILVA et al., 2009; ROGE et al., 2013).

O monitoramento da estabilidade de medicamentos é a maneira mais eficaz para avaliar, prever e prevenir problemas relacionados à qualidade do produto durante seu tempo de validade. Além disso, a segurança e a eficácia dos fármacos podem ser avaliadas através do estudo de produtos de degradação, formados nos estudos de estabilidade, os quais, se presentes, podem gerar perda de atividade terapêutica ou aumento de toxicidade (BLESSY et al., 2014; SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, além de fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

O teste de degradação forçada, ou teste de estresse, é definido como ensaio de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas, mais ainda do que aquelas utilizadas para o estudo de estabilidade acelerada. Este teste mostra-se como uma tendência, dentro do planejamento, para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a pesquisa da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação, indicando tipos de adjuvantes e materiais de acondicionamento, que, provavelmente, contribuirão para manutenção da integridade do fármaco e do produto (BLESSY et al., 2014; MAGGIO; VIGNADUZZO; KAUFMAN, 2013; SILVA et al., 2009).

A realização dos testes de estresse indica, previamente, os possíveis produtos de degradação que podem ocorrer durante os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, auxiliando no estudo da seletividade, durante o desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade. Além disso, esses estudos são importantes, principalmente quando há pouca informação disponível quanto ao potencial de formação de produtos de degradação, ampliando os conhecimentos sobre o ingrediente ativo e a estabilidade do produto, durante a fase de desenvolvimento (ALCANTARA, 2013; REYNOLDS et al., 2002; BLESSY et al., 2014).

Estudos de degradação forçada estão descritos em diretrizes internacionais como o ICH e WHO (ICH, 2003; WHO, 2009). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a RDC nº 45, em 2012, a qual determina que os testes de degradação forçada de fármacos, os quais podem ser realizados em apenas um lote, em que devem incluir a avaliação dos efeitos de temperatura, umidade e luz, bem como susceptibilidade à oxidação e hidrólise em diferentes pHs. Entretanto, a legislação brasileira não descreve detalhes sobre a realização desses estudos, dando uma maior ênfase, apenas, ao estudo de fotodegradação. Nesta resolução, há exigência, para relatório de estudo de estabilidade, de informações sobre a quantificação de produtos de degradação ou justificativa técnica para a não realização, porém não há especificação em relação a notificação, identificação e qualificação destes produtos de degradação em medicamentos (BRASIL, 2012). Essa especificação só foi elaborada pela RDC 58/2013, a qual foi recentemente atualizada pela RDC 53/2015. Esta resolução estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento (BRASIL, 2013; BRASIL, 2015).

Para a determinação de produtos de degradação e impurezas não conhecidas, pode ser aplicada uma variedade de técnicas cromatográficas e espectrométricas, de forma isolada ou em combinação com outras técnicas. Quando um produto não conhecido é isolado, técnicas como Espectrometria de Massas (EM), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Infravermelho (IV) são frequentemente utilizadas para identificar grupamentos funcionais específicos (PILANIYA et al., 2010)

Um método indicativo de estabilidade é um procedimento analítico quantitativo utilizado na detecção de um fármaco livre de interferências como impurezas, excipientes e produtos de degradação. E de acordo com o FDA, um método indicativo de estabilidade é um procedimento analítico quantitativo e validado que pode ser utilizado para avaliar a estabilidade de fármacos e medicamentos. Durante estudos de estabilidade, a cromatografia líquida é utilizada, rotineiramente, para separar e

quantificar os analitos de interesse, no entanto, há necessidade de utilizá-la com detectores que assegurem a ausência de compostos que possam estar co-eluído com o analito de interesse, como os detectores de arranjo de diodo (DAD) e espectrômetro de massas (EM), confirmando dessa forma, a seletividade do método (MAGGIO; VIGNADUZZO; KAUFMAN, 2013; SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010).

2.6 SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

Amidon e seus colaboradores, em 1995 estabeleceram o Sistema de classificação biofarmacêutica, o qual é uma importante ferramenta para classificação de fármacos, caracterizando-os em quatro classes (Classe I, II, III e IV). Este sistema possui como fundamento que parâmetros como a solubilidade e a permeabilidade gastrointestinal são características específicas de cada fármaco (AMIDON et al., 1995; MARTINEZ; AMIDON, 2002).

A descrição das quatro classes que dividem os fármacos com suas características relacionadas a solubilidade e permeabilidade são:

Classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade): são fármacos rapidamente absorvidos e os fatores considerados limitantes é o processo de dissolução, quando este ocorre de maneira muito rápida e o esvaziamento gástrico (AMIDON et al., 1995; UNITED STATES, 2015).

Classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade): são fármacos em que a sua solubilização no trato gastrointestinal é o fator limitante, pois o conteúdo intestinal e a membrana luminal apresentam mudanças ao longo do intestino, e dessa forma, o perfil de dissolução determinará a concentração do fármaco por um período bem maior e a absorção ocorre em um período de tempo mais longo quando comparado aos fármacos de classe I (AMIDON et al., 1995; UNITED STATES, 2015).

Classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade): nesta classe o fator limitante da absorção é a permeabilidade. Nesse caso, tanto a velocidade e a extensão

da absorção podem apresentar grandes variações, devido a alterações na fisiologia do processo de permeabilidade relacionadas ao trânsito intestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana (AMIDON et al., 1995; UNITED STATES, 2015).

Classe IV (baixa solubilidade – baixa permeabilidade): são fármacos que possuem problemas para administração oral, em função da provável ocorrência de forma significativa, de problemas relacionados biodisponibilidade (AMIDON et al., 1995; UNITED STATES, 2015).

O SCB tem por objetivo oferecer uma ferramenta para regulamentar a substituição de estudos *in vivo* (estudos de biodisponibilidade e bioequivalência), por estudos *in vitro*. Esta substituição denominada de bioisenção, tem a finalidade de reduzir a exposição de voluntários em estudos clínicos e diminuir o tempo e custo no processo de desenvolvimento de fármacos e medicamentos com qualidade assegurada (LENNERNÄS; ABRAHAMSSON, 2005; STORPITIS; GAI, 2009).

Neste ano de 2016, muitos medicamentos perderam a proteção do registro de patente, entre eles está o Crestor[®] da Astra Zeneca. Os medicamentos referência passam a concorrer com produtos similares e genéricos que possuem o mesmo princípio ativo contido no medicamento referência com preço mais acessível. Uma demanda maior passa a ocorrer no registro destes novos medicamentos fabricados, e para o Brasil, a bioisenção proporcionaria benefícios tanto ao governo como aos pacientes, em relação a maior acessibilidade ao tratamento medicamentoso (ARRUNÁTEGUI et al., 2015).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na RDC nº 37 utiliza o SCB para permitir a bioisenção de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata de fármacos com elevada solubilidade e permeabilidade (classe I) (BRASIL, 2011). A Food and Drug Administration (FDA) e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) consideram bioisentos fármacos de classe I e ainda, fármacos de classe III, quando estes apresentam dissolução muito rápida (85% em 15 minutos). A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera como bioisentos além dos fármacos classe I e classe III, os fármacos classe II que apresentem características de ser um ácido fraco,

e cumpram na faixa de 250 mL ou menos, o requisito de solubilidade em pH 6,8 (UNITED STATES, 2015; DEZANI et al., 2013; EMEA, 2010; WHO, 2005).

É recomendado pelas agências reguladoras para a bioisenção os testes de solubilidade e permeabilidade para classificação do fármaco entre as diferentes classes do SCB. Com relação aos métodos mais indicados para o estudos de solubilidade, está o método de equilíbrio que emprega a técnica do *shake-flask*, métodos potenciométricos, dissolução intrínseca e de diagrama de fases, sendo a técnica do *shake flask* a mais recomendada pelo FDA (BRASIL, 2011; EMEA, 2010; ISSA; FERRAZ, 2011; UNITED STATES, 2015).

Para a determinação dos estudos de permeabilidade de fármacos, são empregados os métodos de perfusão intestinal *in vivo* ou *in situ*, estudos de permeação *in vitro* utilizando membranas artificiais, cultura de monocamadas de células epiteliais e o método *ex vivo*, onde é utilizado segmento intestinal de animal, isolado e contido em equipamento adequado (ARRUNÁTEGUI et al., 2015; UNITED STATES, 2015; DEZANI et al., 2013).

A solubilidade dos fármacos é uma propriedade importante para a absorção de medicamentos administrados por via oral e depende da dissolução da forma farmacêutica para que então ocorra a permeação através da membrana biológica e o fármaco atinja a circulação sistêmica para realizar a ação farmacológica (ARRUNÁTEGUI et al., 2015; COOK; ADDICKS; WU, 2008; DEZANI et al., 2013).

O método considerado padrão na determinação da solubilidade é o método do equilíbrio empregando a técnica *shake-flask*, onde é adicionado uma quantidade de fármaco em soluções com diferentes valores de pH, até atingir a saturação, a qual é indicada pelo excesso do fármaco precipitado no fundo do frasco. Esta suspensão resultante é agitada a uma temperatura predeterminada durante um tempo definido, para em seguida, serem filtradas e sua concentração determinada (BERGSTRÖM et al., 2014; DEZANI et al., 2013; GLOMME; MÄRZ; DRESSMAN, 2005).

Segundo as agências reguladoras, a faixa de pH avaliada na solubilidade é de 1,2 a 6,8, e o fármaco será considerado altamente solúvel se sua maior dose administrada como uma formulação de liberação imediata solubilizar-se em um volume

de 250 mL. A escolha do volume de 250 mL leva em consideração que nos protocolos de bioequivalência que a administração de um medicamento é com um copo de água. Na Resolução n^o 37, ainda é mencionado que no mínimo três condições de pH (1,2; 4,5 e 6,8) em triplicata devem ser estudadas (BRASIL, 2011; UNITED STATES, 2015; EMEA, 2010; WHO, 2005).

2.7 TESTE DE DISSOLUÇÃO

Os testes de dissolução *in vitro* representam uma ferramenta de grande importância na indústria farmacêutica, sendo um teste oficial utilizado pelas farmacopéias na avaliação da liberação dos fármacos a partir das formas farmacêuticas sólidas (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; TAJIRI et al., 2015).

Nos estudos para desenvolvimento de novas formulações o teste de dissolução é capaz de estimar a liberação do fármaco *in vitro* e sua biodisponibilidade *in vivo*, considerando que estudos clínicos são limitados nas fases de desenvolvimento e pré-formulação além de apresentar menor custo. Com relação ao controle de qualidade, o objetivo deste ensaio está em confirmar a homogeneidade dos lotes, avaliar desvios de fabricação e demonstrar que a fabricação está de acordo com as especificações, assegurando a qualidade do produto (AZARMI; ROA; LÖBENBERG, 2007; GAO, 2016).

Na atual realidade das indústrias farmacêuticas, o ensaio de dissolução possui um papel significativo com relação a alterações pós-registro, envolvendo mudanças na formulação, equipamento, processo produtivo e local de produção, de forma a fornecer justificativas técnicas que comprovem que a realização de ensaios envolvendo seres humanos são irrelevantes, em função de custos e problemas éticos (MARCOLONGO, 2003; TAJIRI et al., 2015).

Para desenvolver um método de dissolução, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a solubilidade, permeabilidade, características

farmacocinéticas do fármaco e peculiaridades relacionadas a formulação. Quando o teste de dissolução não está disponível na monografia, é recomendado que três meios de dissolução diferentes, em uma faixa de pH 1,2 a 6,8, sejam utilizados na comparação de perfis de dissolução do fármaco. Recomenda-se que o ensaio deva ocorrer em condições *sink*, condição definida como o volume do meio ser no mínimo três vezes maior que aquele exigido para formar uma solução saturada do fármaco, com o objetivo de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada pela aproximação da concentração de saturação durante o ensaio (BRASIL, 2010; MALESUIK et al., 2006; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002; MARCOLONGO, 2003; USP 38, 2015).

O volume de meio de dissolução para a realização do ensaio pode variar de 500 até 1000 mL, a temperatura do meio deve ser mantida constante a 37 °C durante todo o teste, o equipamento de realização do ensaio deve estar qualificado, sendo de grande importância a determinação de qual aparato utilizar, sendo cesta ou pá para formas de liberação imediata, definindo assim, um método que permita poder discriminatório máximo para detectar desvios nos padrões de qualidade dos medicamentos avaliados (BRASIL, 2010; UNITED, 2015).

Muitos fatores podem modificar os resultados de um ensaio de dissolução e devem ser levados em consideração para que sejam obtidos resultados confiáveis. Dentre os principais fatores temos aqueles relacionados com o meio de dissolução como o volume, presença de ar ou gases, pH, evaporação do meio, temperatura, viscosidade e tensoativo, os relacionados ao equipamento, como vibração do sistema, velocidade de agitação, posição da haste, posição e método de amostragem e dispositivos para formas farmacêuticas que flutuam e os relacionados ao fármaco e formulação, como a solubilidade, tamanho da partícula e natureza química (MARCOLONGO, 2003; UNITED, 2015).

2.7.1 Meios biorrelevantes

A composição do meio de dissolução vem ganhando importância em relação a utilização de meios biorrelevantes, definidos como meios de dissolução que apresentam composição e características mais próximas aos fluidos do ambiente gastrointestinal, principalmente aqueles que incluem em sua composição conteúdo que simule o TGI após a alimentação (BHAGAT et al., 2014; KLEIN, 2010).

A taxa de absorção de fármacos é muitas vezes mais lenta após a administração de formas farmacêuticas sólidas com a ingestão de alimentos quando comparadas com as condições de jejum, refletindo no perfil de concentração plasmática do fármaco. Assim, é importante conhecer quais os processos relacionados a alimentação que podem comprometer a eficácia do medicamento e conseqüentemente resultar em uma biodisponibilidade significativamente reduzida (ABRAHAMSSON et al., 2004). Dentre as principais interações e mecanismos envolvidos na interferência dos alimentos com a eficácia do fármaco estão o aumento da viscosidade que pode afetar desintegração e dissolução do fármaco tanto *in vitro* como *in vivo*, em decorrência da formação de um filme sobre a superfície do comprimido ou cápsula, precipitação de componentes alimentares, reduzindo a capacidade de penetração do meio dissolvente na matriz sólida, e ainda, complexação fármaco-alimento, diminuição da difusão do fármaco dissolvido, redução do fluxo de fluido do TGI e diminuição da taxa de esvaziamento gástrico (LI et al., 2007).

Segundo o Centro Avaliação e Pesquisa de Fármacos do FDA que aprovou em 28/02/2012 a revisão relacionada ao medicamento referência Crestor[®], consta que este medicamento pode ser administrado com ou sem alimentos (UNITED STATES, 2012). No entanto, há estudos que relatam que a rosuvastatina cálcica administrada com alimentos apresenta uma redução na concentração plasmática deste fármaco em voluntários saudáveis analisados (LI et al., 2007) e ainda, outro estudo realizado em cães que relata que este fármaco apresenta concentração plasmática inferior quando é administrado com alimentos (BAEK; KWON; KIM, 2013). Dessa forma, analisar

rosuvastatina cálcica frente a meios biorrelevantes é de grande importância para avaliar se a liberação deste fármaco pode estar sendo alterada na presença de um meio que contenha carboidratos, lipídeos e proteínas, o qual simule o estado alimentado.

2.8 VALIDAÇÃO

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação (RIBEIRO et al., 2008; GEETHA et al., 2012).

É cada vez mais reconhecida e exigida a necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer o processo de validação (RIBANI et al., 2004; GEETHA et al., 2012).

Para assegurar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados de um método analítico devem ser seguidas todas as etapas necessárias do processo de validação. A validação de um método desenvolvido, ou mesmo, a validação de modificações de ajuste de métodos já publicados, mesmo os oficiais, envolve uma etapa crítica que é o julgamento do nível de validação necessário conforme o objetivo a que se destina o método analítico (PASCHOAL et al., 2008)

O conceito do termo validação foi utilizado em análises, na química analítica, a fim de assegurar dados confiáveis de serem utilizados na descoberta, desenvolvimento e fabricação de produtos farmacêuticos. Atualmente, os dados analíticos também são usados na seleção de fármacos em potencial, no desenvolvimento de sua síntese, nos

estudos de formulações, no monitoramento da estabilidade de fármacos e nos testes de produtos acabados para comercialização (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2013).

Validar um método analítico é demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e tem recebido considerável atenção na literatura. A determinação das características de desempenho do método é somente uma parte do processo e os critérios de aceitação são baseados no uso intencional do método. É recomendado que o planejamento e a execução da validação de método siga um plano mestre de validação (BARROS, 2002; GEETHA et al., 2012).

A validação de métodos analíticos comprova, através de evidências objetivas que requisitos para uma determinada aplicação ou uso específico são atendidos. Pode ser definida como o processo que confere validade a um método analítico, instrumento ou equipamento, cujas especificações são aceitas como corretas, conferindo confiabilidade aos resultados obtidos (SILVA; ALVES, 2006).

Estabelecer um bom procedimento de validação requer a realização de um número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas, o que é um desafio na rotina de um laboratório devido às restrições de tempo, custo e potencial instrumental (RIBEIRO et al., 2008).

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos regulatórios do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às exigências regulatórias evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2003).

A validação do método analítico deve ser documentada e os procedimentos devem ser claros, objetivos e completos. A documentação consiste do plano mestre, protocolo, planilhas de dados e relatório. O plano mestre de validação é o documento

estratégico e contém o cronograma de atividades e responsabilidades pelo desempenho das tarefas inclusive elaboração, revisão e aprovação dos documentos (BARROS, 2002).

Órgãos como ICH (International Conference on Harmonization), IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), ISO (International Standard Organization), ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), INMETRO (Instituto Internacional de Metrologia) e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental no credenciamento para a qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (ICH, 2005; IUPAC, 2002; INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 2005; BRASIL, 2003; INMETRO, 2011).

Não há um procedimento normalizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação. É importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO. Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, como a Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA e o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO, (revisão 4), de julho/2011 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

A Resolução RE nº 899, de 29/05/2003 determina que a validação deva garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2003).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo consiste no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa, e liberação de rosuvastatina cálcica nas formas farmacêuticas comprimido e cápsula, além de avaliar a influência do polimorfismo na molécula do fármaco.

Os objetivos específicos são:

- Caracterizar o fármaco através da determinação do ponto de fusão, espectrofotometria na região ultravioleta (UV) e infravermelho (IV) e análises térmicas (DSC e TG).
- Desenvolver e validar método analítico para quantificação de rosuvastatina cálcica nas formas farmacêuticas comprimido e cápsula, utilizando a espectrofotometria no UV e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Desenvolver e validar ensaio de dissolução *in vitro* para comprimido e cápsula considerando os valores de pH do TGI.
- Avaliar a liberação da rosuvastatina comprimido e cápsula, em meios biorrelevantes contendo proteínas, carboidratos e lipídeos.
- Aplicar o ensaio de dissolução *in vitro* para estudo de equivalência farmacêutica de medicamento similar comparado ao medicamento referência Crestor[®].
- Realizar análise comparativa dos métodos quantitativos desenvolvidos e validados para análise de rosuvastatina cálcica em comprimido e cápsula.
- Avaliar a possível influência do polimorfismo na molécula do fármaco utilizando-se técnicas de difração de raios X, análises térmicas (DSC e TG), infravermelho, estudos de solubilidade e dissolução.

- Avaliar a estabilidade preliminar do fármaco frente à degradação ácida, básica, oxidativa, térmica e fotolítica, com posterior caracterização dos produtos de degradação e análise de comprimidos com prazo de validade expirado.
- Desenvolver e validar método analítico indicativo de estabilidade para quantificação de rosuvastatina cálcica na presença de impurezas, excipientes e produtos de degradação.
- Elaborar monografia farmacopeica para as formas farmacêuticas em comprimido e cápsula.

4 MATERIAS E MÉTODOS

Estão descritos a seguir todos os materiais e métodos que foram empregados no desenvolvimento deste trabalho.

4.1 SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA, PADRÃO DE TRABALHO E MEDICAMENTOS

Foram utilizados como padrão de referência de rosuvastatina cálcica Sigma-Aldrich, teor declarado de 99,8% (Saint Louis, MO, USA) e rosuvastatina cálcica padrão de trabalho (teor declarado de 101,43%, lote: ALL 5199 e fornecedor: All chemistry).

Foram utilizados medicamentos referência e medicamentos similares no desenvolvimento e aplicação dos métodos desenvolvidos.

O medicamento referência utilizado foi o comprimido Crestor[®] 20 mg (lactose mono-hidratada, celulose microcristalina, fosfato de cálcio tribásico, crospovidona, estearato de magnésio, hipromelose, triacetina, dióxido de titânio e férrico vermelho), fabricado pela Astra Zeneca e três medicamentos similares utilizados na forma farmacêutica comprimidos de 20 mg, codificados como S1, S2 e S3.

Foram empregados também medicamentos na forma farmacêutica comprimidos com prazo de validade expirado, codificados como P1, P2, P3 e P4.

Neste estudo foram avaliadas oito formulações de cápsulas, onde três formulações foram adquiridas no comércio local, codificadas como A, B e C e cinco formulações foram manipuladas no laboratório de Tecnologia Farmacêutica (UNIFAL-MG), codificadas como D, E, F, G e H, descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente

Tabela 1 - Composição das formulações de rosuvastatina cálcica cápsulas, obtidas do comércio local.

Excipientes	% Excipientes nas formulações		
	Formulações		
	A	B	C
Dióxido de silício coloidal	1,0	2,5	-
Talco	5,0	7,5	-
Amido	74	81,5	-
Estearato de magnésio	-	1,0	-
Carbonato de magnésio	10	7,5	-
Celulose microcristalina	10	-	-
Celulomax E [®] , ^a	-	-	100

Fonte: Da autora

Nota: ^aMistura comercial de excipientes composta por celulose microcristalina, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico e croscarmelose sódica (superdesintegrante).

Tabela 2 - Composição das formulações de rosuvastatina cálcica (forma amorfa e cristalina), manipuladas no laboratório de Tecnologia Farmacêutica.

Excipientes	% Excipientes nas formulações				
	Formulações				
	D ^a	E	F	G	H
Dióxido de silício coloidal	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Talco	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Amido	80,0	80,0	90,0	87,5	85,0
Estearato de magnésio	-	-	-	2,5	5,0
Carbonato de magnésio	10	10	-	-	-

Fonte: Da autora

Nota: ^a Preparado com a forma cristalina M

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes e reagentes de grau analítico (PA) e grau UV/HPLC utilizados neste trabalho, estão citados abaixo.

- Acetato de sódio, Cinética (Jandira, SP, Brasil).
- Acetonitrila, Panreac (Londrina, PR, Brasil).
- Ácido acético, Synth (Diadema, SP, Brasil).
- Ácido clorídrico, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Ácido fórmico, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Ácido (orto) fosfórico 85% Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Água ultra pura, sistema Millipore Milli-Q
- Fosfato de potássio monobásico, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Hidróxido de sódio, grau P. A, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Lauril sulfato de sódio, Proquímios (Bangu, RJ, Brasil).
- Metanol, Panreac (Londrina, PR, Brasil) e Dinâmica (Diadema, SP, Brasil).
- Peróxido de hidrogênio, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Sulfato cúprico, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).
- Trietilamina, Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil).

4.3 EQUIPAMENTOS

- Aparelho de ultrassom Unique, modelo USC 2800 A (Indaiatuba, SP, Brasil).
- Balança analítica Marte[®], modelo AY 220 (São Paulo, SP, Brasil) e balança analítica Acculab[®], modelo ALC 210.4 (São Paulo, SP, Brasil)
- Bomba de vácuo Nova técnica, modelo NT 613 (Diadema, SP, Brasil).

- Aparelho de ponto de fusão Gehaka, modelo PF1500 (São Paulo, SP, Brasil).
- Calorímetro Exploratório Diferencial - DSC - modelo Q20 - marca TA - Instruments (Barueri, SP, Brasil).
- Calorímetro Exploratório Diferencial - DSC - modelo 3500 Sirius - marca NETZSCH-Geratebau GmbH - Instruments (Selb, Alemanha).
- Centrífuga Celm, modelo LS-3 PLUS (São Caetano do Sul, SP, Brasil).
- Colunas cromatográficas Promosil Agela Technologies C₁₈, 150 mm, 4,6 mm, 5 µm (lote: P951L0513 e lote: P9510515CL0161), (Wilmington, DE, USA).
- Coluna cromatográfica Agilent Technologies C₁₈, 250 mm, 4,0 mm, 5 µm (Barueri, SP, Brasil).
- Coluna cromatográfica C₈ Agilent Technologies C₈, 50 mm, 4,6 mm, 5 µm (Barueri, SP, Brasil).
- Desintegrador Nova ética, modelo 3013 (Vargem Grande paulista, SP, Brasil).
- Difratorômetro de raios X de pó Rigaku® modelo Ultima IV (tipo II) (Tóquio, Japão)
- Dissolutores Electrolab® modelos TDT-08 L e EDT-08LX (n=8), com *sinkers* (Mumbai, Maharashtra, India).
- Durômetro Nova ética, modelo 298 AATS (Vargem Grande paulista, SP, Brasil).
- Espectrofotômetro na região do infravermelho por transformada de Fourier IV-FT Shimadzu®, modelo Affinity-1 (Tóquio, Japão) acoplado à um acessório de amostragem por refletância total atenuada Pike Miracle® com cristais de ZnSe Pike Technologies® (Madison, Wisconsin, EUA);
- Espectrofotômetro na região do UV/Vis Shimadzu®, modelo UV-1601 PC (Quioto, Japão);
- Espectrofotômetro na região do UV/Vis Shimadzu®, modelo UV-1601 PC (Quioto, Japão);
- Estufa Ethiktechnology, modelo 400-2 ND (Piracicaba, São Paulo, Brasil).
- Friabilômetro Nova Ética, modelo 300-1 (Vargem Grande paulista, SP, Brasil).
- Mesa Agitadora MARCONI, modelo MA420 (Piracicaba, São Paulo, Brasil).
- Mesa agitadora Solab® modelo SL180 DT (Piracicaba, São Paulo, Brasil).

- Medidor de pH Marconi[®], modelo PA 200 (Piracicaba, SP, Brasil);
- Peneiras para análise granulométrica BerTel[®], com aberturas de 106 mm/μm e 75 mm/μm (Caieiras, Sp, Brasil);
- Sistemas de cromatografia a líquido LC-10A HPLC da Shimadzu (Kyoto, Japan), com bomba, LC-20AD, forno CTO 20-A, degaseificador DGU-20^a, detector DAD a SPD-MD20A, injetor automático SIL-20-AC HT e controlador CBM-20^a.
- Sistemas de cromatografia a líquido LC-MS 8030 UPLC equipado com um analisador de massas triplo quadrupolo, com bomba LC-20AD, injetor automático SIL-20 AHT e detector UV SPD-10AVP da Shimadzu[®] (Kyoto, Japan).
- Sistema de purificação de água Gehaka[®], modelo osmose reversa 10 LTH (São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Sistema de purificação de água Millipore[®], modelo Direct-Q[®] 5 (São Paulo, São Paulo, Brasil).
- Termobalança SII Nano Technology[®], modelo TG/DTA-7300 (Tóquio, Japão)

4.4 RECRISTALIZAÇÃO DE ROSUVASTATINA CÁLCICA

Para obtenção da forma cristalina a ser avaliada neste estudo foi adicionado cerca de 1,5 g de matéria-prima em uma mistura de solvente acetonitrila e água na proporção de 1:1 (30 mL), a qual foi aquecida na temperatura de 40 °C até completa solubilização. A mistura foi resfriada até 15 °C e submetida à agitação por cerca de 28 horas. Após a observação da precipitação, o produto cristalino foi separado por filtração e seco a 50 °C. O método de recristalização citado foi adaptado da patente WO 2000042024 A1 (TAYLOR, 1999).

4.5 CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA E FORMA RECRISTALIZADA

A seguir estão descritos todos os métodos empregados para caracterizar e identificar a matéria-prima e a forma recristalizada.

4.5.1 Determinação do ponto de fusão

O ponto ou intervalo de fusão é uma avaliação físico-química útil na identificação de fármacos, pois várias substâncias apresentam ponto/faixa de fusão característicos e a presença de qualquer impureza altera o resultado (KOGAWA; SALAGADO, 2013).

As determinações do ponto de fusão da rosuvastatina cálcica e da forma recristalizada, foram realizados por compactação da amostra em tubo capilar com diâmetro de 1 mm e 6 cm de comprimento, através do método capilar, em aparelho de ponto de fusão Gehaka 1500. Preencheu-se, até cerca de 3,0 mm de altura, um tubo capilar vidro com uma das extremidades selada. Quando a temperatura atingiu 10°C abaixo do início da fusão, reduz-se a velocidade de aquecimento para cerca de 1 °C min⁻¹, como descrito na FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010. Os capilares foram colocados na célula de aquecimento do equipamento e procedeu-se a observação da fusão do pó, onde as temperaturas correspondentes foram registradas.

4.5.2 Espectrofotometria no ultravioleta

Os espectros de absorção na região de ultravioleta visando a identificação da matéria-prima foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro de duplo-feixe UV/VIS

Shimadzu e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A leitura foi realizada entre 400 e 200 nm. Foram preparadas soluções de rosuvastatina cálcica, padrão de referência e padrão de trabalho, em metanol (conforme o método desenvolvido no item 4.2.4), na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.5.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho com refletância total atenuada

Os espectros de absorção na região do infravermelho visam ao reconhecimento de grupos funcionais da molécula, auxiliando na caracterização e identificação de substâncias. O espectro de absorção no IV foi obtido em espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier composto com acessório de refletância total atenuada. A amostra, sem prévio tratamento, foi colocada sobre o cristal de reflexão e os dados foram coletados na região do infravermelho entre $4000\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$, à temperatura ambiente.

4.5.4 Análises por difração de raios-X

A amostra de rosuvastatina cálcica, padrão de trabalho, foi caracterizada utilizando um difratômetro Ultima IV da marca Rigaku, do Laboratório de Cristalografia da UNIFAL, radiação monocromática em tubo selado de grafite por filtro de Cu ($K\alpha$ Cu, $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$); varreduras no intervalo de 3 à $35^\circ 2\theta$, à temperatura ambiente, com passo ótico de $0,02$ em 2θ , corrente de 30 mA , tensão de 40 kV , velocidade de varredura de $1^\circ 2\theta/\text{min}$.

