

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

CAROLINE GOLEMBIOUSKI

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO
PARA A DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS HIPOLIPIDÊMICOS

PONTA GROSSA
2019

CAROLINE GOLEMBIOUSKI

DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO
PARA A DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS HIPOLIPIDÊMICOS

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Química Aplicada no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Patrícia Los Weinert

PONTA GROSSA

2019

G625 Golembiowski, Caroline
Desenvolvimento e otimização de um método cromatográfico para a
determinação de fármacos hipolipidêmicos / Caroline Golembiowski. Ponta
Grossa, 2019.
124 f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada - Área de Concentração:
Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Los Weinert.

1. Ciprofibrato. 2. Sinvastatina. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência.
4. Planejamento fatorial. 5. Validação de método analítico. I. Weinert, Patrícia
Los. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. III.T.

CDD: 544.92

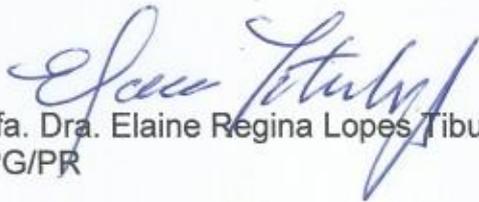
TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINE GOLEMBIOUSKI

“DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS HIPOLIPIDÊMICOS”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora : 
Profa. Dra. Patrícia Los Weinert
UEPG/PR


Profa. Dra. Elaine Regina Lopes Tiburtius
UEPG/PR


Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner
UNICENTRO/PR

Ponta Grossa, 01 de agosto de 2019

Aos meus pais e minhas irmãs

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre iluminar o meu caminho permitindo que esta conquista tão importante em minha vida fosse alcançada. Sou grata por tudo que o Senhor tem feito em minha vida, obrigada por me dar forças para seguir em frente.

Agradeço à minha família por sempre me apoiar, me encorajar ser cada dia melhor e nunca me deixar desistir. Foi graças ao incentivo de vocês que alcancei mais esta conquista em minha vida.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Patrícia Los Weinert pela amizade, incentivo e orientação durante este trabalho. Obrigada por todos os ensinamentos, sem os quais este trabalho não poderia ser desenvolvido.

Agradeço à Amanda pela amizade e companheirismo durante todos esses anos de vida acadêmica, obrigada por estar comigo em todos os momentos importantes em minha vida.

Agradeço ao complexo de laboratórios multiusuários da UEPG (C-Labmu) pela disponibilidade dos equipamentos para a realização das análises, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que me apoiaram durante o mestrado.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Atualmente vêm crescendo o número de pessoas que desencadeiam hipercolesterolemia (aumento dos níveis sanguíneos de LDL-colesterol), fazendo com que aumentem a utilização de fármacos para o tratamento de pacientes que apresentam essa patologia. Os agentes hipolipidêmicos mais utilizados para o tratamento são os derivados do ácido fíbrico e as estatinas. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação individual e ou simultânea de ciprofibrato e sinvastatina em formulações farmacêuticas utilizando-se para isso a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV. As condições cromatográficas foram otimizadas por meio do planejamento fatorial a partir do qual os melhores resultados de separação foram obtidos com coluna C-18 (150 mm x 4,6 mm), eluição isocrática, fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: água (50: 30: 20), em um fluxo de 0,8 mL min⁻¹, temperatura de 40 ° C e detecção em 238 nm. A metodologia proposta foi validada a partir da avaliação das figuras de mérito recomendadas pela ANVISA: especificidade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez, obtendo-se resultados dentro dos padrões recomendados. Portanto, o método proposto apresentou-se linear, preciso, exato e adequado para a determinação de ciprofibrato e sinvastatina em formulações farmacêuticas podendo ser utilizado na rotina de laboratórios de controle de qualidade.

Palavras-chave: Ciprofibrato, sinvastatina, CLAE, planejamento fatorial, função desejabilidade, validação de método analítico

ABSTRACT

Currently the number of people who develop hypercholesteraemia has been growing (increase in blood of LDL-cholesterol levels), increasing the use of drugs in the treatment of patients who have this pathology. The most used hypolipidaemic agents in treatment are fibric acids derivatives and statins. In this sense, the objective of this work was develop and validate of an analytical methodology for determination of ciprofibrate and simvastatin alone or in combination in pharmaceutical formulations using High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) technique with UV detection. Chromatographic conditions were optimized through design factorial starting from which the best separation results were reached with C -18 (150 mm x 4,6 mm) column, isocratic elution, mobile phase constituted of acetonitrile: methanol: water (50: 30: 20), flow rate of 0.8 mL min⁻¹ at 40 ° C and detection at 238 nm. The proposed methodology was validated according to ANVISA guidelines: specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), precision, accuracy and robust, being obtained results inside of the recommended standards. Therefore, the proposed method was linear, precise, accurate and appropriate for the determination of ciprofibrate and simvastatin in pharmaceutical formulations and it may be used in the routine of quality control laboratories.

Key words: Ciprofibrate, simvastatin, HPLC, experimental design, Derringer's desirability function, validation of an analytical method

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do colesterol e do seu principal precursor, o acetato	25
Figura 2 - As estatinas como inibidores da HMG-CoA redutase, uma comparação entre suas estruturas, o que as diferem entre si.....	26
Figura 3 - Estrutura química da sinvastatina (SIM)	28
Figura 4 - Fibratos disponíveis na terapêutica.....	29
Figura 5 - Processo de separação por bioafinidade	42
Figura 6 - Diagrama mostrando como calcular o fator de cauda (T) a partir da largura do pico a 5 % da altura ($W_{0,05}$) e da porção anterior do pico, em relação à largura a 5 % da altura (f)	44
Figura 7 - Espectro de absorção na região do UV para a solução padrão de ciprofibrato ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	69
Figura 8 - Espectro de absorção na região do UV para a solução padrão de sinvastatina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	70
Figura 9 - Sobreposição dos espectros de absorção UV de ciprofibrato e sinvastatina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)	70
Figura 10 - Cromatograma do ciprofibrato (t_r 2,05 min, fator de cauda 0,715) e da sinvastatina (t_r 9,502 min, fator de cauda 1,169), $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN: MeOH: H ₂ O.....	72
Figura 11 - Cromatograma do ciprofibrato (t_r 3,64 min) e da sinvastatina (t_r 15,15 min), $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN: MeOH: H ₂ O, coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm).....	73
Figura 12 - Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados para as respostas avaliadas (a) tempo de retenção do ciprofibrato; (b) tempo de retenção da sinvastatina; (c) área do pico cromatográfico do ciprofibrato; (d) área do pico cromatográfico da sinvastatina; (e) fator de encaudamento do ciprofibrato; (f) fator de encaudamento da sinvastatina; (g) resolução; (h) capacidade de retenção; (i) separação	78
Figura 13 - Superfície de Resposta.....	84
Figura 14 - Cromatograma do ciprofibrato ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em ACN: MeOH: H ₂ O (50: 30: 20).....	86
Figura 15 - Cromatograma da sinvastatina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em ACN: MeOH: H ₂ O (50: 30: 20).....	86
Figura 16 -Cromatograma do ciprofibrato (a) e sinvastatina (b) analisados simultaneamente, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em	

ACN: MeOH: H ₂ O (50:30: 20).....	87
Figura 17 – Perfil cromatográfico da urina sintética	107
Figura 18 - Cromatograma obtido para a análise de CPF e SIM em urina sintética	107
Figura 19 - Sobreposição dos cromatogramas de urina na presença e ausência dos fármacos	109
Figura 20 – Perfil cromatográfico para a amostra de água superficial	110
Figura 21 - Cromatograma obtido para análise dos fármacos em água superficial.....	111
Figura 22 - Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra de água superficial na ausência e presença dos fármacos	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Valores anômalos rejeitados a partir do Teste de Huber para o ciprofibrato.....	89
Gráfico 2 - Curva analítica para o ciprofibrato.....	90
Gráfico 3 - Valores anômalos rejeitados a partir do Teste de Huber para a sinvastatina.....	93
Gráfico 4 - Curva analítica para a sinvastatina.....	94
Gráfico 5 - Curva analítica para o ciprofibrato a partir do método comparativo desenvolvido por Nascimento (2011).....	103
Gráfico 6 - Curva analítica para a sinvastatina obtida a partir do método comparativo desenvolvido por Zepon (2013).....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da sinvastatina.....	27
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do ciprofibrato.....	30
Tabela 3 - Trabalhos encontrados na literatura para a determinação de agentes hipolipidêmicos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	35
Tabela 4 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.....	46
Tabela 5 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.....	48
Tabela 6 - Substâncias químicas de referência e amostras comerciais de ciprofibrato.....	54
Tabela 7 - Substâncias químicas de referência e amostras comerciais de sinvastatina.....	55
Tabela 8 - Concentração final das amostras comerciais de sinvastatina.....	58
Tabela 9 - Condições cromatográficas utilizadas para os testes realizados.....	59
Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com os respectivos níveis experimentais avaliados para o ciprofibrato e sinvastatina.....	60
Tabela 11 - Valores de α para as variáveis e dos níveis utilizados para o planejamento estrela.....	61
Tabela 12 - Matriz do planejamento composto central ou estrela.....	62
Tabela 13 - Níveis de concentração avaliados na determinação da repetibilidade do método.....	66
Tabela 14 - Soluções utilizadas para a avaliação da exatidão do método.....	66
Tabela 15 - Composição da urina sintética.....	67
Tabela 16 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com os respectivos níveis experimentais avaliados para o ciprofibrato e sinvastatina.....	74
Tabela 17 - Resultados experimentais obtidos para o ciprofibrato e sinvastatina.....	75
Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) para as respostas analisadas individualmente....	77
Tabela 19 - Dados da função de desejabilidade parcial e global.....	80
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) para verificar a falta de ajuste do modelo linear.....	81
Tabela 21 - Resultados obtidos para o planejamento composto central.....	82
Tabela 22 - Dados da função de desejabilidade parcial e global.....	83
Tabela 23 - Resultados experimentais obtidos com a realização da condição otimizada	

em relação aos valores previstos pelo modelo matemático obtido.....	84
Tabela 24 - Valores de área obtidos na análise cromatográfica de diferentes concentrações de ciprofibrato obtidos em diferentes dias	88
Tabela 25 - Dados obtidos a partir do Teste de Huber	89
Tabela 26 - Curva analítica do ciprofibrato	90
Tabela 27 - Análise de regressão linear para o ciprofibrato	91
Tabela 28 - Valores de áreas interpolados (A_{int}) e resíduos	91
Tabela 29 - Valores de área obtidos na análise cromatográfica de diferentes concentrações de sinvastatina obtidos em diferentes dias	92
Tabela 30 - Dados obtidos a partir do Teste de Huber	93
Tabela 31 - Curva analítica para a sinvastatina	94
Tabela 32 - Análise de regressão linear para a sinvastatina	95
Tabela 33 - Valores da área interpolados (A_{int}) e resíduos	95
Tabela 34 - Limites de detecção e quantificação encontrados para os fármacos	96
Tabela 35 - Valores de LD e LQ obtidos para a determinação de ciprofibrato e sinvastatina por diferentes trabalhos descritos na literatura	96
Tabela 36 - Resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade do método	97
Tabela 37 - Resultados obtidos para o estudo da precisão intermediária	98
Tabela 38 - Análise de variância (ANOVA) para avaliar a precisão do método	99
Tabela 39 - Resultados obtidos para o ensaio de exatidão	100
Tabela 40 - Resultados obtidos para a análise de diferentes fabricantes de amostras comerciais de ciprofibrato	101
Tabela 41 - Resultados obtidos para a análise de diferentes fabricantes de amostras comerciais de sinvastatina	101
Tabela 42 - Resultados obtidos para a análise simultânea das amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina	102
Tabela 43 - Resultados obtidos para a análise das amostras comerciais de ciprofibrato pelo método comparativo	103
Tabela 44 - Resultados obtidos para as amostras comerciais utilizando-se CLAE-UV e UV	104
Tabela 45 - Comparação dos resultados entre as técnicas de CLAE-UV e UV para determinação quantitativa de ciprofibrato em amostras comerciais	104
Tabela 46 - Resultados obtidos para análise das amostras comerciais de sinvastatina pelo método comparativo	105

Tabela 47 - Comparação dos resultados entre as técnicas de CLAE-UV e UV para determinação quantitativa de sinvastatina em amostras comerciais.....	106
Tabela 48 - Comparação dos resultados entre as técnicas de CLAE-UV e UV para determinação quantitativa de sinvastatina em amostras comerciais.....	106
Tabela 49 - Resultados obtidos para análise de sinvastatina em urina sintética.....	109
Tabela 50 - Resultados obtidos para a análise de sinvastatina em água superficial.....	112

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLC	Cromatografia Líquida Clássica
CNTs-PAH	Cloridrato de Polialilamina
CPF	Ciprofibrato
CV	Carbono Vítreo
DCC	Doença Cardíaca Coronariana
DCV	Doença Cardiovascular
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
DDB	Diamante Dopado com Boro
FDA	Food and Drug Administration
GEM	Genfibrozila
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
IFPMA	Federação Internacional das Associações Farmacêuticas Fabricantes de Produtos Farmacêuticos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
INTERFARMA	Associação das Indústrias Farmacêuticas de Pesquisa
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MS	Ministério da Saúde
ODA	<i>o</i> – diasina

OMS	Organização Mundial da Saúde
PES	Polietersulfona
PDDA	<i>p</i> – fenilenodiamina
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PTFE	Politetrafluoretileno
SIM	Sinvastatina
TG	Triglicerídeos
UV	Ultravioleta
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA.....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	FALSIFICAÇÃO E FISCALIZAÇÃO DE MEDICAMENTOS.....	23
2.2	COLESTEROL.....	25
2.3	ESTATINAS.....	25
2.3.1	SINVASTATINA.....	27
2.4	FIBRATOS.....	28
2.4.1	CIPROFIBRATO.....	29
2.5	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO.....	30
2.5.1	ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	30
2.5.2	MÉTODOS ELETROQUÍMICOS.....	33
2.5.3	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	34
2.6	TÉCNICAS E FERRAMENTAS EMPREGADAS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	39
2.6.1	CROMATOGRAFIA.....	39
2.6.2	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS AVALIADOS.....	42
2.6.2.1	TEMPO DE RETENÇÃO.....	42
2.6.2.2	RESOLUÇÃO (<i>R</i>).....	42
2.6.2.3	FATOR DE CAUDA (<i>T</i>).....	43
2.7	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	44
2.7.1	ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE.....	44
2.7.2	LINEARIDADE.....	45
2.7.3	INTERVALO.....	46
2.7.4	PRECISÃO.....	46
2.7.5	EXATIDÃO.....	47
2.7.6	LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	48
2.7.7	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	48
2.7.8	ROBUSTEZ.....	48
2.8	QUIMIOMETRIA.....	49
2.8.1	PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS.....	49
3	OBJETIVOS.....	53

3.1	OBJETIVO GERAL.....	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1	MATERIAL.....	54
4.1.1	SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS DE REFERÊNCIA E AMOSTRAS.....	54
4.1.2	MATERIAIS E REAGENTES.....	55
4.1.3	EQUIPAMENTOS.....	56
4.2	MÉTODOS.....	56
4.2.1	PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	56
4.2.1.1	SOLUÇÃO ESTOQUE DE CIPROFIBRATO.....	56
4.2.1.2	SOLUÇÃO ESTOQUE DE SINVASTATINA.....	56
4.2.1.3	FASE MÓVEL.....	57
4.2.1.4	SOLUÇÕES DE TRABALHO.....	57
4.2.1.5	SOLUÇÕES DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE SINVASTATINA E CIPROFIBRATO.....	57
4.2.2	ESTUDOS DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	58
4.2.3	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	59
4.2.4	ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS.....	62
4.2.5	MÉTODO COMPARATIVO.....	62
4.2.5.1	CIPROFIBRATO.....	63
4.2.5.2	SINVASTATINA.....	63
4.2.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	64
4.2.6.1	ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE.....	64
4.2.6.2	LINEARIDADE.....	64
4.2.6.3	LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	65
4.2.6.4	PRECISÃO.....	65
4.2.6.5	EXATIDÃO.....	66
4.2.6.6	ROBUSTEZ.....	66
4.2.7	APLICAÇÃO DO MÉTODO NA DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM DIFERENTES MATRIZES.....	67
4.2.7.1	URINA SINTÉTICA.....	67
4.2.7.2	ÁGUAS SUPERFICIAIS.....	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69

5.1	ESTUDOS PRELIMINARES.....	71
5.1.1	TESTE 1.....	71
5.1.2	TESTE 2.....	71
5.1.3	TESTE 3.....	72
5.1.4	TESTE 4.....	73
5.2	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	74
5.2.1	PLANEJAMENTO FATORIAL.....	74
5.2.1.1	FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE.....	80
5.2.2	PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL OU ESTRELA.....	81
5.2.2.1	FUNÇÃO DE DESEJABILIDADE.....	83
5.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	85
5.3.1	ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE.....	85
5.3.2	LINEARIDADE.....	87
5.3.2.1	CURVA ANALÍTICA CIPROFIBRATO.....	87
5.3.2.2	CURVA ANALÍTICA SINVASTATINA.....	92
5.3.3	LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	96
5.3.4	PRECISÃO.....	97
5.3.4.1	REPETIBILIDADE.....	97
5.3.4.2	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	97
5.3.5	EXATIDÃO.....	100
5.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE CIPROFIBRATO E SINVASTATINA.....	101
5.4.1	ANÁLISE SIMULTÂNEA DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE CIPROFIBRATO E SINVASTATINA.....	102
5.5	AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS UTILIZANDO UM MÉTODO COMPARATIVO.....	103
5.5.1	MÉTODO COMPARATIVO CIPROFIBRATO.....	103
5.5.1.1	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS.....	104
5.5.2	MÉTODO COMPARATIVO SINVASTATINA.....	105
5.5.2.1	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS.....	106
5.6	DETERMINAÇÃO DE CIPROFIBRATO E SINVASTATINA EM OUTRAS MATRIZES.....	107
5.6.1	URINA SINTÉTICA.....	107

5.6.2	ÁGUAS SUPERFICIAIS.....	110
6	CONCLUSÃO.....	113
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	115
	REFERÊNCIAS.....	116

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

A sociedade atual está constantemente passando por profundas transformações, onde a busca por novas informações e o avanço das tecnologias vem alterando o modo de pensar e viver das pessoas. Neste sentido, é possível observar algumas mudanças na maneira como as pessoas estão se alimentando, com a busca por alimentos que poupem tempo devido ao ritmo acelerado do dia-a-dia ganhando destaque. Entretanto, essa alimentação, muitas vezes, pode ser caracterizada como sendo extremamente calórica, rica em açúcares e gorduras e insatisfatória do ponto de vista nutricional.

Nos últimos anos, pode-se verificar que uma parcela da população, ainda que pequena, se conscientizou da importância que a alimentação desempenha na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) e passou a procurar por um estilo de vida mais saudável. Entretanto, ainda é possível notar as consequências causadas por uma alimentação desequilibrada, já que o número de pessoas que desencadeiam patologias como obesidade, dislipidemias, diabetes, hipertensão arterial dentre outras doenças crônicas vêm aumentando. Segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), cerca de 18,9 % da população brasileira apresenta obesidade, 8,9 % diabetes e 25,7 % hipertensão arterial (BRASIL, 2017), fazendo com que aumentem os índices de mortalidade, uma vez que estas patologias elevam o risco ao surgimento de doenças cardiovasculares.

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) foram responsáveis por 68 % das mortes no mundo, com destaque para a Doença Cardiovascular (31 %) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017), taxa praticamente idêntica à encontrada no Brasil e, mais de 80% das mortes ocasionadas por Doença Cardiovascular (DCV) no mundo ocorrem em países de média e baixa renda (BRASIL, 2014).

No que diz respeito à dislipidemia (excesso de lipídios no sangue), estudos comprovam inequivocadamente que a redução dos níveis plasmáticos de LDL-colesterol diminui a chance de eventos cardiovasculares, seja no caso de quem já apresentou um evento (prevenção secundária), seja no de quem nunca o apresentou (prevenção primária). Portanto, a primeira meta lipídica para prevenção cardiovascular é o LDL-colesterol (SPOSITO et al., 2007).

Estudos epidemiológicos envolvendo pacientes hiperlipêmicos, (os quais apresentam um excesso de lipídios no sangue) mostram que, as causas para o surgimento de casos clínicos de hiperlipidemia ou hiperlipemia podem ser tanto distúrbios genéticos quanto o estilo de vida (comportamento sedentário e dietas ricas em calorias e gorduras saturadas) (BRUNTON; CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

O colesterol é uma molécula essencial, pois, apresenta papéis fisiológicos essenciais no nosso organismo como, por exemplo, participar na manutenção da integridade das membranas celulares e constituir um precursor importante na síntese de hormônios esteroides (NELSON e COX, 2014).

O tratamento de pacientes que apresentem distúrbios lipídicos vai depender de alguns fatores tais como: o nível de colesterol e triglicérides plasmáticos; a presença ou não de doença cardíaca coronariana (DCC) estabelecida; a gravidade dos fatores de riscos quando presentes e, na avaliação baseada nos níveis de risco de Framingham (escala quantitativa em que objetiva-se prever a probabilidade de um paciente, sem história prévia de DCC ou outra doença aterosclerótica, desenvolvê-la em 10 anos) (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2001; WOOD et al., 1998).

A partir do reconhecimento da hipercolesterolemia como um dos principais fatores de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares fez com que houvesse um desenvolvimento de fármacos que reduzissem os níveis de colesterol. O principal grupo de agentes hipolipidêmicos são os derivados do ácido fíbrico, derivados do ácido nicotínico, resinas biliares, inibidores da absorção do colesterol biliar e dietético e as estatinas. As estatinas são os agentes mais bem tolerados e mais efetivos para o tratamento da dislipidemia (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2001; WOOD et al., 1998; STUDER et al., 2005).

As estatinas são substâncias originárias de cultura de fungos, sendo a primeira substância dessa família isolada em 1976 de uma cultura de *Penicillium citrinum*, chamada de compactina. Esta substância revelou-se como excelente inibidora da síntese do colesterol, porém, devido a sua toxicidade, não foi empregada para uso clínico (NELSON e COX, 2014; MANO, 2005). Desde então, foram produzidas diversas substâncias, com fórmulas estruturais semelhantes, todas mostrando efeito inibidor da síntese do colesterol (BRUNTON; CHABNER e KNOLLMANN, 2012). As estatinas reduzem as LDL-colesterol plasmáticas, uma vez que, interferem na biossíntese do colesterol pela inibição competitiva da 3-hidróxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que catalisa uma etapa inicial e limitante na

biossíntese do colesterol (conversão da HMG-CoA em ácido mevalônico, por mimetizar sua estrutura) (TOBERT, 2003).

Em 1962 foi descrito o primeiro fibrato e, desde então, diversos análogos foram desenvolvidos (CHAPMAN, 2003). Os fibratos são derivados do ácido fíbrico e agem, principalmente, no catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides, baixando seus níveis e aumentando os de HDL-colesterol (STAELS et. al, 1998), inibem também a síntese de colesterol por meio da diminuição da atividade da HMG-CoA redutase.

De acordo com dados divulgados pela Pesquisa Nacional de Saúde (IBGE, 2015), estima-se que 12,5 % (cerca de 18 milhões) da população brasileira apresenta hipercolesterolemia. Diante do exposto, é expressivo o número de pessoas que utilizam medicamentos cuja finalidade é reduzir os níveis de LDL-colesterol no sangue. Em certas ocasiões, o tratamento clínico de pacientes hiperlipêmicos utilizando estatinas em monoterapia acaba sendo insuficiente ou inadequado para que resultados satisfatórios sejam alcançados. Dessa forma, os médicos acabam optando por uma associação de fármacos para que o tratamento seja mais eficaz. Uma das associações mais frequentemente utilizadas é a combinação de estatinas e fibratos, indicada quando o paciente apresenta intolerância a doses mais elevadas de estatinas (XAVIER, 2005).

Segundo dados da INTERFARMA (Associação das Indústrias Farmacêuticas de Pesquisa) em 2017 o Brasil ocupava a 8ª posição do ranking do mercado mundial, com um faturamento anual de cerca de 85,3 bilhões (INTERFARMA, 2017). Visto que o faturamento do setor farmacêutico é muito lucrativo e crescente, aumentam também os casos de falsificação e adulteração de medicamentos. Nota-se, então, a importância em verificar a qualidade dos fármacos que são comercializados no país e, para que isso seja possível, é necessário desenvolver métodos analíticos simples, de baixo custo e que forneçam respostas rápidas e precisas, visto que ainda existe uma grande parcela de fármacos que não apresentam um método de determinação oficial na Farmacopeia Brasileira, o que acaba dificultando a análise de qualidade destes.