4.5.5 Análises térmicas (DSC e TG)

As análises de DSC e TG foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Química (LabiQ-UNIFAL) e Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos (LACFar-UNIFAL), respectivamente. A análise de DSC foi realizada no Calorímetro Exploratório Diferencial - DSC - modelo Q20-marca TA-Instruments, em cadinho de alumínio fechado, temperatura de 30 a 300 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL min⁻¹ e a análise de TG foi realizada na Termobalança, modelo TG 7300, em cadinho de alumínio aberto, temperatura de 30 a 300°C com taxa de aquecimento 10°C min⁻¹ e fluxo de nitrogênio de 50 mL min⁻¹. Foram empregados cerca de 3 mg de matéria-prima e forma recristalizada em ambas as análises.

4.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO ULTRAVIOLETA PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA

A seguir estão descritos os preparos de soluções e as condições de desenvolvimento e validação do método por espectrofotometria na região ultravioleta para rosuvastatina cálcica.

4.6.1 Preparo da solução de excipientes

Cada placebo (cápsulas e comprimidos) foi pesado de acordo com o peso médio de cada forma farmacêutica e transferidos para balões de 50 mL. Para cada preparação foram adicionados cerca de 30 mL de metanol e levados ao banho de ultrassom por 2 minutos. Os volumes foram ajustados com metanol, filtrados e logo em seguida alíquota de 0,5 mL de cada solução foi transferida para balões volumétricos de

10 mL e diluídas com os diferentes solventes (ácido clorídrico (0,1 M), hidróxido de sódio (0,1 M), água, metanol e diluente (metanol: água, 65:35, v/v)) para avaliar o solvente mais adequado para a 2ª diluição, e em seguida realizar a análise por espectrofotometria.

4.6.2 Preparo da solução padrão

Foram pesados o equivalente a 10 mg de rosuvastatina padrão de trabalho, os quais foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados cerca de 30 mL de metanol e levado ao banho de ultrassom para solubilização durante 2 minutos. O volume foi ajustado para 50 mL, filtrado e em seguida, diferentes volumes da solução de trabalho foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, para obtenção de diferentes níveis de concentração, seguida de análise por espectrofotometria.

4.6.3 Preparo das soluções amostras

Foram pesados o equivalente a 10 mg de rosuvastatina, a partir das amostras de cápsulas e comprimidos, os quais foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL, onde foram adicionados 30 mL de metanol, e levadas ao banho de ultrassom por 2 minutos. O volume foi completado para 50 mL, filtrados e em seguida, alíquota de 0,5 mL de cada solução foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com metanol, para posterior análise por espectrofotometria.

4.6.4 Validação do método de espectrofotometria na região UV

A validação do método espectrofotométrico foi embasada em critérios estabelecidos pelo ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003), através da determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez. A formulação E descrita na Tabela 2 (item 4.1) e o medicamento Crestor[®] foram empregados para os ensaios de validação.

4.6.4.1 Seletividade e determinação do comprimento de onda

Foi realizada uma pesquisa na literatura e constatou-se que o metanol foi o solvente mais utilizado no preparo das soluções. Com base nessa informação, as soluções de excipientes cápsula e comprimido foram preparadas com metanol (solvente para a 1ª diluição) e outros solventes de 2ª diluição (ácido clorídrico (0,1 M), hidróxido de sódio (0,1 M), diluente (metanol: água, (65:35, v/v)), água, metanol) para avaliação da seletividade. Com base nos resultados obtidos neste ensaio, foi preparada uma solução padrão de rosuvastatina cálcica no solvente selecionado para determinação do comprimento de onda.

4.6.4.2 Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas analíticas obtidas em 3 dias consecutivos, com 5 concentrações em triplicata no intervalo de 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (4, 7, 10, 13 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A partir das três curvas obtidas,

determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) pelo método dos mínimos quadrados.

4.6.4.3 Precisão

O teste de precisão foi realizado em relação a repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por análise no mesmo dia de soluções de padrão contendo 4, 10 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rosuvastatina e a precisão intermediária foi avaliada por repetição dos ensaios em dois dias diferentes. As soluções de cada concentração foram preparadas em triplicata e os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR).

4.6.4.4 Exatidão

Para o preparo da solução padrão foram pesados o equivalente a 10 mg de rosuvastatina padrão de trabalho, os quais foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, com adição de aproximadamente 30 mL de metanol e levados ao ultrassom por 2 minutos para solubilização. Seguido de ajuste de volume com o mesmo solvente, filtração e posterior análise.

Para o preparo das soluções placebo, foram pesados o equivalente a 10 mg da mistura de excipientes (conforme peso médio dos comprimidos e cápsulas), as quais foram solubilizados em cerca de 30 mL de metanol e levadas ao ultrassom por 2 minutos. O volume foi ajustado para 50 mL e as soluções filtradas. Em seguida, procederam-se as adições de padrão nas soluções placebo, conforme tabela 3:

Tabela 3 - Soluções de padrão e amostra de placebo de cápsulas ou comprimidos em metanol, utilizadas no ensaio de exatidão.

Amostras	Volume de solução padrão (μL)	Volume de solução placebo (cápsulas ou comprimidos (μL))	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1*	400	400	8,0
2*	500	500	10,0
3*	600	600	12,0

Nota: *n=3.

Volumes descritos na tabela 1 foram adicionados em balão de 10 mL e seu volume foi ajustado com metanol para obtenção das concentrações de 8,0, 10,0 e 12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Foram realizadas as leituras das soluções em espectrofotômetro no comprimento de onda de 242 nm.

A porcentagem de recuperação foi calculada em cada uma das amostras adicionadas de padrão. O critério de aceitação foi obter uma recuperação entre 98,0% e 102,0%.

4.6.4.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados pelas equações:

$$(1)LD = (DP \times 3)/IC \text{ e } (2) LQ = (DP \times 10)/IC,$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto e IC é a inclinação média, das três curvas analíticas no estudo da linearidade.

4.6.4.6 Robustez

A solução padrão de trabalho e as soluções amostras de cápsulas e comprimidos foram preparadas na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, para avaliação dos diferentes parâmetros descritos na tabela 4.

Foram realizadas as leituras das soluções em espectrofotômetro, onde as análises foram realizadas em triplicata e o teste t de Student foi utilizado para determinar se as variações produziram alterações significativas nos resultados ($p = 0,05$).

Tabela 4 - Parâmetros avaliados no ensaio de robustez por espectrofotometria.

Amostras	Parâmetro	Condição normal	Condição alterada
1	Comprimento de onda	242 nm	241 – 243 nm
2	Marca de solvente	Dinâmica	Panreac
3	Equipamento	UV 1601 PC Shimadzu	UV 2401 PC Shimadzu

4.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA POR CLAE- UV/DAD

A seguir estão descritos os preparos de soluções e as condições de desenvolvimento e validação do método cromatográfico indicativo de estabilidade para rosuvastatina cálcica por CLAE-UV/DAD.

4.7.1 Condições cromatográficas

Foram testadas diferentes condições, utilizando a CLAE para adequação do sistema, onde foram empregadas colunas cromatográficas C₁₈ de diferentes especificações, diferentes composições, proporções e vazão de fase móvel, e ainda variação com relação a temperatura da coluna, com otimização para as seguintes condições cromatográfica: Coluna C₁₈ (15 cm x 4,6 mm), 5 µm, fase móvel contendo metanol e água com pH =3,0, (ajustada com ácido fosfórico) a 65:35, v/v, vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C e comprimento de onda de 241 nm.

4.7.2 Preparo da solução padrão

Foram pesados o equivalente a 10 mg de rosuvastatina padrão de trabalho e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se aproximadamente, cerca de 7 mL de metanol e levou a banho de ultrassom por 2 minutos. O volume foi ajustado, obtendo-se uma solução estoque amostra 1 mg mL⁻¹. Uma solução intermediária a 100 µg mL⁻¹ com diluente metanol: água (65:35) foi preparada.

A partir da solução intermediária a 100 µg mL⁻¹ foram preparadas as demais soluções em diferentes níveis de concentração para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, usando a proporção metanol: água (65:35) como diluente.

4.7.3 Preparo da solução placebo

O placebo de comprimidos foi preparado com base na composição de excipientes utilizada pelo medicamento referência, em concentrações citadas na

literatura, com exceção da triacetina (agente plastificante), em função de sua indisponibilidade. Assim foram utilizados um preparo da mistura de 10 g de excipientes adaptado da literatura, contendo 1,2 g de lactose, 5,0 g de celulose microcristalina, 1,3 g de fosfato de cálcio tribásico, 0,7 g de crospovidona, 0,6 g de esterato de magnésio, 0,8 g de hipromelose, 0,1 g de dióxido de titânio e 0,3 g de óxido de ferro (TEJERINA, 2011). O placebo de cápsulas avaliado na seletividade foi obtido pela mistura dos excipientes da formulação E, a qual continha 80 % de amido, 10 % de carbonato de magnésio, 7,5 % de talco e 2,5 % de dióxido de silício coloidal. As misturas de placebo foram pesadas de acordo com o peso médio da forma farmacêutica e transferidas para um balão de 10 mL. Adicionou-se aproximadamente, cerca de 7 mL de metanol e levou ao banho de ultrassom por 2 minutos. Posteriormente houve o ajuste de volume, filtração e diluições realizadas de maneira similar ao preparo das amostras de cápsulas e comprimidos (item 4.7.4), para posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

4.7.4 Preparo das soluções amostra

Foram pesadas, individualmente, vinte cápsulas de cada formulação de rosuvastatina cálcica e seu conteúdo foi removido segundo critérios da Farmacopeia Brasileira, 2010. O invólucro foi novamente pesado, e o peso do conteúdo de cada cápsula foi obtido subtraindo-se o peso inicial do peso das cápsulas vazias. Valores equivalentes a 10 mg de cada formulação foram pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL, adicionou-se alíquota de, aproximadamente, 7 mL de metanol e levou-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. O volume foi ajustado com metanol, obtendo-se uma solução estoque amostra de 1 mg mL^{-1} .

Foram pesados, individualmente, vinte comprimidos da marca Crestor[®] de rosuvastatina cálcica e determinou-se o peso médio. Estes comprimidos foram triturados e do pó resultante, foram pesados o equivalente a 10 mg de rosuvastatina

que foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, adicionando-se aproximadamente 7 mL de metanol e levou-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. O volume foi completado com metanol, obtendo-se uma solução estoque amostra de 1 mg mL⁻¹.

As soluções estoques (cápsula e comprimido a 1 mg mL⁻¹) foram diluídas com metanol: água (65:35), resultando em uma solução intermediária de 100 µg mL⁻¹ e a partir das soluções intermediárias foram preparadas as demais soluções em diferentes níveis de concentração para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o mesmo diluente.

4.7.5 Estudo de degradação forçada

Para o estudo de degradação, foi utilizada uma solução padrão de 100 µg mL⁻¹, preparada conforme item 4.7.2.

O perfil de degradação forçada de rosuvastatina cálcica foi estudado sob várias condições como descrito abaixo.

Hidrólise ácida e alcalina: Foram adicionados em balão volumétrico de 10 mL, 2 mL de solução padrão (100 µg mL⁻¹), 3 mL de metanol, 1 mL de HCl 1 M/ HCl 0,1M e 1 mL de NaOH 1M (para a hidrólise ácida e alcalina, respectivamente) e 3 mL de água Mili-Q.

Hidrólise neutra: Foram adicionados em balão volumétrico de 10 mL, 2 mL de solução padrão (100 µg mL⁻¹), 3 mL de metanol e 4 mL de água Mili-Q.

Degradação oxidativa: Foram adicionados em balão volumétrico de 10 mL, 2 mL de solução padrão (100 µg mL⁻¹), 3 mL de metanol, 1 mL de H₂O₂ 35%, para avaliar degradação com 3,5 % de H₂O₂ e ajuste de volume com água Mili-Q.

Degradação por íons metálicos: Foi preparada solução de sulfato cúprico CuSO₄ a 0,1M, da qual foram utilizados 5 mL, juntamente 2 mL de solução padrão (100 µg mL⁻¹) e 3 mL de metanol em um balão volumétrico de 10 mL.

Degradação fotolítica: Foram adicionados em balão volumétrico de 10 mL, 2 mL de solução padrão ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), 3 mL de metanol e 5 mL de água Mili-Q.

Degradação térmica: Quantidade equivalente a 10 mg de padrão de rosuvastatina, foi pesada e o pó foi exposto à temperatura de $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h em estufa. Terminado o período de exposição, foi preparada solução de concentração 1mg mL^{-1} em fase metanol, diluída para $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ em diluente (metanol: água, (65:35, v/v)) e posteriormente uma solução a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ com diluente foi preparada para análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

Todas as soluções para o estudo de degradação de rosuvastatina cálcica foram preparadas para possuir concentração final de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fármaco e todas elas permaneceram à temperatura ambiente por 20 h, ao abrigo da luz, com exceção das soluções de degradação fotolítica.

Antes das análises cromatográficas as soluções ácidas e básicas foram neutralizadas e todas com ajuste de volume no final da reação com água Mili-Q.

As amostras dos brancos correspondentes foram injetadas simultaneamente. Após análise, a porcentagem de recuperação do fármaco foi calculada.

4.7.6 Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência

A validação do método CLAE foi embasada em critérios estabelecidos pelo ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003), através da determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez. A formulação E descrita na Tabela 2 (item 4.1) e o medicamento Crestor[®] foram empregados para os ensaios de validação.

4.7.6.1 Seletividade

Para o estudo da seletividade do método foram comparados os cromatogramas da solução placebo de cápsulas e comprimidos de rosuvastatina cálcica, preparadas conforme mencionado no item 4.7.3 com o cromatograma da solução padrão de fármaco a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada conforme o item 4.7.2.

A seletividade de um método analítico pode ser avaliada também pela pureza do pico cromatográfico empregando o detector DAD (BRASIL, 2003). Dessa forma, para o estudo da seletividade dos produtos de degradação, foi empregado o detector DAD para avaliação da pureza do pico cromatográfico do fármaco frente aos produtos de degradação formados.

4.7.6.2 Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas analíticas obtidas em 3 dias consecutivos, com 5 concentrações em triplicata no intervalo de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (5, 10, 15, 20 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$). A partir das três curvas obtidas, determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) pelo método dos mínimos quadrados.

4.7.6.3 Precisão

O teste de precisão foi realizado em relação a repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por análise no mesmo dia de soluções padrão contendo 5, 20 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de rosuvastatina cálcica e a precisão intermediária foi avaliada por repetição dos ensaios em dois dias diferentes. As soluções de cada

concentração foram preparadas em triplicata e posteriormente analisadas. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativos (DPR).

4.7.6.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação. Preparou-se uma solução estoque de padrão e soluções estoque de excipientes (placebo) das amostras de cápsulas e comprimidos. Alíquotas destas soluções estoque foram retiradas para preparar as soluções para o teste de recuperação por CLAE. Para a exatidão, pelo teste de adição de padrão ao placebo de comprimidos e cápsulas os valores entre 98,0 % e 102,0 % foram considerados adequados (ICH, 2005).

4.7.6.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados pelas equações 1 e 2 conforme item 4.6.4.5.

4.6.6.6 Robustez

A robustez foi avaliada pela variação na proporção de fase móvel, diferentes equipamentos e utilização de duas colunas de diferentes lotes. As análises foram realizadas em triplicata na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de rosuvastatina e o teste t de Student foi utilizado para determinar se as variações produziram alterações significativas nos resultados ($p = 0,05$).

4.8 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA

Os ensaios para o desenvolvimento do método por LC-MS/MS foram realizados no Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos (LATF) da UNIFAL-MG, utilizando um cromatógrafo líquido, Shimadzu® (Kyoto, Japão), equipado com fonte de ionização electrospray (ESI) e detector MS/MS triplo quadrupolo LCMS-8030.

4.8.1 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas utilizadas foram a coluna cromatográfica C₈ (50 mm × 4,6 mm) com partículas de 5 µm, fase móvel constituída da mistura de água com 0,2% de ácido acético e metanol (60:40), vazão de 0,3 mL min⁻¹, volume de injeção de 1 µL, temperatura da coluna de 40 °C. O tempo de execução foi de 15 min, a fim de avaliar possíveis compostos degradados após o tempo de retenção do fármaco analisado. Utilizou-se como método de ionização o *eletrospray* em modo positivo. A energia de colisão foi 35 kV. As temperaturas heat block e de interface foram 400 e 250 °C, respectivamente e as vazões dos gases de nebulização e de secagem foram de 1,5 e 15 mL min⁻¹, respectivamente. As leituras por espectrometria de massas foram obtidas na faixa de 50 a 500 m/z

4.8.2 Preparo da solução padrão

Foram pesados o equivalente a 10 mg de rosuvastatina padrão de trabalho e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. Adicionou-se aproximadamente, cerca

de 7 mL de metanol e levou a banho de ultrassom por 2 minutos. O volume foi ajustado, obtendo-se uma solução estoque amostra 1 mg mL^{-1} . Uma solução intermediária a $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ com diluente metanol: água (65:35) foi preparada.

A partir da solução intermediária a $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas as demais soluções em diferentes níveis de concentração para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando a fase móvel metanol: água 0, 2 % de ácido acético (40:60, v/v) como diluente.

4.8.3 Preparo das soluções amostra para o teste de degradação forçada

As soluções preparadas no item (4.7.5) foram diluídas com fase móvel, metanol: solução aquosa de 0,2 % de ácido acético (40:60, v/v) na proporção de 1:4, obtendo-se uma concentração de $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e avaliação dos produtos de degradação formados.

4.8.4 Validação do método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) para rosuvastatina cálcica

A validação do método LC-MS/MS foi embasada em critérios estabelecidos pelo ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003), através da determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão. As análises para quantificação foram realizadas através do monitorando da transição mais intensa do íon precursor - íon produto de rosuvastatina (482 \rightarrow 258).

4.8.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela comparação dos cromatogramas obtidos a partir do branco da amostra e placebo com o cromatograma do padrão de rosuvastatina cálcica para avaliar se no tempo de retenção do fármaco há co-eluição de interferentes e comparação do espectro de massas obtido no tempo de análise de rosuvastatina cálcica da solução padrão com o espectro de massas obtido no tempo de análise da rosuvastatina a partir das soluções submetidas ao teste de estresse.

4.8.4.2 Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas analíticas obtidas em 3 dias consecutivos, com 6 concentrações em triplicata no intervalo de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1, 2, 3, 4, 5 e $6 \mu\text{g mL}^{-1}$). A partir das três curvas obtidas, determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) pelo método dos mínimos quadrados. As soluções foram preparadas de maneira similar a solução padrão do item 4.8.2.

4.8.4.3 Precisão

O teste de precisão foi realizado em relação a repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada por análise no mesmo dia de soluções padrão contendo 2, 5 e $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de rosuvastatina cálcica e a precisão intermediária foi avaliada por repetição dos ensaios em dois dias diferentes. As soluções de cada

concentração foram preparadas em triplicata e posteriormente analisadas. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativos (DPR).

4.8.4.4 Exatidão

A exatidão foi determinada utilizando três repetições de soluções padrão de rosuvastatina em três níveis de concentração (4, 5, e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os dados foram apresentados como erro relativo (ER) e foram calculados pela equação abaixo:

$$\text{ER} = \frac{\text{Concentração experimental} - \text{Concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} = 100\%$$

4.8.4.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados pelas equações 1 e 2 conforme item 4.6.4.5.

4.8.5 Aplicação do método em amostras reais

Com o desenvolvimento e validação do método de LC-MS/MS e considerando que a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas apresenta maior seletividade e sensibilidade, esta técnica foi aplicada em amostras reais (comprimidos com prazo de validade expirado), com a finalidade de detectar possíveis produtos de degradação e avaliação de seu teor.

4.9 DESENVOLVIMENTO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

A seguir estão descritos os preparos de soluções e as condições de otimização, desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para as formas farmacêuticas cápsulas e comprimidos de rosuvastatina cálcica.

4.9.1 Preparo dos meios de dissolução

As soluções utilizadas neste estudo foram: ácido clorídrico 0,1 M, tampão acetato de sódio (pH 4,5), tampão acetato de sódio (pH 4,5) + lauril sulfato de sódio (LSS) 0,1 % e tampão fosfato (pH 6,8). Antes de serem utilizados, os meios foram aquecidos a 41° C e levados ao banho de ultrassom durante 20 minutos para desgaseificação.

A solução de ácido clorídrico 0,1 M foi preparada por adição de 8,5 mL de ácido clorídrico em balão volumétrico de 1L contendo água, completando-se o volume com o mesmo solvente.

O tampão acetato de sódio (pH 4,5) foi preparado por adição de 5,98 g de acetato de sódio e 3,32 mL de ácido acético glacial em balão volumétrico de 2 L contendo água, completando-se o volume com o mesmo solvente.

Solução tampão acetato de sódio com concentrações de 0,1 % de Lauril sulfato de sódio 1 g para cada litro de tampão acetato de sódio (pH 4,5).

O tampão fosfato de potássio (pH 6,8) foi preparado por adição de 13,609 g de fosfato de potássio monobásico e 22,38 ml de hidróxido de sódio 2 M em balão volumétrico de 2L contendo água, completando-se o volume com o mesmo solvente.

4.9.2 Estudos de solubilidade

O teste de solubilidade da rosuvastatina cálcica forma amorfa e forma cristalina M foi realizado pelo método de equilíbrio, empregando a técnica *shake-flask*. Para a realização deste ensaio, um excesso dos sólidos foi adicionado a 5 mL de água, HCl 0,1 M, tampão acetato de sódio pH 4,5, tampão acetato de sódio pH 4,5 + LSS 0,1% e tampão fosfato de potássio pH 6,8. Os frascos foram protegidos da luz e submetidos a agitação (150 rpm) por 24 h a 37 °C. O estudo foi realizado em triplicata em cada meio. Após o tempo de equilíbrio, as amostras foram coletadas e filtradas (filtro PTFE 0,45 µm), diluídas em fase móvel e quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.9.3 Preparo das soluções padrão do ensaio de dissolução

Para o preparo da solução padrão estoque pesou-se, o equivalente a 50 mg de rosuvastatina e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com metanol. A partir da solução padrão estoque, foi preparada uma solução intermediária de 40 µg mL⁻¹ nos diferentes meios de dissolução (tampão fosfato, tampão acetato e tampão acetato + LSS 0,1%). As soluções de trabalho foram preparadas, retirando-se 2,5 mL de cada solução intermediária e transferindo-se para balão volumétrico de 5 mL, onde o volume final foi ajustado com fase móvel, para obter uma solução com concentração de 20 µg mL⁻¹.

4.9.4 Preparo das soluções amostras

As soluções amostras foram preparadas colocando-se uma cápsula (n=6) em cada cuba contendo meio de dissolução (500 mL) a 37 ° C. Um volume de 5 mL foi coletado nos tempos de 10 15, 20, 30, 45 e 60 minutos (amostra de cápsulas) e 5, 10 15, 20, 30, 45 e 60 (amostra de comprimidos) e filtrado imediatamente. Transferiu-se alíquota de 2,5 mL do filtrado para um balão volumétrico de 5 mL, adicionando 1 mL de HCl 0,1 M e ajustando volume com fase móvel.

4.9.5 Condições cromatográficas

A quantificação do fármaco dissolvido a partir das cápsulas e comprimidos foi realizada por CLAE, nas seguintes condições: temperatura de 25 °C; coluna C₁₈ (150 mm x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel constituída por metanol: água acidificada com ácido fosfórico (pH 3,0) (65:35, v/v), filtrada em membrana filtrante de 0,45 µm (Millipore) e degaseificada em banho de ultrassom, por vinte minutos; vazão de 1,0 mL min⁻¹; volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 241 nm.

4.9.6 Formulações

Foram avaliadas no estudo de dissolução 8 formulações. As formulações codificadas como A, B e C, respectivamente, foram adquiridas no comércio local e estão descritas na tabela 1.

As formulações codificadas como D (forma cristalina M), E, F, G e H foram manipuladas em nosso laboratório, onde a mistura de pós (forma amorfa e cristalina M)

e excipientes foram encapsuladas com cápsulas de gelatina nº 4 (n= 120), contendo 20 mg do fármaco e a composição de cada uma delas está descrita na tabela 2.

4.9.7 Ensaio de dissolução para cápsulas e comprimidos

No desenvolvimento do ensaio de dissolução foram avaliadas as condições de pH do meio de dissolução, observando a capacidade de manter as condições *sink*, tipos de aparatos para agitação do meio e velocidade de agitação, conforme recomendado na legislação (BRASIL, 2010). Assim, foram definidas as condições a serem empregadas no estudo de dissolução das cápsulas e comprimidos.

Os perfis de dissolução de rosuvastatina cálcica em cápsulas e comprimidos foram realizados a $37,0 \pm 0,5$ ° C, empregando um volume de 500 mL, dos meios de dissolução. Aparatos I (cesta) e II (pá) com *sinkers*, foram utilizados para evitar a flutuação das cápsulas e as velocidades de agitação de 50 e 100 rpm foram estudados, conforme recomendado pela USP (UNITED, 2015).

Para as amostras de cápsulas, amostras de 5 mL foram retiradas a 10, 15, 20, 30, 45, e 60 minutos, seguido por reposição imediata de meio com igual volume, na mesma temperatura, utilizando velocidade de 50 ou 100 rpm. A forma farmacêutica comprimidos foi avaliada nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. As amostras foram filtradas utilizando filtros de papel quantitativos, e diluída adicionando 1 mL de HCl 0,1 M e ajuste para 5 mL com fase móvel metanol e água com ajuste de pH = 3,0, filtradas com filtro PTFE 0, 45 µm e posteriormente quantificadas pelo método de CLAE.

4.9.8 Validação do ensaio de dissolução

A validação do ensaio de dissolução e do método de quantificação foi embasada em critérios estabelecidos pela USP (UNITED, 2015), ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003), através da determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação e robustez.

4.9.8.1 Seletividade

Para a determinação da seletividade, amostras de placebo e cápsula vazia foram submetidas às condições do ensaio de dissolução. Ao final do tempo do ensaio, frações foram coletadas, filtradas, diluídas seguindo o mesmo procedimento utilizado para as cápsulas e comprimidos. Avaliando-se a ausência de interferência dessas amostras na quantificação do fármaco.

4.9.8.2 Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas analíticas obtidas em 3 dias consecutivos, com 6 concentrações em triplicata no intervalo de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1, 5, 10, 15, 20 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Soluções utilizadas foram preparadas em fase móvel a partir de uma solução intermediária de tampão fosfato a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, diluída a partir de uma solução de 5mg mL^{-1} preparada em metanol. A partir das três curvas obtidas, determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) pelo método dos mínimos quadrados.

4.9.8.3 Precisão

As análises foram realizadas em dois dias diferentes. A precisão intradia e interdias ($n = 6$) do teste de dissolução foram determinados pela quantidade de fármaco dissolvida em 30 minutos para cápsulas em rotação a 100 rpm e pela quantidade fármaco dissolvida em 30 minutos a 50 rpm para comprimidos, e expressa como desvio padrão relativo (DPR) (%). A formulação E descrita na Tabela 2 e o medicamento Crestor[®] foram empregados para avaliar a precisão do teste de dissolução. O critério de aceitação foi D.P.R. inferior a 2,0% (ICH, 2005; UNITED, 2015).

4.9.8.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de um ensaio de recuperação utilizando quantidades conhecidas de substância referência rosuvastatina adicionadas ao placebo de cápsula e comprimido. Uma solução-estoque, contendo 5 mg mL^{-1} de rosuvastatina padrão, foi preparada em metanol. Alíquotas de 3 mL, 4 mL e 5 mL desta solução foram adicionadas às cubas contendo 500 mL do meio de dissolução. Amostras de placebo proporcionais a cada concentração foram também adicionadas as cubas. As amostras foram submetidas às condições de 150 rpm, utilizando aparato pá por 30 minutos. Alíquotas foram recolhidas, filtradas e diluídas até concentrações finais de 15, 20 e $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, correspondendo a 75, 100 e 125% da concentração de trabalho do método, respectivamente, e analisadas por CLAE. Estes estudos foram realizados em triplicata e a porcentagem de recuperação foi calculada em cada uma das amostras adicionadas de padrão. O critério de aceitação foi obter uma recuperação entre 95,0 % e 105,0 % (UNITED, 2015).

4.9.8.5 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados pelas equações 1 e 2 conforme item 4.6.4.5.

4.9.8.6 Robustez

A robustez foi avaliada pela utilização de filtros de diferentes marcas, utilização de dois equipamentos diferentes e variação da temperatura do meio de dissolução. As amostras obtidas do ensaio foram coletadas no tempo de 30 minutos para ambas as formas farmacêuticas. As análises foram realizadas em triplicata e o teste t de Student foi utilizado para determinar se as variações produziram alterações significativas nos resultados ($p = 0,05$).

4.9.9 Aplicação do ensaio de dissolução para avaliação da equivalência farmacêutica

Após o desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para a forma farmacêutica comprimido, o mesmo foi aplicado para comprimidos similares codificados como S1, S2 e S3 para avaliação do perfil de dissolução comparativo das amostras teste comparadas ao medicamento referência Crestor[®].

A eficiência de dissolução (ED%) foi calculada para os medicamentos referência e similares (S1, S2 e S3) e os valores obtidos foram comparados por ANOVA, para avaliar se houve diferença significativa entre os resultados e, logo após, o teste de

Tukey, para determinar quais formulações são semelhantes e quais são estatisticamente diferentes.

4.10 Desenvolvimento de ensaio de dissolução utilizando meios biorrelevantes

A seguir estão descritos os preparos de soluções e as condições de otimização, desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução utilizando meios biorrelevantes para a forma farmacêutica cápsulas de rosuvastatina cálcica.

4.10.1 Otimização do ensaio de dissolução com meio biorrelevante

Conforme descrito na literatura, a utilização do leite longa vida (UHT) com conteúdo 3,5 %, vem sendo considerado como meio biorrelevante em função da sua relação carboidratos/ proteínas/ lipídeos ser semelhante ao observado no estômago depois da administração de refeições (JANTRATID; DRESSMAN, 2009).

Jantratid e colaboradores descrevem como meios biorrelevantes, o leite utilizando diferentes pHs e diferentes concentrações de NaCl para garantir osmolalidade do meio gástrico em três fases, com a fase inicial de digestão em pH= 6,4 e diluições do leite com tampões, refletindo a diluição da refeição, com o esvaziamento gástrico em função do tempo (JANTRATID et al., 2008).

Dessa forma, os três meios que refletem o estado alimentado (empregando leite longa vida (UHT) integral) descritos na Tabela 5, foram avaliados no estudo de solubilidade da rosuvastatina cálcica, o qual foi realizado nas mesmas condições citadas no item 4.2.6.5, empregando agitação de 150 rpm, temperatura de 37 °C por 24 horas.

Tabela 5 – Composição dos meios para simular conteúdo gástrico no estado alimentado.

	Inicial	Médio	Tardio
Cloreto de sódio (mM)	148	237,02	122,6
Acido acético (mM)	-	17,12	-
Acetato de sódio (mM)		29,75	-
Ácido orto-fosfórico (mM)	-	-	5,5
Fosfato de sódio monobásico	-	-	32
Leite/Tampão	1:0	1:1	1:3
HCl 0,1M/ NaOH 0,1 M	qsp pH 6,4	qsp pH 5,0	qsp pH 3,0
pH	6,4	5,0	3,0
Osmolalidade (mOsm Kg ⁻¹)	559	400	300
Capacidade tamponante (mmol ⁻¹ Δ pH ⁻¹)	21,33	25	25

Fonte: Adaptado de JANTRATID, JENNIFER, 2009.

Com o resultado do teste de solubilidade utilizando o leite em diferentes pHs, o meio com maior solubilidade foi avaliado com as mesmas condições (volume de meio, aparato, rotação, tempos de coleta e condições cromatográficas) dos testes de dissolução desenvolvidos e validados para cápsula e comprimido do item 4.9.7.

4.10.2 Preparo das soluções padrão

Para o preparo da solução padrão estoque pesou-se o equivalente a 40 mg de rosuvastatina e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL, adicionando 10 mL de metanol e 100 mL de água, o qual foi levado ao banho de ultrassom por 2 minutos, seguido de ajuste de volume e filtração. A partir da solução padrão estoque, foi preparada uma solução intermediária em leite pH = 6,4. As soluções de trabalho foram preparadas, preparando uma solução na proporção 1:4 (solução intermediária: fase móvel), seguida de centrifugação a 3400 rpm por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi diluído novamente em fase móvel até a concentração de 5 µg mL⁻¹ na

proporção 1:1 (sobrenadante: fase móvel), centrifugado, filtrado e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.10.3 Preparo das soluções amostras

As soluções amostras foram preparadas colocando-se uma cápsula ou comprimidos (n=6) em cada cuba contendo meio de dissolução biorrelevante (500 mL) a 37 ° C. Um volume de 5 mL foi coletado nos tempos de 10 15, 20, 30, 45 e 60 minutos (amostra de cápsulas) e 5, 10 15, 20, 30, 45 e 60 (amostra de comprimidos) e filtrado imediatamente. Transferiu-se a amostra (proporção de 1:4) para fase móvel, seguida de centrifugação a 3400 rpm por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi diluído novamente em fase móvel na proporção 1:1 (sobrenadante:fase móvel), centrifugado, filtrado e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.10.4 Validação do ensaio de dissolução empregando meio biorrelevante

A validação do ensaio de dissolução e do método de quantificação foi embasada em critérios estabelecidos pela USP (UNITED, 2015), ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003), através da determinação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação.

4.10.4.1 Seletividade

Para a determinação da seletividade, amostras de placebo e cápsula vazia foram submetidas às condições do ensaio de dissolução biorrelevante. Ao final do tempo do ensaio, frações foram coletadas, filtradas, diluídas seguindo o mesmo procedimento utilizado para as cápsulas e comprimidos, avaliando-se a ausência de interferência dessas amostras na quantificação do fármaco.

4.10.4.2 Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada a partir da média de 3 curvas analíticas obtidas em 3 dias consecutivos, com 6 concentrações em triplicata no intervalo de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (1; 2,5; 5,0; 7,5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$). Soluções utilizadas foram preparadas conforme a solução padrão descrita no item 4.2.7.2. A partir das três curvas obtidas, determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) pelo método dos mínimos quadrados.

4.10.4.3 Precisão e exatidão

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação, adicionando quantidades conhecidas de rosuvastatina padrão de trabalho ao placebo. Uma solução estoque de rosuvastatina foi preparada com 5 % de metanol e q.s.p para o meio biorrelevante na concentração de 2 mg/mL.

Alíquotas de 7,5, 10,0 e 12,5 mL desta solução foram adicionadas as cubas contendo o meio de dissolução para um volume total de 500 mL (as concentrações finais

foram de 30, 40 e 50 µg/ mL, o que corresponde a 75, 100 e 125 % da concentração de trabalho. As amostras foram mantidas a $37 \pm 0,5$ °C, com agitação a 150 rpm durante 30 minutos. Em seguida, alíquotas de cada cuba foram coletadas, diluídas (1:4v/v em fase móvel), centrifugadas, diluídas (1:1v/v em fase móvel), filtradas e analisadas. O estudo foi realizado em triplicata em 2 dias diferentes. O critério de aceitação foi a obtenção de recuperação entre 95,0 % e 105,0 % (UNITED, 2011). As mesmas soluções utilizadas no ensaio de exatidão foram analisadas para assegurar a precisão do método. Precisão intermediária e a repetibilidade foram estabelecidos de acordo com o DPR dos resultados. O critério de aceitação é de que DPR seja menor que 2%.

4.10.4.4 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram determinados pelas equações 1 e 2 conforme item 4.6.4.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões estão apresentados a seguir, segundo as análises de caracterização, desenvolvimento, validação e aplicação dos métodos e avaliação da influência do polimorfismo na molécula do fármaco.

5.1 RECRISTALIZAÇÃO DE ROSUVASTATINA CÁLCICA

Com base em uma adaptação da patente WO 2000042024 A1, que descreve a forma polimorfa A, uma forma cristalina foi obtida para o desenvolvimento dos estudos (TAYLOR, 1999). Após as análises de caracterização da forma recristalizada por difração de raio X e análises térmicas citadas nos itens 5.2.4 e 5.2.5, foi observada outra forma cristalina caracterizada como forma M, a qual, também possui poucos relatos na literatura e utilizada em nosso estudo.

5.2 Caracterização da matéria-prima e forma recristalizada

5.2.1 Ponto de fusão

Na tabela 6, podemos observar que a forma amorfa apresentou um ponto de fusão aproximado de 157,6 °C e a forma cristalina apresentou um ponto de fusão (167,9 °C) com cerca de 10 °C a mais que a forma amorfa. Esta diferença observada entre as duas formas, já indica a possibilidade de formação de uma diferente forma cristalina, pois uma das propriedades características dos cristais é o ponto de fusão, o

qual é definido como a temperatura na qual a rede cristalina é desestruturada, fazendo com que as moléculas ganhem, a partir do aquecimento, energia suficiente para vencer as forças de atração que mantêm o cristal. Assim, uma substância que possui moléculas mantidas por forças fracas irão apresentar ponto de fusão menor em relação aquelas que são mantidas por uma força de atração mais forte, como exemplo, numerosas pontes de hidrogênio.

Tabela 6 - Valores obtidos a partir da determinação do ponto de fusão de rosuvastatina cálcica matéria-prima e forma recristalizada.

Determinação	Temperatura de fusão matéria-prima (°C)	Temperatura de fusão forma recristalizada (°C)
1	157,5	167,8
2	157,6	167,9
3	157,6	167,9
Média	157,6	167,9

5.2.2 Espectrofotometria no ultravioleta

Na figura 5 pode ser visto os espectros de absorção no UV do padrão de referência e matéria-prima, os quais foram obtidos após preparo das soluções dos padrões em metanol na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo um teste para identificar a matéria-prima utilizada como padrão de trabalho.

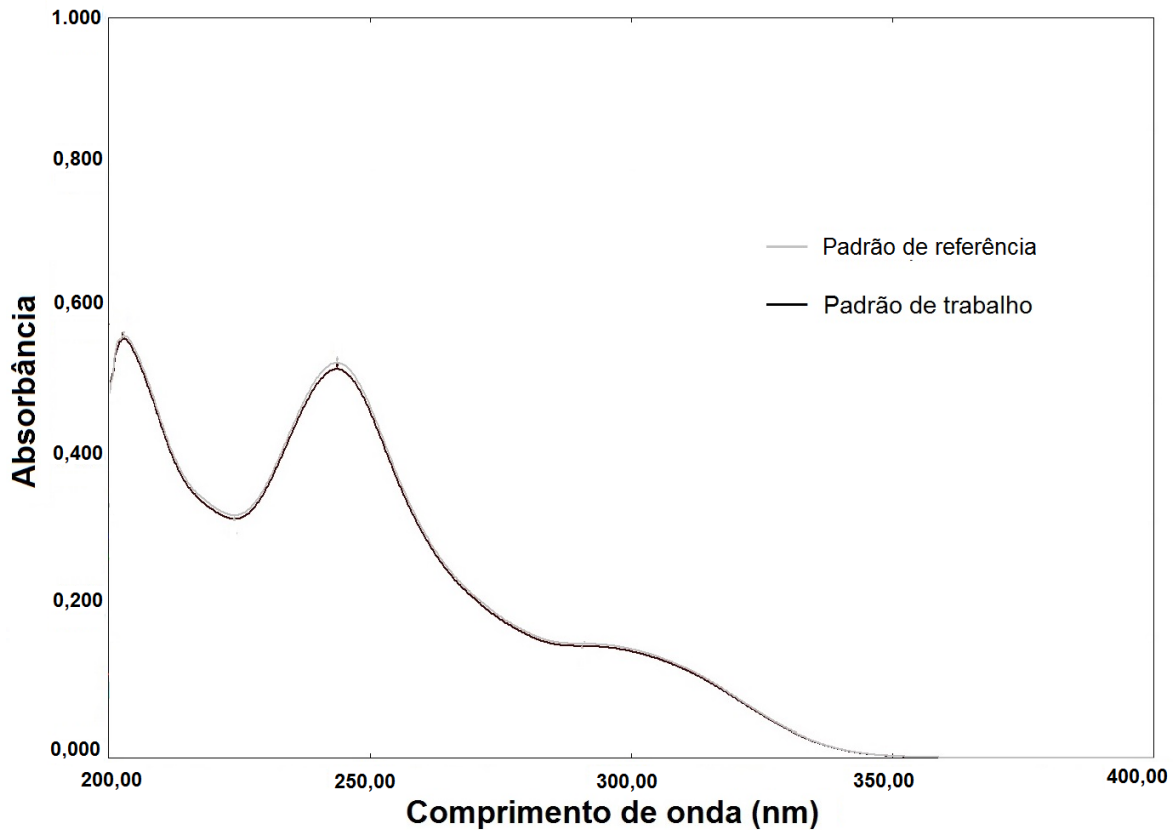


Figura 5 - Espectro de absorção de rosuvastatina cálcica padrão de referência e padrão de trabalho, na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando metanol como solvente.

Fonte: da autora.

5.2.3 Espectroscopia de absorção no infravermelho com refletância total atenuada

Com base em dados da literatura, podemos observar na figura 6 e na tabela 7, que os espectros de infravermelho apresentaram as bandas características de rosuvastatina cálcica para ambas as formas estudadas (amorfa e cristalina M) (GANESAN, 2012; GOMES, 2008; ROHINI, PAVANI, REDDY, 2014; ZHOU, 2013).

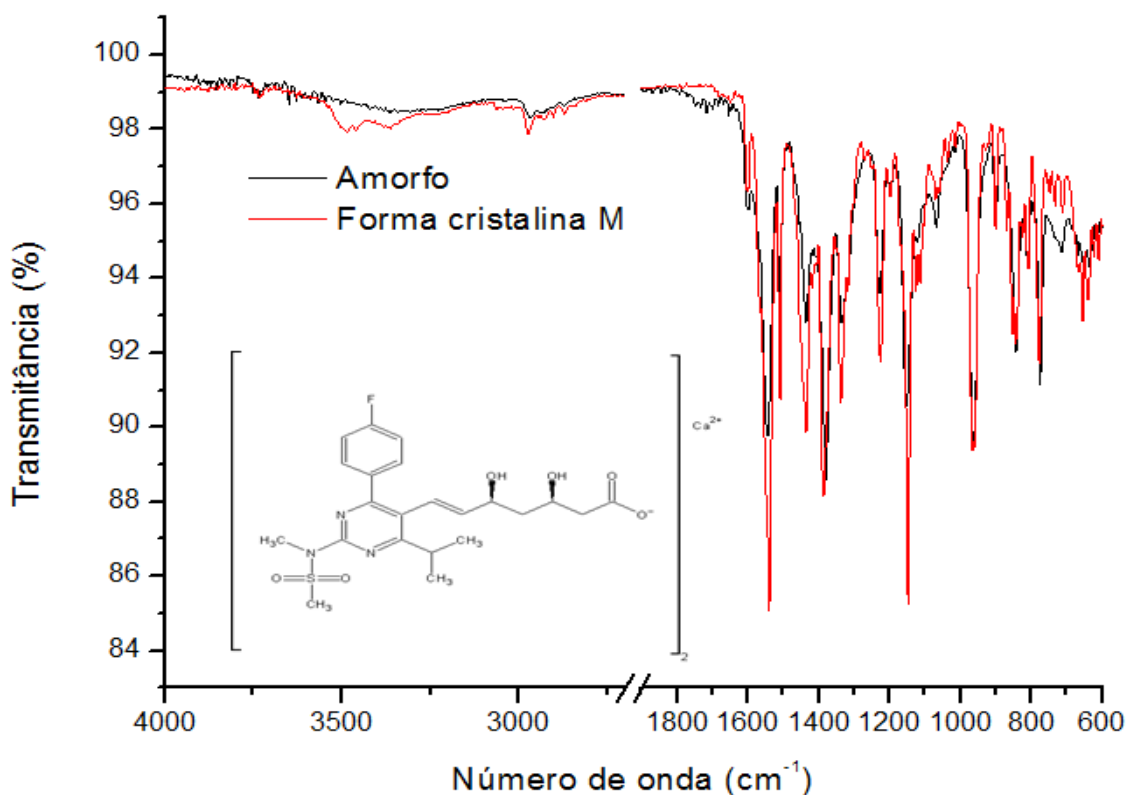


Figura 6 - Espectros de infravermelho de rosuvastatina cálcica forma amorfa e cristalina M.
Fonte: da autora.

Tabela 7 - Bandas de absorção de rosuvastatina cálcica nos espectros de infravermelho.

(cm ⁻¹)	Grupamentos
3479,0	O-H
2968,4	C-H
1540,7	C=C aromático
1436,9	C-H (CH ₃ e CH ₂)
1379,1	O=S=O
1226,5	C-F
1151,5	C-O
775,9	C-H aromático

5.2.4 Análise por difração de raio X pó (DRXP)

Foram realizadas análises por difração de raios X da matéria-prima e da amostra submetida ao processo de recristalização e tamisada. As figuras 7 e 8 demonstram os difratogramas, onde pode-se observar que a matéria-prima utilizada como padrão de trabalho é amorfa e a forma recristalizada como citado no item 5.1, apresentou os principais picos característicos da Forma M descrita na patente WO 2012011129 A2 (3,33, 5,30, 7,52, 10,37, 20,45 e 22,46 \pm 0,2 graus 2θ) .

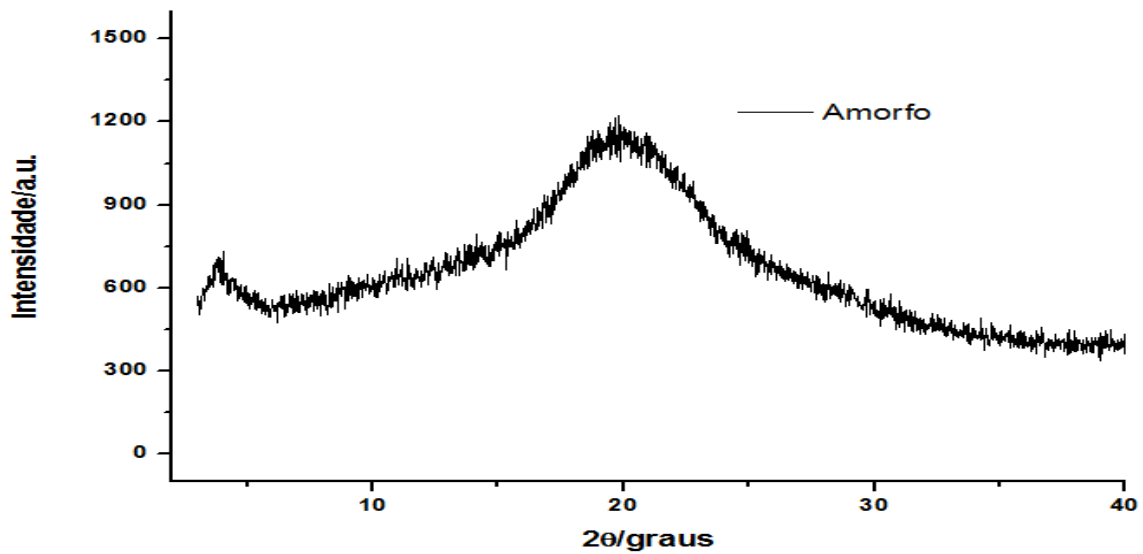


Figura 7 - Difratograma de rosuvastatina cálcica matéria-prima.

Fonte: da autora

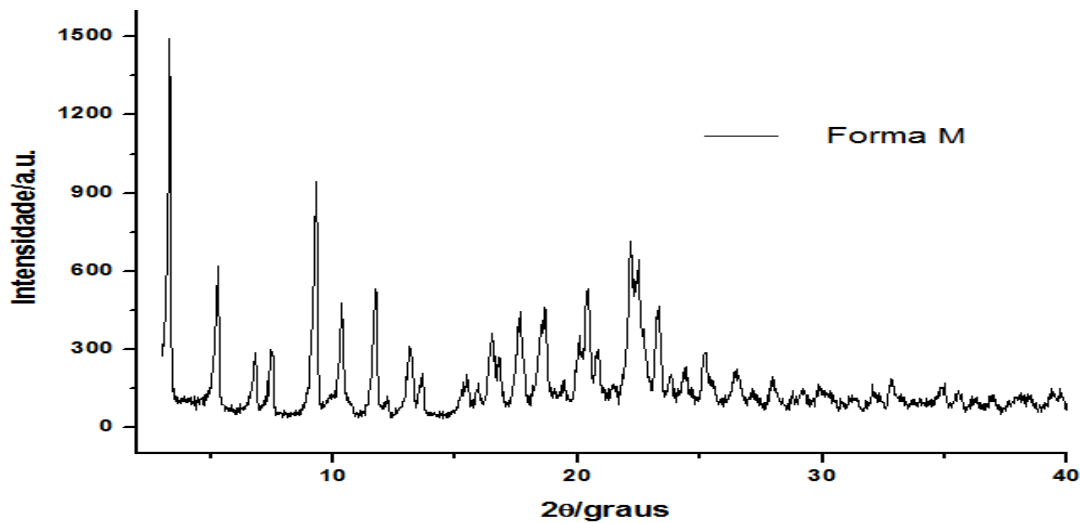


Figura 8 - Difratograma de rosvastatina cálcica forma cristalina M.
Fonte: da autora

5.2.5 Análises térmicas (DSC e TG)

Os resultados das análises térmicas das formas de rosvastatina cálcica são demonstrados nas figuras 9 e 10, com as curvas de DSC e TG sobrepostas. Na Figura 9, é demonstrada a análise térmica da forma amorfa, em que se observa-se na curva do DSC eventos endotérmicos com picos mais alargados, os quais são característicos deste tipo de forma sólida. O primeiro evento é a perda de solvente, sendo este confirmado pelo TG, onde ocorre uma perda de massa igual a 3,7 %. O segundo evento corresponde a fusão do fármaco, observando-se também a degradação inicial da molécula, uma vez que se observou uma perda de massa de 0,2 % a 154 °C. No item, 5.2.1 foi realizado a análise de fusão por capilar, em que se observou a faixa de fusão de (157,5-157,6 °C). Porém, é importante considerar que são diferentes técnicas com precisões diferentes, sendo o DSC uma técnica com maior precisão para determinação da temperatura de fusão. O terceiro evento observado no DSC foi

relacionado à decomposição térmica da rosuvastatina, que ocorreu de maneira mais intensa a partir de 158 °C.

Na figura 10, é apresentada a análise térmica da forma cristalina M, a qual demonstra quatro eventos endotérmicos. O primeiro evento foi relacionado á perda de solvente, pois há uma perda de massa de 2,6 % verificada pela análise termogravimétrica. O segundo evento a 103 °C ocorreu sem perda de massa evidente, sendo uma possível transição de fase no estado sólido levando à formação de uma forma cristalina que ocorre em temperaturas elevadas. O terceiro evento endotérmico (sem perda de massa) pode ser considerado como a fusão da forma cristalina, e tanto este evento (175,7 °C) como o anterior (103,3 °C) foram reportados na patente WO 2012011129 A2, sendo eles característicos da forma cristalina M. O pico de fusão da forma cristalina M da rosuvastatina cálcica é bem evidente, o que contrasta com os resultados obtidos para a forma amorfa. Estes resultados são explicados pela quebra do retículo cristalino da forma M, enquanto que a forma amorfa não o apresenta, uma vez que não existe retículo cristalino. O último evento com perda de massa evidente é a degradação térmica da rosuvastatina cálcica, iniciada aproximadamente a partir de 184 °C. Deste modo, fica demonstrada que a forma M apresenta maior estabilidade térmica que a forma amorfa, o que provavelmente é alcançado devido à organização do retículo cristalino da forma M.

A partir da comparação dos resultados obtidos usando as técnicas de análise térmica para caracterizar a forma cristalina M e a forma amorfa, foi possível observar que a forma amorfa apresenta uma menor temperatura de fusão que a forma cristalina M. Estes resultados são coerentes com os ensaios de solubilidade (item 5.4.1), uma vez que ficou evidente a menor solubilidade da forma cristalina M em comparação à forma amorfa. Em geral, os sólidos cristalinos apresentam temperaturas de fusão superiores às formas amorfas devido ao retículo cristalino que aumenta a estabilidade do sólido, reduzindo as suas interações com as moléculas de solvente, no caso água, consequentemente diminuindo a solubilidade do fármaco.

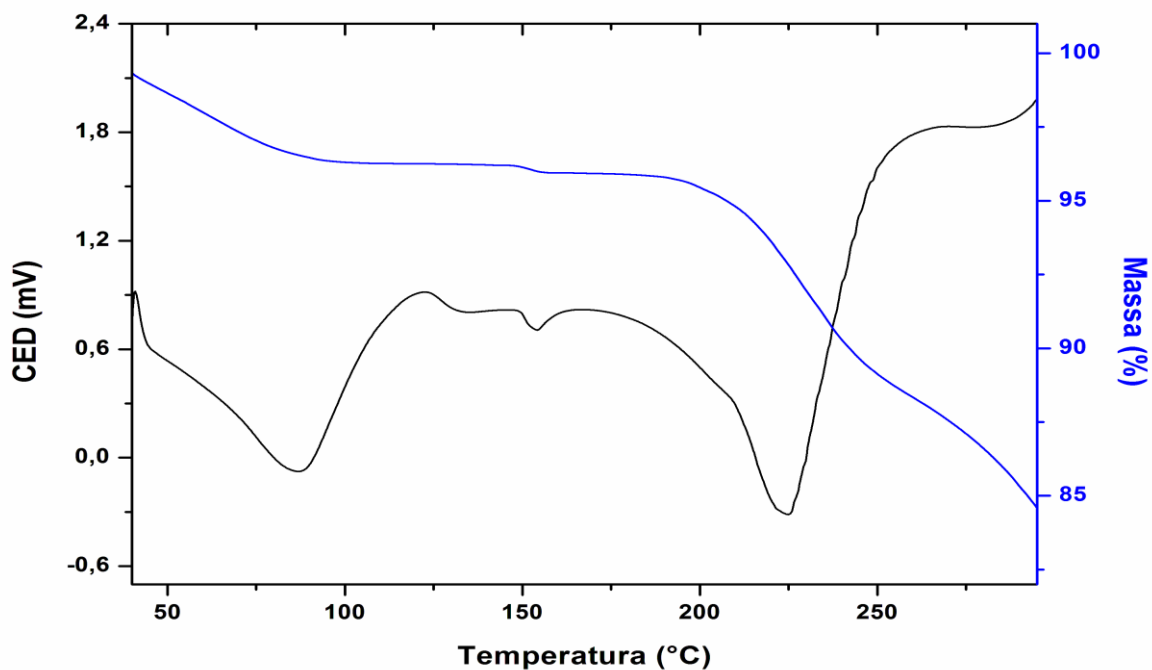


Figura 9 - DSC e TG de rosuvastatina cálcica forma amorfa.
Fonte: da autora

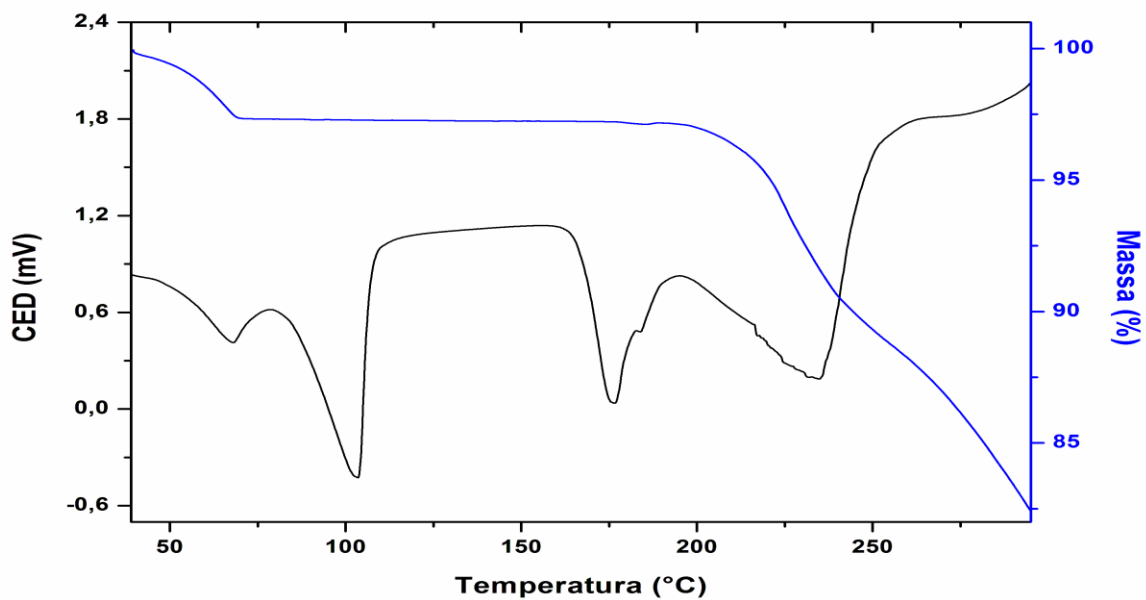


Figura 10 - DSC e TG de rosuvastatina cálcica forma cristalina M.
Fonte: da autora

Com relação a possível transição de fase citada anteriormente, esta foi confirmada com a análise por difração de raio X e DSC da amostra cristalina M

submetida ao aquecimento em temperatura de 105 °C por duas horas, onde observa-se picos no difratograma da Figura 11A (3,38; 5,40; 6,80; 10,46; 13,19; 17,55; 19,03; 21,44 e 22,69 que não foram observados na amostra cristalina caracterizada como forma M (3,29; 5,28; 6,80; 7,50; 9,30; 10,34; 11,72; 13,14; 17,64; 18,67; 20,41; 22,17 e 22,48) e a análise por DSC (figura 11B) notou-se a ausência do segundo evento endotérmico observado na forma cristalina M.

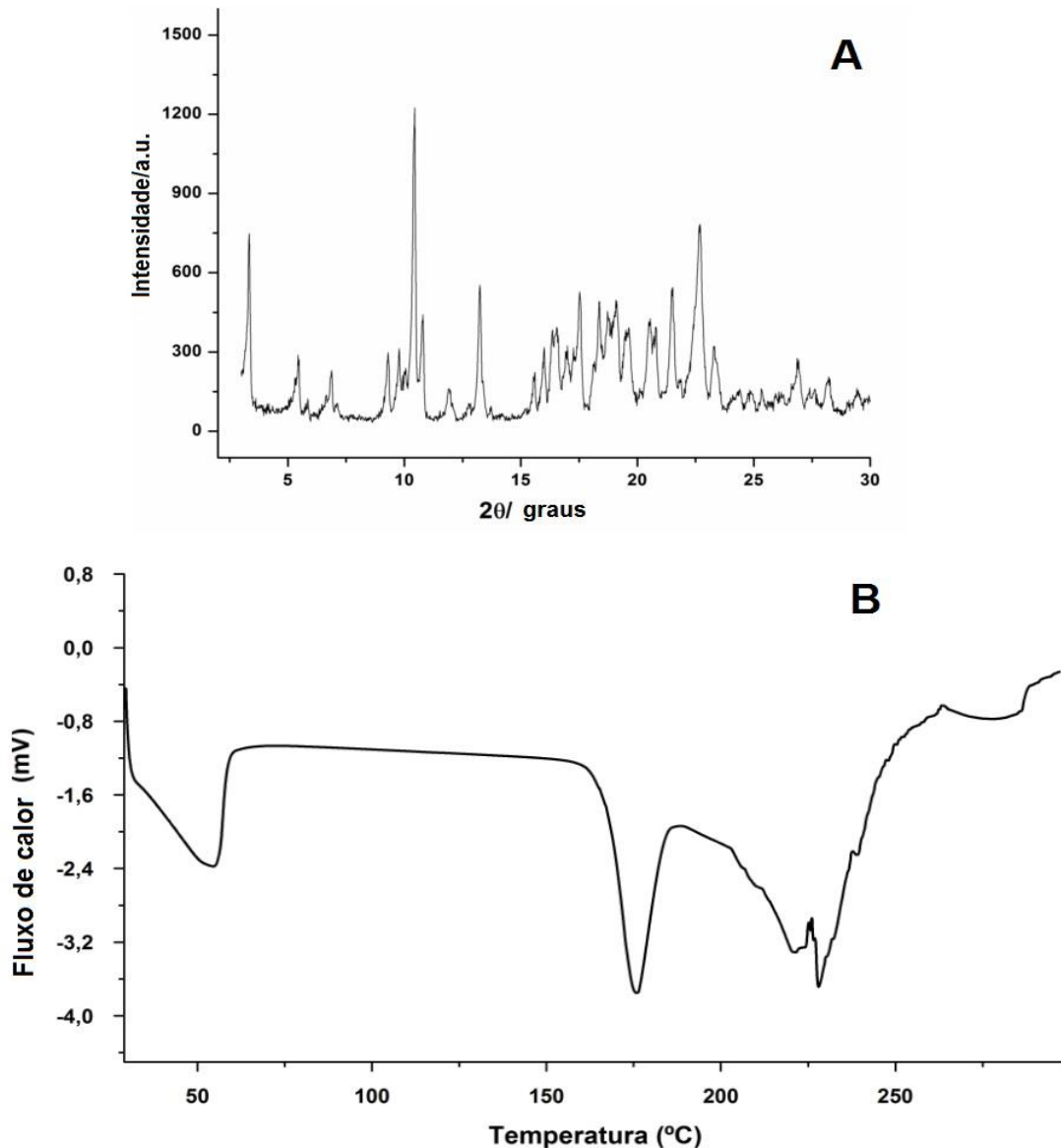


Figura 11 – Difratograma (A) e DSC (B) da amostra cristalina M submetida ao aquecimento em temperatura de 105 °C por duas horas.