Neste sentido, este trabalho propõe o desenvolvimento e a validação de uma metodologia para a determinação e quantificação de ciprofibrato e sinvastatina em formulações farmacêuticas, utilizando a técnica de CLAE com detecção UV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FALSIFICAÇÃO E FISCALIZAÇÃO DE MEDICAMENTOS

Segundo a Farmacopeia Brasileira, “medicamento é o produto farmacêutico, tecnicamente, obtido, ou elaborado, que contém um ou mais fármacos e outras substâncias, com finalidade profilática; curativa; paliativa; ou para fins de diagnóstico e incluem, por exemplo: medicamento de referência, genéricos, similar e fitoterápicos” (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Segundo dados da INTERFARMA (Associação das Indústrias Farmacêuticas de Pesquisa) em 2017 o Brasil ocupava a 8ª posição do ranking do mercado mundial, com um faturamento anual de cerca de 85,3 bilhões (INTERFARMA, 2017). Visto que o faturamento do setor farmacêutico é muito lucrativo e crescente, aumentam também os casos de falsificação e adulteração de medicamentos.

Vários fatores contribuem para a falsificação de medicamentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, por comprometer uma parte da renda familiar, a compra de medicamentos muitas vezes é feita em lugares mais baratos, em pontos de venda que nem sempre são regulamentados, e isso aumenta as chances de que o medicamento comercializado seja falsificado. Outro fator que contribui para o aumento da falsificação é o crescimento do comércio internacional de ingredientes farmacêuticos e medicamentos, dificultando sua rastreabilidade até a origem. É comum a prática de reembalar medicamentos com novos rótulos antes que este chegue ao seu destino final, para ocultar o país de origem do laboratório clandestino (WHO, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Federação Internacional das Associações de Fabricantes de Produtos Farmacêuticos (IFPMA), medicamentos falsificados são aqueles deliberada e fraudulentamente rotulados de forma incorreta com relação à identificação e/ou fonte. A falsificação pode se aplicar tanto a produtos de marca quanto a genéricos, sendo que os mesmos podem incluir produtos com os princípios corretos ou incorretos, sem princípios ativos, com princípios ativos insuficientes ou com embalagem falsa (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2005).

Além dos efeitos na saúde da população, a falsificação pode também abalar a confiança da população nos sistemas de saúde, nos profissionais de saúde, nos fornecedores, nos vendedores de medicamentos originais, nas indústrias farmacêuticas e até a credibilidade da autoridade sanitária (WHO, 1999).

A falsificação de produtos comerciais é uma prática antiga que ocorre em muitos países e é motivada principalmente pelos enormes lucros obtidos. O comércio de medicamentos falsificados parece estar disseminado internacionalmente e afeta, tanto países em desenvolvimento, quanto países desenvolvidos. Na última década, a questão tem chamado a atenção dos governos e do público, como nunca. A disseminação de medicamentos falsificados é geralmente mais pronunciada em países onde a fabricação, importação, distribuição, fornecimento e venda de medicamentos são menos regulamentados e o cumprimento das leis pode ser mais fraco. As informações correntes indicam que a falsificação de medicamentos está se tornando cada vez mais sofisticada, o qual implica na necessidade das autoridades responsáveis manterem a questão sob constante revisão (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2005).

Em países industrializados (como por exemplo, os Estados Unidos, a maior parte da Europa, a Austrália e o Japão), com sistemas rigorosos e eficazes de fiscalização, além do controle de mercado, as falsificações representam menos de 1 % do mercado de medicamentos. Nos países em desenvolvimento a escala do problema é desproporcionalmente maior, estima-se que as vendas de medicamentos falsificados representem cerca de 10 a 30% do mercado. Segundo a OMS, diversos países da África, parte da Ásia e da América Latina possuem áreas com estimativas ainda maiores, superando os 30% (WHO, 2018).

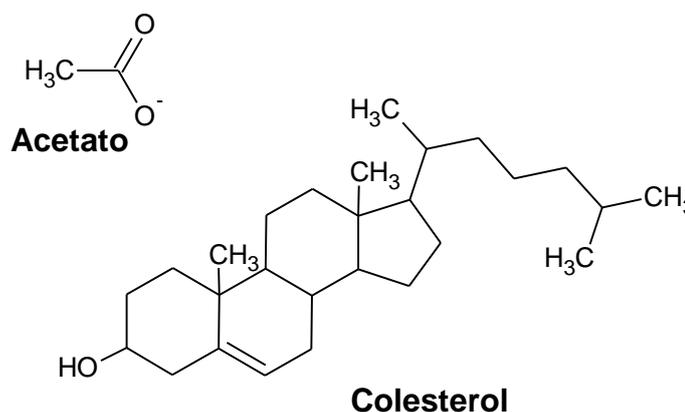
No Brasil, entre 1997 e 1998, o Ministério da Saúde (MS) chegou a registrar 172 casos de falsificação, provocando questionamentos na sociedade sobre a qualidade e a segurança dos produtos comercializados nacionalmente. A partir de então, várias medidas foram adotadas pelo governo, dentre elas a aprovação da Política Nacional de Medicamentos, que garante à população o acesso a medicamentos seguros e eficazes, bem como ações reforçadas com a criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1999. Após a criação da ANVISA, entre 1999 e 2003, apenas 7 falsificações foram confirmadas (ANVISA, 2004).

A Portaria nº 2.814 do Ministério da Saúde, de 29 de maio de 1998, determina que a qualidade dos medicamentos seja assegurada e que seja punida a empresa que comercializar medicamentos falsificados, adulterados ou fraudados (BRASIL, 1998).

2.2 COLESTEROL

O colesterol é sem dúvida o lipídio que recebe maior destaque em decorrência da forte correlação entre os seus altos níveis no sangue e a incidência de doenças cardiovasculares. Muito menos divulgado é o papel crucial do colesterol como um componente das membranas celulares e como precursor dos hormônios progesterona, andrógenos, adrenocorticóides, estrogênios e dos ácidos biliares (NELSON e COX, 2014). A estrutura desse composto de 27 carbonos, como mostra a Figura 1, sugere uma via biossintética complexa, porém todos os seus átomos de carbono são fornecidos por um único precursor – o acetato (NELSON e COX, 2014).

Figura 1 - Estrutura do colesterol e do seu principal precursor, o acetato



Fonte: Adaptado de: NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga, et al. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p. 860

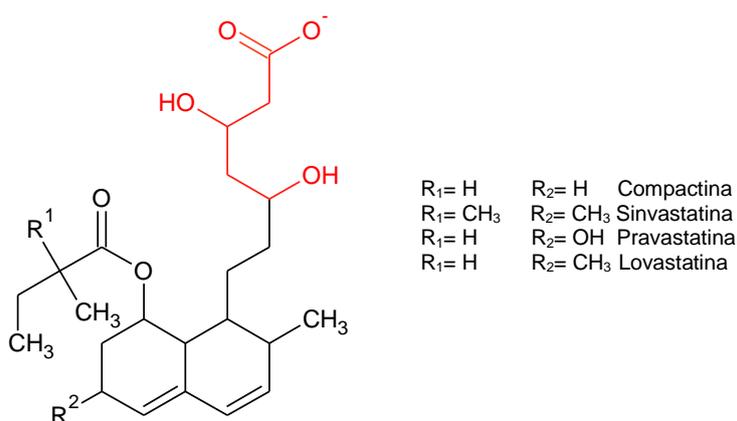
2.3 ESTATINAS

As estatinas são metabólitos de fungos que atuam como potentes inibidores competitivos da enzima HMG-CoA redutase. A primeira substância dessa família foi isolada em 1976, de uma cultura de *Penicillium citrium*, chamada compactina (MANO, 2005). Essa substância revelou-se excelente inibidora da síntese do colesterol, mas, devido à sua toxicidade, não apresentou condições para o uso clínico. Posteriormente, foi isolada a lovastatina da cultura do *Aspergillus terreus* (1980) com as mesmas propriedades da substância anterior, mas com menor toxicidade (YAMAMOTO et al., 1986). Desde a

aprovação da lovastatina pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1987, outras estatinas foram aprovadas.

Todas as estatinas apresentam um grupo lateral estruturalmente semelhante à HMG-CoA, e devido a esta semelhança as estatinas são inibidores competitivos da HMG-CoA. A pravastatina, sinvastatina, mevastatina (compactina) e a lovastatina são metabólitos fúngicos, sendo que cada um desses fármacos contém um anel hexaidronaftaleno. A Figura 2 apresenta as principais diferenças estruturais entre esses fármacos. A lovastatina difere da mevastatina pela presença de um grupo metil em R₂. Existem duas cadeias laterais principais, sendo uma delas um hidroxiácido, que se assemelha a do composto intermediário na reação da HMG-CoA redutase e a outra um éster metilbutirato (no caso da pravastatina e lovastatina) ou um éster dimetilbutirado (na sinvastatina) (YAMAMOTO et al., 1986).

Figura 2 - As estatinas como inibidores da HMG-CoA redutase, uma comparação entre suas estruturas, o que as diferem entre si



Fonte: Adaptado de: NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga, et al. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p. 872

A rosuvastatina é a estatina sintética mais recente, tendo sido aprovada em agosto de 2003 pelo FDA (KAJINAMI; TAKEKOSHI e SAITO, 2003; MUKHTAR; REID e REVKLESS, 2005; CAMPO e CARVALHO, 2007). A pravastatina é um dos melhores inibidores da enzima HMG-CoA redutase, devido ao seu grupo hidroxil, que resulta em hidrofiliabilidade bem maior do que a dos outros inibidores da HMG-CoA redutase (BAUER et al., 2005).

As estatinas empregadas clinicamente são: a lovastatina (Mevacor[®]), a pravastatina (Pravacol[®]), a sinvastatina (Zocor[®]), derivado semi-sintético, a fluvastatina (Lescol[®]), primeiro agente totalmente sintético, derivado da mevalonolactona produzido na forma

racêmica (WERMUTH, 1996). A nova geração de estatinas sintéticas, enantiomericamente puras, é representada pela atorvastatina (Lipitor[®]) e pela rosuvastatina (Crestor[®]).

2.3.1 Sinvastatina

A sinvastatina é um agente redutor do colesterol derivado sinteticamente de um produto de fermentação do *Aspergillus terreus* (MERCK, 2010). A sinvastatina é ingerida sob a forma de uma lactona inativa e é hidrolisada, no fígado, para a forma ativa (β -hidroxiácido) que é um inibidor da HMG-CoA redutase, enzima que catalisa um passo precoce e limitante da taxa de biossíntese do colesterol.

Os principais metabólitos da sinvastatina presentes no plasma humano são o β -hidroxiácido e quatro metabólitos adicionais. Estudos revelam que, a concentração plasmática máxima é atingida com 1,3 a 2,4 horas após a ingestão da dose (MERCK, 2010).

A sinvastatina é bem absorvida e passa por ampla extração hepática de primeira passagem. A extração no fígado depende do fluxo sanguíneo hepático. O fígado é o principal local de ação, com excreção posterior dos equivalentes do fármaco na bile. Conseqüentemente, a disponibilidade do fármaco ativo na circulação sistêmica é baixa. Sua meia-vida média é de 1,9 horas. A eliminação da sinvastatina ocorre pela urina e principalmente pelas fezes (MERCK, 2010).

A Tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas para a sinvastatina.

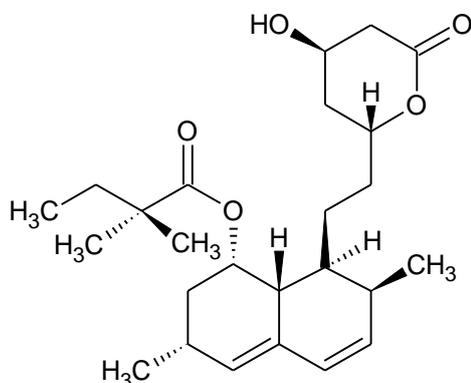
Tabela 1 - Propriedades físico-químicas da sinvastatina

Nome (IUPAC)	(1S,3R,7S,8S,8aR) -1,2,3,7,8,8aHexahidro-3,7-dimetil-8- {2- [(2R,4R) - tetrahydro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-il] etil} -1- naftil 2,2-dimetilbutirato
Substância (Sigla)	Sinvastatina (SIM)
Fórmula molecular	C ₂₅ H ₃₈ O ₅
Massa molecular	418,56
Ponto de fusão	135– 138 °
pKa	4,68
Solubilidade	Insolúvel em água (0,03 g L ⁻¹) e HCl 0,1 M (0,06 g L ⁻¹) e solúvel em clorofórmio (610 g L ⁻¹), metanol (200 g L ⁻¹), etanol (160 g L ⁻¹), polietilenoglicol (70 g L ⁻¹) e NaOH 0,1 M (70 g L ⁻¹)
Cor	Branco
Aspecto físico	Pó fino e cristalino

Fonte: Adaptado: Pubchem, Open Chemistry Database.

A Figura 3 mostra a estrutura química da sinvastatina.

Figura 3 - Estrutura química da sinvastatina (SIM)

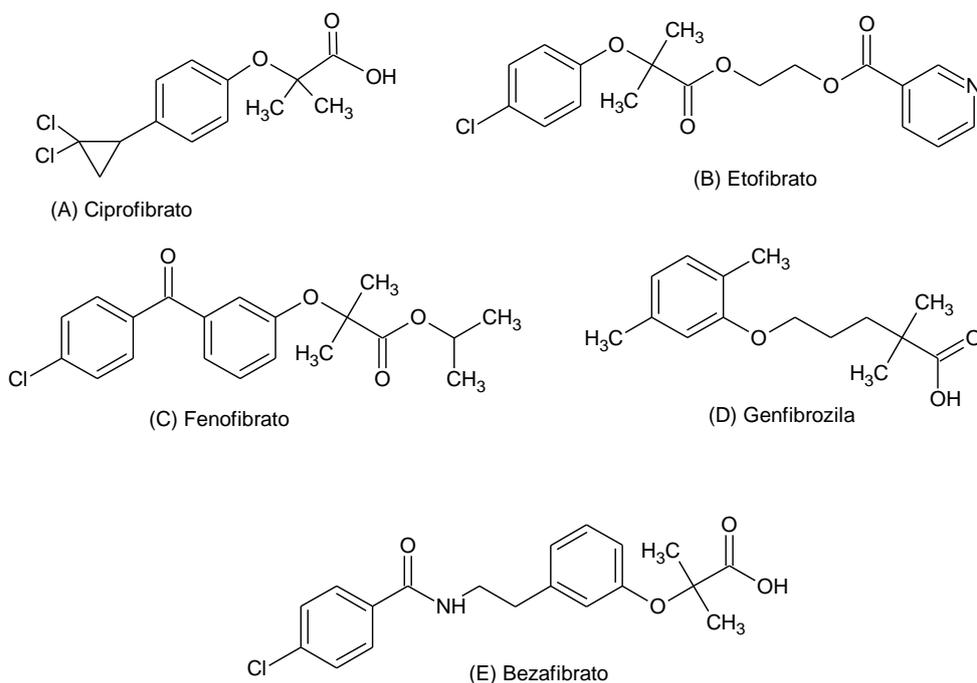


Fonte: Adaptado de: POLONINI et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de sinvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 516-519, 2011

2.4 FIBRATOS

Os fibratos são uma das classes de medicamentos utilizados no tratamento de dislipidemias, pois, diminuem a concentração plasmática de triglicérides (TG), aumentam a concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL), potencializam a eliminação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e têm um papel importante no controle das dislipidemias mistas (BIGHETTI et al., 2009; SANTOS, 2001).

Os fibratos empregados clinicamente são: clofibrato, bezafibrato, genfibrozil, etofibrato, fenofibrato e ciprofibrato. Não existe grande diferença de potência entre eles. Todos são metabolizados pelo fígado e excretados pelos rins. A Figura 4 mostra a estrutura dos fibratos que são utilizados clinicamente.

Figura 4 - Fibratos disponíveis na terapêutica

Fonte: Adaptado de: Polidoro, A. **Estudo da síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente cardiovasculares contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico**. 2013, 212f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos Área de Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, SP, 2013.

2.4.1 Ciprofibrato

O ciprofibrato é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. O metabolismo do ciprofibrato envolve dois tipos de reações: as reações de fase I (catabólicas) e as de fase II (anabólicas). Nas reações de fase I, o citocromo P450 combina-se com a molécula do ciprofibrato, sofre redução, oxidação, hidroxilação, resultando num fármaco oxidado e a regeneração da enzima P450, sendo este processo conhecido como funcionalização, ou seja, induz-se na molécula do ciprofibrato um grupo reativo que serve de ponte de ataque para a conjugação. As reações de fase II são anabólicas, envolvem a conjugação deste grupo reativo introduzido na fase I com o glicuronídeo, processo este conhecido como glicuronização, que ocorre no fígado. Conseqüentemente, há a formação de um conjugado glicurônico polar, que é

excretado facilmente pelos rins (RANG et al., 2007). É excretado na urina inalterado ou como conjugados glicuronídeos (BRUNTON, 2012).

A Tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas para o ciprofibrato.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do ciprofibrato

Nome (IUPAC)	2-[4-[(1R)-2,2-Diclorociclopropil] fenoxi]-ácido-2-metil-propanóico
Substância (Sigla)	Ciprofibrato (CPF)
Fórmula molecular	C ₁₃ H ₁₄ Cl ₂ O ₃
Massa molecular	289,2
Ponto de fusão	114 – 116 °C
pKa	3,65 *
Solubilidade	Praticamente insolúvel em água; Facilmente solúvel em etanol anidro e solúvel em tolueno
Cor	Branco ou levemente amarelo
Aspecto físico	Pó cristalino

Fonte: Adaptado de: EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 7th ed., Council of Europe. Strasbourg: EDQM, 2013;

* HÜTTEMANN, H.; BLASCHKE, G. Achiral and chiral determination of ciprofibrate and its glucuronide in human urine by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 729, n. (1-2), p. 33-41, 1999

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM ESTUDO

São reportados na literatura diferentes técnicas analíticas já desenvolvidas e validadas para a quantificação de estatinas e fibratos, em matrizes biológicas e formulações farmacêuticas, incluindo a espectrofotometria UV-VIS (WANG e ASGHARNEJAD, 2000; BASAVIAH e THARPA, 2008; SOURI e AMANLOU, 2010; NASCIMENTO et al., 2011. HELLWIG, 2014; OLIVEIRA et al., 2014; RAMADAN; MANDIL e SABOUNI, 2015), métodos eletroquímicos (KOMORSKY e NIGOVIC, 2006; DOGAN; USLU e OZKAN, 2007; TAKEDA et al., 2012) e cromatográficos (KIM et al., 2004; ASHFAQ et al., 2007; ASHFAQ et al., 2008; SILVA, 2009; HEFNAWY; AL-OMAR e JULKHUF, 2009; JAIN et al., 2012; PHANEEMDRA e NAGAMALLESWARI, 2015).

2.5.1 Espectrofotometria UV-VIS

São encontrados na literatura trabalhos que empregaram a espectrofotometria para determinação de estatinas e fibratos separadamente empregando medidas de absorção no UV (WANG e ASGHARNEJAD, 2000; JAIN et al., 2009; SOURI e AMANLOU, 2010; NASCIMENTO et al., 2011; HELLWIG, 2014; OLIVEIRA et al., 2014; RAMADAN; MANDIL e SABOUNI, 2015) como também medidas na região do Vis (BASAVIAIAH e THARPA, 2008; THARPA et al., 2010) do espectro.

Wang e Asgharnejad (2000) desenvolveram um método espectroscópico UV de segunda derivada com absorção máxima em 243 nm, para a determinação de sinvastatina em formulações farmacêuticas. Quando comparado com o método UV direto, a espectroscopia UV de segunda derivada eliminou as interferências de excipientes absorventes de UV. O método apresentou linearidade na faixa de 5 – 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi preciso e exato, com valores de recuperação entre 98,1 e 99,6 % para as formulações analisadas.

Jain et al. (2009) desenvolveram um método espectrofotométrico simples, preciso, sensível e altamente seletivo para a determinação simultânea de sinvastatina e ezetimiba. A sinvastatina foi determinada por meio de um método de dupla onda em 223 e 254,5 nm, já a ezetimiba foi estimada em 258,5 nm. O método mostrou-se linear na faixa de 1 – 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com recuperação média de 99,0 % e 99,65 % de sinvastatina e ezetimiba, respectivamente.

Souri e Amanlou (2010) desenvolveram um método espectrofotométrico derivado de primeira ordem para a determinação de sinvastatina e ezetimiba em forma de dosagens combinadas. As medidas foram realizadas em 219 e 265 nm para a sinvastatina e ezetimiba, respectivamente. O método foi linear no intervalo de 2 – 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a sinvastatina na presença de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ezetimiba a 219 nm e de 1 – 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na presença de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sinvastatina a 265 nm, com valores de recuperação entre 98 – 105 % para as amostras analisadas.

Nascimento et al. (2011) desenvolveram um método espectrofotométrico na região do ultravioleta para a determinação de ciprofibrato em comprimidos. A máxima absorção foi em 233 nm. O método apresentou linearidade na faixa de 6 – 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi exato e preciso, com valores de recuperação entre 99,47 – 100,84 % para as formulações analisadas.

Hellwig (2014) desenvolveu e validou um método simples, rápido e de baixo custo por espectrofotometria no ultravioleta para a determinação de ciprofibrato em formulações farmacêuticas disponíveis comercialmente. A máxima absorção foi em 233 nm. O método apresentou-se linear na faixa de 8,0 – 24 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O autor analisou os parâmetros de

especificidade e verificou que não houve interferência dos excipientes na determinação do fármaco. O método foi exato e preciso com percentagens de recuperação média de 99,15 % para comprimidos e 102,59 % para cápsulas.

Oliveira et al. (2014), desenvolveram uma metodologia para a determinação de sinvastatina em formulações farmacêuticas com absorção na região do ultravioleta. A máxima absorção foi em 239 nm. O método apresentou linearidade na faixa de 2 – 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os limites de quantificação e de detecção foram calculados a partir da linearidade como 0,95 e 0,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Também foi preciso e exato, com valores de recuperação entre 95,67 e 104,09 % para as formulações analisadas.

Ramadan; Mandil e Sabouni (2015), propuseram um método para a determinação de atorvastatina cálcica nas formas pura e em formulações farmacêuticas utilizando iodo em acetonitrila. O método é baseado na oxidação da atorvastatina, levando à formação de um complexo triiodeto (I_3^-) o qual apresenta absorbância entre 291 a 360 nm. O método apresentou linearidade na faixa de concentração de 0,5586 – 11,173 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o limite de detecção e quantificação foi de 0,056 e 0,17 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Segundo os autores, o método foi seletivo, preciso, exato para a determinação de atorvastatina em comprimidos e não sofreu interferências dos excipientes, com recuperação de 99,45 – 102,4 %.

Basavaiah e Tharpa (2008) propuseram a determinação espectrofotométrica da sinvastatina em formulações farmacêuticas a partir da reação em meio ácido do princípio ativo com bromo (reação de bromação), na qual, o bromo encontra-se em excesso. O bromo que não reagiu é determinado a partir de uma reação com *p*- fenilenodiamina (PPDA), levando à formação de um produto com coloração vermelho e absorção máxima em 510 nm ou com *o*- dianisina (ODA) com absorbância em 470 nm. A Lei de Beer é obedecida no intervalo de concentração de 20 a 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a reação com PPDA e 2 a 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com ODA. Os autores calcularam as absorvidades molares para ambas as reações, encontrando os valores de $2,24 \times 10^3$ e $1,91 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o PPDA e ODA, respectivamente. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o PPDA foram de 2,96 e 8,97 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e para o ODA foram de 0,14 e 0,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A recuperação foi de 97,38 – 103,4 % e a reação com o ODA mostrou-se mais sensível, quando comparado com o PPDA.

Tharpa et al. (2010) propuseram a determinação da sinvastatina utilizando o permanganato de potássio como reagente oxidimétrico. Em um dos métodos, a sinvastatina foi tratada com um excesso conhecido de permanganato em meio de ácido acético e, o oxidante que não reagiu absorve em 550 nm. No outro método, a reação entre a sinvastatina e

o permanganato ocorre em meio alcalino e o produto (manganato) absorve em 610 nm. No primeiro método, a absorvância diminui com o aumento da concentração enquanto que, no segundo método a absorvância aumenta. Os métodos demonstraram linearidade na faixa de $1,47 - 17,67 \times 10^{-5}$ e $2,27 - 27,18 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o primeiro e segundo método, respectivamente. Ambos os métodos foram aplicados e apresentaram alta capacidade de recuperação, boa exatidão e precisão sem interferência mensurável dos excipientes em meio ácido e com interferência no meio alcalino, sendo neste caso indicada uma etapa prévia de extração com clorofórmio.

Embora os métodos espectrofotométricos apresentem uma ampla aplicação, por se tratar de técnicas que apresentam baixo custo e simplicidade, são comumente utilizados com maior confiabilidade para análise de amostras que contenham um único analito de interesse.