Fonte: da autora

5.3 Desenvolvimento e validação do método por espectrofotometria na região ultravioleta para rosuvastatina cálcica

A seguir estão descritas as condições de otimização, desenvolvimento e validação do método por espectrofotometria na região ultravioleta para rosuvastatina cálcica.

5.3.1 Seletividade e determinação do comprimento de onda

Varreduras foram realizadas para as soluções de excipientes de cápsulas e comprimidos (Figuras 12 e 13), com base nas informações pesquisadas na literatura de que o metanol é o solvente mais utilizado no preparo de soluções. Assim outros solventes para a segunda diluição foram avaliados para determinação da seletividade. Dessa maneira, uma solução padrão de referência e uma solução padrão de trabalho, foram preparadas em metanol a 10 µg/mL na 1^a e 2^a diluição, e pode-se observar que o comprimento de onda de maior absorção foi em 242 nm (Figura 14).

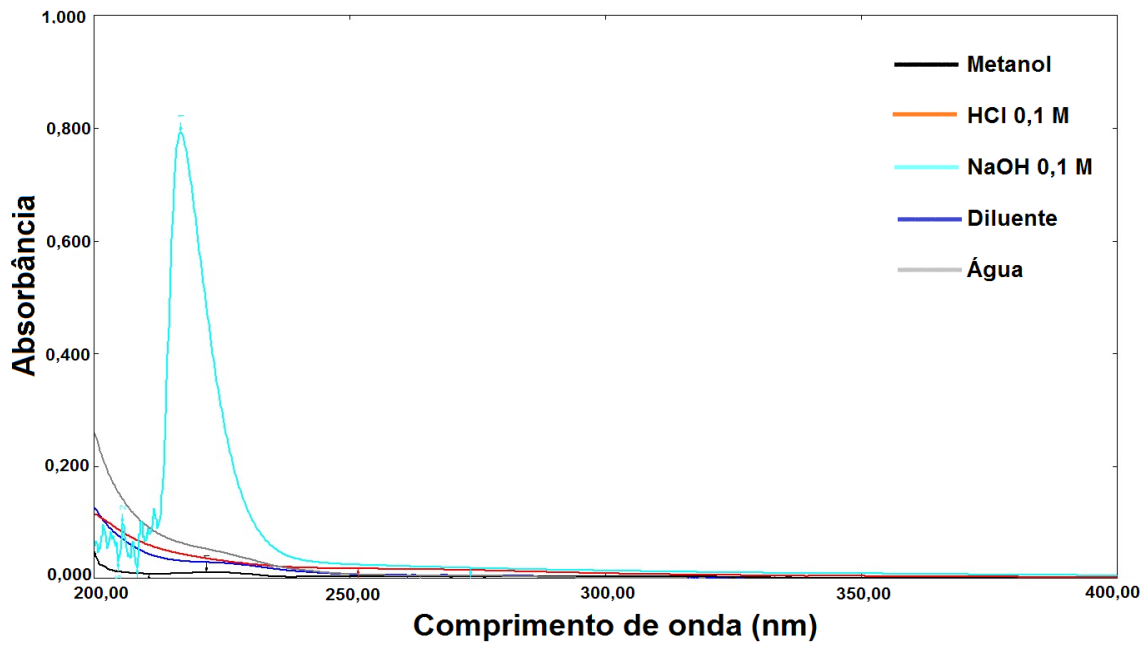


Figura 12 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de cápsulas diluída em diferentes soluções para avaliação da seletividade.

Fonte: da autora

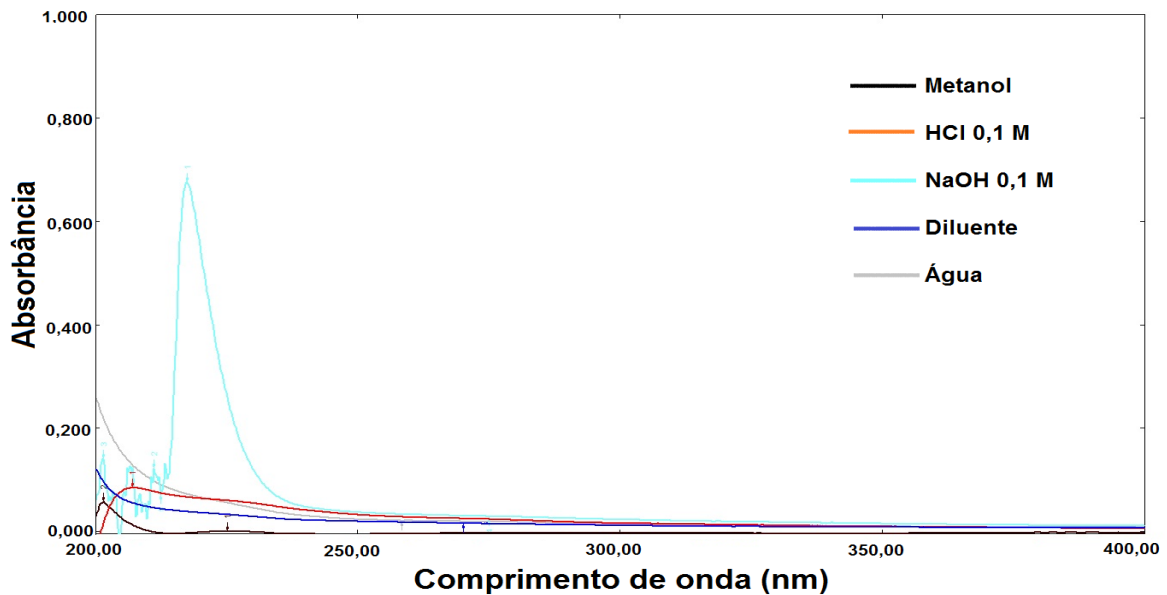


Figura 13 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de comprimidos diluída em diferentes soluções para avaliação da seletividade.

Fonte: da autora

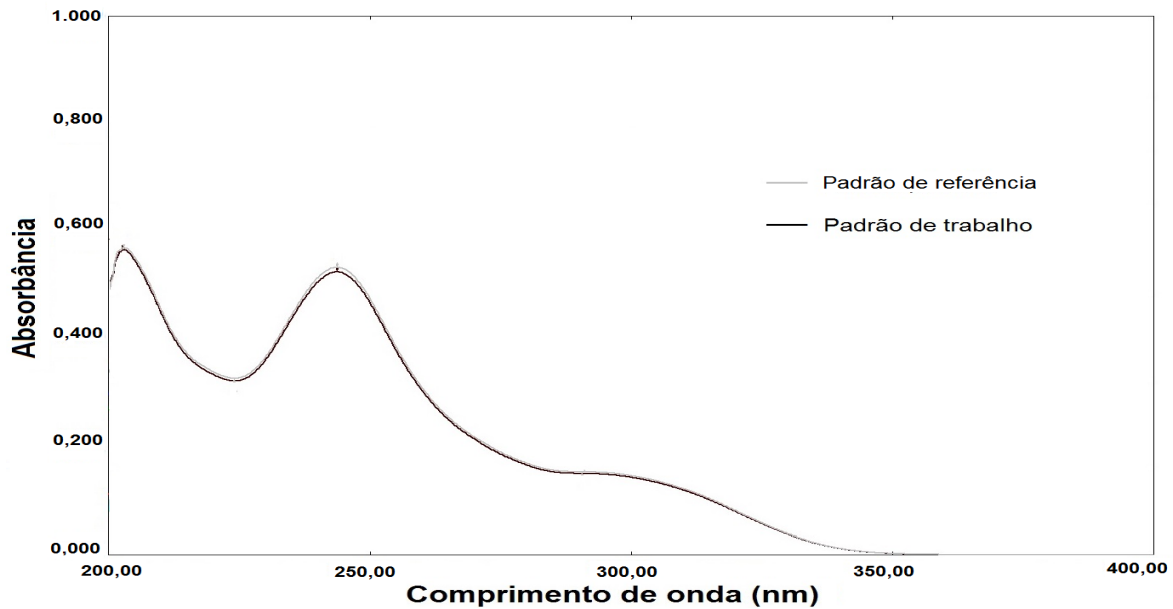


Figura 14 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de padrão de referência e padrão de trabalho ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), utilizando metanol como solvente (1^{a} e 2^{a} diluição), para determinação do melhor comprimento de onda.

Fonte: da autora

5.3.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método espectrofotométrico UV foi realizada utilizando-se os valores obtidos, para o cálculo da correlação entre as concentrações e as médias das absorbâncias. A curva analítica (Figura 15) para rosvastatina padrão de trabalho mostrou-se linear no intervalo avaliado de $4,0$ a $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, com $r = 0,9999$ (coeficiente de correlação). A equação da reta obtida foi: $y = 17496x - 1182,9$.

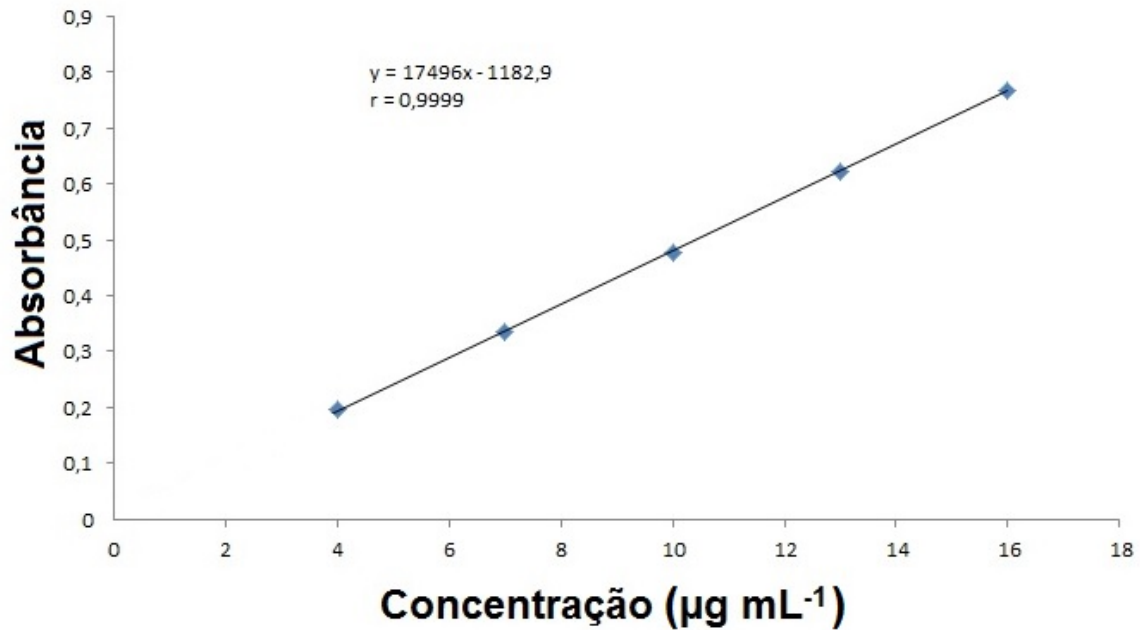


Figura 15 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método espectrofotométrico.

Fonte: da autora.

5.3.3 Precisão

A precisão foi determinada através de 3 níveis de concentração (4, 10 e 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em dois dias diferentes e por dois analistas diferentes. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores da determinação da precisão intradia (repetibilidade) e interdia (reprodutibilidade) do método para rosuvastatina cálcica, utilizando como solvente metanol. Leitura em espectrofotômetro UV a 242 nm.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (DPR%)	
	Interdias (n=6)	Intradias (n=6)
4	1,95	1,71
10	0,40	0,43
16	0,35	0,38

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias) apresentada na tabela 8. Os valores do DPR foram menores que 1,71 % (intradias) e 1,95% (interdias), demonstrando a adequada precisão do método, com valores de DPR inferiores a 2%.

5.3.4 Exatidão

Os valores das recuperações de rosuvastatina cálcica estão demonstrados na tabela 9, estando entre 98,0-102,0%, confirmando a exatidão do método espectrofotométrico (ICH, 2005).

Tabela 9 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica nas amostras de placebo (cápsula e comprimido), pelo método de análise espectrofotometria UV.

	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Recuperação (%)
Cápsula R1 (80%)	8,0	7,99	99,94
Cápsula R2 (100%)	10,0	9,97	99,71
Cápsula R3 (120%)	12,0	12,19	101,65
Comprimido R1 (80%)	8,0	7,97	99,66
Comprimido R2 (100%)	10,0	10,09	100,9
Comprimido R3 (120%)	12,0	12,14	101,16

Nota: * n=3.

5.3.5 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir da curva analítica, com valores de $0,23 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,79 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Concluindo-se que o intervalo de trabalho do método ($4\text{-}16 \mu\text{g mL}^{-1}$) está acima do limite de quantificação e de detecção, demonstrando que o método é adequado para a determinação do fármaco.

5.3.6 Robustez

No ensaio de robustez para o método espectrofotométrico, foram avaliadas pequenas variações relacionadas aos parâmetros de comprimento de onda, diferentes marcas de solventes e diferentes espectrofotômetros.

Tabela 10 - Valores obtidos no teste de robustez para avaliação do comprimento de onda, marca do solvente, e diferentes equipamentos em relação a amostra de cápsulas.

Parâmetros	Condições	Teores (%)			Teste t-Student
Comprimento de onda	241 nm	99,64	99,43	99,01	0,13
	242 nm	99,65	99,65	100,07	
	243 nm	100,14	99,93	100,96	
Marca de solvente	Dinâmica	99,24	99,03	100,07	0,26
	Panreac	99,41	98,76	98,54	
Diferentes equipamentos	Equipamento 1	99,65	99,65	100,07	0,18
	Equipamento 2	98,3	99,75	99,18	

Nota: *Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 11 - Valores obtidos no teste de robustez para avaliação do comprimento de onda, marca do solvente, e diferentes equipamentos em relação a amostra de comprimidos.

Parâmetros	Condições	Teores (%)			Teste t-Student
Comprimento de onda	241 nm	100,28	99,43	98,80	0,21
	242 nm	100,48	100,27	99,86	
	243 nm	100,34	100,75	99,72	
Marca de solvente	Dinâmica	100,48	100,27	99,86	0,12
	Panreac	100,94	100,38	100,73	
Diferentes equipamentos	Equipamento 1	100,48	100,27	99,86	0,29
	Equipamento 2	100,07	100,77	100,96	

Nota: *Significativo para $p < 0,05$.

As tabelas 10 e 11 descrevem os resultados obtidos na avaliação da robustez do método proposto. O método espectrofotométrico foi, portanto, robusto para todos os parâmetros avaliados, não apresentando diferença significativa entre os resultados, de acordo com o teste t de Student ($p = 0,05$).

5.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA POR CLAE-UV/DAD

A seguir estão descritas as condições de otimização, desenvolvimento e validação do método indicativo de estabilidade para rosuvastatina cálcica por CLAE-UV/DAD.

5.4.1 Otimização das condições cromatográficas

Foram realizados inicialmente testes com diferentes colunas (C_8 e C_{18}) composições e proporções de fase móvel até a obtenção de um pico cromatográfico simétrico. Rosuvastatina cálcica foi analisada em fase móvel com pH ácido, a fim de aumentar seu tempo de retenção, uma vez que o fármaco é um ácido fraco não protonado. Diferentes proporções de metanol e água com 0,1% (v/v) de ácido fosfórico com ajuste de pH para 3,0, foram avaliados. Quando as proporções de metanol: 0,1% (v / v) de solução de ácido fosfórico a pH 3,0 foram analisadas a 50:50, o fator de retenção (k'), foi de 13,41. No entanto, quando a percentagem de metanol foi aumentada para 80 %, este valor diminuiu para 0,62. O fator de retenção para análise satisfatória para rosuvastatina cálcica ($k' = 2,11$) foi obtido utilizando 65% de metanol na fase móvel (figura 16). Nessas condições, o número de pratos teóricos foi de 4200 e o fator de cauda de 1,08. Dessa maneira, as condições que apresentaram melhores resultados foram a utilização de uma coluna C_{18} 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m e fase móvel (metanol e água com pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico, (65:35, v/v), vazão de fase móvel de 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna a 25 °C volume de injeção de 20 μ L. Com a definição do método, este foi utilizado para aplicação do estudo de degradação de rosuvastatina cálcica nas condições ácida, alcalina, oxidativa, fotolítica e térmica, onde foi observada a separação de rosuvastatina cálcica de forma seletiva dos demais produtos formados, tornando o método aplicável para análise de rotina.

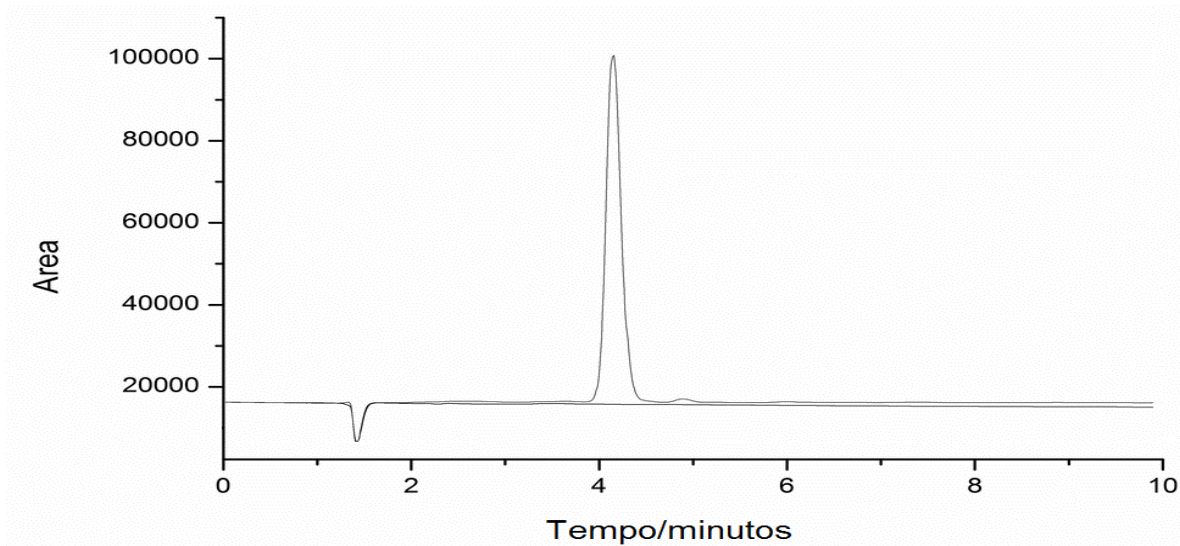


Figura 16 - Solução padrão de rosuvastatina cálcica a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando fase móvel metanol:água com ajuste de pH= 3,0 com ácido fosfórico (65:35, v/v).

Fonte: da autora.

5.4.2 Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência

5.4.2.1 Estudo de degradação e seletividade

Os estudos de degradação forçada se constituem em ferramentas importantes para caracterizar a estabilidade intrínseca dos fármacos, e podem ser aplicados para avaliar a seletividade de métodos analíticos por CLAE. Os métodos capazes de separar e detectar o fármaco na presença dos seus produtos de degradação são chamados métodos indicativos de estabilidade. Rosuvastatina cálcica foi submetida a condições de degradação forçada, e uma baixa estabilidade do fármaco foi encontrada na solução de ácido clorídrico (0,1 M de HCl) e exposição a luz UV (Figura 17). As recuperações de rosuvastatina cálcica nas condições de degradação forçada são apresentadas na Tabela 12. Os picos associados com os produtos de degradação foram separados a partir do pico principal do fármaco. A pureza de pico de rosuvastatina cálcica foi

assegurada em condições de estresse forçado pelo índice de similaridade usando o detector DAD (índice de pureza maior que 0,99). Estes resultados indicaram que o fármaco é um composto lábil, e o método cromatográfico desenvolvido pode ser aplicado para o controle da estabilidade do fármaco em matéria-prima e em formas farmacêuticas deste fármaco. Foi também avaliado o perfil de impurezas do padrão de trabalho, onde uma solução a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ e outra mais concentrada de 1 mg mL^{-1} foram injetadas no sistema cromatográfico ($20 \mu\text{L}$) pelo método de CLAE utilizando as condições cromatográficas anteriormente descritos ($n = 3$). O percentual de impurezas, na solução concentrada ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foram calculados com base na área do pico cromatográfico de rosuvastatina cálcica na solução diluída ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), que foi equivalente a 1 % de impureza (figura 17B). Além das análises quanto a degradação do fármaco e avaliação do perfil de impurezas, foram realizadas também análises para confirmar a interferência do placebo (cápsulas e comprimidos), onde pode-se observar que não houve interferência de excipientes no tempo de retenção do fármaco (Figura 17A).

Tabela 12 - Valores obtidos da recuperação do fármaco após a degradação forçada ($n=3$).

Condições de degradação forçada	% Recuperação do fármaco	\pm DP*
0,01 mol L ⁻¹ HCl (20 h)	86,05	0,55
0,1 mol L ⁻¹ HCl (20 h)	59,45	0,89
0,1 mol L ⁻¹ NaOH (20 h)	98,62	0,24
3,5% (v/v) H ₂ O ₂ (20 h)	99,94	0,55
Metanol: Água (20 h)	97,62	0,39
0,05 mol L ⁻¹ CuSO ₄ (20 h)	97,16	0,78
105 °C (24 h)	97,45	0,36
UV (30 min.)	68,94	0,06
UV (20 h)	Degradação completa	-

Nota: *DP, Desvio padrão

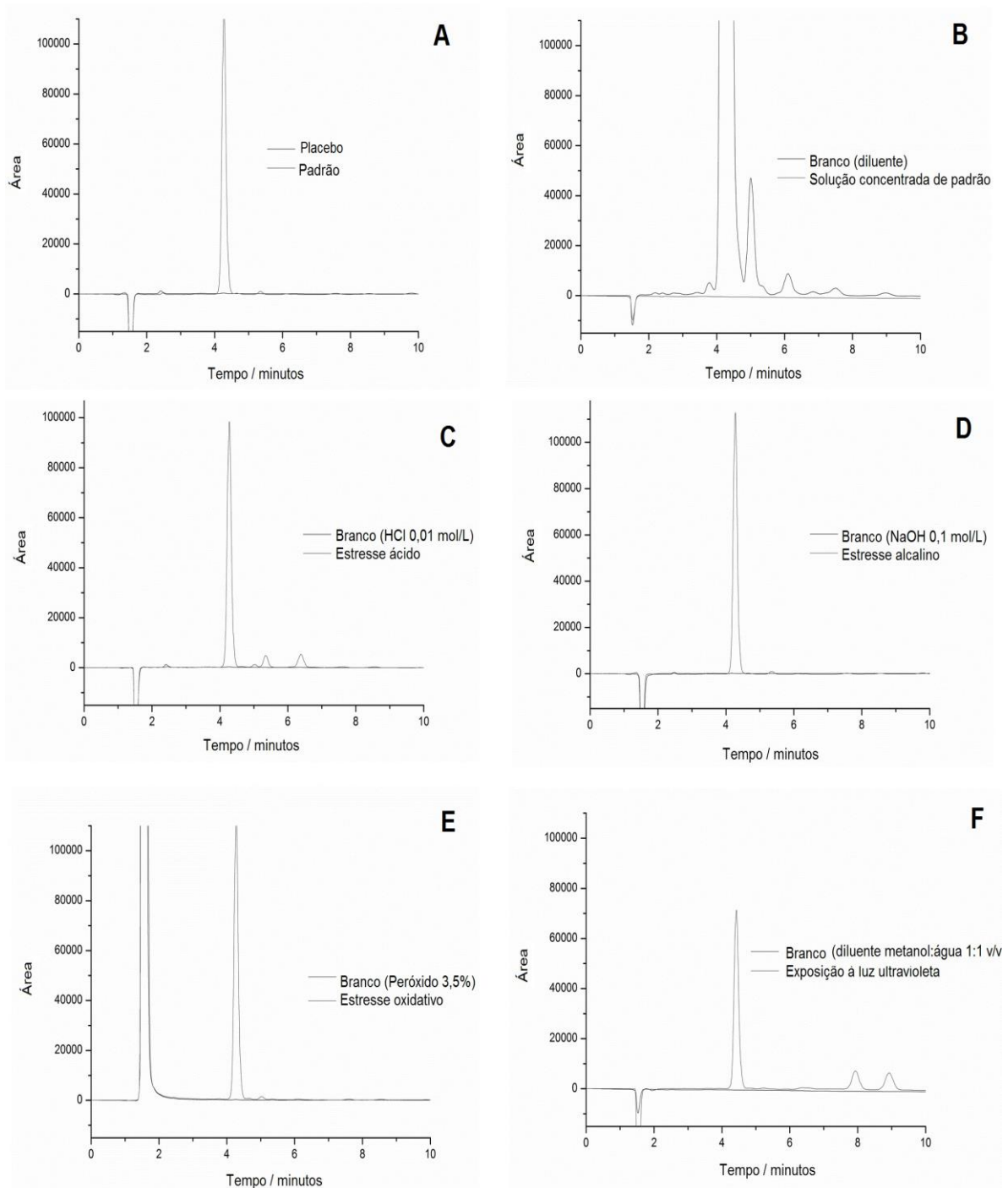


Figura 17 - Cromatogramas do estudo de seletividade de rosuvastatina cálcica, A) seletividade pela mistura de excipientes, B) perfil de impurezas, C) degradação ácida, D) degradação alcalina, E) degradação oxidativa e F) degradação fotolítica, com amostras a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando fase móvel metanol:água com ajuste de pH= 3,0 com ácido fosfórico (65:35, v/v).

Fonte: da autora.

5.4.2.2 Linearidade

A Figura 18 apresenta os dados referentes a linearidade do método.

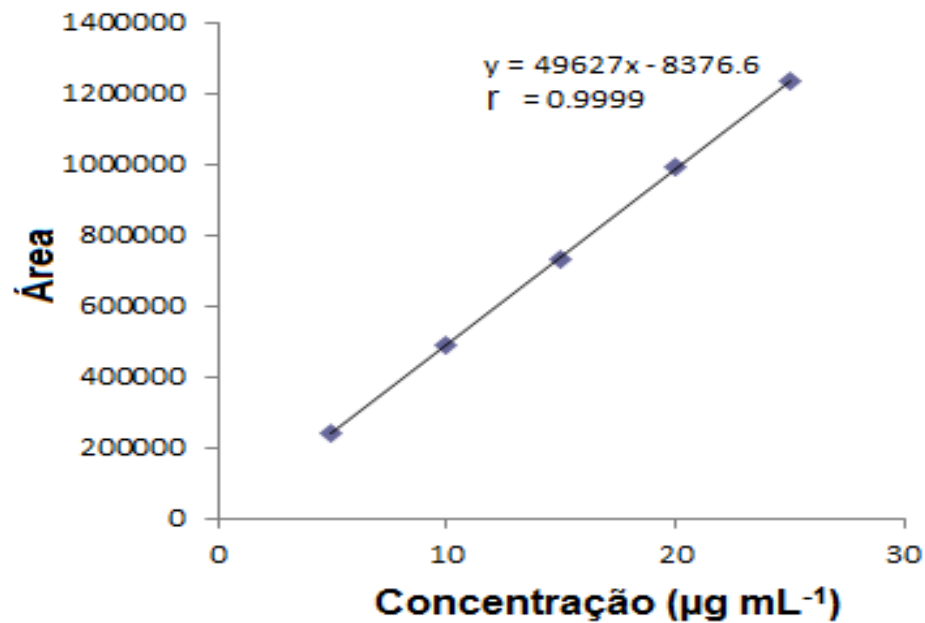


Figura 18 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método CLAE.
Fonte: da autora

A avaliação da linearidade do método por CLAE foi realizada de acordo com o descrito no item 4.7.6.2, onde a curva analítica para rosuvastatina padrão de trabalho mostrou-se linear no intervalo avaliado de 5 a 25 µg mL⁻¹, com $r = 0,9999$ (coeficiente de correlação). A equação da reta obtida foi: $y = 49627x - 8377,6$.

5.4.2.3 Precisão

A Tabela 13 mostra os resultados referentes a precisão inter e intra-dias.

Tabela 13 - Valores obtidos para avaliação da precisão do método de análise por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Precisão (DPR%)	
	Inter-dias (n=6)	Intra-dias (n=6)
5	0,18	0,57
20	0,42	0,26
25	0,09	0,13

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intra-dias) e precisão intermediária (inter-dias) apresentada na tabela 13. Os valores do DPR foram menores que 0,57 % (intradias) e 0,42% (interdias), demonstrando a adequada precisão do método, com valores de DPR inferiores a 2%.

5.4.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da percentagem de recuperação da rosuvastatina, nas concentrações 75, 100 e 125% da concentração de trabalho. A recuperação para cápsulas variou entre 99,79 e 101,63 %, com média de 100,76% demonstrando a exatidão do método (Tabela 14). As recuperações realizadas para a amostra de comprimidos variou entre 100,73 a 101,20% com média de 101,01 % (Tabela 15), mostrando que o valor de recuperação médio encontrou-se dentro de 95 a 105%, a qual é a faixa de valores aceitáveis.

Tabela 14 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica nas amostras de cápsula, pelo método de análise por CLAE.

Concentração teórico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR	Média de recuperação (%)
15	16,12	99,79	1,32	
20	21,21	100,84	1,14	100,76
25	26,66	101,63	0,87	

Nota:*n=3

Tabela 15 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica nas amostras de comprimidos, pelo método de análise por CLAE.

Concentração teórico ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	DPR	Média de recuperação (%)
15	15,18	101,20	0,10	
20	20,15	100,73	0,42	101,01
25	25,28	101,11	0,67	

Nota:*n=3

5.4.2.5 Limite de quantificação e detecção

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir da curva analítica, com valores de $0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Concluindo-se que o intervalo de trabalho do método ($5\text{-}25 \mu\text{g mL}^{-1}$) está acima do limite de quantificação e de detecção, demonstrando que o método é adequado para o objetivo proposto.