2.5.2 Métodos Eletroquímicos

Na literatura existem poucos relatos sobre a utilização de métodos eletroquímicos para a determinação de estatinas e fibratos em formulações farmacêuticas. Komorsky e Nigovic (2006) investigaram as propriedades eletroquímicas da sinvastatina na forma sólida e em solução, a fim de desenvolver métodos para a análise qualitativa e quantitativa de sinvastatina em fármacos. A análise foi feita em eletrodos de grafite e de mercúrio. As micropartículas sólidas de sinvastatina foram imobilizadas mecanicamente sobre a superfície do eletrodo de grafite, o qual foi imerso em uma solução eletrolítica. As micropartículas foram oxidadas em 1,1 V. A sinvastatina foi solubilizada em acetonitrila 0,1 mol L⁻¹ com KH₂PO₄ – Na₂B₄O₇ tampão pH 7 e foi fortemente adsorvida na superfície do eletrodo de mercúrio. A sinvastatina adsorvida foi reduzida em um potencial de -1,45 V. Segundo os autores, o método foi bem eficaz para a determinação de sinvastatina nas formulações analisadas.

Dogan; Uslu e Ozkan (2007) estudou o comportamento eletroquímico da atorvastatina cálcica sobre eletrodos de carbono vítreo (CV) e diamante dopado com Boro (DDB). O método apresentou-se linear na faixa de concentração de $9,65 \times 10^{-7}$ a $3,86 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em meio de ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹. Os limites de detecção foram estimados em $2,05 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o eletrodo de CV e $1,31 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para o eletrodo de DDB. O método foi aplicado com sucesso na determinação de atorvastatina cálcica em medicamentos, plasma humano e urina.

Takeda; Janegitz; Medeiros e Mattoso (2012) desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono com multicamadas funcionalizados com um

filme de cloridrato de polialilamina (CNTs-PAH) para determinar ciprofibrato em formulações farmacêuticas utilizando a voltametria de pulso diferencial. O filme foi previamente avaliado e caracterizado com a técnica de potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura. Os voltamogramas de pulso diferencial apresentaram um pico de oxidação do ciprofibrato em 0,98 V em uma solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). A curva analítica foi linear na faixa de concentração de $1,33 \times 10^{-5}$ – $1,32 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com limite de detecção de $8,34 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O método desenvolvido foi preciso e exato e os resultados estão de acordo com os obtidos pelo método cromatográfico com um nível de confiança de 95 %.

Apesar dos métodos eletroquímicos apresentarem alta sensibilidade, seletividade, estabilidade e versatilidade, existe ainda poucos relatos na literatura que reportem a sua utilização para a determinação dessa classe de fármacos em formulações farmacêuticas, muitas vezes pelo fato da confecção dos eletrodos modificados envolverem um processo meticuloso, e, dessa forma, acabam dificultando a sua utilização para esta finalidade.

2.5.3 Métodos Cromatográficos

São encontrados na literatura trabalhos que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV para a determinação de estatinas e fibratos em amostras biológicas e formulações farmacêuticas, alguns dos quais são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Trabalhos encontrados na literatura para a determinação de agentes hipolipidêmicos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

(continua)

Coluna	Fase Móvel	Fluxo (mL min ⁻¹)	Detector	Fármaco	Tempo de corrida (min)	Faixa Linear	Aplicação	Recuperação (%)	Referência
C – 18 Capcell Pak (250 mm x 1,5 mm, I.D. 5µm)	ACN: Tampão fosfato de potássio (65:35)	0,5	UV	Sinvastatina	28,7	0,5 – 20 ng mL ⁻¹	Plasma Humano	89,7	KIM et al. (2004)
C – 18 (250 mm x 4,6 mm, I.D. 5µm)	ACN: Tampão acetato de amônia (70:30)	1,5	UV	Sinvastatina e ezetimiba	10	20 – 60 µg mL ⁻¹	Formulações farmacêuticas	99,12	ASHFAQ et al. (2007)
C – 18 (250 mm x 4,6 mm, I.D. 5µm)	ACN: Tampão acetato de amônia (85:15)	1,0	UV	Sinvastatina e genfibrozila	8	60 – 420 µg mL ⁻¹ (GEM) e 1 – 7 µg mL ⁻¹ (SIM)	Formulações Farmacêuticas	100,89	ASHFAQ et al. (2008)

Tabela 3 – Trabalhos encontrados na literatura para a determinação de agentes hipolipidêmicos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

(continuação)

Coluna	Fase Móvel	Fluxo (mL min ⁻¹)	Detector	Fármaco	Tempo de corrida (min)	Faixa Linear	Aplicação	Recuperação (%)	Referência
C – 8	ACN: Ácido fosfórico 0,1 % (65:35)	1,5	UV	Sinvastatina	7	28 – 52 µg mL ⁻¹	Formulações Farmacêuticas	99,87	SILVA (2009)
C – 18 (100 mm x 4,6 mm)	ACN: Acetato de amônia (65:35)	3,0	UV	Ezetimiba e Sinvastatina	2	40 – 1200 ng mL ⁻¹	Produtos Farmacêuticos	100,93	HEFNAWY; AL- OMAR e JULKHUF. (2009)
C – 18 (100 mm x 4,6 mm) Onyx [®]	Metanol: água (85:15)	0,8	UV	Sinvastatina	15	1 -10 µg mL ⁻¹	Formulações Farmacêuticas	92,71 – 104,35	ALI et al. (2009)
C 18 (150 x 3,9mm, 4 µm) Novapak [®]	ACN: Tampão acetato de amônia (40:60)	1,3	UV	Atorvastatina	8	50 – 150 µg mL ⁻¹	Formulações Farmacêuticas	99,63 – 100,20	MENDES (2010)
C – 18 (250 mm x 4,6 mm)	Metanol: água (90:10)	1,0	UV	Sinvastatina	9	5 – 50 µg mL ⁻¹	Formulações Farmacêuticas e Plasma Humano	98,69 – 101,21	SAEED et al. (2010)

Tabela 3 – Trabalhos encontrados na literatura para a determinação de agentes hipolipidêmicos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

(conclusão)

Coluna	Fase Móvel	Fluxo (mL min ⁻¹)	Detector	Fármaco	Tempo de corrida (min)	Faixa Linear	Aplicação	Recuperação (%)	Referência
C – 18 (250 mm x 4,6 mm)	Metanol: água (90:10) ACN:	1,0	UV	Ciprofibrato	4	2 – 12 µg mL ⁻¹	Formulações Farmacêuticas	98,65 – 100,01	JAIN et al. (2012)
C – 18	Metanol: Água (50:30:20)	1,0	UV	Sinvastatina	5	2 – 10 µg mL ⁻¹	Formulações Farmacêuticas	99,4	PHANEEMDRA e NAGAMALLESARI (2015)

Fonte: a autora

De modo geral, os métodos cromatográficos são realizados em fase reversa, utilizam como modificador orgânico preferencialmente acetonitrila (ACN) e a fase aquosa é quase sempre tamponada ou acidificada. A eluição é isocrática em 70 % dos métodos. As análises requerem, em média 4 e 10,6 minutos para a determinação de ciprofibrato e sinvastatina e apresentam sensibilidade adequada para o tipo de amostra a que se destinam.

De acordo com os trabalhos descritos na literatura (Tabela 3), em sua grande maioria a fase aquosa utilizada é tamponada ou acidificada, o que requerem um maior cuidado por parte do operador para que o sistema de análise seja preservado. O uso de tampão, por exemplo, se utilizado de maneira inadequada, pode levar à precipitação do sal fazendo com que ocorram problemas no funcionamento da válvula de retenção, comprometendo o sistema de análise, dessa forma, sempre que possível, sistemas tamponados devem ser evitados (DONG, 2006).

Já na utilização de fase móvel acidificada, o controle do pH deve ser bem controlado pois, sabe-se que, em pH menor que 2, as ligações $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ que formam o esqueleto da sílica e são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na superfície, ficam mais susceptíveis à hidrólise. Dessa forma, os grupos orgânicos são mais facilmente lixiviados quando se emprega fases móveis com pH abaixo de 2. Como consequência, o leito cromatográfico dentro da coluna é alterado, resultando em baixas eficiências e alargamento frontal de pico (NEUE, 1997).

Além disso, em alguns casos o tempo de análise é elevado (superior a 15 minutos), o que acaba gerando maiores gastos com solventes e maior geração de resíduos, o que não é interessante do ponto de vista ambiental.

Dentre os trabalhos reportados na literatura, são poucos os relatos que envolvem a determinação simultânea de estatinas e fibratos e, os existentes fazem a utilização de sistemas tamponados. Neste sentido é evidente a necessidade do desenvolvimento de metodologias que envolvam a determinação simultânea desses fármacos e que evitem a utilização de fase aquosa constituída de ácidos ou tampão, e, com a utilização de métodos quimiométricos para a otimização das condições cromatográficas, resultados ainda melhores podem ser alcançados.

2.6 TÉCNICAS E FERRAMENTAS EMPREGADAS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

2.6.1 Cromatografia

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permite separar componentes semelhantes de misturas complexas. Desse modo, a cromatografia, pode ser considerada um método físico-químico de separação, onde a amostra é transportada por uma fase móvel sendo forçada a transpor uma fase estacionária. A fase móvel é um fluido insolúvel na fase estacionária, podendo ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico, que percola através da fase estacionária. Esta, por sua vez, é geralmente de grande área, podendo ser um sólido ou um líquido imiscível e fixa em uma coluna ou superfície sólida. A escolha das duas fases é baseada no grau de distribuição dos componentes da amostra entre as fases. Os componentes que tiverem maior afinidade pela fase móvel serão arrastados primeiramente. Os componentes com maior afinidade pela fase estacionária ficarão mais retidos, se movendo lentamente. Portanto, os componentes eluirão em diferentes momentos, conforme a afinidade pela fase móvel e estacionária (SOARES, 2009).

A cromatografia pode ser classificada de acordo com as diferentes modalidades, sendo mais comuns aquelas relacionadas às técnicas empregadas, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas. De acordo com o meio físico podem ser divididas em coluna ou planar. Na primeira, a fase estacionária é mantida dentro de um cilindro estreito, através da qual a fase móvel é forçada a passar. Já na cromatografia planar, a fase estacionária é disposta sobre uma superfície planar, se movimentando por capilaridade ou gravidade. Podem também ser classificadas de acordo com o estado físico da fase móvel, podendo ser divididas em cromatografia gasosa, na qual a fase móvel é um gás inerte, em cromatografia líquida, na qual é um líquido que pode interagir com os solutos, contribuindo para a separação e em cromatografia supercrítica, na qual é empregado um vapor pressurizado como fase móvel (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

Na cromatografia líquida clássica (CLC) a fase estacionária geralmente é utilizada apenas uma vez, devido à sua adsorção irreversível. O enchimento da coluna se faz necessário a cada separação, representando um desperdício enorme de material e mão-de-obra. A aplicação da amostra exige habilidade e tempo por parte do operador. A eluição ocorre pela ação da gravidade e as frações individuais da amostra são coletadas na porção inferior da coluna. A detecção e quantificação são realizadas por análise manual das frações ou por

monitoramento visual, por meio de algumas técnicas auxiliares, como a espectrofotometria ou uma simples análise gravimétrica. Os resultados analíticos são registrados sob a forma de cromatograma através de um gráfico de coluna (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se tornou uma técnica de separação analítica para fins qualitativos e quantitativos mais utilizados nos últimos trinta anos, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como aplicações ambientais e diversas outras aplicações nos mais diversos ramos da ciência, como a medicina, devido às suas características como grande poder de separação cromatográfica, determinações quantitativas com alta sensibilidade, ser o método mais indicado para a análise de amostras mais complexas como fluídos biológicos, dentre outros.

Na CLAE utiliza-se coluna fechada, reaproveitável capaz de realizar inúmeras separações individuais com a mesma coluna (COLLINS COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997; TONHI et al., 2002) as quais são muito eficientes porém, oferece grande resistência à vazão da fase móvel sendo, portanto, necessário a utilização de uma bomba de alta pressão que possibilite a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. Diversos são os tipos de detectores (UV-Vis, eletroquímico, fluorescência, índice de refração, espectrometria de massa, etc) colocados na saída da coluna, os quais fornecem um registro contínuo da composição do eluente, permitindo que um cromatograma possa ser utilizado na identificação e/ou quantificação dos componentes da amostra.

Na CLAE, a separação cromatográfica pode ocorrer em fase normal ou reversa. Na primeira, a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, enquanto que na fase reversa, a fase móvel é mais polar e a fase estacionária mais apolar (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

Pelo fato da detecção ser contínua e com grande repetibilidade na CLAE, ambas as análises, qualitativa e quantitativa apresentam elevada exatidão e precisão. A análise quantitativa pode atingir uma precisão superior a $\pm 0,5\%$. As múltiplas vantagens da CLAE fizeram desta técnica uma das mais procuradas (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

Existem diferentes mecanismos pelos quais a separação cromatográfica se dá, dentre eles: adsorção, partição, exclusão, troca iônica e bioafinidade.

O mecanismo de separação por adsorção baseia-se na competição que existe entre moléculas da amostra e as da fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície de um sólido (fase estacionária). Para que a molécula do soluto possa ser adsorvida na fase estacionária, primeiro uma molécula da fase móvel deve ser deslocada da superfície. É importante que as partículas da fase estacionária apresentem uma grande área de superfície, isto é, um grande

número de sítios ativos. A atividade da superfície de muitos sólidos (incluindo a sílica e albumina) se encontra com frequência afetada pela retenção de certas moléculas de alta polaridade e, devido a eles, em determinadas ocasiões, é difícil reproduzir os resultados obtidos nas análises, porque as propriedades da superfície sofreram mudanças. Em consequência, a superfície da sílica empregada na CLAE é habitualmente submetida a determinados processos de desativação com o propósito de diminuir a retenção de moléculas muito polares e, assim, se mantém a superfície em condições uniformes, o que contribuirá para melhorar a reprodutibilidade das análises (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

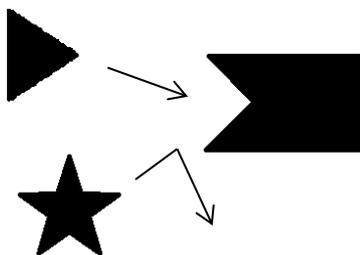
A separação por partição foi desenvolvida por MARTIN e SYNGE em 1941 para a separação de vários aminoácidos, usando uma fase estacionária de água em sílica e clorofórmio como fase móvel. O mecanismo de partição, ou mecanismo de distribuição como também é chamado, baseia-se nas diferentes solubilidades que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Então, os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos por ela, enquanto os menos solúveis são transportados mais rapidamente pela fase móvel. A cromatografia por partição é utilizada para compostos levemente polares, cujas massas moleculares são inferiores a 2000 (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

Na separação por exclusão a separação ocorre de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. A coluna é recheada com matéria inerte cujos poros têm tamanho controlado. As moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros e apresentarem um maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as moléculas pequenas são excluídas lentamente pela fase móvel. A cromatografia por exclusão é predominantemente usada para análises de compostos de alta massa molecular, incluindo polímeros orgânicos, silicones e biopolímeros. Sua aplicação tem aumentado na caracterização de altos polímeros, pela determinação da distribuição de suas massas moleculares (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

Na separação por troca iônica, a fase estacionária é, normalmente, uma resina de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno, na qual são ligados grupos iônicos. Os grupos iônicos têm um contra-íon que pode ser deslocado pelos íons da fase móvel de carga similar a eles (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

Na separação por bioafinidade somente os componentes que possuem bioafinidade com a fase estacionária são retidos, (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997) como mostra a Figura 5.

Figura 5 - Processo de separação por bioafinidade



Fonte: Adaptado de: Conselho Regional de Química IV Região – SP. **Conceitos Fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)**. São José do Rio Preto, 2010. Disponível em: <<http://www.crq4.org.br>>. Acesso em: 03 fev. 2018

Nas análises farmacêuticas as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são dominantes podendo ser utilizadas na pesquisa, desenvolvimento e no controle de qualidade tanto da matéria-prima quanto do produto acabado (MAZZARESE, 2005). Neste sentido, o presente trabalho visa desenvolver, otimizar e validar um método por CLAE - UV que possibilite a determinação simultânea de ciprofibrato e sinvastatina em formulações farmacêuticas. Dessa forma, o desenvolvimento e a validação deste método contribuirão para verificar a qualidade dessa classe de fármacos que são comercializados no país.

2.6.2 Parâmetros Cromatográficos Avaliados

2.6.2.1 *Tempo de retenção*

O tempo de retenção é característico da substância analisada, entretanto não é exclusivo. A comparação entre os tempos de retenção da amostra da substância química de referência pode ser utilizada como indicativo da identidade da substância, porém é insuficiente para garantir a total caracterização da amostra (Farmacopeia Brasileira, 2010).

2.6.2.2 *Resolução (R)*

A resolução, R , é o parâmetro cromatográfico que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, sendo calculada segundo as expressões:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 - W_2} \quad \text{ou} \quad R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} - W_{2,h/2})} \quad (1)$$

em que,

t_2 e t_1 = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base pelo método da triangulação;

$W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ = respectivas larguras dos picos à meia altura.

A área ou a altura do pico são, usualmente, proporcionais à quantidade da substância eluída. A área sob o pico, geralmente, é mais utilizada, entretanto pode ser menos precisa se houver outros picos interferentes (Farmacopeia Brasileira, 2010).

2.6.2.3 Fator de cauda (T)

O fator de cauda, T , indica a simetria do pico. Quando este fator é igual a 1, refere-se a um pico perfeitamente simétrico. Os valores ideais compreendem o intervalo entre 0,5 e 2,0 (LANÇAS, 2004; DONG, 2006). Esse valor aumenta à medida que a assimetria do pico se torna mais pronunciada. À medida que a assimetria do pico aumenta, a integração e a precisão se tornam menos confiáveis (Farmacopeia Brasileira, 2010). Pode ser calculado segundo a expressão:

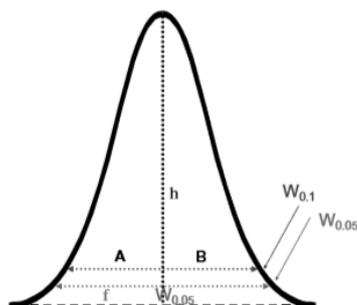
$$T = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (2)$$

em que,

$W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura;

f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura, de acordo com a Figura 6.

Figura 6 - Diagrama mostrando como calcular o fator de cauda (T) a partir da largura do pico a 5 % da altura ($W_{0,05}$) e da porção anterior do pico, em relação à largura a 5 % da altura (f)



Fonte: DONG, M. W. “**Modern HPLC for practicing scientists**”. Wiley Interscience Massachusetts, 2006

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico garante a credibilidade durante o seu uso rotineiro, em outras palavras, assegura que determinado método é eficaz para aquilo que ele é indicado para fazer (ANVISA, 2017). 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 o registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil (INMETRO, ANVISA) e de outros países recomendam a validação e as diretrizes a serem adotadas no processo de validação do método analítico (RIBANI et al., 2004; FERRO, 2010).

Os parâmetros a serem considerados para atender às exigências mínimas de validação de métodos analíticos são: especificidade, exatidão, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), faixa de aplicação (intervalo) e robustez (ANVISA, 2017).

2.7.1 Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método apresenta em medir exatamente um composto em presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2017).

Para análise qualitativa (teste de identificação) é fundamental demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isso deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos com amostras que não contém o fármaco, porém, compostos estruturalmente semelhantes (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004).

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminados com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um procedimento bem caracterizado, podendo ser uma metodologia presente em farmacopeia ou outro procedimento já validado. Essas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse como luz, calor úmido, hidrólise ácida/básica, oxidação (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004).

A seletividade é o primeiro passo para o desenvolvimento e validação de um método analítico, devendo ser reavaliada constantemente. Se este parâmetro não for garantido, a linearidade, a exatidão e precisão estarão comprometidas (FERRO, 2010).

2.7.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2017). Deve ser avaliada pela análise de no mínimo cinco diferentes concentrações (de 80 a 120 % da concentração teórica do teste), em triplicata, sem a inclusão do zero, pelos erros associados. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados devem ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinar-se o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Caso não haja relação linear, deve-se realizar transformações matemáticas (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004).

O coeficiente de correlação (r) permite uma estimativa da qualidade da curva analítica obtida, pois, quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Os critérios mínimos aceitos pela ANVISA são de um coeficiente de correlação $r = 0,990$ (ANVISA, 2017).

2.7.3 Intervalo

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade da aplicação pretendida pelo método, como apresenta a Tabela 4. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ANVISA, 2017).

Tabela 4 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos

ENSAIO	ALCANCE
Determinação quantitativa do teor do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80 % a 120 % da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do limite de quantificação até 120% (cento e vinte por cento) da concentração no limite da especificação de cada impureza individual;
Uniformidade de conteúdo	De 70 % a 130 % da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De ± 20 % sobre o valor especificado pelo intervalo

Fonte: ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 166, de 24 de julho de 2017. “**Guia para validação de métodos analíticos**”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 nov. 2018

2.7.4 Precisão

Consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. É considerada em três níveis (ANVISA, 2017):

- **Repetibilidade** (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica;
- **Precisão intermediária** (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por analistas distintos;
- **Reprodutibilidade** (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV %) de uma série de medidas, que pode ser calculada a partir da Equação nº 3.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (3)$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

2.7.5 Exatidão

A exatidão de um método é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias estão disponíveis para a determinação da exatidão, as quais variam conforme o ensaio realizado. Os métodos mais utilizados para a determinação da exatidão são: materiais de referência certificados, comparação de métodos, ensaio de recuperação e adição de padrão (ANVISA, 2017; RIBANI et al., 2004).

A exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo e da especificidade do método. É expressa pela relação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação nº 4).

$$Exatidão = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (4)$$

2.7.6 Limite de Detecção (LD)

É a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não obrigatoriamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. É determinado através de soluções de concentrações conhecidas decrescente do analito, até o menor nível detectado (ANVISA, 2017).

2.7.7 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra. É estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2017).

2.7.8 Robustez

Indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, o que confere confiança durante seu uso normal. A Tabela 5 apresenta os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método (ANVISA, 2017).

Tabela 5 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico

Identificação	Fatores a serem avaliados
Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
Cromatografia Líquida	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel

Fonte: ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 166, de 24 de julho de 2017. “**Guia para validação de métodos analíticos**”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 nov. 2018

A ANVISA não estabelece quanto cada fator modificado pode ser variado, mas que essa variação não deve ser significativa para influenciar na corrida analítica e quantificação dos analitos (RIBANI et al., 2004).

2.8 QUIMIOMETRIA

Nos dias atuais, em decorrência das necessidades da sociedade moderna, a pesquisa científica tem promovido grandes avanços em todos os campos da ciência, gerando uma gama crescente de dados e informações, sendo que para a devida exploração e o correto entendimento, a aplicação de ferramentas estatísticas torna-se indispensável (PEREIRA; POPPI e ARRUDA, 2002) para que não haja um desperdício financeiro com reagentes, análises químicas e testes físicos (BARROS; SCARMINIO e BRUNS, 2001).

A Quimiometria utiliza modelos matemáticos e estatísticos para o tratamento dos dados (químicos), de forma a extrair maior quantidade de informações e melhores resultados analíticos (OTTO, 1999). Apresenta atividades desde a década de 70, porém seu uso se consolidou apenas nos últimos 30 anos graças à popularização dos computadores e o desenvolvimento de softwares para auxiliar os pesquisadores nos cálculos estatísticos (BARROS; SCARMINIO e BRUNS, 2006).

A aplicação de métodos quimiométricos tem se difundido nas mais diversas áreas da química e ciências afins. Ela divide-se em algumas áreas, dentre elas: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento e classificação de padrões, calibração multivariada, monitoramento e modelagens de processos multivariados e métodos de inteligência artificial (OTTO, 1999).

2.8.1 Planejamento e Otimização de Experimentos

A utilização de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos permite que os pesquisadores consigam extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis, sendo necessária a realização de um número mínimo de experimentos (BARROS; SCARMINIO e BRUNS, 2001).

Diante do exposto e levando em consideração que no Brasil, os recursos financeiros e laboratoriais encontram-se escassos em decorrência das restrições de verbas para a aquisição de equipamentos e materiais de consumo, uma reflexão deve ser realizada no início de cada

pesquisa científica, para a definição das condições experimentais, que permitam a aquisição de resultados confiáveis, já que a otimização de parâmetros experimentais de relevância é considerada como uma das etapas mais críticas do trabalho científico, principalmente daqueles que têm por objetivo o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em grande escala (PERALTA; MORAIS e NAGATA, 2005).

Geralmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. Segundo alguns autores, estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de ótimos verdadeiros, os quais são atingidos pelo emprego de sistemas multivariados (BRASIL et al., 2007).

A utilização de um planejamento experimental não garante apenas uma rota a ser seguida para alcançar a meta estabelecida, ao contrário, direciona a condução dos experimentos para que os objetivos sejam atingidos. Portanto, é necessário: selecionar as variáveis independentes a serem avaliadas; selecionar os níveis em que cada variável será avaliada e projetar o planejamento do experimento de forma que se possa ser obtida exatamente o tipo de informação desejada (BARROS; SCARMINIO e BRUNS, 2001; WERKEMA e AGUIAR, 1996).