5.4.2.6 Robustez

As tabelas 16 e 17 descrevem os resultados obtidos na avaliação da robustez do método proposto. O método foi considerado robusto para todos os parâmetros avaliados, não apresentando diferença significativa entre os resultados, de acordo com o teste t de Student ($p = 0,05$).

Tabela 16 - Valores obtidos para avaliação da robustez do método analítico das amostras de cápsulas de rosuvastatina cálcica por CLAE.

Parâmetros	Condições	Teores (%)			Teste t de Student*
Diferentes colunas cromatográficas	Coluna 1	98,78	99,72	99,30	0,60
	Coluna 2	99,29	99,38	98,46	
Equipamentos com diferentes temperaturas	Equip. 1	98,78	99,72	99,30	0,22
	(25° C)				
	Equip. 2	98,26	98,83	99,11	
Proporção de fase móvel	(65:35)	98,78	99,72	99,30	0,13
	(64:36)	100,47	99,53	99,93	

Nota: *Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 17 - Valores obtidos para avaliação da robustez do método analítico das amostras de comprimidos de rosuvastatina cálcica por CLAE.

Parâmetros	Condições	Teores (%)			Teste t de Student*
Diferentes colunas cromatográficas	Coluna 1	100,51	98,6	98,7	0,84
	Coluna 2	99,97	99,46	98,84	
Equipamentos com diferentes temperaturas	Equip. 1	100,51	98,6	98,7	0,28
	(25° C)				
	Equip. 2	99,96	99,76	100,6	
Proporção de fase móvel	(65:35)	100,51	98,6	98,7	0,08
	(64:36)	101,57	100,43	100,6	

Nota: *Significativo para $p < 0,05$.

5.4.3 Aplicação do método às formas farmacêuticas

Considerando a especificação para o doseamento de 90,0 a 110,0 % do valor rotulado, todas as amostras cumpriram o teste, como observado na Tabela 18. Parâmetros da conformidade do sistema cromatográfico como assimetria, fator de retenção e número de pratos teóricos foram avaliados. Estes foram calculados pelo software LC solution versão 1.21 e todos se apresentaram de acordo as especificações do FDA, garantindo desta forma que as condições estão adequadas para a aplicação do método.

Tabela 18 - Valores do teor de rosuvastatina cálcica e parâmetros cromatográficos das amostras de cápsulas e comprimidos (n=6).

	Teor (%)	DPR (%)	Fator de Assimetria* (<2)	Fator de retenção* (>2)	Pratos teóricos* (>2000)
Formulação A	98,80	0,10	1,18	2,76	4474
Formulação B	100,36	0,38	1,19	2,87	4430
Formulação C	100,01	0,14	1,18	2,82	4476
Formulação D	99,85	0,12	1,18	2,89	4447
Formulação E	99,83	1,10	1,19	2,87	4458
Formulação F	98,58	0,91	1,16	2,85	4471
Formulação G	100,2	1,09	1,18	2,82	4448
Formulação H	99,91	0,22	1,17	2,89	4459
Comprimido Crestor®	99,41	1,03	1,18	2,91	4469

Nota: * Especificações do FDA (UNITED STATES, 2015).

5.4.4 Comparação dos métodos de determinação de rosuvastatina por espectrofotometria no UV e CLAE

A técnica de espectrofotometria no UV já possuiu grande utilização na indústria farmacêutica, no entanto, com o avanço de outras técnicas mais sensíveis, como a cromatografia líquida de alta eficiência, esta técnica apresenta uma menor utilização, porém ainda continua sendo empregada, devido as suas conhecidas vantagens, como baixo custo, fácil manuseio e rapidez nas análises. Atualmente esta é utilizada nas rotinas laboratoriais, não sendo vastamente empregada nos estudos de estabilidade de medicamentos, por não ser considerada sensível o suficiente para detectar produtos de degradação e impurezas. Esta técnica pode ser aplicada na rotina das indústrias farmacêuticas para a realização dos controles em processo, que exigem rapidez e confiabilidade nos resultados. Com os valores obtidos do ensaio de determinação de rosuvastatina padrão de trabalho, cápsulas (formulação E) e comprimidos (Crestor[®]) por análise espectrofotométrica e por CLAE foi realizado o teste t de Student para confirmar estatisticamente que os valores obtidos nas determinações são iguais em ambas as técnicas. De acordo com os resultados apresentados na tabela 19, observa-se que não houve diferenças significativas entre os teores determinados entre as duas técnicas, podendo ambas ser implementadas na rotina laboratorial.

Tabela 19 - Valores obtidos da comparação estatística entre as determinações por CLAE e espectrofotometria UV.

Amostras analisadas	Teores (%)		Teste t de Student *
	CLAE	Espectrometria UV	
Padrão de trabalho	100,26	100,08	0,25
	99,86	100,23	
	99,38	100,23	
Amostra cápsulas	98,78	99,65	0,16
	99,72	99,65	
	99,30	100,07	
Amostra comprimidos	98,70	100,48	0,55
	101,12	100,27	
	99,35	99,86	

Nota: * Significativo para $p < 0,05$.

5.5 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) PARA ROSUVASTATINA CÁLCICA

5.5.1 Otimização das condições cromatográficas do LC-MS/MS

A otimização dos parâmetros experimentais foi realizada com a finalidade de garantir maior sensibilidade e eficiência nas análises do padrão de rosuvastatina cálcica e dos produtos degradados. Várias modificações na composição e proporção da fase móvel, além da vazão, foram realizadas para alcançar melhor desempenho na separação e maior detecção do método. Estas modificações na fase móvel envolveu o emprego de acetonitrila, metanol e água com ácido acético ou ácido fórmico em concentrações de 0,1 ou 0,2%. Com a utilização de acetonitrila com ácido acético 0,2% ou ácido fórmico 0,1 %, ou ainda, metanol e ácido fórmico 0,1%, foi observado maior

tempo de retenção associado com alargamento dos picos. Além disso, duas colunas cromatográficas foram avaliadas (C_{18} e C_8), e a que se apresentou mais adequada foi a coluna C_8 , principalmente em relação ao tempo de retenção. Com os testes realizados, obtendo picos mais simétricos e resposta adequada com os parâmetros otimizados, a melhor condição cromatográfica alcançada foi a utilização de 0,2 % de ácido acético e metanol (60:40, v/v) como fase móvel, coluna Agilent Technologies C_8 (50 x 4,6 mm), 5 μ m, comprimento de onda de 241 nm, vazão 0,3 mL min⁻¹, volume de injeção 1 μ L e temperatura da coluna 40 °C. . A energia de colisão foi de 35 kV. As temperaturas heat block e de interface foram 400 e 250 °C , respectivamente e as vazões dos gases de nebulização e de secagem foram de 1,5 e 15 mL min⁻¹, respectivamente.

5.5.2 Identificação dos produtos de degradação

Os espectros de massas de rosuvastatina cálcica e seus produtos de degradação foram obtidos pelo método de ionização por electrospray, em modo positivo. Observou-se que a ionização desta molécula gerou como íon molecular a espécie (M+H)⁺ com m/z 482.

A análise feita por LC-MS/MS no modo *Product Ion Scan* gerou um espectro de massas no qual foi possível identificar os fragmentos característicos da molécula, sendo esta uma estratégia importante, pois oferece informações que auxiliam na elucidação estrutural dos produtos de degradação formados. O espectro de massas no modo *Product Ion Scan* de rosuvastatina (Figura 19) apresentou os fragmentos com m/z 422, 402, 378, 314, 300, 282, 272, 270, 258, 230 e 189, característicos do fármaco, pois os mesmos são descritos em trabalhos na literatura (SEGALIN, 2015).

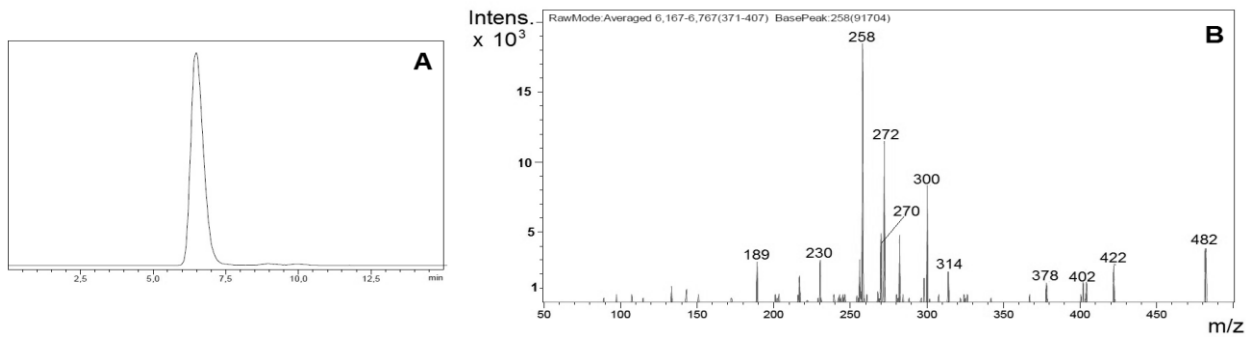


Figura 19 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS em modo TIC(+) da solução padrão de rosuvastatina 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A) e espectro de massa do íon precursor de rosuvastatina, obtido no modo de operação *Product Ion Scan* (B).

Fonte: da autora.

No estudo de estresse foi observado a instabilidade do fármaco frente a hidrólise ácida e fotodegradação. Nas análises obtidas foram detectados um produto de degradação ácida (PD1) e dois produtos por fotodegradação (PD2 e PD3). O espectro de massas de PD1 (Figura 20) mostra o íon molecular de m/z 496 (14 unidades de massa mais elevada que o fármaco rosuvastatina) e seus principais fragmentos. Segundo Reddy et al. (2011) o valor de 14 unidades observado, possivelmente seria o grupo metileno ($-\text{CH}_2$) e juntamente com o padrão de fragmentação formado, pode-se sugerir que PD1 foi obtido a partir da esterificação do grupo ácido presente na molécula do fármaco.

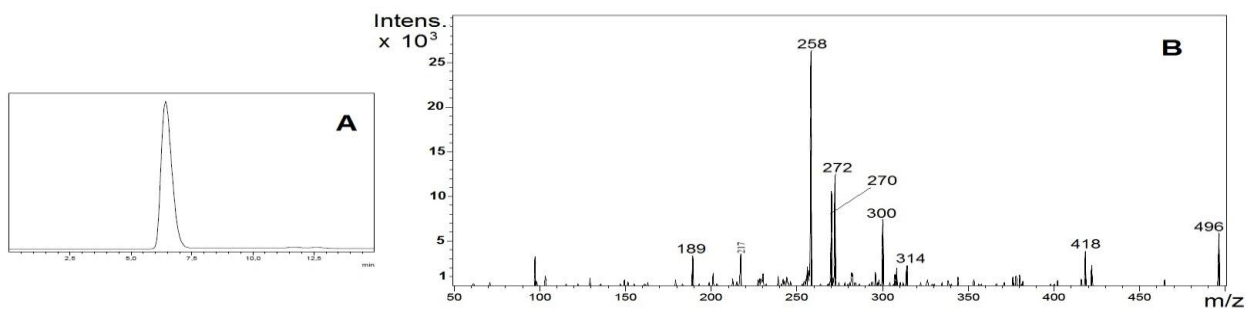


Figura 20 – Cromatograma obtido por LC-MS/MS em modo TIC(+) da solução submetida ao estudo degradação ácida (A) e espectros de massas dos íons precursores de PD1 (B), obtido no modo de operação *Product Ion Scan*.

Fonte: da autora.

Com relação ao PD2 e PD3, foi observado que ambos apresentaram o mesmo valor m/z de 482 da molécula inicial, com padrões de fragmentação semelhantes (figura 21).

De acordo com a literatura, estes produtos podem ser considerados diastereoisômeros, por apresentarem similaridade no padrão de fragmentação e isômeros do fármaco rosuvastatina (KHEDR et al., 2013; SHAH;SAH;SINGH, 2013).

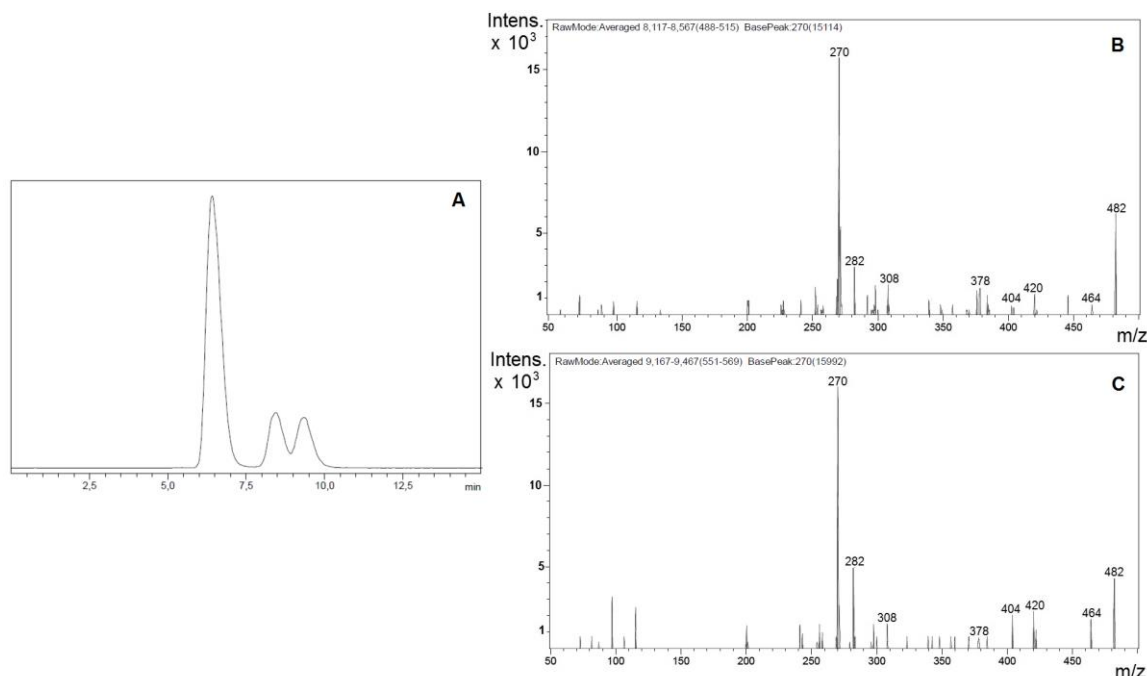


Figura 21 - Cromatograma obtido por LC-MS/MS em modo TIC(+) da solução submetida ao estudo de degradação fotolítica (A) e espectros de massas dos íons precursores de PD2 (B) e PD3 (C), obtido no modo de operação *Product Ion Scan*.

Fonte: da autora.

Shah e colaboradores (2013) sugeriram em seu estudo uma estrutura (Figura 22) para representar estes compostos diastereoisômeros. O padrão de fragmentação de PD2 e PD3 mostra os principais fragmentos com valores de m/z 464 correspondente a $[M-H_2O+H]^+$, 420 correspondente a $[M-H_2O-CO_2+H]^+$, 404 correspondente a $[M-H_2O-CH_3COOH+H]^+$ e 270 correspondente a $[M-SO_2CH_3-C_5H_9O_4+H]^+$ sendo que $C_5H_9O_4$ corresponde a cadeia alifática lateral da molécula de rosuvastatina.

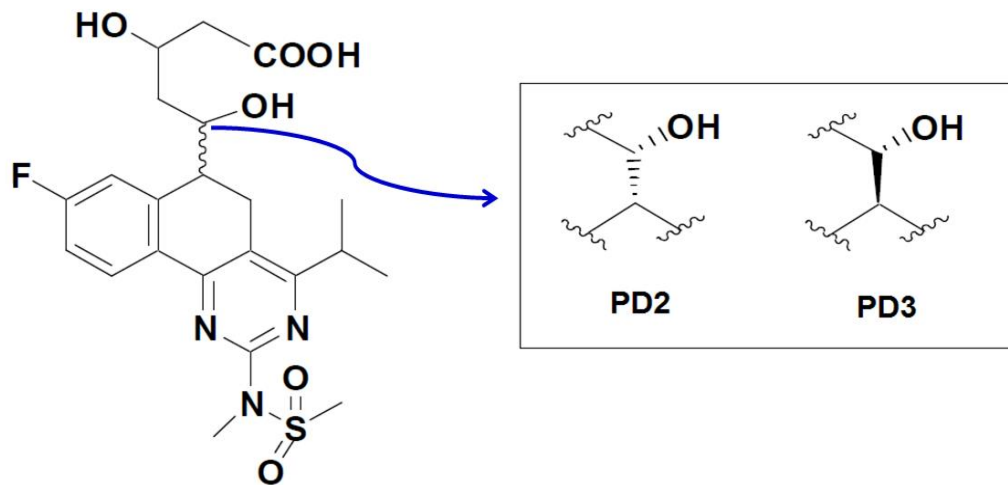


Figura 22 – Estrutura que representa o PD2 e PD3.

Fonte: Adaptado de SHAH; SAHU; SINGH, 2013.

5.5.3 Validação do método de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas

5.5.3.1 Seletividade

A análise do cromatograma do padrão de rosuvastatina cálcica na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de soluções placebo e branco demonstra que não há interferentes no tempo de retenção do fármaco. A confirmação de que nenhum produto de degradação co-eluiu com a rosuvastatina cálcica foi realizada através de análises por espectrometria de massas no tempo de análise da solução padrão do fármaco e das soluções submetidas ao teste de estresse, onde os espectros de massas obtidos do pico de rosuvastatina das soluções degradadas (HCl, NaOH, neutra, luz e H_2O_2) foram iguais ao espectro de massas obtido da solução padrão de rosuvastatina, garantindo a seletividade da separação cromatográfica obtida.

5.5.3.2 Linearidade

A Figura 23 apresenta os dados referentes a linearidade do método.

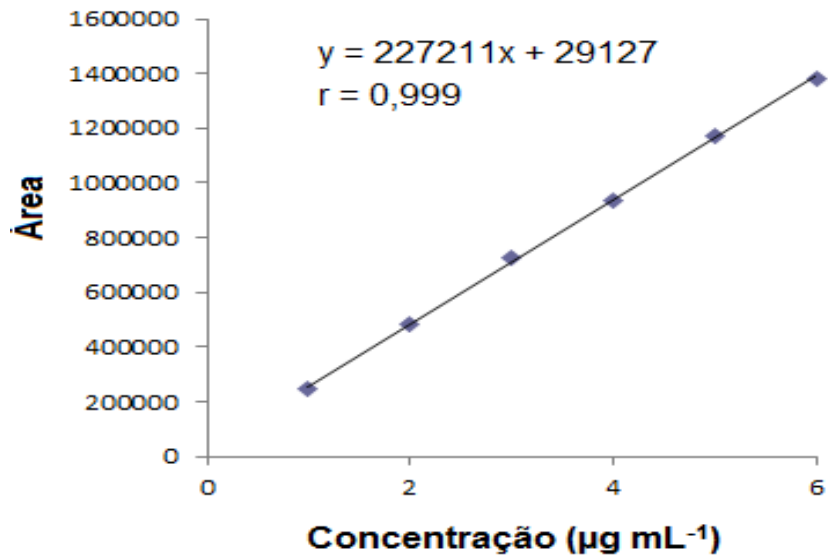


Figura 23 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método LC-MS/MS.

Fonte: da autora

A avaliação da linearidade do método por LC-MS/MS foi realizada de acordo com o descrito no item 4.8.4.2, onde a curva analítica para rosuvastatina padrão de trabalho mostrou-se linear no intervalo avaliado de 1 a 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com $r = 0,999$ (coeficiente de correlação). A equação da reta obtida foi: $y = 227211x - 29127$.

5.5.3.3 Precisão

A Tabela 20 mostra os resultados referentes a precisão inter e intradias.

Tabela 20 - Valores obtidos para avaliação da precisão do método de análise por LC-MS/MS.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão (DPR%)	
	Inter-dias (n=3)	Intra-dias (n=6)
2	0,98	1,51
5	0,49	1,49
6	0,93	1,31

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias) apresentada na tabela 20. Os valores do DPR foram menores que 1,31 % (intradias) e 0,49% (interdias), demonstrando a adequada precisão do método, com valores de DPR inferiores a 2%.

5.5.3.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da percentagem de recuperação da rosuvastatina, nas concentrações 80, 100 e 120% da concentração de trabalho. A recuperação para cápsulas variou entre 99,70 e 100,3 %, com média de 99,87% demonstrando a exatidão do método (Tabela 21).

Tabela 21 - Valores médios de recuperação para rosuvastatina cálcica, pelo método de análise LC-MS/MS.

	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Recuperação (%)
R1 (80%)	4,0	3,98	99,7
R2 (100%)	5,0	5,03	100,7
R3 (120%)	6,0	5,95	99,23

Nota: * n=3.

5.5.3.5 Limite de quantificação e detecção

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos a partir da curva analítica, com valores de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Concluindo-se que o intervalo de trabalho do método ($1-6 \mu\text{g mL}^{-1}$) está acima do limite de quantificação e de detecção, demonstrando que o método é adequado para o objetivo proposto.

5.5.4 Aplicação do método às amostras reais (comprimidos com prazo de validade expirado)

Como observado no teste de degradação forçada, a molécula apresenta instabilidade em condições ácidas e fotolíticas, e considerando que dentre os sistemas de detecção acoplados a cromatografia líquida, a espectrometria de massas é tida como uma técnica mais seletiva e sensível quando comparada a cromatografia líquida UV/DAD, objetivou-se aplicar a metodologia desenvolvida em amostras reais, avaliando o teor e a detecção de possíveis produtos de degradação nestas amostras com prazo de validade expirado.

As amostras dos medicamentos (comprimidos) com o prazo de validade expirado foram codificadas como P1 (validade: 01/2015), P2 (validade: 04/2015), P3 (validade: 05/2015) e P4 (validade: 09/2015), e como resultado, observou-se apenas redução no teor de uma das amostras avaliadas, considerando a especificação para doseamento de 90 a 110% do valor rotulado, e nenhum produto de degradação foi detectado de acordo com as condições analisadas. Na tabela 22, está especificado o valor do teor obtido para cada produto avaliado.

Tabela 22 - Valores de teor obtidos a partir do teste de doseamento por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, de amostras reais (comprimidos com prazo de validade expirado).

% de teor ± DPR de amostras com prazo de validade expirado			
P1	P2	P3	P4
88,04% ± 3,54	96,16% ± 0,61	93,25% ± 2,46	96,09% ± 1,34

5.6 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

A seguir estão descritas as condições de otimização, desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para rosuvastatina cálcica.

5.6.1 Solubilidade

Segundo as agências reguladoras a faixa de pH a ser avaliada nos ensaios de solubilidade varia de 1,2 a 6,8, sendo ainda mencionado que no mínimo três valores de pH (1,2; 4,5 e 6,8) devem ser avaliados (BRASIL, 2011; UNITED STATES, 2015; EMEA, 2010; WHO, 2005). A seguir estão os valores (tabela 23) obtidos no ensaio de solubilidade para as duas formas sólidas estudadas.

Tabela 23 - Valores obtidos do estudo de solubilidade para a forma amorfa e para a forma recristalizada.

Meios de dissolução	Solubilidade	
	Forma amorfa	Forma recristalizada
Tampão fosfato pH= 6,8	14,34 ± 1,86	5,73 ± 0,66
Tampão acetato pH= 4,5	2,42 ± 0,99	2,00 ± 0,01
Tampão acetato pH= 4,5 + LSS	2,21 ± 0,04	2,14 ± 0,0-3
Água	7,64 ± 0,241	4,13 ± 0,58
HCl	0,53 ± 0,01	0,42 ± 0,06

A solubilidade de rosuvastatina cálcica apresentou um comportamento dependente do pH, relacionado com as propriedades do fármaco ser um ácido fraco ($pK_a = 4,6$ para a porção grupamento ácido carboxílico), e sua ionização ser maior em valores de pH mais elevados. A solubilidade da forma amorfa do fármaco foi maior do que a forma cristalina M em todos os meios avaliados. De acordo com os dados obtidos, a solubilidade das duas formas analisadas foi maior no tampão fosfato pH 6,8 ($14,34 \pm 1,86$ e $5,73 \pm 0,66$ mg/mL, forma amorfa e forma cristalina M, respectivamente) e na água ($7,64 \pm 0,24$ e $4,13 \pm 0,58$ mg/mL, forma amorfa e forma cristalina M, respectivamente). Neste valor de pH ocorre a ionização do grupamento ácido da molécula. Entretanto, a solubilidade de rosuvastatina cálcica em meios com valores de pH menores que 6,8 não apresentou diferenças muito evidentes entre a forma cristalina M e a forma amorfa. No meio de pH 1,2 avaliado (HCl 0,1 M), a forma amorfa apresentou solubilidade de $0,53 \pm 0,01$ mg/mL, enquanto que a forma cristalina M mostrou uma solubilidade de $0,42 \pm 0,06$ mg/mL. A solubilidade de rosuvastatina cálcica em tampão acetato de sódio (pH 4,5) foi determinada com e sem a adição do agente tensoativo iônico lauril sulfafo de sódio LSS (0,1% m / v). Os resultados obtidos no tampão acetato de sódio (pH 4,5) sem LSS foram $2,42 \pm 0,09$ para a forma amorfa e $2,00 \pm 0,01$ mg/mL para a forma cristalina M. Quando foi incluído LSS no meio tampão acetato de sódio pH=4,5 os resultados encontrados foram $2,21 \pm 0,04$ para a forma amorfa e $2,14 \pm 0,03$ mg/mL para a forma cristalina M. Com base nestes resultados, foi observado que a solubilidade do fármaco não foi aumentada com a utilização do agente tensoativo aniônico no tampão acetato de sódio (pH= 4,5). Estes resultados indicaram que a solubilização micelar do fármaco não é uma estratégia eficaz para promover a solubilidade aquosa de rosuvastatina cálcica, pois uma vez que a rosuvastatina é um fármaco com características hidrofílicas ($\log P = 0,13$), é provável que não ocorra solubilização desta molécula. Os resultados de solubilidade do fármaco para ambas as formas estudadas, demonstraram que as condições *sink* foram asseguradas em todos os meios avaliados, além do comportamento de solubilidade ser dependente do pH do fármaco.

Os critérios considerados para assegurar condições *sink* foram a obtenção de uma solubilidade em equilíbrio do fármaco no meio de dissolução, de pelo menos, três vezes maior do que a concentração de fármaco durante o teste de dissolução. Quando as condições *sink* são asseguradas, a solubilidade do fármaco no meio de dissolução não é um fator limitante na velocidade de dissolução (STORPIRTIS; GAIN, 2011). Devido à ocorrência de condições *sink in vivo*, a relevância dos meios de dissolução que asseguram condições *sink* é maior. Assim, rosuvastatina cálcica mostrou uma solubilidade elevada em todos os meios aquosos avaliados, assegurando condições *sink* na faixa de pH (1,2-6,8). Dessa forma, de acordo com SCB, sugere-se que este fármaco pode ser classificado como alta solubilidade, considerando que a maior dosagem de comprimido é de 40 mg, e a sua solubilidade em um volume de 250 ml de meio aquoso foi alcançada em todos os meios avaliados (solubilidade aquosa > 0,16 mg/mL). Na figura 24, podemos observar a comparação de solubilidade das duas formas analisadas.

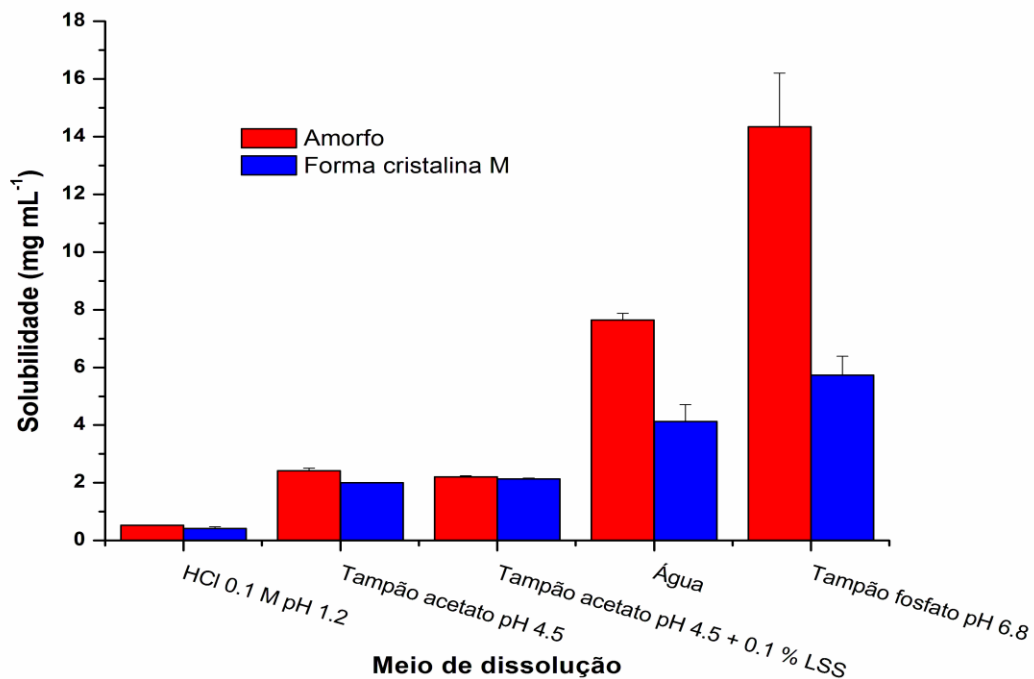


Figura 24 - Gráfico comparativo da solubilidade da forma amorfa e forma cristalina M nos meios aquosos testados.

Fonte: da autora.

5.6.2 Otimização do ensaio de dissolução para cápsulas e comprimidos

Com o intuito de avaliar o impacto das propriedades do estado sólido e ainda mais, avaliar a influência da formulação no perfil de dissolução, um ensaio de dissolução discriminativo foi desenvolvido. Para isso, diferentes formulações manipuladas em laboratório e outras obtidas no comércio local foram avaliadas.

Os testes foram realizados com as formulações descritas nas tabelas 1 e 2. Primeiramente foi realizado o teste de desintegração das cápsulas das formulações magistrais obtidas do comércio local, onde foi observado que as formulações A, B e C desintegraram nos tempo de 4, 6 e 3 minutos, respectivamente, e dessa forma, o tempo de início para coleta das amostras no ensaio de dissolução foi iniciado após 10 minutos.