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois, permitem avaliar simultaneamente os efeitos de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (PERALTA; MORAIS e NAGATA, 2005).

São encontrados na literatura trabalhos que fazem o uso de planejamentos experimentais tanto para otimizar as condições experimentais quanto para avaliar a robustez do método desenvolvido. Janardhanan e colaboradores (2012) desenvolveram, otimizaram e validaram um método cromatográfico em fase reversa e eluição isocrática para a separação de rosuvastatina, telmisartana, ezetimiba e atorvastatina em formulações farmacêuticas utilizando a metodologia de superfície de respostas. Os autores utilizaram para a separação cromatográfica uma coluna Phenomenex[®] C-18 (15 cm x 4,6 mm, 5µm) e detecção UV em 239 nm. Os intervalos das variáveis avaliadas foram: a porcentagem de acetonitrila (33 – 38%), metanol (10 – 20 %) e concentração do tampão (10 – 20 mM) na fase móvel e a taxa de fluxo (1 – 2 mL min⁻¹). As respostas avaliadas foram: a capacidade de retenção do primeiro pico, as resoluções do segundo e terceiro pico e a capacidade de retenção do quinto pico

cromatográfico. As respostas foram avaliadas utilizando a otimização simultânea de várias respostas (Função de Desejabilidade) na qual, as melhores condições experimentais obtidas foram fase móvel constituída de acetonitrila: metanol: 20 mM KHPO₄ (pH 3,0 \pm 0,2) (34,27: 20: 45,73, v/ v/ v) e taxa de fluxo de 2 mL min⁻¹. O método foi validado e aplicado em amostras comerciais dos fármacos e mostrou-se adequado para as análises de rotina podendo ser aplicado em análises de controle de qualidade.

Sakac e colaboradores (2013) otimizaram um método cromatográfico para análise de atorvastatina (nas formas ácida e lactona), *orto* e *p*-hydroxi-atorvastatina por meio do planejamento de experimentos. Os autores utilizaram o planejamento de experimentos tanto para as etapas de triagem (a fim de identificar os fatores que apresentavam efeitos significativos para as respostas cromatográficas), quanto para obter a melhor condição experimental para as respostas avaliadas. Realizaram um planejamento fatorial completo 2³ e, a melhor condição experimental foi alcançada utilizando a Função de Desejabilidade, a qual permite a otimização simultânea de várias respostas. O intervalo das variáveis utilizadas para a otimização foram: porcentagem de acetonitrila na fase móvel (60 – 70 %), temperatura da coluna (30 – 40 °C) e taxa de fluxo (0,8 – 1,2 mL min⁻¹). As respostas avaliadas foram: tempo de retenção do primeiro pico (*p* – hidroxí – atorvastatina) e do último pico cromatográfico (atorvastatina), fator de encaudamento de todos os quatro picos cromatográficos e a capacidade de retenção. O método foi validado e aplicado com êxito para a determinação de atorvastatina (nas formas ácidas e lactona) e dos seus respectivos metabólitos no plasma.

Dash e colaboradores (2015) desenvolveram e otimizaram um método cromatográfico para a determinação de ezetimiba no qual utilizaram um planejamento Box-Behnken para a otimização dos parâmetros experimentais. As respostas avaliadas foram o tempo de retenção, fator de encaudamento e o número de pratos teóricos. A porcentagem de acetonitrila na fase móvel foi a variável que apresentou maior significância sobre o tempo de retenção e o fator de encaudamento enquanto que, as interações entre a porcentagem de acetonitrila e o pH do tampão da fase móvel tiveram maior significância sobre o número de pratos teóricos. As respostas foram analisadas a partir da otimização simultânea de várias respostas (Função de Desejabilidade), na qual as melhores condições experimentais alcançadas foram temperatura de 35 \pm 2 ° C, fase móvel constituída de acetonitrila: tampão dihidrogenofosfato de potássio (pH 3,5; 20 mM) (45: 55, v/ v), taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 μ L. O método cromatográfico otimizado foi aplicado com êxito para quantificar ezetimiba em uma nova formulação nano emulsificante.

Dastkhooon e colaboradores (2016) desenvolveram um método para a síntese e aplicação de um adsorvente inovador para a pré-concentração e extração de atorvastatina em diferentes matrizes biológicas, uma vez que a concentração do fármaco nessas matrizes é muito baixo. Os autores utilizaram a metodologia de superfície de respostas para avaliar a influência de várias variáveis incluindo a dosagem do adsorvente, volume do eluente e o tempo de sonicação, a fim de verificar quais as melhores condições experimentais para as respostas avaliadas. Após a otimização das condições experimentais, a faixa de linearidade obtida para o método foi de 0,3 – 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ com um ótimo coeficiente de determinação de 0,999. Os limites de detecção e de quantificação em amostras de plasma foram de 0,0608 e 0,2033 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Ahmad e colaboradores (2016) desenvolveram e validaram um método cromatográfico em fase reversa com detecção UV em 238 nm para a determinação de pravastatina nas formas pura e em formulações farmacêuticas. A separação cromatográfica foi alcançada com coluna C – 18 Symmetry[®] (150 mm x 3,9 mm, 5 μm), eluição isocrática, fase móvel constituída de metanol: tampão fosfato (70: 30, v/ v, pH 4) e taxa de fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Os autores utilizaram um planejamento Box – Behnken para avaliar a robustez do método, no qual avaliaram a influência que a porcentagem de metanol na composição da fase móvel, a taxa de fluxo e o pH da fase móvel exerciam na área do pico cromatográfico e no tempo de retenção. Os resultados indicaram que uma pequena alteração na composição da fase móvel e na taxa de fluxo apresentaram diferenças significativas nas respostas avaliadas enquanto que, uma pequena variação do pH não exerceu influência nas respostas. O método desenvolvido foi aplicado em formulações farmacêuticas e mostrou-se rápido, sensível, robusto e adequado para determinação de pravastatina em análises de rotina podendo ser aplicado em análises de controle de qualidade.

Dentre os trabalhos reportados na literatura que utilizam planejamentos experimentais para otimização das condições cromatográficas, existem poucos relatos que envolvem a determinação simultânea de estatinas e fibratos. Nesse sentido é evidente a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas que envolvam a determinação simultânea desses fármacos e que utilizem ferramentas quimiométricas para a otimização dos parâmetros cromatográficos para que resultados ainda melhores sejam alcançados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação simultânea de ciprofibrato e sinvastatina em formulações farmacêuticas, urina sintética e águas superficiais, empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção UV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Otimizar os parâmetros experimentais da separação cromatográfica através de planejamentos experimentais;
- II. Validar a metodologia analítica desenvolvida através de parâmetros de validação como seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão;
- III. Avaliar as etapas do processo de preparação de amostras quando necessário;
- IV. Determinar a concentração de ciprofibrato e sinvastatina em amostras comerciais de medicamentos empregando o método cromatográfico otimizado;
- V. Associar as amostras comerciais dos fármacos e analisa-los simultaneamente fazendo o uso do método de CLAE - UV otimizado;
- VI. Determinar a concentração de ciprofibrato e sinvastatina em amostras de urina sintética e águas superficiais por CLAE - UV aplicando a metodologia proposta;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Substâncias Químicas de Referência e Amostras

As substâncias químicas de referência bem como as amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina que foram utilizadas são apresentadas nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Substâncias químicas de referência e amostras comerciais de ciprofibrato

CIPROFIBRATO				
Amostra	Lote	Validade	Peso médio dos comprimidos (mg)	Fornecedor
Padrão	16C21-B038-003903	24/09/2018	-	Pharmanostra
Padrão	QH20171215CPF	15/12/2020	-	Galena Química e Farmacêutica Ltda
Ciprofibrato 100 mg	L1710211	10/2019	204,00	Geolab
Ciprofibrato 100 mg	770074	07/2020	202,00	Medley
Ciprofibrato 100 mg	B17H1660	08/2019	183,20	Neo Química

Tabela 7 - Substâncias químicas de referência e amostras comerciais de sinvastatina

SINVASTATINA				
Amostra	Lote	Validade	Peso médio dos comprimidos (mg)	Fornecedor
Padrão	1609004911	20/06/2018	-	Galena Química e Farmacêutica Ltda
Padrão	17H10-B002-023722	23/04/2019	-	Infinity Pharma [®]
Sinvastacor [®]				Sandoz do Brasil
10 mg	HD8598	03/2019	144,10	Indústria Farmacêutica Ltda
Sinvastatina				
20 mg	L240236	04/2019	206,20	Pharlab S/A
Sinvastatina				
40 mg	OI1431	02/2020	424,40	EMS S/A

4.1.2 Materiais e Reagentes

- Água ultrapura Milli-Q
- Acetonitrila grau HPLC, Merck
- Metanol grau HPLC, Merck
- Balão volumétrico de 10, 25 e 50 mL, classe A
- Vials para HPLC (1,5 mL)
- Filtros de seringa, membrana - PTFE hidrofílica (25 mm x 0,45 µm), Analítica
- Filtros de seringa, membrana - PES hidrofílica (25 mm x 0,22 µm), Kasvi, modelo K18-230
- Creatina monohidratada, Embrafarma
- Lauril Sulfato de Sódio, P.A, Dinâmica
- Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O), Biotec
- Cloreto de sódio (NaCl), Vetec
- Sulfato de sódio (Na₂SO₄), Vetec
- Dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), Riedel-de Haën do Brasil

- Cloreto de amônio (NH_4Cl), Chemco
- Cloreto de potássio (KCl), Ecibra
- Ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), Vetec

4.1.3 Equipamentos

- Balança analítica Metter Toledo modelo XP26
- Ultrassom magnético
- Micropipetas 100 – 1000 μL
- Almofariz e pistilo
- Coluna Shimadzu C-18 Shim-pack VP-ODS (150 mm x 4,6 mm)
- Coluna Shimadzu C-18 Shim-pack VP-ODS (250 mm x 4,6 mm)
- HPLC Shimadzu equipado com unidades de bombeamento de solventes LC-20AT, auto-injetor SIL-20A HT, forno de colunas CTO-20A, detector de rede de fotodiodos SPD-M20A e controlador do sistema CBM-20A e software LCsolution
- Espectrômetro UV-Vis NIR, modelo Cary Varian 50

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação das Soluções

4.2.1.1 *Solução estoque de Ciprofibrato*

Pesou-se exatamente 100 mg de ciprofibrato e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolveu-se em metanol grau HPLC. Filtrou-se a solução em membrana de PTFE hidrofílica 0,45 μm . Obteve-se uma solução com concentração final de 1 mg mL^{-1} .

4.2.1.2 *Solução estoque de Sinvastatina*

Pesou-se exatamente 100 mg de sinvastatina e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Dissolveu-se em metanol grau HPLC. Filtrou-se a solução em membrana de PTFE hidrofílica 0,45 μm . Obteve-se uma solução com concentração final de 1 mg mL⁻¹.

4.2.1.3 *Fase móvel*

Transferiu-se com o auxílio de uma proveta 500 mL de acetonitrila grau HPLC, 300 mL de metanol grau HPLC e 200 mL de água ultrapura Milli-Q para um frasco de 1 L. A solução resultante foi submetida a sonicacão em banho de ultrassom (frequência de 37 kHz) por 30 minutos para degaseificação, ou seja, para evitar a formação de bolhas durante a separação cromatográfica o que pode interferir no desempenho da análise.

4.2.1.4 *Solução de trabalho*

As soluções de trabalho tanto de sinvastatina quanto de ciprofibrato foram preparadas a partir das soluções estoque, diluindo-as com a própria fase móvel utilizada para a separação cromatográfica.

4.2.1.5 *Soluções de amostras comerciais de Sinvastatina e Ciprofibrato*

Vinte comprimidos de um mesmo lote de cada amostra comercial analisada foram pesados em balança analítica. Determinou-se o valor da massa média dos comprimidos com variação menor que 5% (ANVISA, 2003). Os comprimidos foram subsequentemente pulverizados em gral de ágata até obtenção de um pó fino.

Pesou-se exatamente a massa referente a 10, 20 e 40 mg de sinvastatina, as quais foram dissolvidas em metanol grau HPLC e transferidas para balões volumétricos de 25, 25 e 50 mL, respectivamente. As soluções resultantes foram sonicadas em banho de ultrassom (frequência de 37 kHz) por 30 minutos para a completa solubilização. A concentração final de cada uma das soluções é apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração final das amostras comerciais de sinvastatina

SINVASTATINA		
Amostra	Balão Volumétrico	Concentração Final
Sandoz [®] (10 mg)	25 mL	0,4 mg mL ⁻¹
Pharlab (20 mg)	25 mL	0,8 mg mL ⁻¹
EMS (40 mg)	50 mL	0,8 mg mL ⁻¹

Após as diluições as soluções foram filtradas em membrana PTFE hidrofílica 0,45 µm.

As amostras comerciais de ciprofibrato foram preparadas de maneira semelhante, pesou-se exatamente a massa referente a 100 mg de cada uma das amostras, as quais foram dissolvidas em metanol grau HPLC e transferidas para balões volumétricos de 100 mL. As soluções resultantes foram sonicadas em banho de ultrassom (frequência de 37 kHz) por 30 minutos para a completa solubilização. Após as diluições, as soluções foram filtradas em membrana PTFE hidrofílica 0,45 µm.

As amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina foram associadas para verificar a eficiência do método na determinação simultânea dos fármacos. Para isso, pesou-se exatamente a massa referente a 100 mg de ciprofibrato e 40 mg de sinvastatina, a qual foi dissolvida em metanol grau HPLC e transferida para um balão volumétrico de 50 mL. A solução resultante foi sonicada em banho de ultrassom (frequência de 37 kHz) por 30 minutos para a completa solubilização. Obteve-se uma solução com concentração final de 2 mg mL⁻¹ para o ciprofibrato e 0,8 mg mL⁻¹ para a sinvastatina. Após as diluições, obteve-se uma solução com concentração final de 3 µg mL⁻¹ para o ciprofibrato e 1,2 µg mL⁻¹ para a sinvastatina, a qual foi filtrada em membrana PTFE hidrofílica 0,45 µm.

4.2.2 Estudo das Condições Cromatográficas

Para o desenvolvimento do método analítico proposto, algumas condições cromatográficas foram testadas para verificar quais eram as mais promissoras, para então otimiza-las utilizando ferramentas quimiométricas de planejamento de experimentos. As condições cromatográficas testadas são apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições cromatográficas utilizadas para os testes realizados

Teste 1	
CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	(SULTANA; ARAYNE e NAVEED, 2011)
Coluna	C - 18 (150 x 4,6 mm)
Fase Móvel (v/v)	ACN: H ₂ O (60: 40)
Taxa de Fluxo (mL min ⁻¹)	0,8
Volume de injeção (µL)	20
Temperatura (° C)	40
Teste 2*	
CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	
Coluna	C - 18 (150 x 4,6 mm)
Fase Móvel (v/v)	ACN: H ₂ O (70: 30)
Taxa de Fluxo (mL min ⁻¹)	0,8
Volume de injeção (µL)	10
Temperatura (° C)	40
Teste 3	
CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	(PHANEEMDRA e NAGAMALLESWARI, 2015)
Coluna	C - 18 (150 x 4,6 mm)
Fase Móvel (v/v)	ACN: MeOH: H ₂ O (50:30:20)
Taxa de Fluxo (mL min ⁻¹)	0,8
Volume de injeção (µL)	10
Temperatura (° C)	40
Teste 4*	
CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	
Coluna	C - 18 (250 x 4,6 mm)
Fase Móvel (v/v)	ACN: MeOH: H ₂ O (50:30:20)
Taxa de Fluxo (mL min ⁻¹)	0,8
Volume de injeção (µL)	10
Temperatura (° C)	40

*Condições cromatográficas adaptadas

4.2.3 Otimização das Condições Cromatográficas

Para o desenvolvimento da metodologia proposta, optou-se pela utilização de planejamentos experimentais para otimizar as condições cromatográficas para a separação dos fármacos.

No presente trabalho, optou-se por utilizar um sistema de planejamento fatorial completo 2² com a adição de ponto central, a partir do qual avaliou-se simultaneamente o

efeito que o fluxo e a temperatura exercem na separação cromatográfica. A Tabela 10 apresenta as variáveis analisadas e os níveis escolhidos para cada uma delas. Como respostas foram medidos os parâmetros: área, intensidade (I), resolução (R), capacidade de retenção (k'), separação (α) e fator de encaudamento ($T.F$).

Estas respostas foram avaliadas para assegurar a precisão e a exatidão do método em quantificar adequadamente os fármacos, uma vez que, o fator de encaudamento ($T.F$) e a capacidade de retenção (k) permitem ajustar a simetria e o alargamento do pico cromatográfico. Dessa forma, contribuem para a maior confiabilidade na quantificação, assim como a área que permite ajustar a sensibilidade do método, pois, quanto maior seu valor melhor a resolução dos picos e maior a precisão na quantificação. Portanto, é importante verificar esses parâmetros para que a quantificação dos fármacos seja fidedigna.

Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com os respectivos níveis experimentais avaliados para o ciprofibrato e sinvastatina

	Níveis	Variáveis	
		Fluxo (mL min^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
	-1	0,6	35
Nº Experimento	0	0,8	40
	1	1,0	45
1		-1	-1
2		1	-1
3		-1	1
4		1	1
5		0	0
6		0	0
7		0	0

Como podemos verificar na matriz do planejamento fatorial completo (Tabela 10) foram realizados ensaios em triplicata no ponto central (nível 0 do planejamento fatorial) para estimar o erro e a falta de ajuste do modelo avaliado.

Os ensaios experimentais foram realizados aleatoriamente e os resultados obtidos foram tratados no software Statistica[®]. Inicialmente cada uma das respostas foi avaliada individualmente através da análise de variância (ANOVA) para avaliar os efeitos principais e os efeitos de interação dos parâmetros analisados e a influência que estes exerciam nas

respostas avaliadas. Os resultados normalizados do planejamento experimental foram avaliados a 5 % de significância e analisadas por meio do gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados.

Os resultados obtidos foram, então, tratados no software Statistica[®] por meio de um método de otimização simultânea de várias respostas baseadas na Função de Desejabilidade, a fim de obter-se uma condição experimental adequada para todas as respostas avaliadas.

Com base nas informações obtidas no Planejamento Fatorial 2² pode-se dar prosseguimento com a otimização das condições cromatográficas utilizando um Planejamento Composto Central ou Estrela, com intuito de obter a superfície de resposta, a qual fornece modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema em estudo e como consequência poder-se explorar o sistema até a sua otimização. Os experimentos foram realizados estabelecendo-se valores para pontos extremos (pontos axiais) os quais são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores de α para as variáveis e dos níveis utilizados para o planejamento estrela

Fator	- α	-1	0	1	α
Fluxo (mL min ⁻¹)	0,5	0,6	0,8	1,0	1,1
Temperatura (° C)	33	35	40	45	47

Os valores de α para ambas as variáveis foram calculados com base na Equação nº 5:

$$\pm\alpha = \frac{Z_i - x_0}{\frac{x_{+1} - x_{-1}}{2}} \quad (5)$$

onde Z_i é o valor do ponto que deseja-se encontrar, x_0 é o valor do ponto central, x_{+1} é o valor no nível alto e x_{-1} no nível baixo, lembrando que o valor codificado de α é igual a $\pm\sqrt{2}$.

A matriz para o planejamento composto central ou estrela são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Matriz do planejamento composto central ou estrela

Nº Experimento	Variáveis	
	Fluxo (mL min ⁻¹)	Temperatura (° C)
1	0,6	35
2	1,0	35
3	0,6	35
4	0,6	45
5	0,8	40
6	0,8	40
7	0,8	40
8	0,5	40
9	1,1	40
10	0,8	33
11	0,8	47

Os resultados obtidos foram tratados no software Statistica[®] por meio de um método de otimização simultânea de várias respostas, baseados na Função de Desejabilidade a fim de obter-se a superfície de resposta e, dessa forma, otimizar as condições experimentais.

4.2.4 Análise das Amostras Comerciais

Para a análise das amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina, preparou-se as soluções conforme descrito no item 4.2.1.5 e, a partir das condições cromatográficas otimizadas, realizou-se a separação cromatográfica dos fármacos. A partir da curva analítica pode-se determinar a concentração de ciprofibrato e sinvastatina presentes nas amostras.

4.2.5 Método Comparativo

Para poder-se emitir um parecer final a respeito das amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina que foram analisadas por meio do método desenvolvido, realizou-se a análise das amostras a partir de métodos já validados descritos na literatura (NASCIMENTO et al., 2011; ZEPON et al., 2013) a fim de determinar-se com confiabilidade

os resultados a respeito da qualidade das amostras avaliadas. E, para isso, realizou-se a análise estatística dos dados utilizando-se o teste F e o teste t-pareado, já que estes permitem verificar as diferenças nos resultados de cada método analítico sem a interferência da variabilidade amostral.

4.2.5.1 *Ciprofibrato*

Utilizou-se o método descrito por Nascimento e colaboradores (2011) os quais desenvolveram um método utilizando a espectroscopia UV para a determinação de ciprofibrato em comprimidos.

A curva analítica variou de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ e, as amostras comerciais foram preparadas a partir da determinação do peso médio de 20 comprimidos de um mesmo lote de cada amostra comercial. Os comprimidos foram pulverizados até obtenção de um pó finamente dividido e então pesou-se a massa referente a 100 mg de ciprofibrato e transferiu-a para um balão volumétrico de 100 mL. Solubilizou-se com metanol e filtrou-se a solução com membrana PTFE hidrofílica $0,45 \mu\text{m}$. Em seguida, transferiu-se 1,0 mL para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução com concentração final de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e realizou-se a leitura em 233 nm.

4.2.5.2 *Sinvastatina*

Utilizou-se o método descrito por Zepon e colaboradores (2013), os quais desenvolveram um método utilizando a espectroscopia UV para a determinação de sinvastatina em comprimidos.

A curva analítica variou de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que as diluições foram realizadas utilizando-se uma solução de lauril sulfato de sódio 0,5 % e, as amostras comerciais foram preparadas a partir da determinação do peso médio de 10 comprimidos de cada uma das amostras. Em seguida, os comprimidos foram pulverizados em gral de ágata até obtenção de um pó fino, a partir do qual pesou-se a massa média referente a 10, 20 e 40 mg de sinvastatina, as quais foram transferidas para balões volumétricos de 50, 100 e 200 mL, respectivamente, solubilizadas em metanol, e sonicadas em banho de ultrassom (frequência de 37 kHz) por 15 minutos para a completa solubilização. Em seguida filtrou-se a solução em membrana PTFE hidrofílica $0,45 \mu\text{m}$ e transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL para um balão de

100 mL e completou-se o volume com uma solução tampão fosfato contendo lauril sulfato de sódio 0,5 %, obtendo-se uma solução com concentração final de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Realizou-se a leitura das amostras em 239 nm.

4.2.6 Validação do Método Analítico

4.2.6.1 *Especificidade e Seletividade*

A especificidade do método foi avaliada a partir da análise dos cromatogramas dos fármacos obtidos quando analisados isoladamente, a fim de verificar a capacidade do método em detectar cada um dos fármacos. Já a seletividade foi avaliada a partir da obtenção dos cromatogramas dos fármacos analisados simultaneamente a fim de investigar a presença de interferentes entre os picos cromatográficos dos fármacos.

A especificidade de detecção de cada um dos fármacos pode ser assegurada por meio da determinação do tempo de retenção e pelo espectro de absorção UV característico para cada composto.

4.2.6.2 *Linearidade*

A linearidade do método foi determinada por meio da obtenção de curvas analíticas para cada um dos fármacos em oito níveis de concentração. As soluções foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque de modo que a concentração final variou de $0,5 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a construção da curva analítica traçou-se o gráfico dos valores da área em função das concentrações de sinvastatina e ciprofibrato. Os ensaios foram realizados de acordo com as condições cromatográficas otimizadas a partir do planejamento experimental.

As curvas analíticas foram obtidas realizando-se ensaios em replicatas ($n = 3$) no mesmo dia e em quatro dias diferentes e aplicando-se o teste de Huber (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003) para que possíveis dados anômalos fossem desprezados conferindo uma maior confiabilidade ao conjunto de dados obtidos.

A linearidade foi avaliada realizando-se a análise de regressão linear para o conjunto de dados obtidos após a exclusão dos valores considerados anômalos, os quais foram identificados pelo teste de Huber (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003).

4.2.6.3 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram determinados por meio das Equações nº 6 e nº 7 conforme recomendados pela ANVISA (ANVISA, 2017):

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (6)$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (7)$$

onde σ é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e IC é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica obtidos a partir de três curvas analíticas.

4.2.6.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da determinação da repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída).

A repetibilidade do método foi avaliada realizando-se determinações contemplando o intervalo linear do método, ou seja, concentrações baixa, média e alta com três replicatas em cada nível de concentração, realizadas no mesmo dia, pelo mesmo analista, de acordo com a Tabela 13.

Calculou-se o desvio padrão relativo (Equação 8) a fim de verificar as variações dentre as replicatas e poder-se assegurar a repetibilidade do método. O valor de DPR aceito pela agência regulatória (ANVISA, 2017), deve ser inferior a 5,0 %.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (8)$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

A precisão intermediária foi avaliada de maneira semelhante, entretanto, em dias diferentes por diferentes analistas.

Realizou-se a análise de variância (ANOVA) de dois fatores para verificar a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes por diferentes analistas e, dessa forma, avaliar a interferência de dias e de analistas na precisão do método.

Tabela 13 - Níveis de concentração avaliados na determinação da repetibilidade do método

	Concentração baixa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração alta ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ciprofibrato	0,5	1,0	10,0
Sinvastatina	0,5	1,0	10,0

4.2.6.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da adição de padrão, onde adicionou-se à uma alíquota das amostras comerciais dos fármacos contendo o equivalente a $0,80 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos, volumes variados do padrão de ciprofibrato e sinvastatina de modo a obter 3 concentrações diferentes como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14 - Soluções utilizadas para a avaliação da exatidão do método

Concentração Padrão CPF e SIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Amostra Comercial CPF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração Amostra Comercial SIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0,50	0,80	0,80
1,00	0,80	0,80
10,0	0,80	0,80

A partir da equação da reta obtida no ensaio de linearidade, pode-se verificar a exatidão do método a partir do cálculo do percentual das amostras recuperadas nas soluções (Equação 9).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (9)$$

4.2.6.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada a partir da otimização das condições cromatográficas realizadas por meio do planejamento de experimentos conforme descrito no item 4.2.3.

4.2.7 Aplicação do Método na Determinação dos Fármacos em Diferentes Matrizes

4.2.7.1 *Urina Sintética*

A fim de avaliar a determinação de ciprofibrato e sinvastatina em fluidos biológicos e, portanto, a capacidade do método desenvolvido em analisar os fármacos em diferentes matrizes, preparou-se uma amostra de urina sintética conforme descrito por LAUBE e colaboradores (2001) a qual é apresentada na Tabela 15.

Tabela 15 - Composição da urina sintética

Composição Urina Sintética (LAUBE; MOHR e HESSE, 2001)	
Substância	Concentração (g L ⁻¹)
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,103
NaCl	2,925
Na ₂ SO ₄	2,250
KH ₂ PO ₄	1,400
KCl	1,600
NH ₄ Cl	1,000
Ureia	25,00
Creatina	1,100
pH	6,00*

*(Ajustado com NaOH/HCl)

Preparou-se a solução de urina sintética utilizando-se água ultrapura Milli-Q para solubilizá-la. A solução foi sonicada em banho de ultrassom (frequência 37 kHz) por 30 minutos para total solubilização e então filtrou-se a solução em membrana de PES hidrofílica 0,22 µm.

As amostras foram preparadas adicionando-se 500 µL de uma solução de 10 µg mL⁻¹ das amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina em um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a solução de urina sintética, obtendo-se uma solução com concentração final de 0,5 µg mL⁻¹. As análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.7.2 *Águas Superficiais*

As amostras de água superficial foram coletadas no arroio de Olarias localizado na porção centro-sudeste do espaço urbano da cidade de Ponta Grossa, PR.

As amostras foram filtradas em membranas de acetato celulose e então sonicadas em banho de ultrassom (frequência 37 kHz) por 30 minutos para a degaseificação. Em seguida foram filtradas em uma membrana de PES hidrofílico 0,22 μm .

As amostras foram preparadas adicionando-se 500 μL de uma solução de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina em um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a água superficial, obtendo-se uma solução com concentração final de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em triplicatas e verificou-se o percentual de recuperação das soluções.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia proposta envolve a separação cromatográfica simultânea de ciprofibrato e sinvastatina utilizando a técnica de CLAE com detecção UV.

Primeiramente determinou-se o comprimento de onda de detecção UV para o método a partir da avaliação da absorbância máxima do ciprofibrato e sinvastatina. Para isso, preparou-se soluções dos fármacos na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol (MeOH) grau HPLC. Realizou-se a leitura na faixa de comprimento de onda de 200 – 400 nm e comparou-se com os máximos de absorção descritos na literatura. Os espectros obtidos são apresentados nas Figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 - Espectro de absorção na região do UV para a solução padrão de ciprofibrato ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)

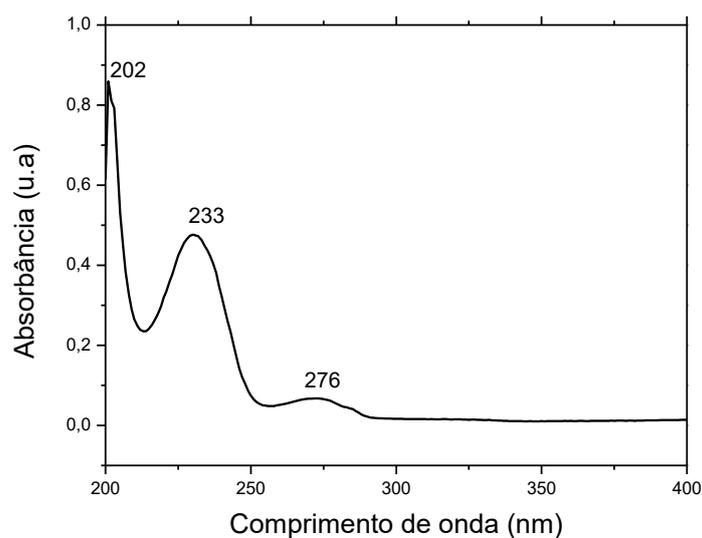
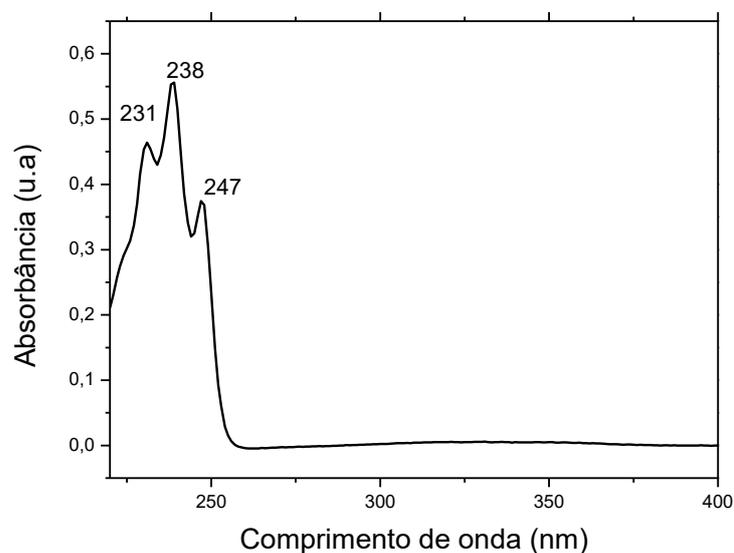
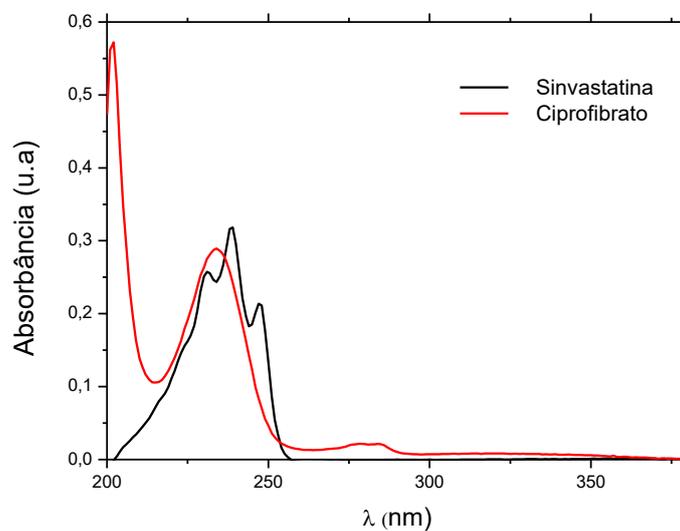


Figura 8 - Espectro de absorção na região do UV para a solução padrão de sinvastatina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)**Figura 9** - Sobreposição dos espectros de absorção UV de ciprofibrato e sinvastatina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Os espectros obtidos para os fármacos são condizentes com os espectros encontrados na literatura com máximos de absorção em 202 nm, 233 nm e 276 nm, para o ciprofibrato e 231 nm, 238 nm e 247 nm para a sinvastatina (NASCIMENTO et al., 2011, POLONINI et al., 2011).

Realizou-se alguns testes a partir dos quais, pode-se verificar que o melhor comprimento de onda para o método analítico foi 238 nm.

5.1 ESTUDOS PRELIMINARES

Realizou-se alguns testes preliminares para estabelecer-se as condições cromatográficas mais promissoras para serem então otimizadas por meio de planejamento de experimentos.

5.1.1 Teste 1

As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas do método desenvolvido por Sultana e colaboradores (2011). As condições utilizadas foram coluna C – 18 (150 mm x 4,6 mm), fase móvel constituída de ACN: H₂O (60: 40), taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹, temperatura de 40 °C, detecção UV em 238 nm e volume de injeção de 20 µL. Nessas condições cromatográficas, o tempo de retenção da sinvastatina foi superior a 30 minutos, o que não é interessante para uma separação cromatográfica, uma vez que tempos elevados de análise levam a maiores gastos com solventes e maior geração de resíduos. Além disso, houve um deslocamento da linha base. Neste caso, para diminuir o tempo de retenção da sinvastatina, optou-se por aumentar a força eluotrópica do sistema e, dessa forma, aumentar a afinidade da molécula pela fase móvel. Para isso, diminuiu-se a proporção de água na fase móvel para que a eluição ocorresse em um tempo inferior.

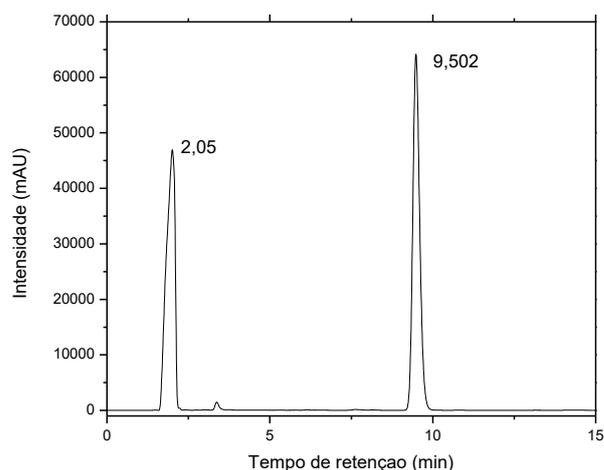
5.1.2 Teste 2

As condições cromatográficas utilizadas foram semelhantes às utilizadas no teste anterior, entretanto, aumentou-se a força eluotrópica do sistema em uma tentativa de diminuir o tempo de retenção da sinvastatina. Utilizou-se coluna C – 18 (150 mm x 4,6 mm), fase móvel constituída de ACN: H₂O (70: 30), taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹, temperatura de 40 °C, detecção UV em 238 nm e volume de injeção de 10 µL. Nessas condições cromatográficas, o tempo de retenção da sinvastatina ficou próximo de 22 minutos, menor quando comparado com o teste anterior. Entretanto, ainda pode ser considerado um tempo de análise longo para uma separação cromatográfica. Optou-se então por modificar novamente a composição da fase móvel do sistema.

5.1.3 Teste 3

As condições cromatográficas utilizadas foram adaptadas do método desenvolvido por Phaneendra e Nagamalleswari (2015). As condições utilizadas foram coluna C – 18 (150 mm x 4,6 mm), fase móvel constituída de ACN: MeOH: H₂O (50:30:20), taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹, temperatura de 40 ° C, detecção UV em 238 nm e volume de injeção de 10 µL. Nessas condições cromatográficas, o tempo de retenção do ciprofibrato foi de 2,05 min e da sinvastatina de 9,502 min, como apresentado na Figura 10.

Figura 10 - Cromatograma do ciprofibrato (t_r 2,05 min, fator de cauda 0,715) e da sinvastatina (t_r 9,502 min, fator de cauda 1,169), 10 µg mL⁻¹ em ACN: MeOH: H₂O



Nessas condições cromatográficas, o tempo de análise para a separação dos fármacos foi menor quando comparado com os testes anteriores, portanto, essas condições foram mais promissoras que as anteriormente testadas.

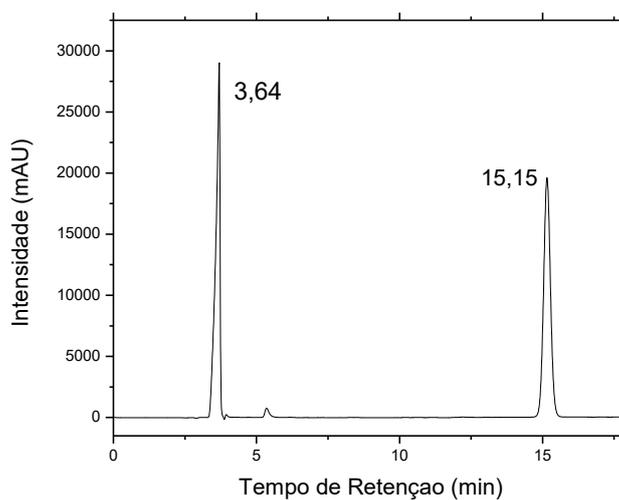
Alguns autores e o FDA (Food and Drug Administration) recomendam para que a precisão na quantificação não fique comprometida, que os valores para o fator de cauda, T_f (os quais indicam a simetria do pico), estejam compreendidos no intervalo entre $0,5 < T_f < 2,0$ (DONG, 2006; LANÇAS, 2004; U.S FOOD, 1994), assim como a capacidade de retenção, k (que mede o grau de retenção do analito na coluna), varie entre 1 a 20 para que os analitos presentes na amostra tenham tempo suficiente de interagir com a fase estacionária, resultando em migração diferencial. (DONG, 2006). Neste caso, na condição cromatográfica analisada, obteve-se um fator de cauda de 0,715 e 1,169 para o ciprofibrato e sinvastatina,

respectivamente, bem como a capacidade de retenção foi de 3,729. Portanto, tanto o fator de cauda quanto a capacidade de retenção compreendem os intervalos recomendados.

5.1.4 Teste 4

Para verificar a influência da coluna na separação cromatográfica, realizou-se a análise com as mesmas condições cromatográficas do teste anterior e mudou-se apenas a coluna cromatográfica. Neste caso, utilizou-se uma coluna C – 18 (250 mm x 4,6 mm) e pode-se notar que o tempo de retenção tanto para o ciprofibrato quanto para a sinvastatina aumentaram quando comparados com os obtidos utilizando-se uma coluna C – 18 (150 mm x 4,6 mm), como pode ser verificado na Figura 11. Assim sendo, as condições cromatográficas mais promissoras foram aquelas analisadas no Teste 3.

Figura 11 - Cromatograma do ciprofibrato (t_r 3,64 min) e da sinvastatina (t_r 15,15 min), $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN: MeOH: H₂O, coluna C-18 (250 mm x 4,6 mm)



Depois de estabelecidas as condições cromatográficas mais promissoras para a separação cromatográfica entre os fármacos, pode-se então otimizá-las por meio do planejamento de experimentos.

5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento da metodologia proposta, optou-se pela utilização de planejamentos experimentais para otimizar as condições cromatográficas para a separação dos fármacos.

5.2.1 Planejamento Fatorial

A Tabela 16 apresenta a matriz do planejamento fatorial 2^2 completo com as variáveis analisadas e os níveis escolhidos para cada uma delas.

Tabela 16 - Matriz do planejamento fatorial 2^2 com os respectivos níveis experimentais avaliados para o ciprofibrato e sinvastatina

Nº Experimento	Variáveis		
	Níveis	Fluxo (mL min ⁻¹)	Temperatura (° C)
	-1	0,6	35
	0	0,8	40
	1	1,0	45
1		-1	-1
2		1	-1
3		-1	1
4		1	1
5		0	0
6		0	0
7		0	0

Os resultados experimentais obtidos são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Resultados experimentais obtidos para o ciprofibrato e sinvastatina

Nº Experimento	t _r		Área (u.a)		I (mAU)		T.F		Resolução	k'	Separação
	CPF	SIM	CPF	SIM	CPF	SIM	CPF	SIM			
1	2,103	13,31	200689	234588	23913	10742	0,747	1,276	19,55	5,330	4,643
2	1,288	8,173	122047	141729	22135	9935	0,779	1,292	18,39	5,344	4,815
3	2,131	11,31	200521	236338	23504	12752	0,721	1,286	17,47	4,310	4,067
4	1,150	6,298	111191	129746	23046	11580	0,815	1,324	15,99	4,477	4,064
5	1,568	9,364	151445	177758	21486	11249	0,734	1,293	17,97	4,973	4,371
6	1,574	9,363	151825	177368	23068	11233	0,759	1,295	18,00	4,949	4,364
7	1,570	9,357	151647	177654	23314	11283	0,759	1,298	17,99	4,960	4,362

* CPF – ciprofibrato; SIM – sinvastatina; t_r – tempo de retenção; I – intensidade; T.F – fator de encaudamento; k' - capacidade de retenção

Inicialmente cada uma destas respostas foi avaliada individualmente através da análise de variância (ANOVA) para avaliar os efeitos principais e os efeitos de interação dos parâmetros analisados e a influência que estes exerciam nas respostas avaliadas. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 18.

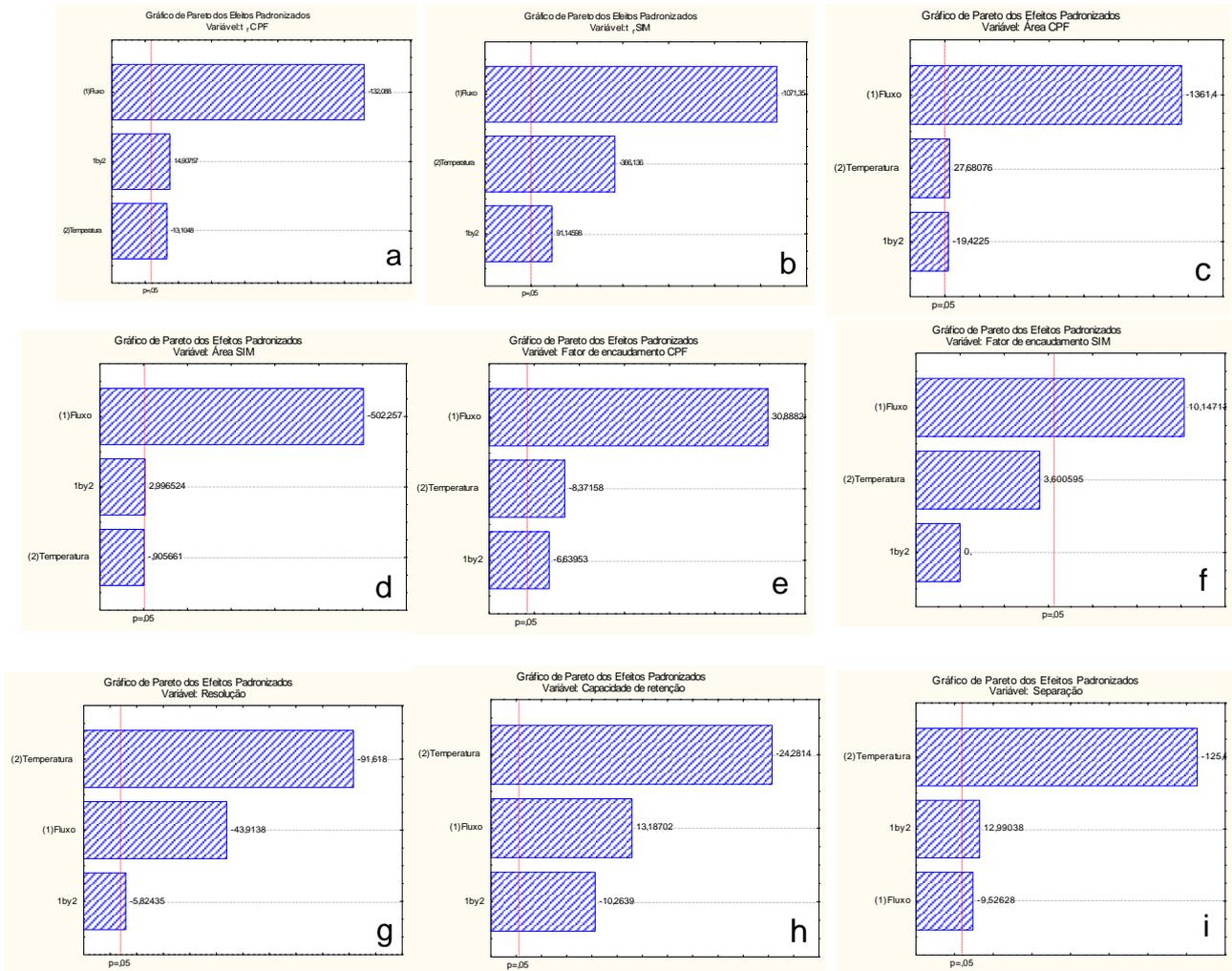
Tabela 18 - Análise de variância (ANOVA) para as respostas analisadas individualmente

	R	SQ	MQ	F	p
t_r CPF					
Fluxo (1)		9,10 x 10 ⁻¹	9,10 x 10 ⁻¹	1,74 x 10 ⁴	5,70 x 10 ⁻⁵
Temperatura (2)	0,919	8,90 x 10 ⁻³	8,90 x 10 ⁻³	171,74	5,70 x 10 ⁻³
1 x 2		1,10 x 10 ⁻²	1,10 x 10 ⁻²	222,24	4,50 x 10 ⁻³
t_r SIM					
Fluxo (1)		23,34	23,34	1,14 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁻⁶
Temperatura (2)	0,957	2,73	2,73	1,34 x 10 ⁵	7,00 x 10 ⁻⁶
1 x 2		1,69 x 10 ⁻¹	1,69 x 10 ⁻¹	8,3 x 10 ³	1,2 x 10 ⁻⁴
Área (u.a) CPF					
Fluxo (1)		2,06 x 10 ¹⁰	2,06 x 10 ¹⁰	1,85 x 10 ⁶	1,00 x 10 ⁻⁶
Temperatura (2)	0,950	8,52 x 10 ⁶	8,52 x 10 ⁶	766,00	1,30 x 10 ⁻³
1 x 2		4,19 x 10 ⁶	4,19 x 10 ⁶	377,00	2,64 x 10 ⁻³
Área (u.a) SIM					
Fluxo (1)		3,10 x 10 ¹⁰	3,10 x 10 ¹⁰	2,50 x 10 ⁵	4,00 x 10 ⁻⁶
Temperatura (2)	0,949	1,00 x 10 ⁵	1,00 x 10 ⁵	0,80	4,61 x 10 ⁻¹
1 x 2		1,10 x 10 ⁶	1,10 x 10 ⁶	9,00	9,50 x 10 ⁻²
T.F (CPF)					
Fluxo (1)		2,86 x 10 ⁻³	2,86 x 10 ⁻³	9,50 x 10 ²	1,05 x 10 ⁻³
Temperatura (2)	0,981	2,10 x 10 ⁻⁴	2,10 x 10 ⁻⁴	70,10	1,39 x 10 ⁻²
1 x 2		1,30 x 10 ⁻⁴	1,30 x 10 ⁻⁴	44,10	2,19 x 10 ⁻²
T.F (SIM)					
Fluxo (1)		9,60 x 10 ⁻⁴	9,60 x 10 ⁻⁴	1,02 x 10 ²	9,57 x 10 ⁻³
Temperatura (2)	0,645	1,21 x 10 ⁻⁴	1,21 x 10 ⁻⁴	12,96	6,90 x 10 ⁻²
1 x 2		0	0	0	1,00
Resolução					
Fluxo (1)		2,20 x 10 ⁻¹	2,20 x 10 ⁻¹	1,93 x 10 ³	5,18 x 10 ⁻⁴
Temperatura (2)	0,991	9,80 x 10 ⁻¹	9,80 x 10 ⁻¹	8,39 x 10 ³	1,19 x 10 ⁻⁴
1 x 2		3,90 x 10 ⁻³	3,90 x 10 ⁻³	33,90	2,82 x 10 ⁻²
k'					
Fluxo (1)		1,57 x 10 ⁻¹	1,57 x 10 ⁻¹	1,73 x 10 ²	5,70 x 10 ⁻³
Temperatura (2)	0,925	5,34 x 10 ⁻¹	5,34 x 10 ⁻¹	5,89 x 10 ²	1,69 x 10 ⁻³
1 x 2		9,50 x 10 ⁻²	9,50 x 10 ⁻²	10,50 x 10 ²	9,36 x 10 ⁻³
Separação					
Fluxo (1)		3,00 x 10 ⁻⁵	3,00 x 10 ⁻⁵	90,70	1,08 x 10 ⁻²
Temperatura (2)	0,991	5,26 x 10 ⁻³	5,26 x 10 ⁻³	1,50 x 10 ⁴	6,30 x 10 ⁻⁵
1 x 2		5,60 x 10 ⁻⁵	5,60 x 10 ⁻⁵	1,68 x 10 ²	5,87 x 10 ⁻³

*CPF- ciprofibrato; SIM- sinvastatina; T.F – fator de encaudamento; k' - capacidade de retenção; R – coeficiente de correlação; SQ – soma quadrática; MQ – média quadrática; F – teste F; p – p-value

Os efeitos normalizados do planejamento experimental foram analisados a 5 % de significância e avaliados por meio dos gráficos de Pareto dos efeitos padronizados, os quais são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Gráfico de Pareto dos Efeitos Padronizados para as respostas avaliadas (a) tempo de retenção do ciprofibrato; (b) tempo de retenção da sinvastatina; (c) área do pico cromatográfico do ciprofibrato; (d) área do pico cromatográfico da sinvastatina; (e) fator de encaudamento do ciprofibrato; (f) fator de encaudamento da sinvastatina; (g) resolução; (h) capacidade de retenção; (i) separação



Fonte: Statistica®

A linha vertical no gráfico de Pareto significa que os efeitos são estatisticamente significativos, ou seja, $p < 0,05$, logo, as barras que ultrapassam essa linha correspondem aos efeitos que são estatisticamente significativos com um nível de confiança de 95 %.