O perfil de dissolução das formas farmacêuticas foi avaliado utilizando-se como meio de dissolução 500 mL da solução de tampão fosfato de potássio pH= 6,8. Este meio foi escolhido, baseado na maior solubilidade de rosuvastatina cálcica neste valor de pH. O estudo foi realizado com seis unidades de cada formulação, utilizando aparato 1 (cesta), com velocidade de 50 rpm a 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$), com intervalos de coleta de 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. A cada coleta 5 mL de amostra foram retiradas, com imediata reposição do mesmo volume de meio.

As formulações magistrais obtidas do comércio local foram testadas e os dados obtidos estão apresentados na figura 25.

Nas três formulações, houve uma liberação de $89,7 \pm 5,4$ % para a formulação A, $64,7 \pm 18,7$ % para a formulação B e $90,4 \pm 1,83$ % da formulação C em 60 minutos. A formulação B apresentou uma baixa liberação, possivelmente por conter em sua formulação estearato de magnésio, o qual é utilizado geralmente como lubrificante no intuito de melhorar as propriedades de enchimento das cápsulas. Por outro lado, a formulação C possui em sua composição um agente superdesintegrante (croscarmelose sódica), o qual interfere diretamente na velocidade de desagregação, promovendo a dissolução. Sendo assim, a formulação C foi também avaliada,

utilizando o aparato pá a 50 rpm, empregando *sinkers* para evitar a flutuação das cápsulas. No entanto, foi observado que em 60 minutos houve um aumento de apenas 2,14 % (92,54 % de liberação) e ainda, houve aumento do desvio padrão entre as réplicas.

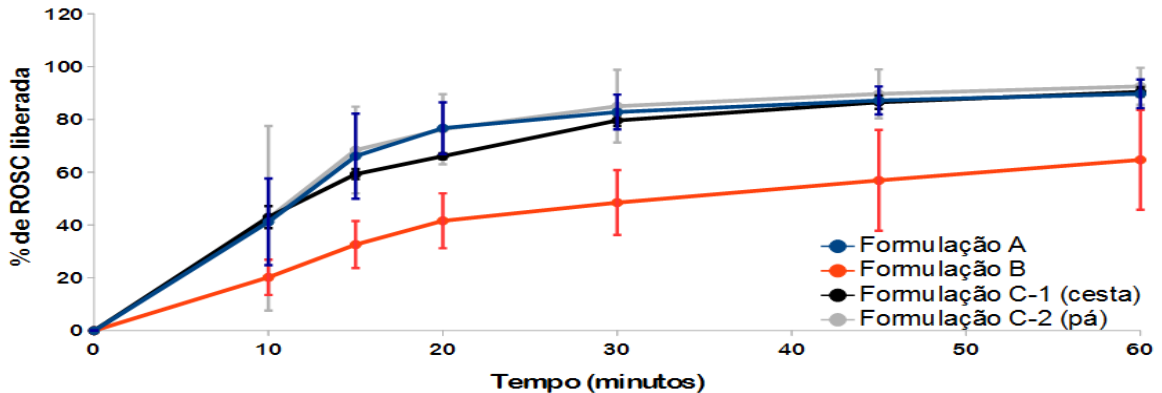


Figura 25 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local. As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão fosfato pH= 6,8, aparato cesta e pá*, com velocidade de rotação 50 rpm e volume de 500 mL. *Aparato pá utilizado na formulação C.

Fonte: da autora.

Com base nas formulações preparadas em farmácias magistrais, realizamos a manipulação em laboratório de 5 formulações, como observado na tabela 2. Entre estas formulações, uma contém o fármaco na forma cristalina M (formulação D) para avaliar o impacto do polimorfismo no estado sólido, no perfil de dissolução das cápsulas.

Primeiramente foram manipuladas as formulações E e F, as quais contêm dióxido de silício coloidal, talco e amido, e na formulação E ainda há um quarto componente, o carbonato de magnésio. O dióxido de silício coloidal é normalmente utilizado como adsorvente, evitando que a formulação absorva umidade, além de diminuir o coeficiente de atrito, auxiliando no aumento da fluidez. O talco foi utilizado como lubrificante, reduzindo a adesão entre os pós e melhorando as propriedades de fluxo. O amido e o carbonato de magnésio foram empregados como diluentes, os quais são adjuvantes inertes que participam em maior proporção dentro da formulação com a função de aumentar o volume até uma quantidade manipulável, e além de diluente o

carbonato de magnésio ainda previne absorção de umidade (AULTON, 2005; PRISTA, 2002).

Após o teste com as duas formulações (E e F), foi observado que ambas apresentaram liberação similar, no entanto, a formulação E apresentou um menor desvio entre as réplicas quando comparada com a F. Dessa maneira, a formulação E foi utilizada para a manipulação das cápsulas que contêm a forma cristalina M (codificada como formulação D) em função do menor desvio entre as réplicas observado. A formulação D apresentou um baixo perfil de liberação de rosuvastatina cálcica (figura 26), o qual está diretamente associado à menor solubilidade da forma cristalina M.

Foi analisado também formulações com diferentes proporções de estearato de magnésio (2,5 e 5,0%), denominadas formulações G-1 e H, respectivamente. O objetivo destas determinações foi confirmar a interferência do excipiente estearato de magnésio nas propriedades de liberação do fármaco. Ainda mais, a formulação G, que contém a quantidade de 2,5 % de estearato de magnésio foi avaliada utilizando o aparato pá com *sinkers*.

Os perfis de dissolução das formulações D, E, F, G (pá e cesta) e H estão apresentados na figura 26.

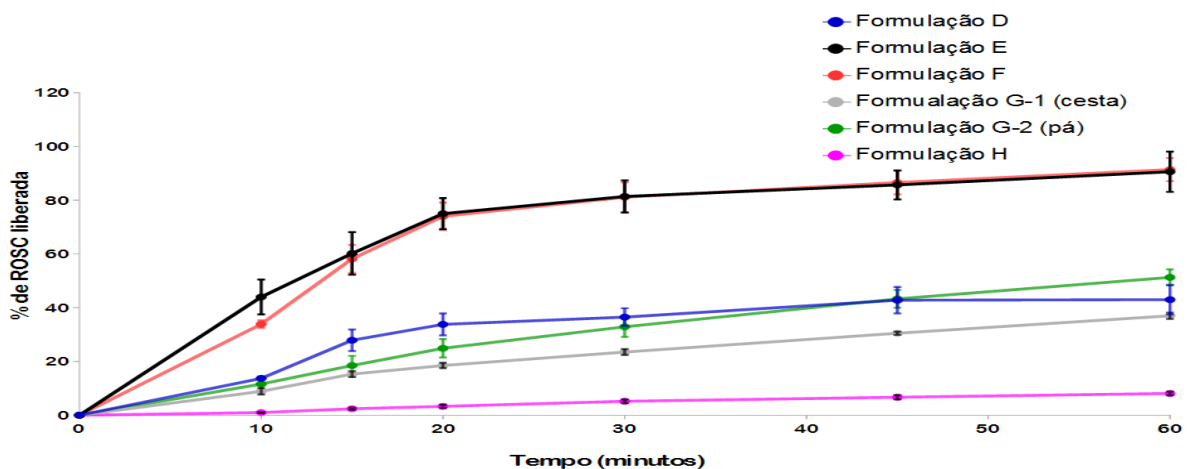


Figura 26 - Perfis de dissolução de cápsulas manipuladas em laboratório (n= 6). As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão fosfato pH= 6,8, aparato cesta e pá*, com velocidade de rotação 50 rpm e volume de 500 mL. *Aparato pá utilizado na formulação G-2.

Fonte: da autora.

Pode-se observar que a liberação com as formulações de 2,5 e 5% de estearato de magnésio apresentaram uma liberação muito inferior ($30,0 \pm 1,2\%$ e $8,1 \pm 0,8\%$, respectivamente) comparada à formulação B que contém somente 1 % deste excipiente. Estes resultados demonstram a influência negativa do estearato de magnésio na liberação de rosuvastatina cálcica, uma vez que este excipiente apresenta características hidrofóbicas e reduziu a molhabilidade da massa de pós no meio de dissolução, prejudicando a liberação da rosuvastatina cálcica. Com relação a utilização do aparato pá, houve um aumento na liberação em 60 minutos quando comparado aos resultados encontrados utilizando o aparato cesta ($51,3 \pm 3,0\%$ e $30,0 \pm 1,2\%$, respectivamente). Considerou-se que o uso do aparato pá pode reduzir o poder discriminante do método, já que a formulação C (formulação de liberação mais rápida) não apresentou diferenças importantes nas suas características de dissolução variando o aparato utilizado.

Os perfis de dissolução das formulações comerciais e das três principais formulações manipuladas em laboratório foram avaliados com velocidade de rotação a 100 rpm (Figura 27). As formulações A, C, E e F, apresentaram desde o tempo de 20 minutos liberação superior a 87 %. No tempo de 30 minutos a liberação a partir destas mesmas formulações foi praticamente total, com valores superiores a 95 %. Em relação ao desvio entre as réplicas analisadas, no tempo de 30 minutos houve um menor desvio em relação aos tempos anteriores. A condição de análise foi capaz de discriminar entre formulações com problemas relacionados a menor solubilidade da forma sólida do fármaco utilizado. Dessa forma, a rotação de 100 rpm, utilizando o aparato cesto a 30 minutos foi escolhida como a mais apropriada para avaliar a liberação de rosuvastatina cálcica na forma farmacêutica cápsula. Além disso, estabeleceu-se como especificação para a forma farmacêutica cápsula que não menos que 85 % de rosuvastatina cálcica fosse liberada em 30 minutos ($Q= 80$). Estas especificações foram estabelecidas de modo a assegurar a rápida e completa liberação do fármaco, o que é coerente com a forma farmacêutica estudada, por tratar-se de uma formulação de liberação imediata.

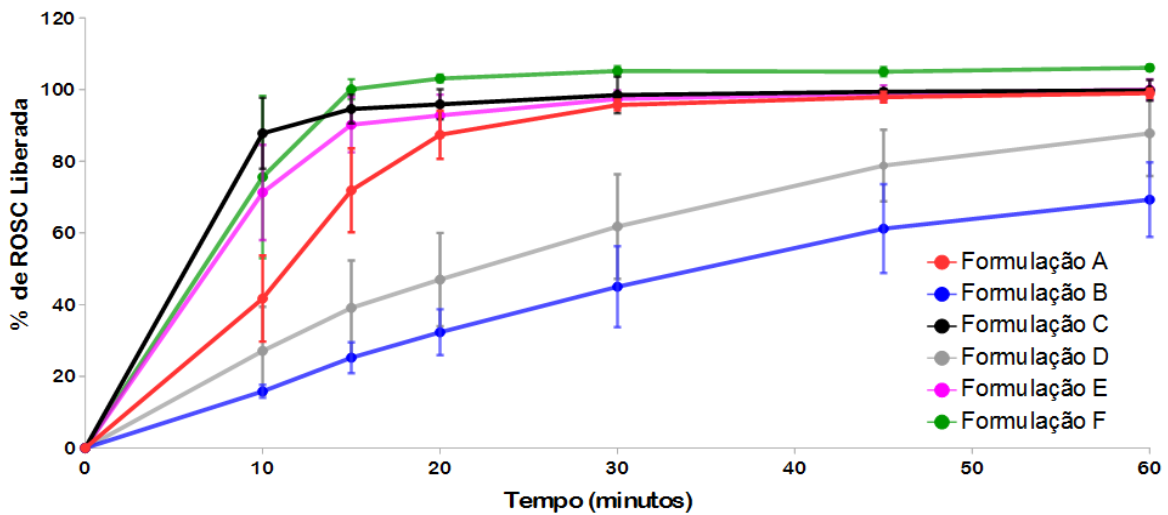


Figura 27 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local e cápsulas manipuladas em nosso laboratório (D, E e F). As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão fosfato pH= 6,8, aparato, com velocidade de rotação 100 rpm e volume de 500 mL.

Fonte: da autora.

Considerando a faixa de pH (pH \approx 5,0) em que o fármaco possui melhores características de absorção, o meio acetato de sódio também foi avaliado para as formulações comerciais.

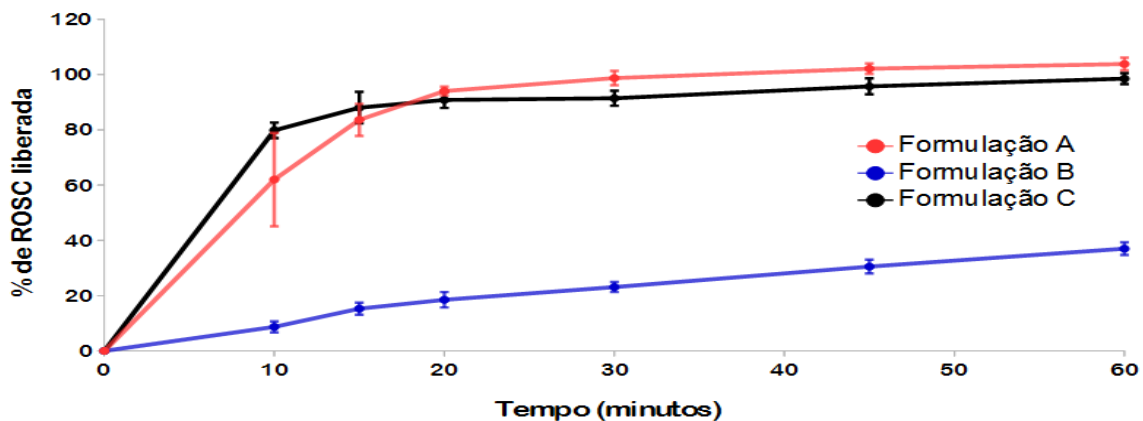


Figura 28 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local. As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão acetato de sódio pH= 4,5, aparato cesta, com velocidade de rotação 100 rpm e volume de 500 mL.

Fonte: da autora.

Como observado na figura 28, a formulação B que contém 1 % de estearato de magnésio, apresentou uma menor taxa de liberação comparada às formulações A e C.

As formulações A e C apresentaram perfis similares com rápida dissolução de rosuvastatina cálcica, respectivamente $94,0 \pm 1,6 \%$ e $90,8 \pm 2,9 \%$, em 20 minutos. Entretanto, o meio com tampão fosfato de potássio pH= 6,8 foi escolhido para o desenvolvimento do ensaio, pois a solubilidade do fármaco no meio pH 6,8 foi mais elevada para as duas formas sólidas avaliadas, em comparação ao tampão acetato pH= 4,5. Considerando que a solubilidade é o principal fator associado a liberação do fármaco, a solubilidade do fármaco no meio deve ser elevada de modo a assegurar condições *sink*, aumentando a relevância biológica do meio de dissolução.

O meio de dissolução com tampão acetato pH= 4,5 adicionado de lauril sulfato de sódio 0,1% também foi avaliado. De acordo com a figura 29, foi observado que o acréscimo deste tensoativo faz com que ocorra redução do poder discriminativo do ensaio de dissolução entre as formulações avaliadas, pois neste caso ocorre a molhabilidade da formulação B, aumentando artificialmente a dissolução destas formulações devido a presença do agente molhante no meio.

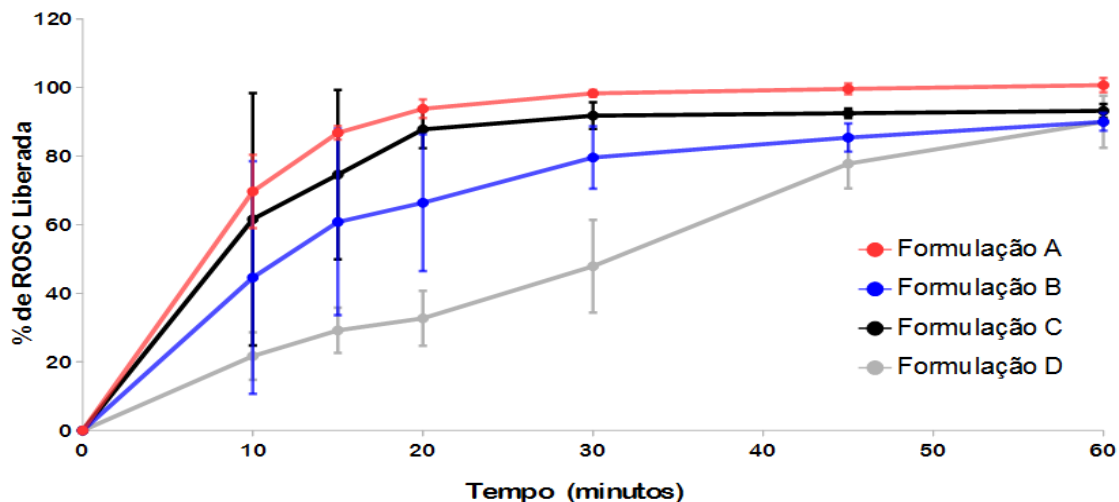


Figura 29 - Perfis de dissolução de cápsulas comerciais (n= 6), preparadas em farmácias magistrais do comércio local e cápsulas manipuladas em nosso laboratório (D, E e F). As condições utilizadas foram meio de dissolução tampão acetato de sódio pH= 4,5 adicionado de LSS, aparato cesta, com velocidade de rotação 100 rpm e volume de 500 mL.

Fonte: da autora.

A eficiência de dissolução (ED), a qual é definida como a área sob a curva de dissolução, em um determinado intervalo de tempo, foi calculada a partir das curvas de porcentagem de fármaco dissolvido versus o tempo. A partir destes resultados, determinou-se a área sob a curva (AUC) a partir do método dos trapézios. O valor de porcentagem da AUC em relação á a área total do gráfico, foi utilizado para calcular a ED (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

Na figura 30, observam-se os resultados da eficiência de dissolução para os diferentes meios avaliados.

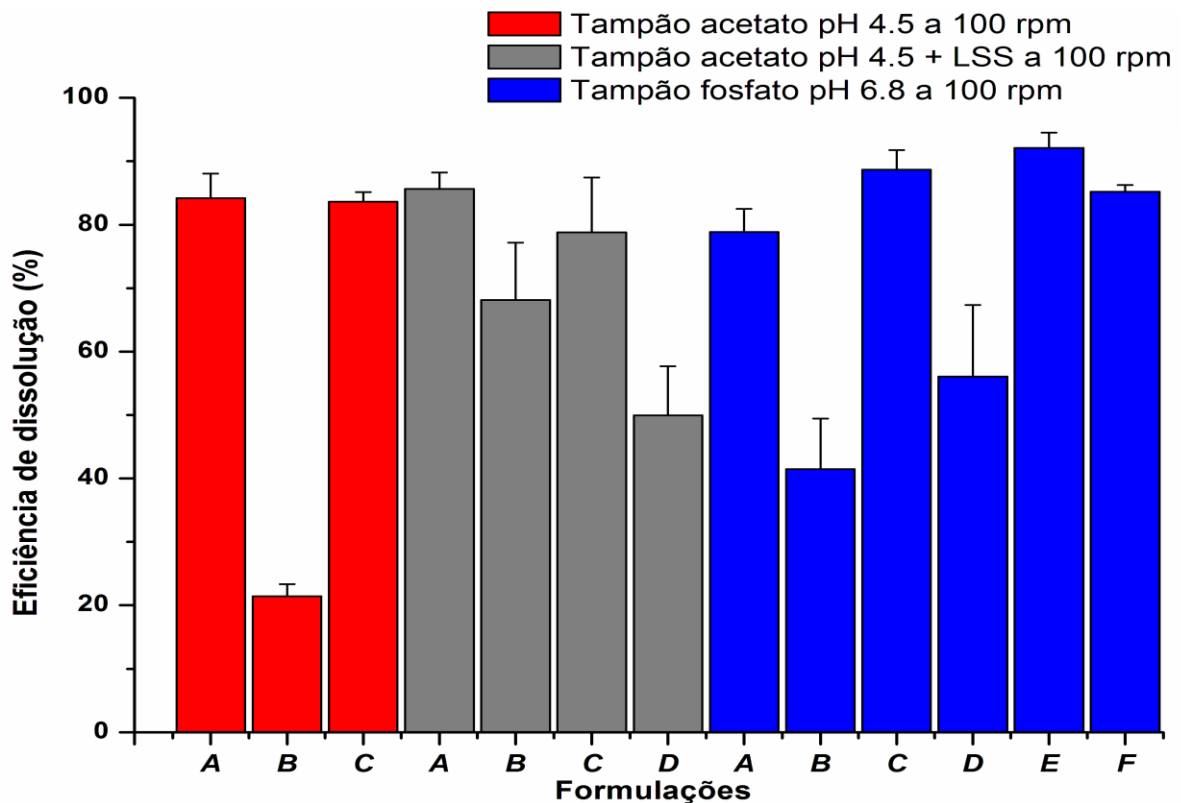


Figura 30 - Eficiência de dissolução avaliada com as diferentes formulações em diferentes meios de dissolução.

Fonte: da autora.

Uma taxa de liberação rápida foi caracterizada para todas as formulações, exceto para as formulações B e D. A formulação B por conter estearato de magnésio formou uma mistura de pó com caráter hidrofóbico, e diminuiu a molhabilidade da formulação, reduzindo a taxa de liberação do fármaco e reduziu a taxa de liberação do

fármaco em todas as condições que foram avaliadas. A formulação D, por conter uma forma sólida diferente com menor solubilidade aquosa, apresentou também uma menor taxa de liberação, fazendo com que estes resultados apresentem grande relevância em caracterizar o poder discriminativo do ensaio de dissolução desenvolvido neste trabalho.

O fator de similaridade (F2) não foi calculado para comparar os perfis de dissolução devido à rápida liberação do fármaco na maioria das formulações (C, E e F) com valores de liberação do fármaco em 15 minutos de 94,6%, 100,1% e 90,2%, respectivamente. Desta forma, o cálculo da ED mostrou-se uma estratégia mais eficaz para comparação dos perfis de dissolução e com os valores obtidos foi realizada a análise por ANOVA e o teste Tukey para comparação dos perfis realizados em tampão fosfato a 100 rpm. Com o teste Tukey foi observado diferença significativa para as formulações A, B e C com $p < 0,05$ (0,0063, 0,0003 e 0,0014, respectivamente), confirmando diferença no perfil de dissolução destas formulações quando comparadas com a formulação E, que apresentou melhor liberação. No entanto, a formulação A de acordo com o teste estabelecido atende ao critério de no mínimo 85 % de liberação do fármaco em 30 minutos.

Por fim, as condições definidas para realizar o teste de dissolução de cápsulas de rosuvastatina cálcica foram: 500 mL de tampão fosfato de potássio pH=6,8 utilizando aparato cesta a 100 rpm. A quantidade de fármaco dissolvida de 80% aos 30 minutos foi selecionada como especificação para o teste de dissolução de um ponto único para a avaliação de cápsulas de rosuvastatina cálcica em análises de rotina.

Foi otimizado também um método para avaliar o perfil de dissolução da forma farmacêutica comprimidos. Para isto, foi considerado a faixa de pH fisiológico, avaliando três meios de dissolução no volume de 500 mL, onde foi empregado como meio o tampão fosfato pH= 6,8, tampão acetato pH= 4,5 e HCl pH=1,2, com aparato pá o qual é o aparato rotineiramente utilizado para comprimido (UNITED, 2015) e rotação de 50 rpm.

Os resultados na figura 31 demonstram que houve uma liberação acima de 85 % nos três meios de análise, onde o HCl pH= 1,2 foi o meio que apresentou maior desvio

entre as réplicas avaliadas quando comparado aos demais meios, podendo-se sugerir como escolha do melhor meio de dissolução o tampão fosfato pH=6,8, já que neste houve maior liberação do fármaco da forma farmacêutica comprimidos e maior solubilidade do fármaco no ensaio de solubilidade aquosa.

Assim um método para a forma farmacêutica comprimido também pode ser proposto com utilização de tampão fosfato pH=6,8, aparato pá e velocidade de rotação de 50 rpm, considerando um mínimo de 85 % de liberação do fármaco em 30 minutos (Q= 80).

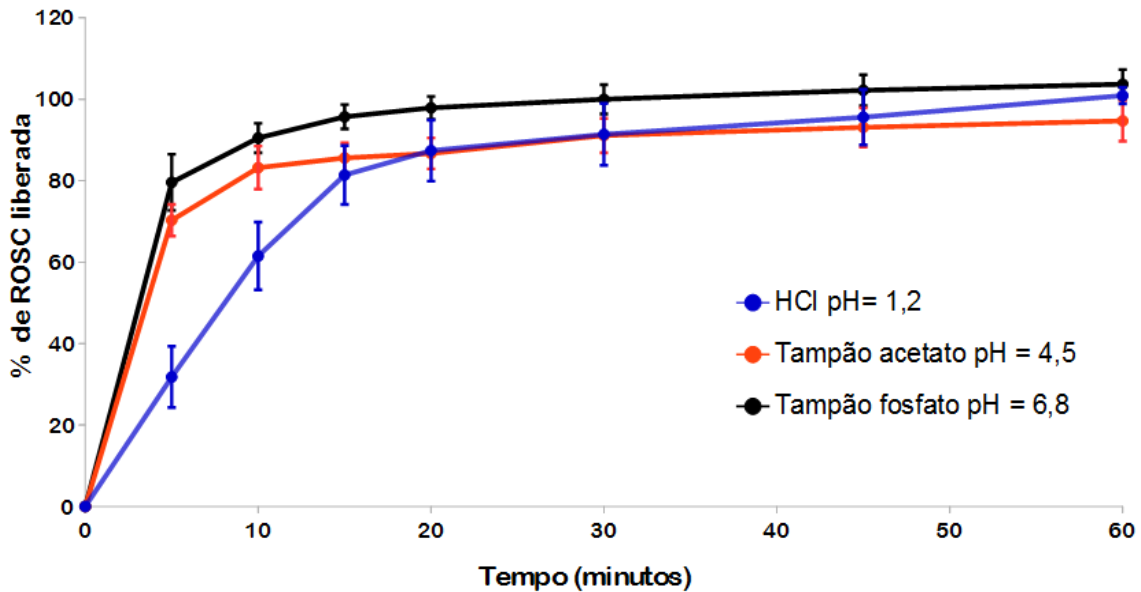


Figura 31 - Perfis de dissolução de comprimidos Crestor[®] (n= 6) utilizando tampão fosfato pH 6,8, aparato pá, com velocidade de 50 rpm e volume de 500 mL.

Fonte: da autora.

5.6.3 Validação do método de dissolução

A validação do ensaio de dissolução foi realizada através dos critérios estabelecidos pela USP (UNITED, 2015), ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

5.6.3.1 Seletividade

Na avaliação da seletividade do método de dissolução por CLAE, foram realizadas análises da cápsula vazia e placebo, os quais não foram observados picos cromatográficos adicionais no mesmo tempo de retenção do fármaco, demonstrando, assim, a seletividade do método proposto.

5.6.3.2 Linearidade

Para as concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rosuvastatina, foi obtida a seguinte equação de calibração $y = 49091 (\pm 465) x + 25595 (\pm 1247)$ e $r = 0,99968$. A regressão por mínimos quadrados mostrou coeficiente de correlação satisfatório ($r = 0,9999$), confirmando a linearidade do método na Figura 32. O desvio padrão relativo de cada ponto ($n = 3$) foi inferior a 2%. Estes resultados satisfazem os critérios de aceitação (UNITED, 2015).

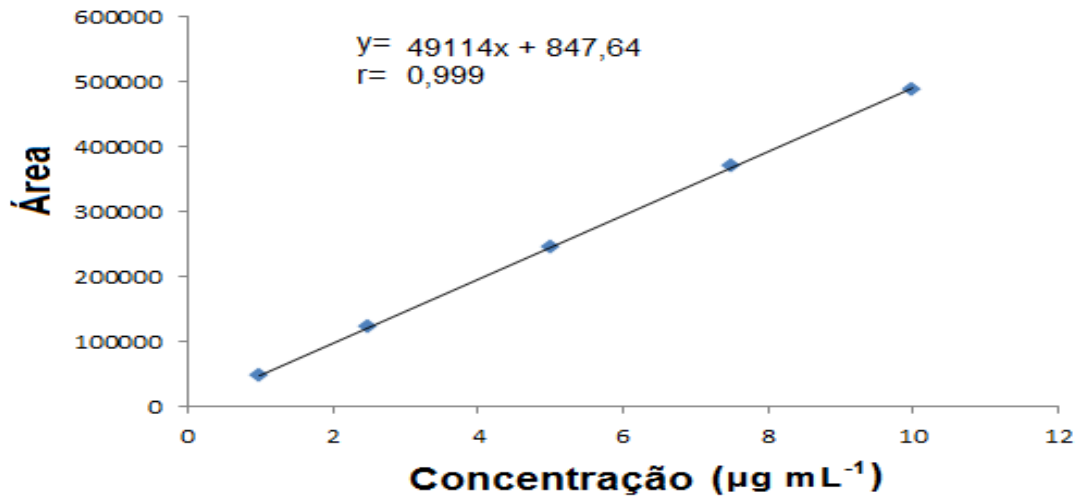


Figura 32 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método CLAE para dissolução.

Fonte: Da autora.

5.6.3.3 Precisão

Os resultados da repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias) do procedimento de dissolução foram aceitáveis, uma vez que os desvios padrão relativos não excederam 5,0%, apresentando precisão adequada para o teste de dissolução (UNITED, 2015; BRASIL, 2003), conforme Tabelas 24 e 25.

Tabela 24. Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de cápsulas de rosuvastatina cálcica.

	Precisão interdias (n=12)	Precisão intradidas (n=6)
Média %	97,4	98,9
DPR%	1,62	1,41

Tabela 25 - Valores obtidos no teste de precisão de ensaio de dissolução de comprimidos de rosuvastatina cálcica.

	Precisão interdias (n=12)	Precisão intradidas (n=6)
Média %	95,91	96,33
DPR%	0,51	1,03

5.6.3.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da percentagem de recuperação da rosuvastatina nas concentrações 75, 100 e 125 % da concentração de trabalho, conforme mostra a Tabela 26. A recuperação média foi de 101,57 %, confirmando a exatidão do método cromatográfico (UNITED, 2015).

Tabela 26 - Valores obtidos no teste de recuperação de rosuvastatina após realização de ensaio de dissolução.