Analisando-se os gráficos de Pareto dos efeitos padronizados, podemos verificar que, para o tempo de retenção (gráficos “a” e “b”), ambas as variáveis foram estatisticamente significativas tanto para o ciprofibrato quanto para a sinvastatina, ou seja, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e

$p < 0,05$, sendo a taxa de fluxo a variável mais influente e, quando ajustadas no nível mais baixo ($0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e $35 \text{ }^\circ\text{C}$), maior o tempo de retenção para ambos os fármacos.

Quando analisamos a área do pico cromatográfico (gráficos “c” e “d”), podemos verificar que para o ciprofibrato, ambas as variáveis foram estatisticamente significativas, ou seja, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e $p < 0,05$ enquanto que, para a sinvastatina, apenas a taxa de fluxo foi estatisticamente significativa. Para ambos os fármacos a taxa de fluxo foi a variável mais influente e, quando ajustada no nível mais baixo ($0,6 \text{ mL min}^{-1}$), maior a área do pico cromatográfico obtido.

Quando analisamos o fator de encaudamento (gráficos “e” e “f”), para a sinvastatina, apenas o fluxo foi estatisticamente significativo, ou seja, para a temperatura $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ e $p > 0,05$, portanto, apenas a taxa de fluxo influencia esta resposta, enquanto que, para o ciprofibrato, ambas as variáveis foram estatisticamente significativas e, quando ajustadas no nível mais alto ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$) maior o valor deste fator. Entretanto, deve-se tomar cuidado em trabalhar com um fluxo muito alto, pois, além de diminuir a vida útil da coluna cromatográfica, aumentar o consumo de solventes e conseqüentemente aumentar o volume de resíduos, recomenda-se que o fator de encaudamento $T.F \leq 2$ (U.S FOOD, 1994).

Para a resolução (gráfico “g”), capacidade de retenção (gráfico “h”) e separação entre os picos cromatográficos (gráfico “i”), ambas as variáveis foram estatisticamente significativas, ou seja, $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ e $p < 0,05$, sendo a temperatura a variável que apresentou a maior influência. Quando as variáveis estão ajustadas no nível baixo ($0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e $35 \text{ }^\circ\text{C}$) obtêm-se maiores resoluções, maior capacidade de retenção e maior a separação entre os picos cromatográficos do ciprofibrato e da sinvastatina.

Quando se analisa os resultados obtidos por meio da análise de variância (ANOVA) e dos gráficos de Pareto para os efeitos padronizados para cada uma das respostas individuais, pode-se verificar que nem todas indicam as mesmas condições experimentais como sendo as melhores condições. Então, para que exista um equilíbrio entre as condições experimentais para os fatores analisados, utiliza-se uma função global para otimizá-las, de modo que seja possível obter indicações a respeito da melhor região experimental.

Derringer e Suich (1980), descreveram um método para a otimização simultânea de várias respostas, baseado na construção de uma função de desejabilidade para cada resposta individual (função de desejabilidade parcial), estabelecendo ao final uma função de desejabilidade global. Cada resposta tem associado um valor de desejabilidade parcial que varia de acordo com a proximidade da resposta desejada (LEWIS; MATHIEU e PHAN-TAN-LUU, 1999; BARROS NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2007; BREITKREITZ, 2007;

ZECEVIC et al., 2008). Assim como cada resposta pode ser calculada dentro da região experimental utilizando-se o modelo e os coeficientes calculados, também a desejabilidade correspondente pode ser calculada dentro daquela região por meio de equações adequadas a cada caso. Então os valores individuais de desejabilidade são combinados criando uma função de desejabilidade global, empregando-se a média geométrica, e foca-se então em maximizar este valor (LEWIS; MATHIEU e PHAN-TAN-LUU, 1999; BREITKREITZ, 2007).

5.2.1.1 Função de Desejabilidade

Os dados de desejabilidade para cada resposta individual avaliada (função de desejabilidade parcial), assim como a função de desejabilidade global são apresentadas na Tabela 19.

Tabela 19 - Dados da função de desejabilidade parcial e global

Fator	Nível	t _r C	Área		T.F		Área		T.F		R	k'	Sep	D
			(C)	I (C)	(C)	t _r S	(S)	I (S)	(S)					
A	-1	2,039	197617	23482	0,73	12,1	232031	11748	1,28	18,6	4,8	4,3	0,493	
A	-0,5	1,826	176620	23203	0,74	10,8	207100	11500	1,28	18,4	4,9	4,4	0,522	
A	0	1,613	155622	22923	0,76	9,59	182168	11253	1,29	17,9	4,9	4,4	0,481	
A	0,5	1,400	134625	22644	0,77	8,32	157237	11006	1,30	17,6	4,9	4,4	0,392	
A	1	1,187	113628	22364	0,79	7,05	132306	10758	1,31	17,2	4,9	4,4	0,194	
B	-1	1,618	158377	22798	0,76	10,5	184727	10339	1,28	19,0	5,4	4,7	0,478	
B	-0,5	1,616	157000	22860	0,76	10,1	183447	10796	1,29	18,5	5,1	4,5	0,497	
B	0	1,613	155622	22923	0,76	9,59	182168	11253	1,29	17,9	4,9	4,4	0,481	
B	0,5	1,611	154245	22986	0,76	9,11	180889	11710	1,30	17,3	4,7	4,2	0,432	
B	1	1,608	152868	23049	0,76	8,62	179610	12167	1,30	16,8	4,4	4,0	0,000	

*A – Taxa de fluxo; B – Temperatura; C – ciprofibrato; S – sinvastatina; I – intensidade; T.F – fator de cauda; R – resolução; k' – capacidade de retenção; Sep – separação; D – função desejabilidade global

A melhor condição experimental é aquela em que a desejabilidade global coincide para ambos os fatores. Neste caso, a melhor região experimental é no nível 0 do planejamento fatorial, ou seja, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e temperatura de 40 ° C (valores destacados em negrito na Tabela 19).

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) para as respostas avaliadas para verificar se a falta de ajuste foi ou não estatisticamente significativa.

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) para verificar a falta de ajuste do modelo linear

Falta de ajuste					
Parâmetro	R	SQ	MQ	F	p-value
Área CPF	0,950	$5,19 \times 10^8$	$5,19 \times 10^8$	$4,67 \times 10^4$	$2,10 \times 10^{-5}$
Área SIM	0,949	$7,95 \times 10^8$	$7,95 \times 10^8$	$6,47 \times 10^3$	$1,54 \times 10^{-4}$
t _r CPF	0,919	$3,89 \times 10^{-2}$	$3,89 \times 10^{-2}$	$7,49 \times 10^2$	$1,33 \times 10^{-3}$
t _r SIM	0,957	$5,73 \times 10^{-1}$	$5,73 \times 10^{-1}$	$2,81 \times 10^4$	$3,50 \times 10^{-5}$
T.F CPF	0,981	$2,40 \times 10^{-5}$	$2,40 \times 10^{-5}$	8,03	0,105
T.F SIM	0,645	$5,76 \times 10^{-4}$	$5,76 \times 10^{-4}$	61,73	$1,58 \times 10^{-2}$
Resolução	0,991	$5,28 \times 10^{-3}$	$5,28 \times 10^{-3}$	45,13	$2,14 \times 10^{-2}$
k'	0,925	$2,88 \times 10^{-2}$	$2,88 \times 10^{-2}$	31,88	$2,99 \times 10^{-2}$
Separação	0,995	$1,11 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-5}$	34,32	$2,79 \times 10^{-2}$

* CPF – ciprofibrato; SIM – sinvastatina; t_r – tempo de retenção; T.F – fator de encaudamento; k' – capacidade de retenção; R – coeficiente de correlação; SQ – soma quadrática; MQ – média quadrática; F – teste F; p –value – nível de confiança 95 %

Analisando-se as informações obtidas por meio da análise de variância (ANOVA) (dados apresentados na Tabela 20), podemos verificar que a falta de ajuste foi estatisticamente significativa, ou seja, $p < 0,05$ para todas as respostas avaliadas com exceção da resposta fator de encaudamento do ciprofibrato, onde $p > 0,05$. Portanto, o modelo linear avaliado não é capaz de explicar satisfatoriamente os resultados obtidos experimentalmente. A próxima etapa consiste então em construir um modelo de ordem superior, no caso um modelo de segunda ordem.

5.2.2 Planejamento Composto Central ou Estrela

Com base nos resultados obtidos por meio do planejamento fatorial 2^2 com ponto central, pode-se dar prosseguimento ao processo de otimização utilizando um planejamento composto central ou estrela.

A matriz do planejamento composto central juntamente com as respostas obtidas para os ensaios realizados são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados obtidos para o planejamento composto central

Nº Experimento	Variáveis		t _r	t _r	Área	Área (u.a)	I (mAU)	I (mAU)	T.F	T.F	Resol.	k'	Sep.
	A	B	CPF	SIM	(u.a) CPF	SIM	CPF	SIM	CPF	SIM			
1	0,6	35	2,103	13,31	200689	234588	23913	10742	0,747	1,276	19,55	5,330	1,276
2	1,0	35	1,288	8,173	122047	141729	22135	9935	0,779	1,292	18,39	5,344	1,292
3	0,6	35	2,131	11,31	200521	236338	23504	12752	0,721	1,286	17,47	4,310	1,286
4	0,6	45	1,150	6,298	111191	129746	23046	11580	0,815	1,324	15,99	4,477	1,324
5	0,8	40	1,568	9,364	151445	177758	21486	11249	0,734	1,293	17,97	4,973	1,293
6	0,8	40	1,574	9,363	151825	177368	23068	11233	0,759	1,295	18,00	4,949	1,295
7	0,8	40	1,570	9,357	151647	177654	23314	11283	0,759	1,298	17,99	4,960	1,298
8	0,5	40	2,493	14,65	240057	282126	22202	12016	0,701	1,237	18,82	4,880	1,237
9	1,1	40	1,149	6,889	111228	129652	22623	10678	0,806	1,304	17,17	4,995	1,304
10	0,8	33	1,706	10,52	160236	175983	19539	9850	0,740	1,295	19,34	5,170	1,295
11	0,8	47	1,572	8,336	151649	178430	23533	12650	0,751	1,319	16,47	4,305	1,319

*A- fluxo (mL min⁻¹); **B – temperatura (° C); t_r – tempo de retenção; CPF – ciprofibrato; SIM – sinvastatina; I – intensidade; T.F – fator de encaudamento; Resol.- Resolução; k' – capacidade de retenção; Sep. - separação

Analisando-se os resultados obtidos por meio da análise de variância (ANOVA), para cada uma das respostas individuais, pode-se verificar que assim como no planejamento anterior, nem todas elas indicam as mesmas condições experimentais como sendo as melhores condições. Então, para que exista um equilíbrio entre as condições experimentais para os fatores analisados, utiliza-se a função de desejabilidade para otimizá-las, a fim de obter-se a superfície de resposta a qual fornece modelos matemáticos empíricos que conseguem explicar satisfatoriamente os resultados obtidos experimentalmente.

5.2.2.1 Função de Desejabilidade

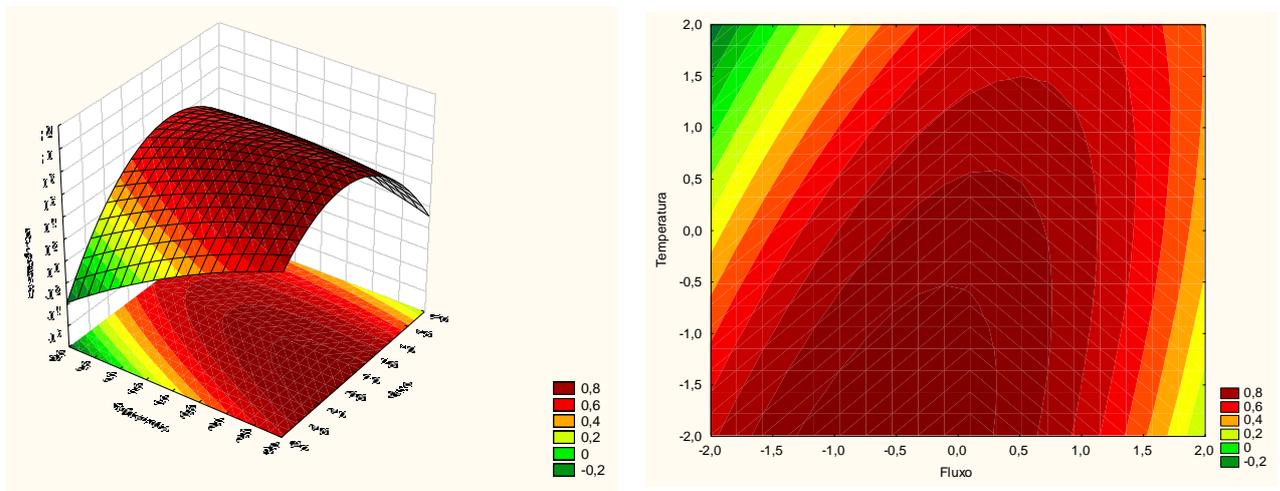
Assim como no planejamento anteriormente realizado, cada uma das respostas foi avaliada individualmente (desejabilidade parcial) e estabelecendo ao final uma função de desejabilidade global. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22 - Dados da função de desejabilidade parcial e global

Fator	Nível	Área (C)	T.F (C)	Área (S)	T.F (S)	R	k'	Sep	D
A	-1,41	233814,9	0,713	276136,5	1,247	18,82	4,89	4,27	0,725
A	-0,705	187656,0	0,729	220562,8	1,276	18,42	4,92	4,32	0,818
A	0	151667,8	0,750	177617,3	1,295	17,99	4,96	4,36	0,807
A	0,705	125850,4	0,777	147299,9	1,302	17,54	4,98	4,38	0,735
A	1,41	110203,7	0,809	129610,7	1,299	17,07	5,01	4,39	0,648
B	-1,41	156397,4	0,748	175390,1	1,296	19,36	5,30	5,03	0,817
B	-0,705	153872,2	0,749	177360,2	1,292	18,71	5,18	4,66	0,811
B	0	151667,8	0,75	177617,3	1,295	17,99	4,96	4,36	0,807
B	0,705	149784,2	0,753	176161,2	1,305	17,20	4,63	4,13	0,805
B	1,41	148221,2	0,758	172992,1	1,323	16,34	4,20	3,97	0,804

*A- Fluxo (mL min⁻¹); B – temperatura (° C); C – ciprofibrato; S – sinvastatina; T.F – fator de cauda; R – resolução; k' – capacidade de retenção; Sep – separação; D – função desejabilidade global

Figura 13 - Superfície de Resposta



Fonte: Statistica[®]

A melhor região experimental é aquela em que a desejabilidade global coincide para ambos os fatores. Neste caso, a melhor condição experimental é no nível 0 do planejamento composto central, ou seja, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e temperatura de 40 ° C (valores em negrito na Tabela 22). Nessa região, o modelo fornece as respostas esperadas para cada um dos parâmetros em análise, as quais são apresentadas na Tabela 23. Realizou-se então as análises em triplicata nessas condições experimentais com objetivo de validar o planejamento realizado e os resultados coletados são apresentados e comparados com os valores previstos para o modelo.

Tabela 23 - Resultados experimentais obtidos com a realização da condição otimizada em relação aos valores previstos pelo modelo matemático obtido

	Experimento				Valor Previsto
	1	2	3	Média	
Área (CPF)	152261	152176	152699	152378	151667
Área (SIM)	177574	177704	177812	177696	177617
Resolução	18,039	18,065	18,043	18,049	17,993
k'	4,926	4,914	4,944	4,928	4,960
Fator de encaudamento (CPF)	0,777	0,779	0,786	0,781	0,750
Fator de encaudamento (SIM)	1,307	1,314	1,311	1,310	1,295
Separação	4,369	4,365	4,364	4,366	4,365

Como podemos verificar, comparando-se os dados previstos com os valores obtidos experimentalmente, os valores estão bem próximos, portanto, o modelo matemático é válido e consegue explicar satisfatoriamente os resultados obtidos experimentalmente. Dessa forma as condições cromatográficas encontram-se otimizadas.

Quando comparamos as condições cromatográficas que foram otimizadas com as descritas na literatura (Tabela 3), podemos verificar que a utilização de modelos estatísticos contribui para obtenção de melhores condições experimentais para a separação cromatográfica entre os fármacos, uma vez que a grande maioria dos métodos existentes utiliza como fase móvel ácido ou sistemas tamponados, além de trabalhar com fluxo muito alto o que ajuda a diminuir a vida útil da coluna cromatográfica, aumentar o consumo de solventes e conseqüentemente aumentar o volume de resíduos. Nesse sentido, pode-se notar a importância que modelos estatísticos desempenham para que as melhores condições cromatográficas sejam obtidas levando às melhores respostas, além de necessitar de um número reduzido de ensaios experimentais, o que garante a mínima utilização de reagentes, gerando o mínimo de resíduos possíveis, o que nos dias atuais é de extrema importância não somente pela escassez de recursos financeiros destinados à pesquisa como também devido às questões ambientais.

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.3.1 Especificidade e Seletividade

Para verificar a especificidade do método, analisou-se isoladamente cada fármaco para obter-se seu respectivo cromatograma a fim de verificar seu tempo de retenção característico nas condições cromatográficas analisadas, como também a presença de possíveis interferentes na sua determinação. Os cromatogramas dos fármacos são apresentados nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Cromatograma do ciprofibrato ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em ACN: MeOH: H₂O (50: 30: 20)

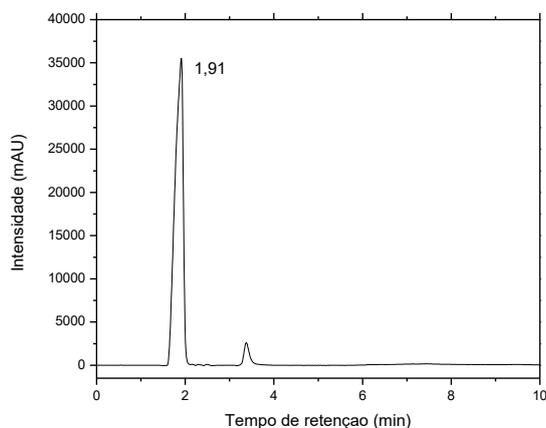
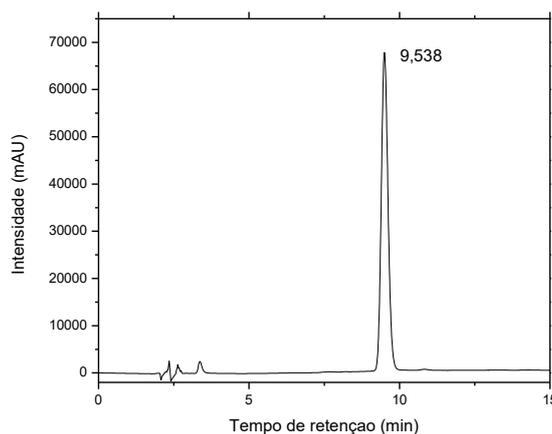


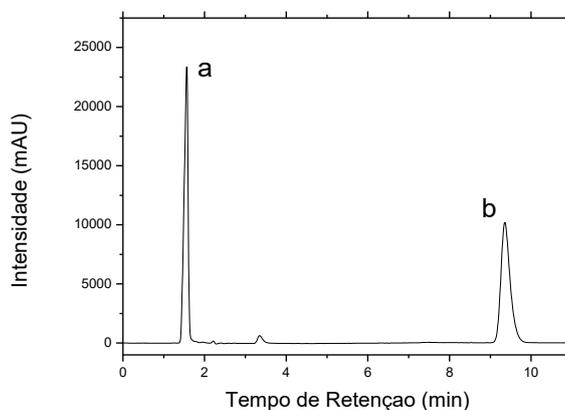
Figura 15 - Cromatograma da sinvastatina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) em ACN: MeOH: H₂O (50: 30: 20)



Analisando-se os cromatogramas, pode-se verificar que não houve a presença de interferentes na determinação de cada um dos fármacos, portanto, foi possível comprovar a capacidade do método em detectar cada analito independente, ou seja, o método pode ser considerado específico para a determinação de cada um dos fármacos.

Para verificar a seletividade do método, ou seja, a capacidade em determinar simultaneamente diferentes analitos, realizou-se a análise simultânea dos fármacos obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Cromatograma do ciprofibrato (a) e sinvastatina (b) analisados simultaneamente, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em ACN: MeOH: H₂O (50:30: 20)



Analisando-se o cromatograma, pode-se verificar que não existiu a presença de interferentes na amostra eluindo no mesmo tempo de retenção característico dos fármacos. Portanto, o método possibilitou a separação cromatográfica simultânea dos fármacos sem interferência entre as amostras, ou seja, o método pode ser considerado seletivo para os fármacos analisados.

Pode-se concluir que o método apresentou adequada especificidade e seletividade viabilizando análises para detecção de cada analito independentemente ou quando analisados simultaneamente sem a presença de interferentes entre as amostras.

5.3.2 Linearidade

5.3.2.1 Curva analítica Ciprofibrato

A curva analítica foi obtida pela construção de gráficos plotando-se a área do pico cromatográfico em função da concentração do fármaco. Uma relação linear foi observada na faixa de concentração de $0,5 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os dados obtidos estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Valores de área obtidos na análise cromatográfica de diferentes concentrações de ciprofibrato obtidos em diferentes dias

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Área média (u.a)	DPR (%)
0,50	17591,0	16454,0	16351,0	16373,0	15744,0	16502,60	4,10
0,60	21513,0	20891,0	20027,0	20398,0	19259,0	20417,60	4,20
0,70	24514,0	24016,0	24267,0	22721,0	23781,0	23859,80	2,90
0,80	28010,0	27352,0	31011,0	26742,0	31591,0	28941,20	7,60
1,00	39267,0	30327,0	36091,0	32601,0	35653,0	34787,80	9,90
3,00	93307,0	95963,0	98490,0	99643,0	98877,0	972560,00	2,70
5,00	153736,0	158080,0	168190,0	168490,0	165937,0	162886,60	4,10
10,00	313855,0	335123,0	328646,0	333571,0	342156,0	330670,20	3,20

Como podemos verificar nos dados acima apresentados, em algumas concentrações analisadas, os valores experimentais apresentaram muitas oscilações, o que pode ser evidenciado pelo desvio padrão entre as medidas, ou seja, indícios da presença de valores anômalos, os quais não representam o conjunto de dados analisados e acabam dificultando a obtenção de uma equação que os represente com confiabilidade. Existem critérios seguros que avaliam a presença de valores anômalos entre as medidas, os quais são baseados na Curva de Linearidade (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003).

Para que se possa rejeitar dados anômalos com base nos princípios da curva de linearidade, utiliza-se o procedimento denominado de Teste de Huber (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003). Para aplica-lo é necessário estabelecer um valor central e intervalos de confiança acima e abaixo deste, de modo que fique definida uma região onde os dados são aceitáveis, ou seja, os que pertencem ao intervalo de confiança, uma vez que este representa a faixa de variação esperada para os ensaios experimentais. Para isso, é necessário um critério para estabelecer o valor central de forma que ele não dependa dos dados anômalos. Neste sentido, recomenda-se o uso da mediana dos dados, uma vez que este valor não é afetado pelos dados anômalos (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003).