	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%) \pm DP
R1 (75%)	30,0	98,76 \pm 0,37
R2 (100%)	40,0	100,7 \pm 0,11
R3 (125%)	50,0	99,95 \pm 0,86

* n=3

5.6.3.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção encontrado foi de $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de quantificação encontrado foi de $0,35 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados demonstram que as análises foram realizadas em uma região acima destes valores (intervalo de trabalho do método: $1,0\text{--}25 \mu\text{g mL}^{-1}$).

5.6.3.6 Robustez

Diferentes parâmetros foram avaliados com relação a robustez do ensaio de dissolução para as formas farmacêuticas cápsulas e comprimidos (Tabelas 27 e 28). Foi realizado o teste t de Student para comparação dos resultados obtidos em relação a diferentes equipamentos, diferentes marcas de filtros e diferentes temperaturas do meio. De acordo com os resultados obtidos, o método pode ser considerado robusto para as variações analisadas.

Tabela 27 - Valores obtidos do teste de robustez do ensaio de dissolução cápsulas.

Parâmetros	Condições	Teores (%)			Teste t de Student
Diferentes equipamentos	Equipamento 1	97,62	98,09	98,25	0,72
	Equipamento 2	100,56	95,64	95,73	
Marca de Filtro	JProlab	97,62	98,09	98,25	0,79
	Vetec	100,76	95,80	95,93	
Diferentes temperaturas de meio	37 °C	97,62	98,09	98,25	0,14
	36 °C	96,38	96,85	97,88	

Nota: * Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 28 - Valores obtidos do teste de robustez do ensaio de dissolução comprimidos.

Parâmetros	Condições	Teores (%)			Teste t de Student
Diferentes equipamentos	Equipamento 1	100,01	99,32	98,86	0,62
	Equipamento 2	103,14	96,41	100,17	
Marca de Filtro	JProlab	100,01	99,32	98,86	0,12
	Vetec	103,14	100,17	100,87	
Diferentes temperaturas de meio	37 °C	100,01	99,32	98,86	0,15
	36 °C	103,14	96,41	100,17	

Nota: * Significativo para $p < 0,05$.

5.6.4 Aplicação do ensaio de dissolução para avaliação do perfil comparativo com medicamentos similares

Após o desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução para comprimidos, utilizando como meio de dissolução tampão fosfato de potássio pH= 6,8, com aparato pá e rotação de 50 rpm, o mesmo foi aplicado em três medicamentos similares codificados como S1, S2 e S3, com o objetivo de realizar os testes de controle de qualidade e perfil de dissolução, nos três produtos similares citados, comparando os resultados obtidos com o medicamento de referência.

Como podemos observar na figura 33, o medicamento similar S2 apresenta um perfil de liberação mais lento que o medicamento referência, apesar de que no tempo de 30 minutos ele libera 89,8 % do fármaco, atendendo a proposta de especificação, com liberação de no mínimo 85% (Q=80) no tempo de 30 minutos. Já os medicamentos similares S1 e S3 apresentaram um perfil de liberação semelhante ao medicamento referência. Em função dos medicamentos referência e os similares S1 e S3 terem apresentado rápida dissolução (mais que 85,0% em 15 minutos), com liberação de 95,1%, 95,0% e 97,5%, respectivamente, o fator F2 foi desconsiderado, visto que este perde o seu poder discriminatório. Assim, a eficiência de dissolução (ED%), outro modelo utilizado para comparação entre as formulações, vem sendo usualmente empregado como um parâmetro de confiança na avaliação da equivalência farmacêutica entre medicamentos. Este parâmetro utiliza o cálculo da área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução em relação à área representada pelo tempo total de ensaio, apresentando valores que podem estar mais bem relacionados com o desempenho *in vivo*, já que a biodisponibilidade também é determinada pelo cálculo da área sob a curva. (SERRA; STORPIRTIS, 2007).

Os valores obtidos com ED % foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, para comparar os medicamentos similares S1, S2 e S3 com o medicamento referência Crestor[®] (Figura 34). Houve diferença significativa apenas para o medicamento similar S2 em relação ao medicamento referência, com $p < 0,05$ (<

0,01). Pode-se observar com os testes físicos e físico-químicos (tabelas 29 e 30) e com o perfil de dissolução realizado que os medicamentos similares S1 e S3 apresentou características de peso médio, dureza, desintegração, doseamento, uniformidade e liberação semelhantes ao produto referência Crestor[®].

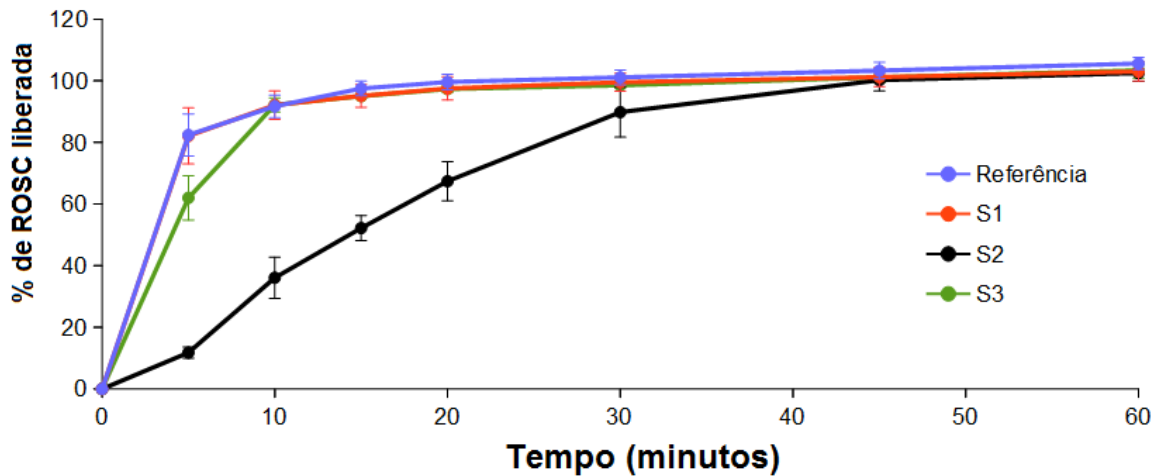


Figura 33 - Perfis de dissolução de comprimidos Crestor[®] e similares (n= 6) utilizando tampão fosfato pH 6,8, aparato pá, com velocidade de 50 rpm e volume de 500 mL.

Fonte: da autora.

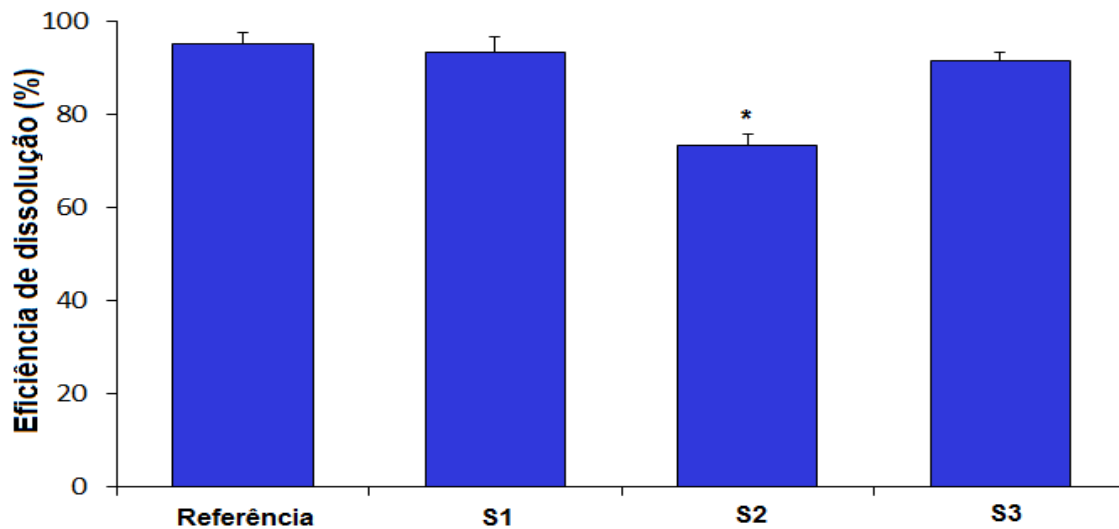


Figura 34 - Eficiência de dissolução avaliada com o comprimido referência Crestor[®] e similares.

Fonte: da autora.

Nota: * Significativo para $p < 0,05$.

Tabela 29 - Resultados obtidos nos testes de peso médio, dureza, friabilidade e desintegração de rosuvastatina cálcica 20 mg.

Produtos	Peso médio ± DP	Dureza (N) ± DP	Desintegração (min.)
Referência	310,5 ± 2,07	7,87 ± 0,81	2
S1	310,0 ± 2,49	15,98 ± 1,98	2
S2	310,3 ± 1,61	11,04 ± 2,06	5
S3	303,3 ± 2,52	5,91 ± 0,80	3

Tabela 30 - Resultados obtidos nos testes de doseamento e uniformidade de rosuvastatina cálcica 20 mg.

Produtos	Doseamento	Uniformidade
Referência	99,6 ± 0,98	100,3 ± 1,46
S1	100,5 ± 1,12	101,1 ± 1,67
S2	98,4 ± 1,23	99,2 ± 1,98
S3	100,2 ± 1,02	100,9 ± 1,78

5.7 DETERMINAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO POR ESPECTROFOMETRIA

Foi avaliada a possibilidade de determinação de rosuvastatina cálcica a partir do ensaio de dissolução em espectrofotometria UV. No entanto, no estudo de seletividade, as amostras de placebo (cápsulas e comprimidos) avaliadas em diferentes solventes de 2ª diluição (tampão fosfato, água, HCl 0,1 M, NaOH 0,1 M, metanol e fase móvel), mostraram absorvância no comprimento de onda em que ocorre absorção do fármaco, tornando-se a aplicação deste ensaio com esta técnica inviável, como pode ser observado nas figuras 35 e 36.

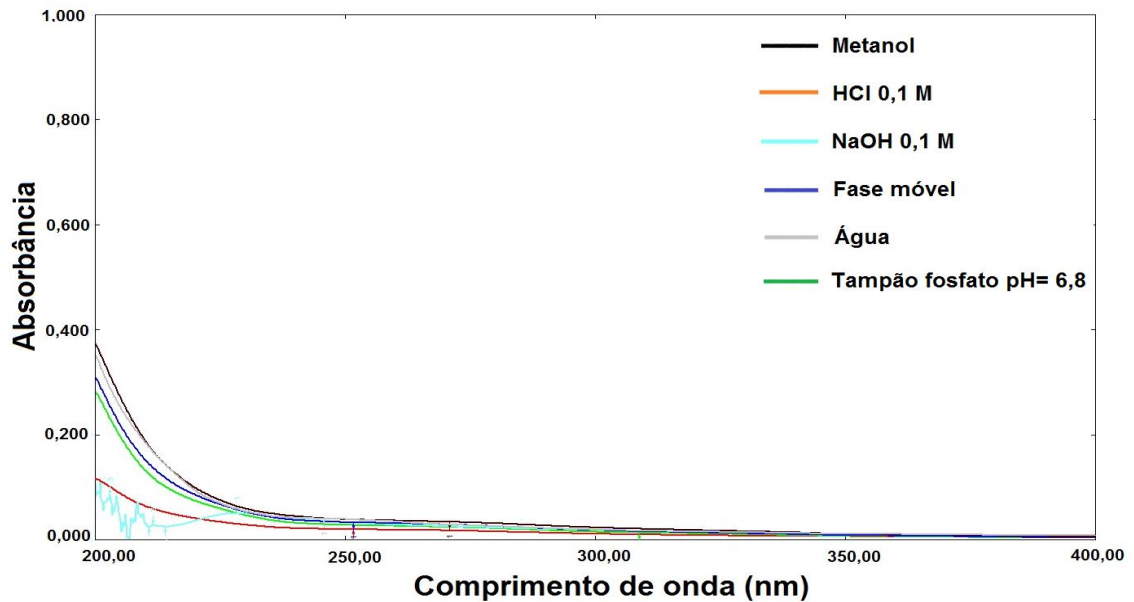


Figura 35 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de cápsulas, diluídas em diferentes soluções para avaliação da seletividade do método de dissolução.

Fonte: da autora.

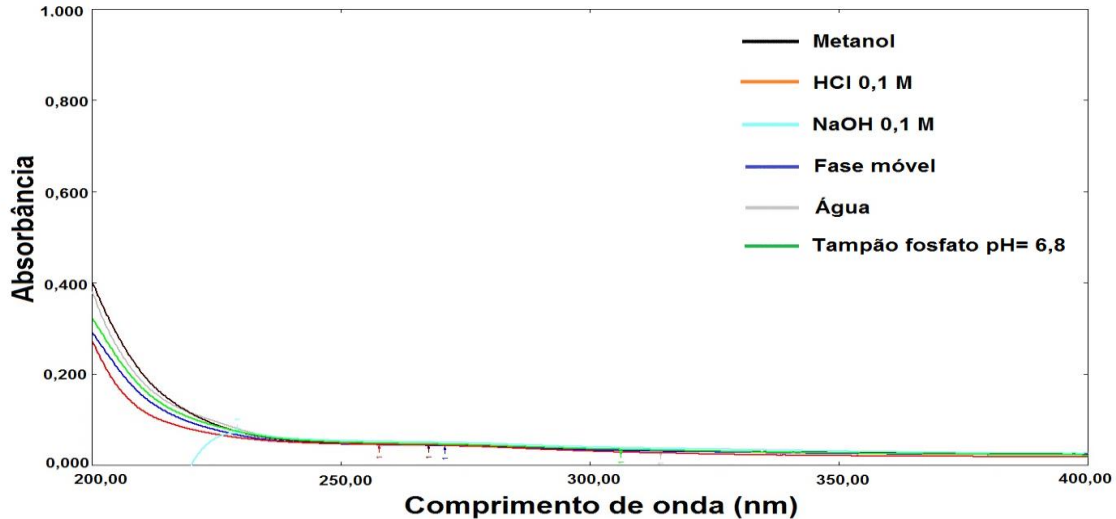


Figura 36 - Varredura espectral de 400 a 200 nm das soluções de excipientes de comprimidos, diluídas em diferentes soluções para avaliação da seletividade do método de dissolução.

Fonte: da autora.

5.8 DESENVOLVIMENTO DE ENSAIO DE DISSOLUÇÃO UTILIZANDO MEIOS BIORRELEVANTES

A seguir estão descritas as condições de otimização, desenvolvimento e validação do ensaio de dissolução biorrelevante para rosuvastatina cálcica.

5.8.1 Otimização e aplicação do meio de dissolução biorrelevante

Com o intuito de avaliar a influência do meio biorrelevante contendo componentes da alimentação (carboidratos, proteínas e gorduras) na liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica cápsula e comprimido, três meios biorrelevantes foram selecionados para o teste de solubilidade. Os meios citados na tabela 5 relata um meio que contém leite a um pH = 6,4, um segundo meio que emprega o leite na proporção de 1:1, v/v com tampão acetato ajustado a um pH= 5,0 e um terceiro meio que emprega o leite na proporção de 1:3, v/v com tampão fosfato ajustado a um pH= 3,0.

Com o teste de solubilidade realizado nas mesmas condições citadas no item 4.9.2 , utilizando a técnica *shake flask* na temperatura de 37 °C, a 150 rpm por 24 horas, foi observado que o meio biorrelevante contendo leite e tampão fosfato (1:3,v/v) em pH = 3,0 foi obtida uma solubilidade de 2,9 mg mL⁻¹, com o meio contendo leite e tampão acetato (1:1,v/v) em pH = 5,0 foi obtida uma solubilidade de 7,9 mg mL⁻¹ e o meio biorrelevante contendo leite em pH = 6,4 foi obtida uma solubilidade de 15,0 mg mL⁻¹. A partir destes resultados simulando o estado alimentado, confirmou-se que em pHs mais elevados há uma maior solubilidade do fármaco, e dessa forma, utilizamos o meio contendo leite em pH= 6,4 nas mesmas condições estabelecidas para o ensaio de dissolução que utilizou o tampão fosfato pH = 6,8 para cápsulas (aparato cesta a 100 rpm) e comprimidos (aparato pá a 50 rpm).

A formulação de cápsulas com melhor liberação (formulação E) e o comprimido referência Crestor[®] foram avaliadas neste teste, que emprega o meio biorrelevante simulando o estado alimentado no estômago. No estado alimentado, a composição do lume do estômago dependerá grandemente do tipo de alimentos ingeridos e o leite “Long-Life” tem sido sugerido como representativo de meios adequados para a simulação desta condição (MANADAS;PINA;VEIGA, 2002)

O perfil de dissolução que utiliza o leite em pH = 6,4 foi realizado nos mesmos tempos de coleta realizado para o meio tampão fosfato pH = 6,8 para forma farmacêutica cápsulas e comprimidos, e de acordo com a figura 37. Foi observado uma liberação mais lenta do fármaco empregando o meio biorrelevante quando comparado com o tampão fosfato pH = 6,8 na forma farmacêutica cápsulas e liberação similar do fármaco empregando meio biorrelevante quando comparado com o tampão fosfato pH = 6,8 para a forma farmacêutica comprimido.

Realizou-se um teste de desintegração com as cápsulas com este meio contendo leite pH= 6,4 e observou-se que o rompimento do invólucro inicia-se em 5 minutos e ocorre de maneira mais lenta, quando se compara com o tempo de desintegração utilizando o tampão fosfato pH = 6,8 (3 minutos), onde o rompimento do invólucro ocorre de maneira mais acelerada. Assim, acredita-se que esta liberação lenta esteja envolvida com o rompimento do invólucro e não com a formulação analisada, no entanto, considerando a mesma especificação estabelecida (liberação de no mínimo 85 % do fármaco em 30 minutos), constata-se que o teste de dissolução seria atendido, pois houve a liberação de 89,4 % do fármaco em 30 minutos para a forma farmacêutica cápsulas e no caso do teste realizado com a forma farmacêutica comprimidos foi verificado que o perfil de liberação realizado no leite se apresentou semelhante ao realizado com tampão fosfato pH = 6,8, com uma diferença na liberação observada apenas nos primeiros cinco minutos.

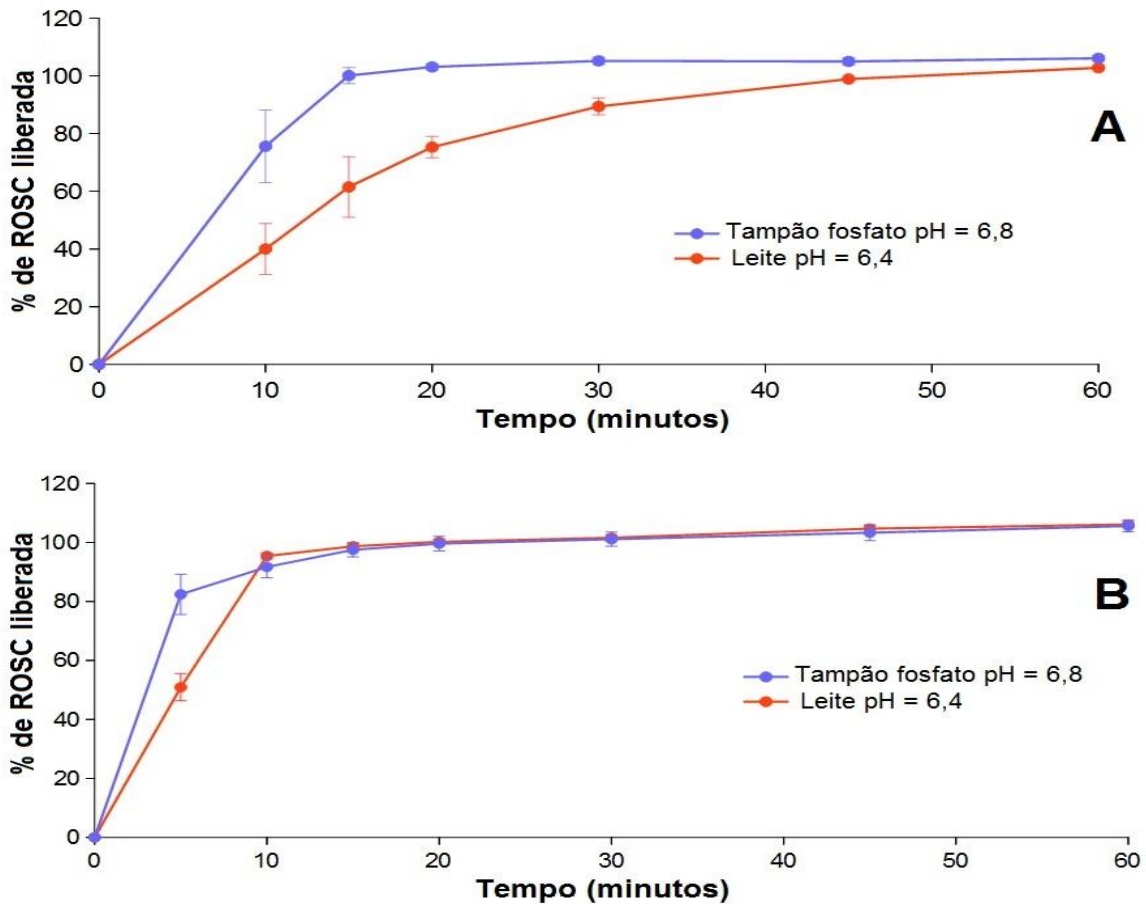


Figura 37 - Perfis de dissolução com cápsulas da formulação E (A) e comprimidos (B), utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH = 6,8 (500 mL) e leite pH = 6,4 (500 mL), aparato cesta a 100 rpm (Figura A) e aparato pá a 50 rpm (Figura B).

Fonte: da autora.

Em função da liberação rápida (> 85 % de liberação em 15 minutos) para ambas formulações no meio tampão fosfato pH = 6,8, a eficiência de dissolução (Figura 38) foi avaliada para ambos os meios analisados, e para comparação dos dados obtidos foi utilizado o teste t de Student. De acordo com a análise realizada, obteve-se um valor de $p < 0,05$ ($< 0,01$), demonstrando que o perfil de dissolução estudado que emprega o meio biorrelevante é significativamente diferente do meio tampão fosfato pH = 6,8 utilizando a forma farmacêutica cápsulas, como mencionado anteriormente, este fato pode estar envolvido com uma possível interferência com a abertura do invólucro, e considerado semelhante para a forma farmacêutica comprimidos.

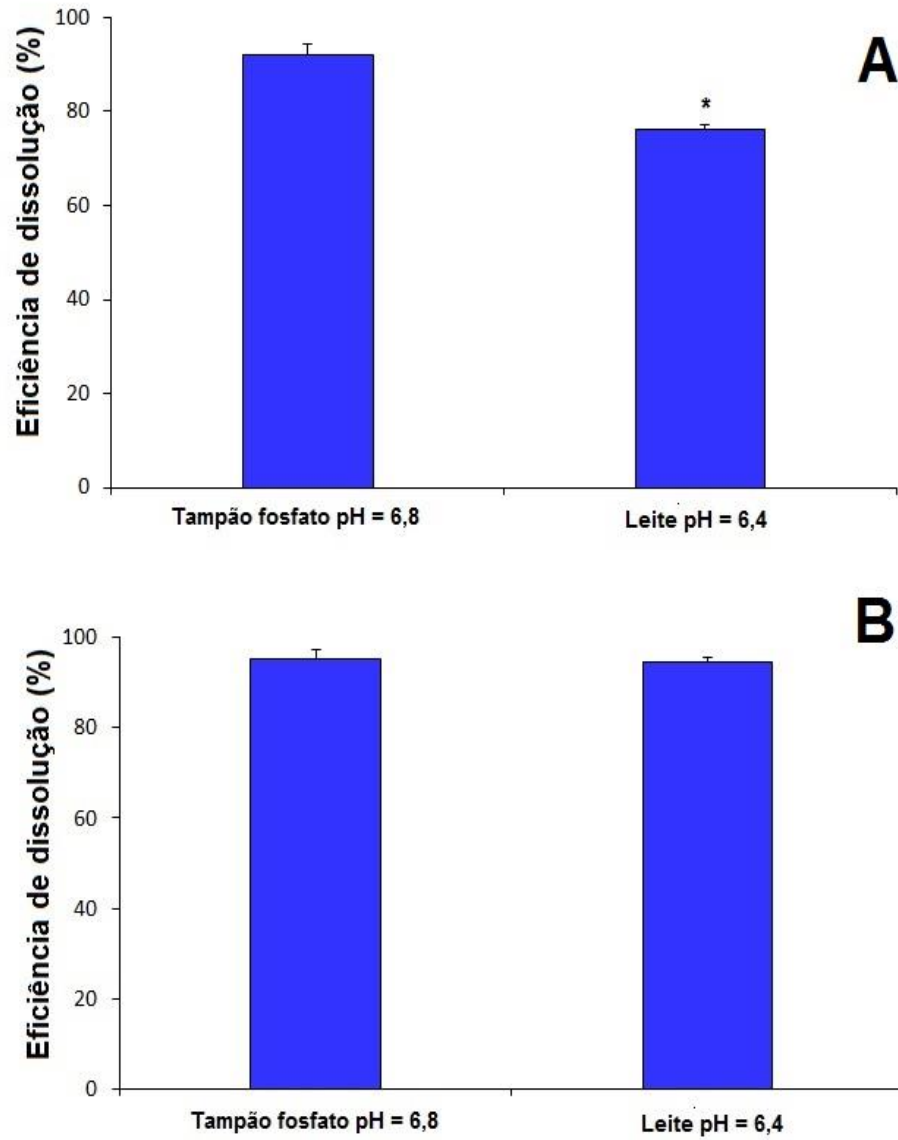


Figura 38 - Eficiência de dissolução avaliada com cápsulas da formulação E (A) e comprimidos (B), utilizando como meio de dissolução tampão fosfato pH = 6,8 e leite pH = 6,4, aparato cesta a 100 rpm (cápsulas) e aparato pá a 50 rpm (comprimidos).

Fonte: da autora.

Nota: * Significativo para $p < 0,05$.

5.8.2 Validação do método de dissolução biorrelevante

A validação do ensaio de dissolução biorrelevante foi realizada através dos critérios estabelecidos pela USP (UNITED, 2015), ICH (ICH, 2005) e ANVISA (BRASIL, 2003).

5.8.2.1 Seletividade

Na avaliação da seletividade do método de dissolução biorrelevante por CLAE, foram realizadas análises da cápsula vazia e placebo, os quais não foram observados picos cromatográficos adicionais no mesmo tempo de retenção do fármaco, demonstrando, assim, a seletividade do método proposto.

5.8.2.2 Linearidade

Para as concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rosuvastatina, foi obtida a seguinte equação de calibração $y = A$ regressão por mínimos quadrados mostrou coeficiente de correlação satisfatório ($r = 0,999$), confirmando a linearidade do método na Figura 39. O desvio padrão relativo de cada ponto ($n = 3$) foi inferior a 2%. Estes resultados satisfazem os critérios de aceitação (UNITED, 2015).

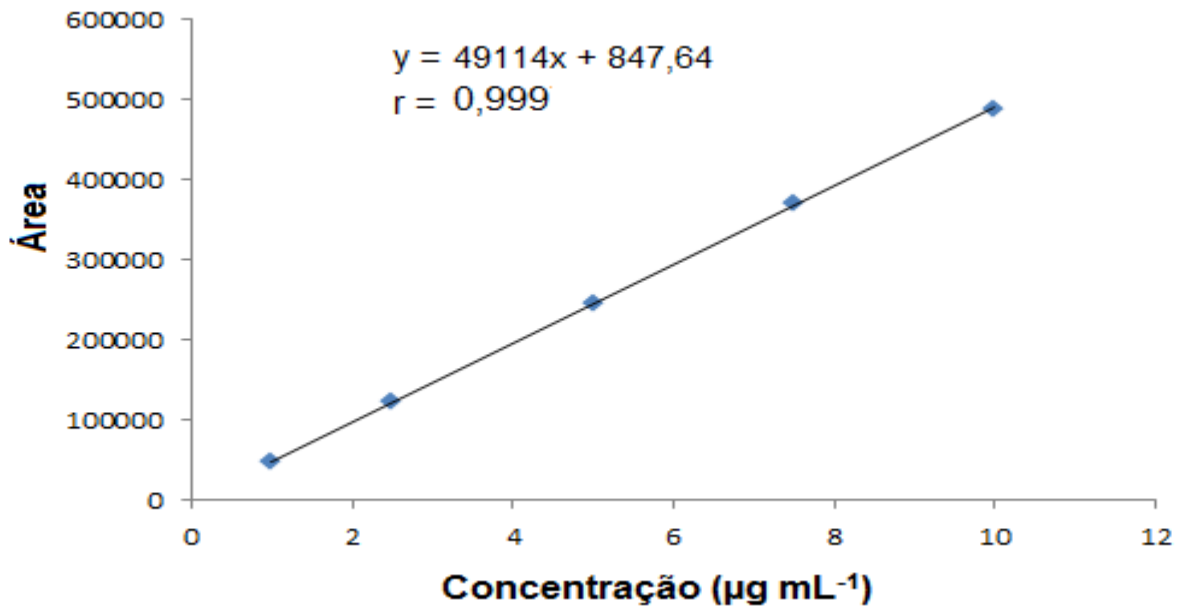


Figura 39 - Curva analítica obtida da média de três curvas analíticas, método CLAE para dissolução biorrelevante.

Fonte: da autora.

5.8.2.3 Precisão e exatidão

A precisão do método analítico foi demonstrada pela repetibilidade (intradias) e precisão intermediária (interdias) apresentada na tabela 31. Os valores do DPR foram menores que 1,19 % (intradias) e 0,95 % (interdias), demonstrando a adequada precisão do método, com valores de DPR inferiores a 2%.

Tabela 31 - Valores obtidos para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária do método de dissolução biorrelevante para rosuvastatina cálcica.

Concentração (µg mL ⁻¹)	Precisão (DPR%)	
	Interdias (n=3)	Intradias (n=6)
2	1,08	1,54
5	0,95	1,26
6	1,08	1,19

A exatidão foi determinada pela percentagem de recuperação de quantidades conhecidas de rosuvastatina cálcica. Recuperações entre 95 a 105 % são recomendáveis (UNITED, 2015). Os resultados encontrados para o teste de recuperação foram satisfatórios e estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 - Valores médios de recuperação do método de dissolução biorrelevante para rosuvastatina cálcica.

	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração recuperada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Recuperação (%)
R1 (75%)	15,0	14,7	99,4
R2 (100%)	20,0	20,2	102,41
R3 (150%)	25,0	24,8	100,61

Nota: * n=3.