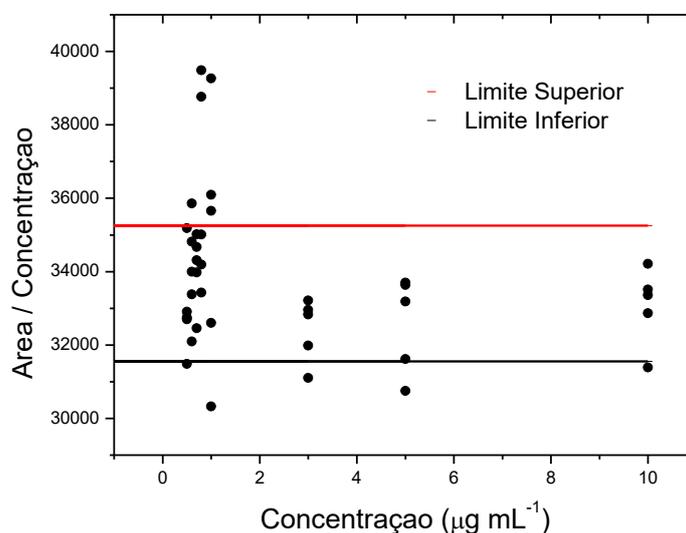
A Tabela 25 apresenta os dados obtidos aplicando-se o Teste de Huber (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003) para o conjunto de respostas das curvas analíticas apresentadas na Tabela 24.

Tabela 25 - Dados obtidos a partir do Teste de Huber

Mediana	33402,9
Mediana Absoluta	925,0
k	2
Limite Superior	35252,9
Limite Inferior	31552,9

O valor de k varia de 2 a 8 e a sua escolha em um primeiro momento depende do analista (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003). Entretanto, após rejeitar os anômalos, obter os dados e construir o gráfico da área versus a concentração, calcula-se o valor dos resíduos para analisar e verificar se os dados obtidos são ou não confiáveis e determinar se a escolha do k foi ou não adequada.

O Gráfico 1 apresenta os valores anômalos que foram rejeitados, ou seja, os valores que não encontram-se dentro do intervalo de confiança.

Gráfico 1 - Valores anômalos rejeitados a partir do Teste de Huber para o ciprofibrato

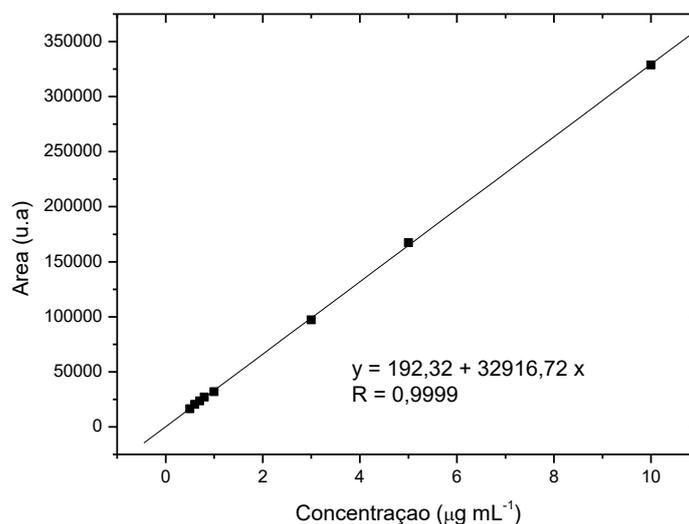
Como podemos verificar no Gráfico 1, os valores anômalos rejeitados são aqueles que não encontram-se entre o intervalo de confiança (limites superior e inferior). Com os dados incluídos dentro do intervalo de confiança pode-se construir a curva analítica colocando em gráfico os valores da área obtidos versus a concentração de ciprofibrato. A faixa de

concentração avaliada foi de 0,5 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Tabela 26 apresenta os dados da área utilizados para a construção da curva analítica.

Tabela 26 - Curva analítica do ciprofibrato

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área média (u.a)	DPR (%)
0,5	16502,60	4,10
0,6	20143,80	3,40
0,7	23859,80	2,90
0,8	27368,00	2,30
1,0	32601,00	0,00
3,0	98243,30	1,60
5,0	165174,30	2,90
10,0	334874,00	1,70

Gráfico 2 - Curva analítica para o ciprofibrato



Como pode-se observar no Gráfico 2, se considerarmos toda a faixa de concentração avaliada, a relação linear foi satisfatória, dado que o coeficiente de correlação linear, r , para a curva analítica do ciprofibrato apresentou um valor de r de 0,9999. O valor encontrado para o coeficiente de correlação linear foi muito próximo de 1,0, valor recomendado pela ANVISA

(ANVISA, 2017) para que seja menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Realizou-se a análise de regressão linear para o conjunto de dados e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 - Análise de regressão linear para o ciprofibrato

	SQ	gl	MQ	F	F de significação
Regressão	$8,14 \times 10^{10}$	1	$8,14 \times 10^{10}$	$4,88 \times 10^4$	$3,59 \times 10^{-11}$
Resíduos	$8,32 \times 10^6$	5	$1,66 \times 10^6$		
Total	$8,14 \times 10^{10}$	6			

*SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste F; Nível de confiança 95 %

Analisando-se os resultados obtidos pode-se verificar a existência de uma relação linear entre as variáveis X e Y (concentração do analito e área do pico cromatográfico), uma vez que $F_{\text{significação}} < 0,05$. Portanto, o método pode ser considerado linear na faixa avaliada.

Para verificar se a escolha do coeficiente k foi adequada, calculou-se os resíduos e os valores obtidos são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Valores de áreas interpolados (A_{int}) e resíduos

A_{int}	r_s (%)
16338,40	-1,01
19679,60	-2,36
23020,90	-3,64
26362,10	-3,82
33044,60	+1,34
99869,60	+1,63
166694,32	+0,91
333756,90	-0,33

Os resíduos apresentados na Tabela 28 sugerem que o erro máximo a ser cometido em interpolações com a equação obtida para a curva analítica estaria em torno de 3,8 %. Pode-se verificar, ainda, que os sinais dos resíduos estão equilibrados e, o coeficiente de correlação

obtido $r = 0,9999$ indica uma baixa dispersão no conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Portanto, pode-se concluir que o coeficiente de k utilizado está adequado para a rejeição dos valores anômalos.

5.3.2.2 Curva analítica Sinvastatina

A curva analítica foi obtida pela construção de gráficos plotando-se a área do pico cromatográfico em função da concentração do fármaco. Uma relação linear foi observada na faixa de concentração de $0,5 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os dados coletados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Valores de área obtidos na análise cromatográfica de diferentes concentrações de sinvastatina obtidos em diferentes dias

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Área média (u.a)	DPR (%)
0,5	19761	18694	21139	18611	16856	19012	8,30
0,6	24217	24396	27742	22247	21894	24099	9,70
0,7	28035	27840	32912	26166	26910	28373	9,30
0,8	32296	31272	42372	31824	32043	33961	13,90
1,0	43946	34565	48309	37852	35500	40034	14,70
3,0	101485	105480	114034	115988	102515	107900	6,20
5,0	166969	161286	195517	198406	170958	178627	9,60
10,0	370970	341241	383577	387810	329644	362648	7,10

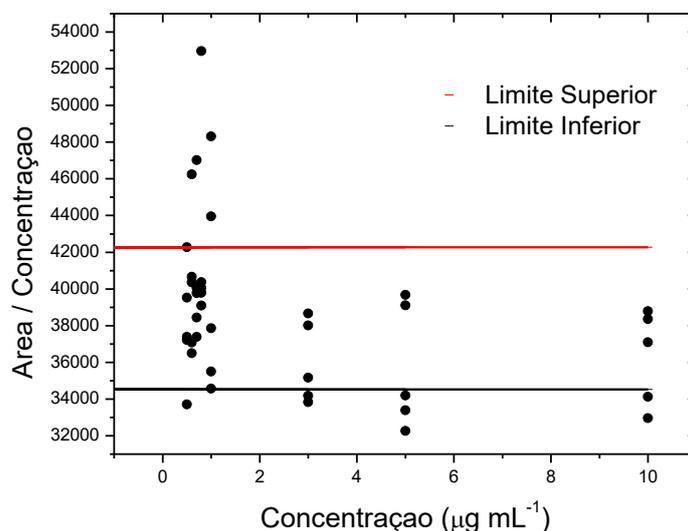
Assim como observou-se para as medidas realizadas para o ciprofibrato, para a sinvastatina pode-se verificar que os valores experimentais apresentaram oscilações ainda maiores, o que pode ser evidenciado pelo desvio padrão entre as medidas ser ainda mais expressivo quando comparado com os obtidos para o ciprofibrato. Dessa forma, a fim de verificar a presença de valores anômalos realizou-se o Teste de Huber para avaliar a presença destes entre as medidas e as respostas obtidas para o conjunto de dados da sinvastatina aplicando-se o teste são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Dados obtidos a partir do Teste de Huber

Mediana	38400,28
Mediana Absoluta	1936,83
k	2
Limite Superior	42272,95
Limite Inferior	34529,61

Como mencionado anteriormente, o valor de k varia de 2 a 8 e a sua escolha em um primeiro momento depende do analista (AUGUSTO; RIEDO e VALENTE, 2003). Entretanto, após rejeitar os anômalos, obter os dados e construir o gráfico da área versus a concentração, calcula-se o valor dos resíduos para analisar e verificar se os dados obtidos são ou não confiáveis e determinar se a escolha do k foi ou não adequada.

O Gráfico 3 apresenta os valores anômalos que foram rejeitados, ou seja, os valores que não encontram-se dentro do intervalo de confiança.

Gráfico 3 - Valores anômalos rejeitados a partir do Teste de Huber para a sinvastatina

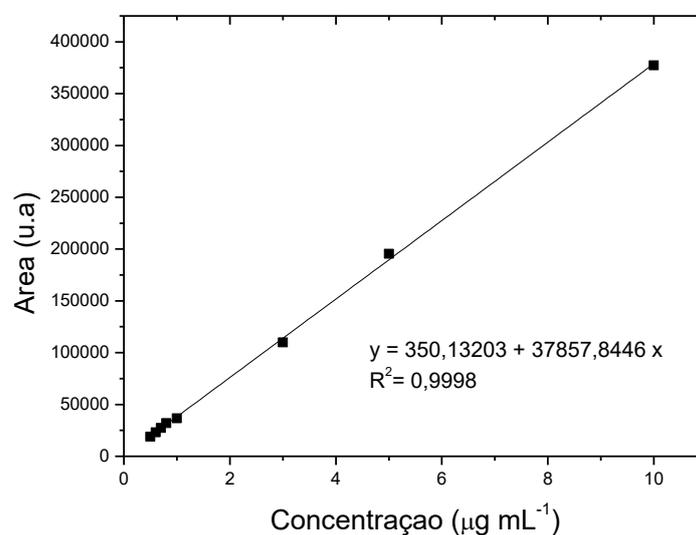
Como podemos verificar no Gráfico 3, os valores anômalos rejeitados são aqueles que estão fora do intervalo de confiança (limites superior e inferior). Com os dados incluídos dentro do intervalo de confiança pode-se construir a curva analítica colocando em gráfico os valores da área obtidos versus a concentração de sinvastatina. A faixa de concentração

avaliada foi de 0,5 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A Tabela 31 apresenta os dados da área utilizados para a construção da curva analítica.

Tabela 31 - Curva analítica para a sinvastatina

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (u.a)	DPR (%)
0,5	19022,00	3,37
0,6	23188,50	5,61
0,7	27237,75	3,18
0,8	31858,75	1,36
1,0	36676,00	4,53
3,0	109757,00	5,51
5,0	195517,00	0,00
10,0	377273,50	2,36

Gráfico 4 - Curva analítica para a sinvastatina



Como pode-se observar no Gráfico 4, se considerarmos toda a faixa de concentração avaliada, a relação linear foi satisfatória, r de 0,9998, valor superior ao recomendado pela ANVISA (ANVISA, 2003).

Realizou-se a análise de regressão linear para o conjunto de dados e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 - Análise de regressão linear para a sinvastatina

	SQ	gl	MQ	F	F de significação
Regressão	$1,04 \times 10^{11}$	1	$1,04 \times 10^{11}$	$8,90 \times 10^3$	$2,53 \times 10^{-9}$
Resíduos	$5,86 \times 10^7$	5	$1,17 \times 10^7$		
Total	$1,04 \times 10^{11}$	6			

*SQ = soma quadrática; gl = graus de liberdade; MQ = média quadrática; F = teste F;

Analisando-se os resultados obtidos pode-se verificar a existência de uma relação linear entre as variáveis X e Y (concentração do analito e área do pico cromatográfico), uma vez que $F_{\text{significação}} < 0,05$. Portanto, o método pode ser considerado linear na faixa avaliada.

Para verificar se a escolha do coeficiente k foi adequada, calculou-se os resíduos e os valores obtidos são apresentados na Tabela 33.

Tabela 33 - Valores da área interpolados (A_{int}) e resíduos

A_{int}	r_s (%)
20254,677	+0,71
24034,616	-1,06
27814,554	-1,89
31594,492	-4,39
39154,369	+3,72
114753,14	+3,59
190351,9	-3,13
379348,82	+0,44

Os resíduos apresentados na Tabela 33 sugerem que o erro máximo a ser cometido em interpolações com a equação obtida para a curva analítica estaria em torno de 4,40 %. Pode-se verificar, ainda, que os sinais dos resíduos estão equilibrados e, o coeficiente de correlação obtido $r = 0,9998$ indica uma baixa dispersão no conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Pode-se concluir que, o coeficiente k utilizado está adequado para a rejeição dos valores anômalos.

Pode-se concluir que para os fármacos avaliados o método proposto é linear na faixa analisada.

5.3.3 Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Os valores dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram obtidos de acordo com as Equações 6 e 7 e são apresentados na Tabela 34.

Tabela 34 - Limites de detecção e quantificação encontrados para os fármacos

Fármaco	Limite de Detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Ciprofibrato	0,054	0,164
Sinvastatina	0,018	0,056

Os valores obtidos para o LD e LQ tanto para o ciprofibrato quanto para a sinvastatina podem ser considerados satisfatórios para a sua determinação em diferentes matrizes, desde formulações farmacêuticas até amostras de fluidos biológicos, além de que, os valores encontrados são comparáveis aos obtidos em trabalhos descritos na literatura que fazem o uso de métodos cromatográficos como apresentado na Tabela 35.

Tabela 35 - Valores de LD e LQ obtidos para a determinação de ciprofibrato e sinvastatina por diferentes trabalhos descritos na literatura

LD	LQ	Fármaco	Aplicação	Referência
-	$0,17 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sinvastatina	Formulações Farmacêuticas	ASHFAQ et al. (2007)
$0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,06 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sinvastatina	Formulações Farmacêuticas	ASHFAQ et al. (2008)
$0,57 \mu\text{g mL}^{-1}$	$1,90 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sinvastatina	Formulações Farmacêuticas e Plasma Humano	SAEED et al. (2010)
$0,02 \text{ ng mL}^{-1}$	$0,07 \text{ ng mL}^{-1}$	Sinvastatina	Formulações Farmacêuticas	SULTANA et al. (2011)
$0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$	$0,73 \mu\text{g mL}^{-1}$	Ciprofibrato	Formulações Farmacêuticas	JAIN et al. (2012)
-	$0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$	Sinvastatina	Urina de rato	ZHAO et al. (2014)

5.3.4 Precisão

5.3.4.1 Repetibilidade

Os resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade do método são apresentados na Tabela 36.

Tabela 36 - Resultados obtidos para o ensaio de repetibilidade do método

Analito	Concentração		Recuperação (%)	DP	DPR (%)
	Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração média (n = 3)			
CPF	0,50	0,504	100,71	$8,38 \times 10^{-3}$	1,66
	1,00	0,984	98,43	$1,25 \times 10^{-2}$	1,27
	10,00	9,884	98,84	$1,00 \times 10^{-1}$	1,02
SIM	0,50	0,501	100,14	$8,68 \times 10^{-3}$	1,73
	1,00	0,965	96,45	$2,89 \times 10^{-3}$	0,30
	10,00	9,935	99,35	$8,30 \times 10^{-2}$	0,84

*CPF = ciprofibrato; SIM = sinvastatina; DP = desvio padrão; DPR = desvio padrão relativo

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se verificar a partir dos valores de desvio padrão relativo (DPR) que, para ambos os analitos foram observadas variações inferiores a 2,0 % dentre as replicatas. Portanto, pode-se assegurar que não houve variabilidade significativa nos resultados no decorrer de um dia de análise, o que garante a repetibilidade do método.

5.3.4.2 Precisão intermediária

Os resultados obtidos para a avaliação da precisão intermediária para o ciprofibrato e para a sinvastatina são apresentados na Tabela 37.

Tabela 37 - Resultados obtidos para o estudo da precisão intermediária

Analito	Concentração Teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DP	DPR (%)	Rec. (%)
CPF	0,50	A ₁ - 0,502	$8,35 \times 10^{-3}$	1,66	100,40
		A ₂ - 0,500	$1,43 \times 10^{-2}$	2,87	100,00
		D ₁ - 0,499	$1,51 \times 10^{-2}$	3,01	99,80
		D ₂ - 0,503	$6,63 \times 10^{-3}$	1,32	100,60
	1,00	A ₁ - 1,00	$8,94 \times 10^{-3}$	0,89	100,00
		A ₂ - 1,01	$1,53 \times 10^{-2}$	1,51	101,00
		D ₁ - 1,01	$1,31 \times 10^{-2}$	1,31	101,00
		D ₂ - 1,009	$1,40 \times 10^{-2}$	1,38	100,90
	10,00	A ₁ - 10,01	$1,39 \times 10^{-1}$	1,39	100,10
		A ₂ - 10,12	$8,65 \times 10^{-2}$	0,85	101,20
		D ₁ - 10,09	$1,45 \times 10^{-2}$	1,44	100,90
		D ₂ - 10,04	$1,06 \times 10^{-1}$	1,06	100,40
SIM	0,50	A ₁ - 0,490	$8,70 \times 10^{-3}$	1,77	98,00
		A ₂ - 0,476	$1,79 \times 10^{-2}$	3,77	95,20
		D ₁ - 0,479	$5,75 \times 10^{-3}$	1,20	95,70
		D ₂ - 0,488	$2,09 \times 10^{-2}$	4,29	97,60
	1,00	A ₁ - 0,987	$4,77 \times 10^{-2}$	4,83	98,70
		A ₂ - 0,980	$2,44 \times 10^{-2}$	2,49	98,00
		D ₁ - 0,966	$1,58 \times 10^{-2}$	1,63	96,60
		D ₂ - 1,00	$4,38 \times 10^{-2}$	4,37	100,00
	10,0	A ₁ - 9,98	$2,84 \times 10^{-1}$	2,85	99,80
		A ₂ - 9,99	$4,52 \times 10^{-1}$	4,52	99,90
		D ₁ - 9,91	$3,70 \times 10^{-1}$	3,74	99,10
		D ₂ - 10,06	$3,66 \times 10^{-1}$	3,64	100,60

*CPF - ciprofibrato; SIM - sinvastatina; Conc. - concentração; A₁ - analista 1; A₂ - analista 2; D₁ - dia 1; D₂ - dia 2; DP - desvio padrão; DPR - desvio padrão relativo; Rec. - recuperação;

Realizou-se a análise de variância (ANOVA) para o conjunto de dados obtidos (Tabela 37) para verificar a influência de diferentes dias e analistas na precisão do método. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 38.

Tabela 38 - Análise de variância (ANOVA) para avaliar a precisão do método

Analito	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor - p	F crítico
CPF	0,50	Analista	$8,33 \times 10^{-6}$	1	$8,33 \times 10^{-6}$	$5,10 \times 10^{-2}$	$8,27 \times 10^{-1}$	5,317
		Dia	$3,33 \times 10^{-5}$	1	$3,33 \times 10^{-5}$	$2,04 \times 10^{-1}$	$6,63 \times 10^{-1}$	5,317
		Analista x Dia	$4,03 \times 10^{-5}$	1	$4,03 \times 10^{-5}$	$2,47 \times 10^{-1}$	$6,32 \times 10^{-1}$	5,317
		Dentro	$1,31 \times 10^{-3}$	8	$1,63 \times 10^{-4}$			
		Total	$1,39 \times 10^{-3}$	11				
	1,00	Analista	$4,44 \times 10^{-4}$	1	$4,44 \times 10^{-4}$	2,26	$1,71 \times 10^{-1}$	5,317
		Dia	$8,33 \times 10^{-8}$	1	$8,33 \times 10^{-8}$	$4,24 \times 10^{-4}$	$9,84 \times 10^{-1}$	5,317
		Analista x Dia	$4,08 \times 10^{-6}$	1	$4,08 \times 10^{-6}$	$2,07 \times 10^{-2}$	$8,89 \times 10^{-1}$	5,317
		Dentro	$1,57 \times 10^{-3}$	8	$1,96 \times 10^{-4}$			
		Total	$2,02 \times 10^{-3}$	11				
	10,00	Analista	$3,68 \times 10^{-2}$	1	$3,68 \times 10^{-2}$	2,37	$1,62 \times 10^{-1}$	5,317
		Dia	$9,80 \times 10^{-3}$	1	$9,80 \times 10^{-3}$	$6,30 \times 10^{-1}$	$4,50 \times 10^{-1}$	5,317
		Analista x Dia	$2,52 \times 10^{-4}$	1	$2,52 \times 10^{-4}$	$1,62 \times 10^{-2}$	$9,01 \times 10^{-1}$	5,317
		Dentro	$1,24 \times 10^{-1}$	8	$1,56 \times 10^{-2}$			
		Total	$1,71 \times 10^{-1}$	11				
SIM	0,50	Analista	$6,16 \times 10^{-4}$	1	$6,16 \times 10^{-4}$	2,91	$1,27 \times 10^{-1}$	5,317
		Dia	$2,43 \times 10^{-4}$	1	$2,43 \times 10^{-4}$	1,14	$3,16 \times 10^{-1}$	5,317
		Analista x Dia	$4,80 \times 10^{-5}$	1	$4,80 \times 10^{-5}$	$2,26 \times 10^{-1}$	$6,47 \times 10^{-1}$	5,317
		Dentro	$1,69 \times 10^{-3}$	8	$2,12 \times 10^{-4}$			
		Total	$2,60 \times 10^{-3}$	11				
	1,00	Analista	$1,47 \times 10^{-4}$	1	$1,47 \times 10^{-4}$	$1,10 \times 10^{-1}$	$7,48 \times 10^{-1}$	5,317
		Dia	$3,67 \times 10^{-3}$	1	$3,67 \times 10^{-3}$	2,76	$1,35 \times 10^{-1}$	5,317
		Analista x Dia	$4,03 \times 10^{-5}$	1	$4,03 \times 10^{-5}$	$3,02 \times 10^{-2}$	$8,66 \times 10^{-1}$	5,317
		Dentro	$1,06 \times 10^{-2}$	8	$1,33 \times 10^{-3}$			
		Total	$1,45 \times 10^{-2}$	11				
	10,00	Analista	$3,63 \times 10^{-4}$	1	$3,63 \times 10^{-4}$	$2,15 \times 10^{-3}$	$9,64 \times 10^{-1}$	5,317
		Dia	$6,93 \times 10^{-2}$	1	$6,93 \times 10^{-2}$	$4,10 \times 10^{-1}$	$5,39 \times 10^{-1}$	5,317
		Analista x Dia	$5,21 \times 10^{-3}$	1	$5,21 \times 10^{-3}$	$3,08 \times 10^{-2}$	$8,65 \times 10^{-1}$	5,317
		Dentro	1,35	8	$1,68 \times 10^{-1}$			
		Total	1,45	11				

*CPF - ciprofibrato; Sim - sinvastatina; SQ - soma quadrática; gl - graus de liberdade; MQ - média quadrática; F - teste F; valor - p com 95 % de significância;

Analisando-se os resultados obtidos a partir da análise de variância (ANOVA), pode-se verificar que não houve diferença significativa entre as variâncias das análises realizadas por diferentes analistas e em dias diferentes, assim como a interação entre analistas x dias, uma vez que, $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ e os valores de $p > 0,05$ para ambos os fármacos. Dessa forma, não houve a interferência de dias e de analistas na precisão do método.

O método proposto apresentou resultados satisfatórios para os ensaios da precisão intra e inter-dia, assim sendo, pode ser considerado preciso para a determinação simultânea de ciprofibrato e sinvastatina.

5.3.5 Exatidão

Avaliou-se a exatidão do método por meio da adição de padrão, onde adicionaram-se em quantidades fixas das amostras comerciais dos fármacos e variou-se a concentração dos padrões ciprofibrato e sinvastatina conforme descrito no item 4.2.6.5.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 39.

Tabela 39 - Resultados obtidos para o ensaio de exatidão

Analito	Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *	DPR (%)	Recuperação (%)
CPF	0,50	0,510	2,27	102,1
	1,00	1,009	1,71	100,9
	10,00	10,13	0,50	101,3
SIM	0,50	0,492	1,77	98,4
	1,00	1,044	1,08	104,4
	10,0	10,02	0,66	100,2

* média (n=3)

Os percentuais de recuperação obtidos para o ciprofibrato e sinvastatina variaram de 100,9 a 102,1 % e 98,4 a 104,4 %, respectivamente. Os resultados obtidos foram satisfatórios para ambos os fármacos, uma vez que atendem aos critérios de aceitação recomendados pela ANVISA, 100 ± 5 %. Dessa forma, o método proposto pode ser considerado exato.

5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE CIPROFIBRATO E SINVASTATINA

Após a verificação dos parâmetros analíticos recomendados pela ANVISA para o método proposto, aplicou-se o mesmo para a quantificação dos fármacos em amostras comerciais. As soluções foram preparadas conforme descrito no item 4.2.1.5.

Análises em replicatas (n = 3) foram realizadas a partir das condições cromatográficas otimizadas e os resultados das taxas de recuperação dos fármacos encontrados nas amostras comerciais são apresentados nas Tabelas 40 e 41.

Tabela 40 - Resultados obtidos para a análise de diferentes fabricantes de amostras comerciais de ciprofibrato

Fabricante	Teor declarado (mg)	Teor médio encontrado (mg)*	% Recuperação	DPR (%)
A	100,00	99,60	99,60	1,796
B	100,00	96,94	96,94	3,301
C	100,00	100,20	100,20	1,358

*média (n=3)

O valor do princípio ativo especificado pelos fabricantes nas amostras é de 100 mg/comprimido. Como podemos verificar nos resultados obtidos, todas as amostras analisadas apresentaram valores de recuperação dentro do intervalo recomendado pela farmacopeia, ou seja, $100 \pm 5\%$. Portanto, esses resultados indicam que as amostras contêm teores dentro do recomendado. Entretanto, para confirmar esta suposição, é necessário analisar as amostras por outro método já validado para confrontar os resultados e então emitir um parecer final sobre as amostras e o método proposto.

Tabela 41 - Resultados obtidos para a análise de diferentes fabricantes de amostras comerciais de sinvastatina

Fabricante	Teor declarado (mg)	Média teor encontrado (mg)*	% Recuperação	DPR (%)
A	10,00	10,30	103,0	0,226
B	20,00	19,72	98,60	3,219
C	40,00	39,02	97,60	0,979

*média (n=3)

O valor do princípio ativo especificado pelos fabricantes nas amostras é de 10, 20 e 40 mg/comprimido, respectivamente. Como podemos verificar nos resultados obtidos, todas as amostras analisadas apresentaram valores de recuperação dentro do intervalo recomendado pela farmacopeia, ou seja, $100 \pm 5 \%$. Portanto, esses resultados indicam que as amostras contêm teores dentro do recomendado pela farmacopeia. Entretanto, para confirmar esta suposição, é necessário analisar as amostras por outro método já validado para confrontar os resultados e então emitir um parecer final sobre as amostras e o método proposto.

5.4.1 Análise Simultânea de Amostras Comerciais de Ciprofibrato e Sinvastatina

Para avaliar a eficiência do método em analisar simultaneamente amostras comerciais dos fármacos, realizou-se a análise da amostra associada de ciprofibrato e sinvastatina. Preparou-se a solução conforme descrito no item 4.2.1.5. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 42.

Tabela 42 - Resultados obtidos para a análise simultânea das amostras comerciais de ciprofibrato e sinvastatina

Fabricante	Teor declarado	Média teor	% Recuperação	DPR (%)
	(mg)	encontrado (mg) *		
1	100,00	102,2	102,2	0,65
2	40,00	40,47	101,2	2,64

*média (n=3)

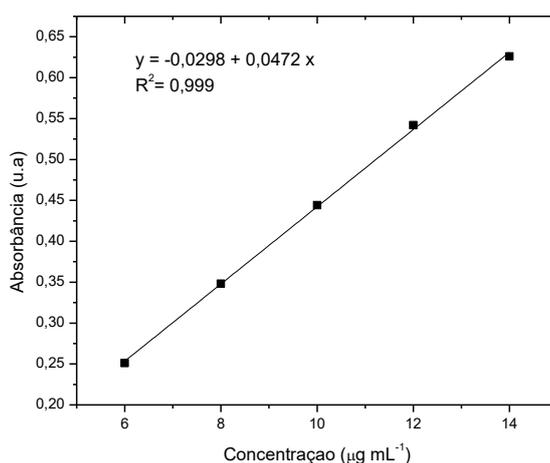
Analisando-se os resultados obtidos, podemos verificar que o método proposto é eficaz para a determinação simultânea dos fármacos em amostras comerciais, uma vez que os excipientes presentes em cada uma das formulações não interferiram na correta quantificação de ambos os fármacos e, os resultados obtidos estão de acordo com os valores recomendados pela farmacopeia.

5.5 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS UTILIZANDO UM MÉTODO COMPARATIVO

5.5.1 Método Comparativo Ciprofibrato

Para a obtenção da curva analítica, preparou-se uma solução padrão estoque com concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da qual foram realizadas diluições de modo que a concentração variou de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $14 \mu\text{g mL}^{-1}$ conforme apresentada no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Curva analítica para o ciprofibrato a partir do método comparativo desenvolvido por Nascimento (2011)



As amostras comerciais foram preparadas conforme descrito no item 4.2.5.1 e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 43.

Tabela 43 - Resultados obtidos para a análise das amostras comerciais de ciprofibrato pelo método comparativo

Fabricante	Teor declarado (mg)	Teor médio encontrado (mg)*	Recuperação (%)	DPR (%)
A	100,00	101,40	101,40	2,16
B	100,00	100,20	100,20	4,69
C	100,00	100,50	100,50	3,92

*média (n=3)

5.5.1.1 Comparação entre os métodos

A Tabela 44 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos para a análise das amostras comerciais de ciprofibrato pelo método desenvolvido (CLAE-UV) e pelo comparativo descrito por Nascimento e colaboradores (2011).

Tabela 44 - Resultados obtidos para as amostras comerciais utilizando-se CLAE-UV e UV

Fabricante	Teor declarado (mg)	Teor médio encontrado (mg)* CLAE	Recuperação (%) CLAE	DPR (%) CLAE	Teor médio encontrado (mg)* UV	Recuperação (%) UV	DPR (%) UV
A	100,00	99,60	99,60	1,79	101,40	101,40	2,16
B	100,00	96,94	96,94	3,30	100,20	100,20	4,69
C	100,00	100,20	100,20	1,36	100,50	100,50	3,92

*média (n=3)

A fim de verificar-se a concordância entre os resultados obtidos por meio dos métodos, realizou-se a análise estatística dos dados utilizando-se para isso o teste F e o teste t-pareado, os quais permitem verificar as diferenças nos resultados de cada método analítico sem a interferência da variabilidade amostral. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 45.

Tabela 45 - Comparação dos resultados entre as técnicas de CLAE-UV e UV para determinação quantitativa de ciprofibrato em amostras comerciais

Fabricante	Teor médio encontrado (mg)* CLAE	DPR (%) CLAE	Teor médio encontrado (mg)* UV	DPR (%) UV	Teste F	Teste t
A	99,60	1,79	101,40	2,16	1,44	0,79
B	96,94	3,30	100,20	4,69	12,34	0,37
C	100,20	1,36	100,50	3,92	1,50	2,65

*média (n=3); Valor crítico de F – 95 % significância = 39,0 Valor crítico de t-Student com 95 % de significância = 4,30

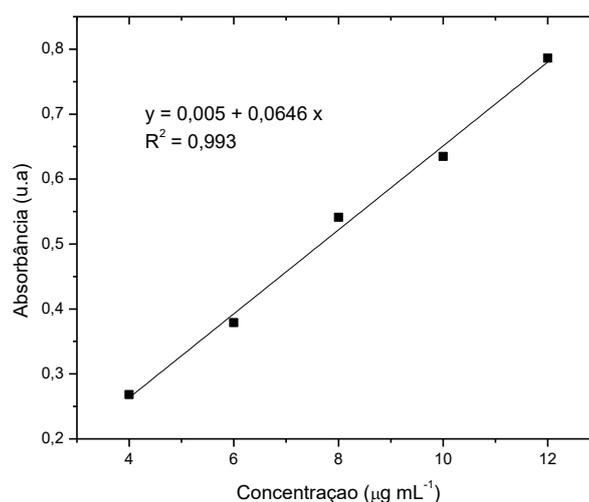
Analisando-se os resultados obtidos por meio dos testes F e t-pareado verificou-se que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos pelos métodos, uma vez que o valor de $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ e o valor de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$. Portanto, esses resultados indicam que

as amostras comerciais de ciprofibrato contêm teores dentro do recomendado, dessa forma, as amostras estão conformes.

5.5.2 Método Comparativo Sinvastatina

Para a obtenção da curva analítica, preparou-se uma solução padrão estoque com concentração final de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da qual foram realizadas diluições com uma solução de lauril sulfato de sódio 0,5 % , de modo que a concentração variou de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ a qual é apresentada no Gráfico 6

Gráfico 6 - Curva analítica para a sinvastatina obtida a partir do método comparativo desenvolvido por Zepon (2013)



As amostras comerciais foram preparadas conforme descrito no item 4.2.5.2 e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 46.

Tabela 46 - Resultados obtidos para análise das amostras comerciais de sinvastatina pelo método comparativo

Fabricante	Teor declarado	Teor médio encontrado		
	(mg)	(mg)*	Recuperação (%)	DPR (%)
A	10,00	10,03	100,3	4,36
B	20,00	20,70	103,5	1,82
C	40,00	40,68	101,7	1,23

*média (n=3)

5.5.2.1 Comparação entre os métodos

A Tabela 47 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos para a análise das amostras comerciais de sinvastatina pelo método desenvolvido (CLAE-UV) e pelo comparativo descrito por Zepon e colaboradores (2013).

Tabela 47 - Comparação dos resultados entre as técnicas de CLAE-UV e UV para determinação quantitativa de sinvastatina em amostras comerciais

Fabricante	Teor	Teor médio	Recuperação	DPR	Teor médio	Recuperação	DPR
	declarado (mg)	encontrado (mg)* CLAE	(%) CLAE	(%) CLAE	encontrado (mg)* UV	(%) UV	(%) UV
A	10,00	10,08	100,80	3,78	10,03	100,3	4,36
B	20,00	19,72	98,60	3,22	20,70	103,5	1,82
C	40,00	39,02	97,60	0,98	40,68	101,7	1,23

*média (n=3)

A fim de verificar a concordância entre os resultados obtidos por meio dos métodos utilizados, realizou-se a análise estatística dos dados utilizando-se para isso o teste F e o teste t-pareado, já que estes permitem verificar as diferenças nos resultados de cada método analítico sem a interferência da variabilidade amostral. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 48.

Tabela 48 - Comparação dos resultados entre as técnicas de CLAE-UV e UV para determinação quantitativa de sinvastatina em amostras comerciais

Fabricante	Teor médio	DPR	Teor médio	DPR	Teste F	Teste t
	encontrado (mg)* CLAE	(%) CLAE	encontrado (mg)* UV	(%) UV		
A	10,30	0,23	10,03	4,36	1,33	-0,08
B	19,72	3,22	20,70	1,82	0,35	1,92
C	39,02	0,98	40,68	1,23	0,60	2,30

* média (n=3); Valor crítico de F – 95 % de significância = 39,00; Valor crítico de t- Student com 95 % de significância = 4,30

Analisando-se os resultados obtidos por meio dos testes F e t-pareado verificou-se que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos pelos métodos, uma vez que o

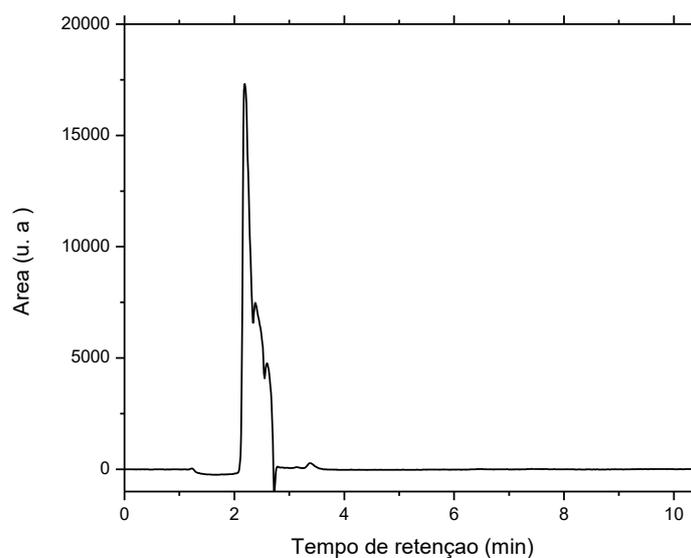
valor de $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ e o valor de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$. Portanto, esses resultados indicam que as amostras comerciais de sinvastatina contêm teores dentro do recomendado, dessa forma, as amostras estão conformes.

5.6 DETERMINAÇÃO DE CIPROFIBRATO E SINVASTATINA EM OUTRAS MATRIZES

5.6.1 Urina Sintética

Primeiramente, realizou-se a análise cromatográfica da urina sintética na ausência dos fármacos a fim de obter-se o seu perfil cromatográfico, o qual é apresentado na Figura 17.

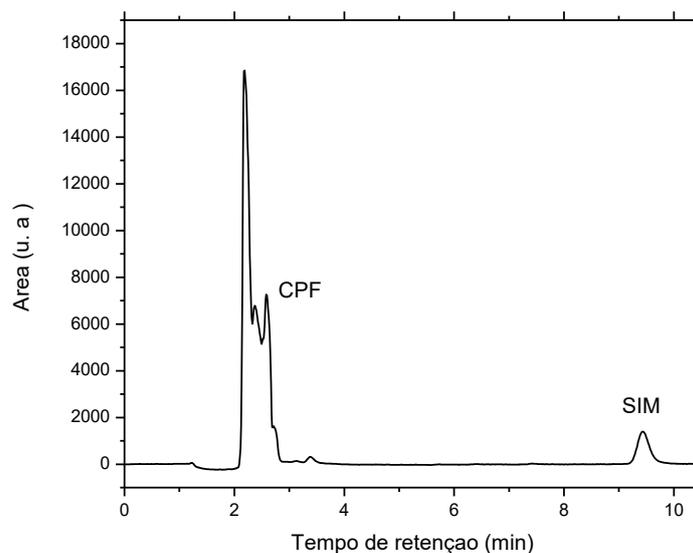
Figura 17 – Perfil cromatográfico da urina sintética



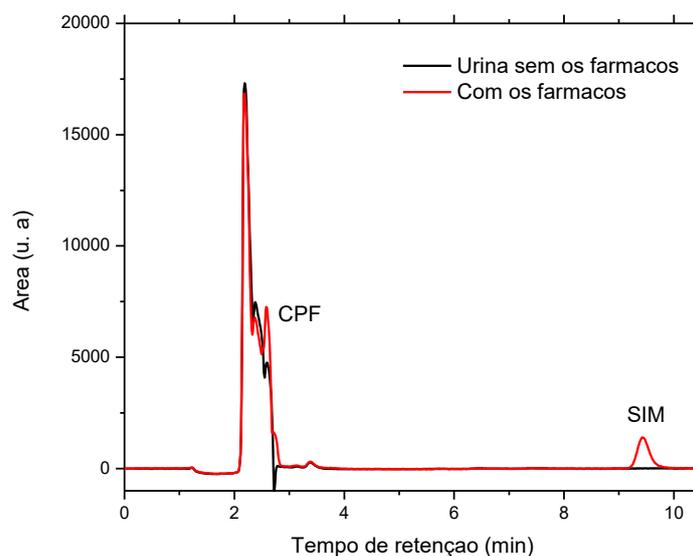
A partir do cromatograma obtido, pode-se identificar os picos característicos dos componentes presentes na urina sintética e, dessa forma, pode-se prosseguir com as análises das amostras contendo os fármacos.

Realizou-se as análises das amostras e obteve-se o cromatograma o qual é apresentado na Figura 18.

Figura 18 - Cromatograma obtido para a análise de CPF e SIM em urina sintética



Analisando-se o cromatograma obtido para os fármacos em urina sintética, pode-se verificar que, o ciprofibrato apresenta seu pico característico no mesmo tempo de retenção que os componentes presentes na amostra de urina, o que pode ser comprovado quando o cromatograma do perfil cromatográfico da urina é sobreposto ao cromatograma contendo os fármacos, pelo aumento da intensidade do pico devido à presença do ciprofibrato, como apresentado na Figura 19. No caso da sinvastatina, por ela apresentar um tempo de retenção superior ao do ciprofibrato, não houve a interferência dos componentes presentes na urina em sua determinação. Dessa forma, pode-se determinar com precisão e exatidão aceitáveis apenas sinvastatina em amostra de urina sintética. Para a adequada quantificação de ciprofibrato em urina faz-se necessário alguns procedimentos para remover os componentes presentes na urina que apresentam tempo de retenção semelhante ao do ciprofibrato e, dessa forma, possibilitar a sua determinação.

Figura 19 - Sobreposição dos cromatogramas de urina na presença e ausência dos fármacos

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.7.1 e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 49.

Tabela 49 - Resultados obtidos para análise de sinvastatina em urina sintética

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *	DPR (%)	Recuperação (%)
0,500	0,490	2,80	98,1

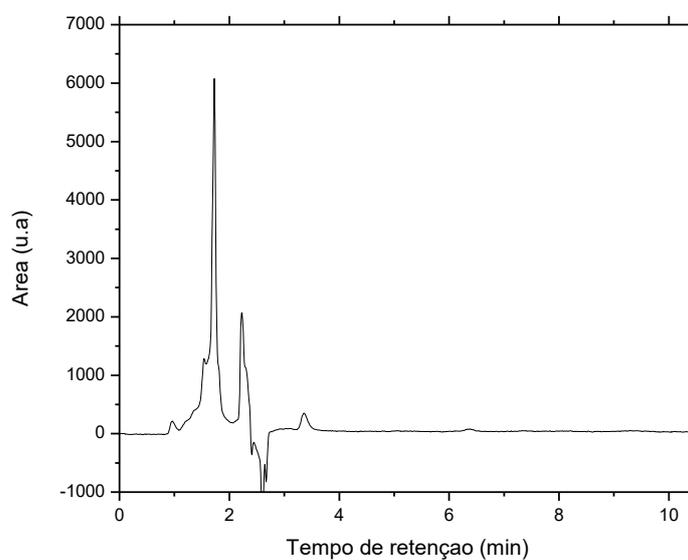
*média (n=3)

Com base nos resultados obtidos, pode-se verificar que o método desenvolvido pode ser utilizado para a identificação e quantificação com precisão e exatidão adequada para sinvastatina em amostras de fluidos biológicos, com valores de recuperação aceitáveis pela agência regulatória (ANVISA).

5.6.2 Águas Superficiais

Realizou-se a análise da amostra de água superficial primeiramente na ausência dos fármacos para poder-se identificar o seu perfil cromatográfico o qual é apresentado na Figura 20.

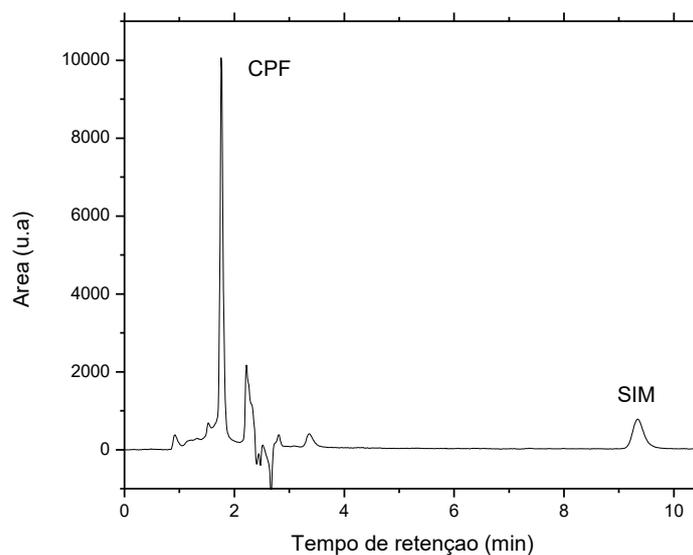
Figura 20 – Perfil cromatográfico para a amostra de água superficial



Com base no cromatograma que obteve-se foi possível identificar os picos característicos dos componentes presentes na amostra de água superficial analisada e, a partir de então, pode-se dar continuidade com as análises das amostras contendo os fármacos.

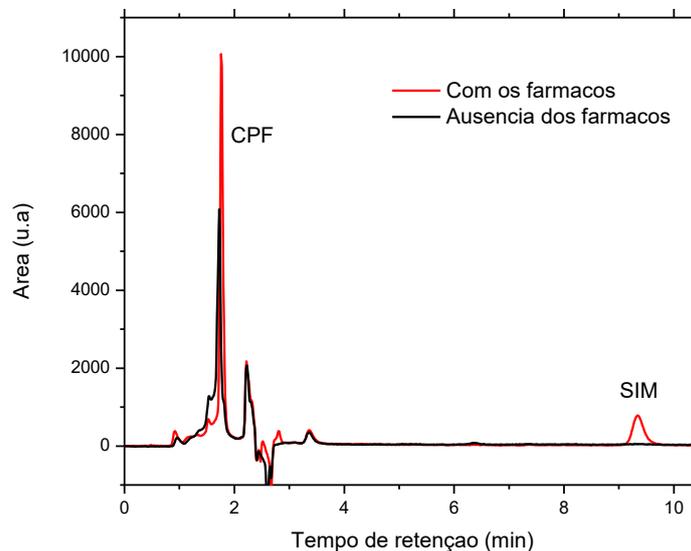
Realizou-se as análises das amostras na presença dos fármacos e o cromatograma obtido é apresentado na Figura 21.

Figura 21- Cromatograma obtido para análise dos fármacos em água superficial



Analisando-se o cromatograma obtido, pode-se verificar que, os componentes presentes na amostra de água superficial apresentaram seu tempo de retenção semelhante ao do ciprofibrato, assim como observou-se na amostra de urina sintética, fato este, que pode ser evidenciado quando o cromatograma do perfil cromatográfico da água superficial é sobreposto ao cromatograma na presença dos fármacos, o qual é apresentado na Figura 22, uma vez que pode-se verificar um aumento na intensidade do pico na região dos picos característicos dos componentes presentes na água superficial, devido à presença do ciprofibrato. Para a sinvastatina, os componentes não interferiram na sua determinação, portanto, é possível sua quantificação com precisão e exatidão aceitáveis.

Figura 22 - Sobreposição dos cromatogramas de uma amostra de água superficial na ausência e presença dos fármacos



As amostras foram preparadas conforme descrito no item 4.2.7.2 e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 50.

Tabela 50 - Resultados obtidos para a análise de sinvastatina em água superficial

Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g mL}^{-1}$) *	DPR (%)	Recuperação (%)
0,500	0,523	4,70	104,6

*média (n=3)

Analisando-se os resultados obtidos, pode-se verificar que o método desenvolvido é preciso, exato e confiável para a determinação de sinvastatina em amostras de água superficial.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, um novo método analítico utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção UV para a determinação simultânea de ciprofibrato e sinvastatina em formulações farmacêuticas foi validado no qual as condições cromatográficas utilizadas foram otimizadas a partir do Planejamento de Experimentos, onde utilizando-se a Função de Desejabilidade, obteve-se uma condição experimental adequada para os fatores avaliados e os melhores resultados para a separação cromatográfica foram alcançados. Sendo assim, pode-se concluir que, a utilização de modelos estatísticos contribui para a obtenção de ótimas condições experimentais para a separação cromatográfica entre os fármacos sem a necessidade em trabalhar-se com fluxos muito elevados ou fase móvel constituída de ácidos ou tampões, preservando-se dessa forma a vida útil da coluna cromatográfica e garantindo uma redução na quantidade de reagentes utilizados, gerando o mínimo de resíduos possíveis, o que é de extrema importância quando pensamos nas questões ambientais.

A avaliação das figuras de mérito recomendadas pela agência regulatória mostrou que o método desenvolvido apresentou adequada seletividade e especificidade podendo ser utilizado em análises para detecção de cada fármaco independentemente ou quando analisados simultaneamente sem a presença de interferentes entre as amostras.

A utilização do Teste de Huber para a verificação da linearidade do método possibilitou identificar valores anômalos presentes no conjunto de dados analisados os quais não conferiam uma confiabilidade aos dados obtidos, portanto, melhores resultados foram alcançados e a relação linear foi satisfatória, dado que o coeficiente de correlação linear, r , para a curva analítica do ciprofibrato e da sinvastatina foram de 0,9999 e 0,9998, respectivamente.

Os valores obtidos para o LD e LQ para ambos os fármacos podem ser considerados satisfatórios para a sua determinação em diferentes matrizes, como em formulações farmacêuticas, fluidos biológicos ou amostras ambientais, além de que, os valores