5.8.2.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção encontrado foi de $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$. O limite de quantificação encontrado foi de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estes resultados demonstram que as análises foram realizadas em uma região acima destes valores (intervalo de trabalho do método: $1,0$ - $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

6 CONCLUSÕES

- Foram realizados ensaios de caracterização de rosuvastatina cálcica para a matéria-prima e para a forma recristalizada através da determinação do ponto fusão, espectrofotometria na região UV, espectrofotometria por Infravermelho e análises térmicas (DSC e TG), obtendo-se como formas sólidas para estudo, uma forma amorfa e uma forma cristalina definida segundo a literatura como M.
- Foram desenvolvidos e validados método por CLAE e espectrofotometria na região do UV para determinação de rosuvastatina cálcica, onde o método indicativo de estabilidade por CLAE que apresentou melhores resultados e que foi selecionado para avaliação de rosuvastatina cálcica em cápsulas e comprimidos, mostrou condições de adequabilidade do sistema com vazão de $1,0 \text{ mL min.}^{-1}$, fase móvel constituída de metanol e água pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico (65:35, v/v), coluna C_{18} (150 mm x 4,6 mm), 5 μm , temp. de 25 °C e comprimento de onda a 241 nm e o método espectrofotométrico selecionado foi o que apresentou seletividade para o solvente metanol 1ª e 2ª diluição com máximo de absorvância em 242 nm.
- Ambos os métodos desenvolvidos e validados para quantificação do fármaco foram comparados e não apresentaram diferença estatística para o nível de significância de 5 %.
- Com relação aos ensaios do estudo de degradação forçada realizado sob diferentes condições, foi observada instabilidade da molécula frente a degradação ácida e fotolítica, com caracterização dos produtos de degradação e aplicação do LC-MS/MS em amostras reais.
- Foram realizados os ensaios de solubilidade pelo método de equilíbrio para ambas as formas sólidas de estudo, onde foi observado que a molécula

apresenta ser pH-dependente e foi demonstrado que as condições *sink* foram asseguradas em todos os meios avaliados, sendo a forma amorfa mais solúvel que a forma cristalina M.

- O ensaio de dissolução desenvolvido para cápsula foi considerado discriminativo, pois foi capaz de identificar diferenças quanto a formulação e diferenças quanto forma sólida. As condições envolveram a utilização de tampão fosfato pH= 6,8, aparato cesta e velocidade de rotação 100 rpm, com tempo de coleta da amostra em 30 minutos e tolerância de, no mínimo, 85 % de liberação.
- Para a forma farmacêutica comprimidos também foi desenvolvido e validado ensaio de dissolução, com a utilização de tampão fosfato pH= 6,8, aparato pá e velocidade de rotação 50 rpm, com tempo de coleta da amostra em 30 minutos e tolerância de, no mínimo, 85 % de liberação. O mesmo foi aplicado para medicamentos similares, observando juntamente com os testes físicos e físicos e físico-químicos e a equivalência farmacêutica dos similares S1 e S3.
- Um ensaio de dissolução biorrelevante foi desenvolvido e validado empregando como meio de dissolução leite (UHT) integral com pH= 6,4, utilizando aparato cesta e rotação 100 rpm para cápsulas e aparato pá com rotação 50 rpm, verificando uma liberação mais lenta com relação a forma farmacêutica cápsulas, possivelmente relacionada ao rompimento do invólucro, e com perfil de liberação similar ao comprimido quando utilizado o meio tampão fosfato pH= 6,8.

BIBLIOGRAFIA

ABRAHAMSSON, B. et al. Food effects on tablet disintegration. **Eur J Pharm Sci.**, v. 22, p. 165 – 172, 2004.

AFROZ, A. et al. Spectrophotometric Estimation of Rosuvastatin Calcium and Glimepiride in Tablet Dosage Form. **Asian J. Pharm. Ana.** v. 1, p. 74-78, 2011.

AKKAM, J. A.- et al. Determination of Atorvastatin and Rosuvastatin in Rat Plasma By Reversed-. v. 5, 2013.

ALCÂNTARA et al. Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos. **Rev. Pesq. Inov. Farm.** v. 5, n. 1, p. 38–48, 2013.

AMIDON G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n.3, p. 413-420, 1995.

ARRUNÁTEGUI, L. B. et al. Biopharmaceutics classification system: Importance and inclusion in biowaiver guidance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 143–154, 2015.

ASHFAQ, M. et al. Simultaneous estimation of rosuvastatin and amlodipine in pharmaceutical formulations using stability indicating HPLC method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p. 629–638, 2014.

AULTON, M. E. Delineamento de Formas Farmacêuticas, Porto Alegre, Artmed Editora, 2ª ed., 2005.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, n. 1 SPEC. ISS., p. 12–21, 2007

BADAWY, A. M. et al. Stability Indicating Spectrophotometric Methods For

Determination Of Rosuvastatin In The Presence Of Its Acid Degradation Products By Derivative Spectrophotometric Techniques . **Ijpr**, v. 2, n. 1, p. 44–55, 2011.

BAEK, I. H.; KWON, K. I.; KIM, M. S. Effect of food on the pharmacokinetics of rosuvastatin after administration of a single oral dose in dogs. **Drug Research**. v. 63, n. 3, p. 145-149, 2013.

BAGHAT, M. B. et al. A review on development of biorelevant dissolution medium. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**. v. 2, p. 140-148, 2014.

BALAKUMAR, K. ET AL. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**. p. 337., v112, 2013.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as Bases Moleculares da Ação dos fármacos. 3 ed., Editora Artmed: Grupo A, 2015.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BELUDARI, M. I.; PRAKASH, K. V.; MOHAN, G. K. RP-HPLC method for simultaneous estimation of Rosuvastatin and Ezetimibe from their combination tablet dosage form. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 4, n. 4, p. 205–209, 2013.

BERGMAN, E. et al. Biliary secretion of rosuvastatin and bile acids in humans during the absorption phase. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n. 3-4 SPEC. ISS., p. 205–214, 2006.

BERGSTRÖM, C. A. S. et al. Early pharmaceutical profiling to predict oral drug absorption: Current status and unmet needs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, n. 1, p. 173–199, 2014.

BINAL, S. B. et al. Difference Spectrophotometric Method Development and Validation For Simultaneous Estimation of Rosuvastatin Calcium and Telmisartan in Bulk and Combined Dosage Form. **IJRPS**. v. 2, p. 106-114, 2012.

BLAGDEN, N. et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 7, p. 617–630, 2007.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

BONETTI, P. O. et al. Statin effects beyond lipid lowering - Are they clinically relevant. **European Heart Journal**, v. 24, n. 3, p. 225–248, 2003.

BORBA, P. A. A. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrofotometria UV para quantificação de carvedilol. **Quím. Nova**. v. 36, p. 582-586, 2013.

BOZZA, R. et al. Associação do gasto energético diário com fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica em adolescentes. Associação do gasto energético diário com fatores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica em adolescentes. **R. bras. Ci. e Mov.** v. 20, n. 4, p.69-76, 2012.

BRAGA, D. et al. Crystal Polymorphism and Multiple Crystal Forms. *Struct Bond*. v. 132, p. 25-50, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de junho 2003.

BRASIL. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde RESOLUÇÃO - RDC Nº 3i. Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 11 de agosto de 2010.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**: Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos, RDC Nº. 45, 2012.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**: Estabelece Parâmetros Para a Notificação, Identificação e Qualificação de Produtos de Degradação em Medicamentos com Substâncias Ativas Sintéticas e Semissintéticas, Classificadas Como Novos, Genéricos e Similares, e Dá Outras Providências, RDC No. 58, 2013.

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

CHEN, X. et al. Synthetic studies on statins. Part 3: A facile synthesis of rosuvastatin calcium through catalytic enantioselective allylation strategy. **Tetrahedron**, v. 70, n. 35, p. 5794–5799, 2014.

COOK, J.; ADDICKS, W.; WU, Y. H. Application of the biopharmaceutical classification system in clinical drug development--an industrial view. **The AAPS journal**, v. 10, n. 2, p. 306–310, 2008.

DE ARAUJO, G. L. B. et al. Polimorfismo na produção de medicamentos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 27–36, 2012.

DEZANI, A. B. et al. Equilibrium solubility versus intrinsic dissolution: Characterization of lamivudine, stavudine and zidovudine for BCS classification. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 853–863, 2013.

EMEA. Guideline on the investigation of bioequivalence. **European Medicines Agency**. v. 1, n. January, p. 1–27, 2010.

ENDO, A. A gift from nature: the birth of the statins. **Nature medicine**, v. 14, n. 10, p. 1050–1052, 2008.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Council of Europe**, Strasbourg Cedex. France, 8. ed., v. 2, 2015.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** 5. ed. Brasília: Anvisa. 2010.

GANESAN, M. et al. A simple spectrophotometric method for the estimation of mecobalamin in injections. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, p. 559-562, 2012.

GAO, Z. In Vitro Dissolution Testing of Gelatin Capsules with Applied Mechanical Compression—a Technical Note. **AAPS PharmSciTech**, n. 21, 2016.

GAZOLLA, F. M. et al. Fatores de risco cardiovasculares em crianças obesas
Cardiovascular risk factors in obese children. **Revista HUPE**. v. 13, p. 26-32, 2014.
GEETHA. et al. Analytical Method Validation: An Updated Review OF ANALYTICAL
METHOD AND VALIDATION. v. 1, n. 1, p. 64–71, 2012.

GLOMME, A.; MARZ. R. Z, J.; DRESSMAN, J. B. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 1, p. 1–16, 2005.

GOBAL, F. A; MEHTA, J. L. Management of dyslipidemia in the elderly population. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, v. 4, n. 6, p. 375–383, 2010.

GOMES, F. P. Validação de métodos para análise de estatinas em medicamentos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GOMES, F. P. et al. Development and validation of stability-indicating HPLC methods for quantitative determination of pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, and rosuvastatin in pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 42, n. 12, p. 1784–1804, 2009.

GONZALEZ, L.; HELKIN, A.; GAHTAN, V. Dyslipidemia Part 2: Review of Dyslipidemia Treatment in Patients With Noncoronary Vascular Disease. **Vascular and endovascular surgery**, v. 50, n. 2, p. 119–135, 2016.

GUPTA, A.; MISHRA, P.; SHAH, K. Simple UV Spectrophotometric determination of Rosuvastatin Calcium in Pure Form and in Pharmaceutical Formulations. **E-Journal of Chemistry**. v. 6, p. 89-92, 2009.

HAZRA, K.; COUNCIL, C.; SCI, A. Development and validation of RP-HPLC method for

estimation of Rosuvastatin calcium solid dispersions tablet. n. September 2014, 2016.

ICH. **International Conference on Harmonization**. Guidance for industry Q1A (R2) stability testing of new drug substances and products, 2003.

ICH. **International Conference on Harmonization** (ICH) of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use Topic Q2 (R1); Validation of Analytical procedures: Text and Methodology, Geneva, 2005.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 04 de julho de 2011 (revisão), 2011.

International Standard Organization. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories, ISO/IEC 17025, 1999.

ISSA, M. G.; FERRAZ, H. G. Intrinsic dissolution as a tool for evaluating drug solubility in accordance with the biopharmaceutics classification system. **Dissolution Technologies**, v. 18, n. 3, p. 6–13, 2011.

JANARDHANAN, V. S.; MANAVALAN, R.; VALLIAPAN, K. Chemometric technique for the optimization of chromatographic system: Simultaneous HPLC determination of Rosuvastatin, Telmisartan, Ezetimibe and Atorvastatin used in combined cardiovascular therapy. **Arabian Journal of Chemistry**. 2012.

JEMNITZ, K. et al. Biliary efflux transporters involved in the clearance of rosuvastatin in sandwich culture of primary rat hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 2, p. 605–610, 2010.

KHAN, KA. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.27, n.1, p.48-49, 1975.

KLEIN, M. The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug. **The AAPS Journal**. v. 12, p. 397-406, 2010.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos para a análise de darunavir comprimidos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 34, p. 207-213, 2013.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário terapêutico Guanabara 19^a ed.** Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p. 13.913.11, 2012.

KUMAR, T. R. et al. Determination of rosuvastatin in rat plasma by HPLC: Validation and its application to pharmacokinetic studies. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 9, p. 881–887, 2006.

LENNERNÄS, H.; ABRAHAMSSON, B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 3, p. 273–285, 2005.
LINARELLI, M. C. B.; POTT JR, H. Estatinas: uma revisão sobre aspectos vasculares. **Rev. Ciênc. Méd.** v. 17, n. 1, p.43-52, 2008.

LI, Y. et al. Pharmacokinetic Properties of Rosuvastatin After Single-Dose, Oral Administration in Chinese Volunteers: A Randomized, Open-Label, Three-Way Crossover Study. **Clinical Therapeutics**. v. 29, n. 10, p. 2194-2203, 2007.

LITVIĆ, M. et al. A study of photodegradation of drug rosuvastatin calcium in solid state and solution under UV and visible light irradiation: The influence of certain dyes as efficient stabilizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 252, p. 84–92, 2013.

LIU, H. H.; LI, J. J. Aging and dyslipidemia: A review of potential mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 19, p. 43–52, 2015.

LU, J.; ROHANI, S. Polymorphism and Crystallization of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs). **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 884–905, 2009.

MACHADO, T. C. et al. Photocatalytic degradation of rosuvastatin: Analytical studies and toxicity evaluations. **Science of the Total Environment**, v. 502, p. 571–577, 2015.

MAGGIO, R. M.; VIGNADUZZO, S. E.; KAUFMAN, T. S. Practical and regulatory

considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, n. September, p. 57–70, 2013.

MAHMOOD, D.; JAHAN, K.; HABIBULLAH, K. Primary prevention with statins in cardiovascular diseases: A Saudi Arabian perspective. **Journal of the Saudi Heart Association**, v. 27, n. 3, p. 179–91, 2015.

MALESUIK, M. D. et al. Desenvolvimento de teste de dissolução e estudo comparativo de comprimidos e cápsulas magistrais contendo anlodipino. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 37–49, 2006.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.38, n.4, p.375-399, 2002.

MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. p. 127, 2003.
MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A Mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: A review of fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, p. 620-643, 2002.

MCCRONE, W.C. **Polymorphism in physics and chemistry of the organic solid state**. New York: WileyInterscience. p.726-767, v. 2, 1965.

MOREIRA, R. O. et al. Perfil lipídico de pacientes com alto risco para eventos cardiovasculares na prática clínica diária. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 50, n.3, 2006.

MORISSETTE, S. L. et al. High-throughput crystallization: Polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 3, p. 275–300, 2004.

NAGAPUDI, K.; JONA, J. Amorphous Active Pharmaceutical Ingredients in Preclinical Studies: Preparation, Characterization, and Formulation. **Current Bioactive Compounds**, v. 4, n. 4, p. 213–224, 2008.

NARAPUSETTI, A. et al. Simultaneous determination of rosuvastatin and amlodipine in human plasma using tandem mass spectrometry: Application to disposition kinetics. **Journal of Advanced Research**, p. 931–940, 2014.

NASIR, F. et al. Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 30, p. 3434–3443, 2011.

NAGABHUSHANAM, M.V. ; RAO, C.V. P. ; PRABHAKAR, C. Hydrophilic polymers for dissolution enhancement of celecoxib. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, v.3, n.5, p.547-549, 2011.

NAZIR, S. et al. Pharmacokinetic study of rosuvastatin in males and females. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 40, n. 3, p. 313–318, 2015.

NAZIR, S.; IQBAL, Z.; NASIR, F. Impact of Menopause on Pharmacokinetics of Rosuvastatin Compared with Premenopausal Women. **European journal of drug metabolism and pharmacokinetics**, 2015.

NIETO-RAMIREZ, I. J. et al. Las estatinas: Química, técnicas analíticas, biosíntesis y farmacocinética. **Vitae**, v. 20, n. 1, p. 49–63, 2013.

PAPAGEORGIU, N. et al. Statins and myocardial infarction: Type, dose, and administration time: Does it matter? **Trends in Cardiovascular Medicine**, 2016.

PARR, A. et al. The Effect of Excipients on the Permeability of BCS Class III Compounds and Implications for Biowaivers. **Pharm Res**. v. 33, p. 167–176, 2016

PASCHOAL, J. A. R. et al. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008

PILANIYA et al. Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. **J Adv Pharm Technol Res**. v. 1, n. 3, p. 302-310, 2010.

PORTELA, A. S. et al. Estatinas x ácido lipóico na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 35, p. 09-15, 2014.

PRISTA, L. N. et al. Tecnologia Farmacêutica. Lisboa, Fundação Calouste Gulbekian, 6ª ed., Vol. I e II, 2002.

QU, L.; JIANG, J.; KONG, W. Pharmacological Effects of Statins Related to Gap Junction Modulation. n. April, p. 319–331, 2014.

RAJ, H. A. et al. Development and validation of two chromatographic stability-indicating methods for determination of rosuvastatin in pure form and pharmaceutical preparation. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, n. 3, p. 677–689, 2009.

RAJENDRA, R. G. Development of a Stability-Indicating Stereoselective Method for the Quantification of Enantiomer in Drug Substance and Pharmaceutical Dosage form of Rosuvastatin Calcium by Enhanced Approach. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, n. 2, p. 279–296, 2015.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REDDY, G. V. R. et al. Development and validation of a stability-indicating uplc method for rosuvastatin and its related impurities in pharmaceutical dosage forms. **Quimica Nova**, v. 34, n. 2, p. 250–255, 2011.

REYNOLDS, D. W. et al. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology, Iselin**, p. 48-56, 2002.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. et. al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Quím. nova**. v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008

RODRIGUES, A. C. Efeito da atorvastatina sobre a atividade funcional e expressão de transportadores de membrana do tipo ABC e SLC. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ROHINI, P.; PAVANI, A.; REDDY, R. R. Formulation and Evaluation of Orally Disintegrating Tablets of Rosuvastatin. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.**, v. 24, p. 209-214, 2014.

SAHADEVA, R. M. et al. Novel polymorph of bis[(e)-7-[4-(4-fluorophenyl)-6-iso-propyl-2-[methyl (methylsulfonyl)amino]pyrimidin-5-yl)](3r,5s)-3,5-dihydroxyhept-6-enoic acid] calcium salt. World patent WO 2012011129 A2. 21 de julho de 2011.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 117–125, 2005.

SEGALIN, J. et al. Identification of transformation products of rosuvastatin in water during ZnO photocatalytic degradation through the use of associated LC-QTOF-MS to computational chemistry. **Journal of hazardous materials**, v. 299, p. 78–85, 2015.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. **Chromatographia**, v. 72, n. 1, p. 1–6, 2010.
SERRA, C. H. D. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 79–88, 2007.

SETHI, M. K. et al. Matriz Laboratories Ltd. Novel polymorphic forms of rosuvastatin calcium and process for preparation of the same. World patent WO 2011074016 A1. 20 de dezembro de 2010.

SEVDA, R. R., RAVETKAR, A. S.; SHIROTE, P. J. UV Spectrophotometric estimation of Rosuvastatin Calcium and Fenofibrate in bulk Drug and Dosage Form using Simultaneous Equation Method. **International Journal of ChemTech Research**. v. 3, p. 629-635, 2011.

SHAH, Y. et al. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization

of various experimental parameters. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 9-10, p. 557–563, 2011.

SHITARA, Y.; SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 71–105, 2006.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. **EQUALAB - Congresso e Feira de Qualidade em Metrologia**. p. 8-15, 2006.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**. v. 2, n. 30, p. 129-135, 2009.

SIRTORI, C. R. The pharmacology of statins. **Pharmacological Research** . v.88, p. 3–11, 2014.

SPOSITO, A. C. et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol**. v. 88, 2007.

SREE JANARDHANAN, V.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Chemometric technique for the optimization of chromatographic system: Simultaneous HPLC determination of Rosuvastatin, Telmisartan, Ezetimibe and Atorvastatin used in combined cardiovascular therapy. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.

ŠTERK, D. et al. Efficient and highly stereoselective assembly of rosuvastatin. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 12, p. 1338–1341, 2016.

STORPIRTIS, S.; GAI, MN. Biofarmacotécnica: Principios de biodisponibilidade, bioequivalência, Equivalência Farmacêutica, Equivalência Terapêutica e Intercambialidade de Medicamentos. Em: Storpirtis, S .; Gonzalez, JE; CHIANN, C. ; GAI, M N.. (Eds.). Biofarmacotécnica. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.3-11, 2011.

SULTANA, N. RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Lisinopril and NSAIDs in API, Pharmaceutical Formulations and Human Serum. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 02, p. 147–152, 2012.

SULTANA, N.; ARAYNE, M. S.; IFTIKHAR, B. Simultaneous Determination of Atenolol, Rosuvastatin, Spironolactone, Glibenclamide and Naproxen Sodium in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma by RP-HPLC. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 55, n. 5, p. 1022–1029, 2008.

SZELAGIEWICZ, M.; BLATTER, F.; SCHAAF, A.V. Crystalline Forms Of Rosuvastatin Calcium Salt. United states patent US 20080194604 A1. 23 de janeiro de 2006.

SZELAGIEWICZ, M. et al. Basf Se. Multicomponent crystalline system of rosuvastatin calcium salt and vanillin. United states patent US 20140031377 A1. 16 de abril de 2012.

TAJIRI, T. et al. Developing dissolution testing methodologies for extended-release oral dosage forms with supersaturating properties. Case example: Solid dispersion matrix of indomethacin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, p. 368–374, 2015.

TALAY, A. et al. Investigation of thermodynamic acidity constants of some statins with RPLC method. **Journal of Molecular Liquids**, v. 208, p. 286–290, 2015.

TAYLOR, N. P. AstraZeneca AB. Crystalline bis[(e)-7- [4-(4- fluorophenyl)- 6-isopropyl- 2- [methyl (methylsulfonyl) amino] pyrimidin -5-yl] (3r,5s)-3, 5-dihydroxyhept -6-enoic acid]calcium salt. World patent WO 2000042024 A1. 23 de dezembro de 1999.

TEGERINA, K. L. G. Validação de métodos para análise de estatinas em medicamentos por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TRIVEDI, H. K.; PATEL, M. C. Development and validation of a stability-indicating RP-UPLC method for determination of rosuvastatin and related substances in pharmaceutical dosage form. **Scientia Pharmaceutica**, v. 80, n. 2, p. 393–406, 2012.

UNITED STATES. FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a

biopharmaceutics classification system. **Center for Drug Evaluation and Research**, n. May, p. 1–2, 2015.

UNITED States Pharmacopeia. USP 38. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.

UYAR, B; CELEBIER, M.; ALTINOZ, S. Spectrophotometric determination of rosuvastatin calcium in tablets. **Pharmazie**. v. 6, p. 89-92, 2009.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação De Métodos Analíticos. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 11, n. 2, p. 26–31, 2013.

VAN EERDENBRUGH, B. et al. Classification of the crystallization behavior of amorphous active pharmaceutical ingredients in aqueous environments. **Pharmaceutical research**, v. 31, p. 969–82, 2014.

VARMA, M. V. et al. PH-sensitive interaction of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) with organic anion transporting polypeptide 2B1. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 4, p. 1303–1313, 2011.

VIERTELHAUS, M.; HAFNER, A. Co - Crystals and Their Advantages for APIs with Challenging Properties. **Review**. v. 33, n. October, p. 1–7, 2015.

World Health Organization (WHO). Technical Report Series, Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. Annex 2, nº. 953, 2009.

XAVIER, H. T. et al. V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DA ATEROSCLEROSE V D iretriz B rasileira de D islipidemias e P revenção. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, supl.1, p. 1–20, 2013.

ZHOU, C et al. Preparation, characterization and in vitro release of microparticles based on dextran–rosuvastatin conjugate. **Carbohydrate Polymers**. v. 96, p. 156– 162, 2013.

ANEXO A – PROPOSTA DE MONOGRAFIA FARMACOPEICA PARA CÁPSULAS

CÁPSULAS DE ROSUVASTATINA CÁLCICA

Contém, no mínimo, 90,0 % e, no máximo, 110,0 % da quantidade declarada de rosuvastatina $C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2$.

IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: Tampão fosfato de potássio pH =6,8, (500 mL)

Aparelhagem: cestas

Velocidade de agitação: 100 rpm

Tempo: 30 minutos

Procedimento: Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar e diluir 2,5 mL do filtrado, com 1 mL de HCl 0,1 M e fase móvel q.s.p 5 mL. Preparar solução padrão estoque em metanol na concentração de 5 mg/mL, em seguida, preparar uma solução intermediária com tampão fosfato de potássio pH= 6,8 na concentração de 40 µg/mL e diluir 2,5 mL desta solução, com 1 mL de HCl 0,1 M e fase móvel q.s.p 5 mL. Injetar, separadamente, 20 µL das Soluções

padrão e amostra, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos, utilizando o mesmo método descrito no *Doseamento*. Calcular a quantidade de $C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2$ dissolvida no meio a partir das respostas obtidas com as Soluções padrão e amostra.

Tolerância: não menos que 85% (Q=80%) da quantidade declarada de $C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2$ se dissolvem em 30 minutos.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito no Doseamento. Injetar, 20 μ L da *solução intermediária* a 100 μ g/mL. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de cada impureza a partir da fórmula:

$$100 \times (r_i/r_s)$$

em que: r_i é a área de cada impureza e r_s é a soma das áreas de todos os picos. O limite é de 0,5% para cada impureza e de 2,0% para o total de impurezas.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em Cromatografia à líquido de alta eficiência (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 241 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18) com partículas 5 μ m, mantida à temperatura de 25 °C e vazão de Fase móvel de 1,0 mL/minuto.

Fase móvel: metanol e água com ajuste de pH = 3,0 com ácido fosfórico (65:35, v/v).

Solução amostra: pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. Transferir, exatamente, o equivalente a 10 mg de rosuvastatina cálcica para balão volumétrico de 10 mL, acrescentar 7 mL de metanol, deixar em ultrassom por 2 minutos e completar o volume com o mesmo solvente, homogeneizar e filtrar. Preparar uma solução intermediária de 100 µg/mL, com diluente metanol e água (65:35) e em seguida, diluir para a concentração final de 20 µg/mL com o mesmo diluente.

Solução padrão: Pesar quantidade equivalente a 10 mg de rosuvastatina e transferir para balão volumétrico de 10 mL, acrescentar 7 mL de metanol, deixar em ultrassom por 2 minutos e completar o volume com o mesmo solvente, homogeneizar e filtrar. Preparar solução intermediária de 100 µg/mL, com diluente metanol e água (65:35) e em seguida, diluir para a concentração final de 20 µg/mL com o mesmo diluente.

Procedimento: Injetar, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de $C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2$ à partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.

ANEXO B – PROPOSTA DE MONOGRAFIA FARMACOPEICA PARA COMPRIMIDOS

ROSUVASTATINA CÁLCICA COMPRIMIDOS

Contém, no mínimo, 90,0 % e, no máximo, 110,0 % da quantidade declarada de rosuvastatina $C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2$.

IDENTIFICAÇÃO

O tempo de retenção do pico principal do cromatograma da *Solução amostra*, obtida em *Doseamento*, corresponde àquele do pico principal da *Solução padrão*.

CARACTERÍSTICAS

Determinação de peso (5.1.1). Cumpre o teste.

Teste de dureza (5.1.3.1). Cumpre o teste.

Teste de desintegração (5.1.4.1). Cumpre o teste.

Uniformidade de doses unitárias (5.1.6). Cumpre o teste.

TESTE DE DISSOLUÇÃO (5.1.5)

Meio de dissolução: Tampão fosfato de potássio pH =6,8, (500 mL)

Aparelhagem: pá

Velocidade de agitação: 50 rpm

Tempo: 30 minutos

Procedimento: Imediatamente após o teste, retirar alíquota do meio de dissolução, filtrar e diluir 2,5 mL do filtrado, com 1 mL de HCl 0,1 M e fase móvel q.s.p 5 mL. Preparar solução padrão estoque em metanol na concentração de 5 mg/mL, em

seguida, preparar uma solução intermediária com tampão fosfato de potássio pH= 6,8 na concentração de 40 µg/mL e diluir 2,5 mL desta solução, com 1 mL de HCl 0,1 M e fase móvel q.s.p 5 mL. Injetar, separadamente, 20 µL das Soluções padrão e amostra, registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos, utilizando o mesmo método descrito no *Doseamento*. Calcular a quantidade de C₄₄H₅₄F₂N₆O₁₂S₂ dissolvida no meio a partir das respostas obtidas com as Soluções padrão e amostra.

Tolerância: não menos que 85% (Q=80%) da quantidade declarada de C₄₄H₅₄F₂N₆O₁₂S₂ se dissolvem em 30 minutos.

ENSAIOS DE PUREZA

Substâncias relacionadas. Proceder conforme descrito no Doseamento. Injetar, 20 µL da *solução intermediária* a 100 µg/mL. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de cada impureza a partir da fórmula:

$$100 \times (r_i/r_s)$$

em que: r_i é a área de cada impureza e r_s é a soma das áreas de todos os picos. O limite é de 0,5% para cada impureza e de 2,0% para o total de impurezas.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4). Utilizar cromatógrafo provido de detector de ultravioleta a 241 nm; coluna de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18) com partículas 5 µm, mantida à temperatura de 25 °C e vazão de Fase móvel de 1,0 mL/minuto.

Fase móvel: metanol e água com ajuste de pH = 3,0 com ácido fosfórico (65:35, v/v).

Solução amostra: pesar 20 cápsulas, remover o conteúdo e pesá-las novamente. Transferir, exatamente, o equivalente a 10 mg de rosuvastatina cálcica para balão volumétrico de 10 mL, acrescentar 7 mL de metanol, deixar em ultrassom por 2 minutos e completar o volume com o mesmo solvente, homogeneizar e filtrar. Preparar uma solução intermediária de 100 µg/mL, com diluente metanol e água (65:35) e em seguida, diluir para a concentração final de 20 µg/mL com o mesmo diluente.

Solução padrão: Pesar quantidade equivalente a 10 mg de rosuvastatina e transferir para balão volumétrico de 10 mL, acrescentar 7 mL de metanol, deixar em ultrassom por 2 minutos e completar o volume com o mesmo solvente, homogeneizar e filtrar. Preparar solução intermediária de 100 µg/mL, com diluente metanol e água (65:35) e em seguida, diluir para a concentração final de 20 µg/mL com o mesmo diluente.

Procedimento: Injetar, separadamente, 20 µL das soluções padrão e amostra. Registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular a quantidade de $C_{44}H_{54}F_2N_6O_{12}S_2$ à partir das respostas obtidas com as soluções padrão e amostra.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem fechados.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente.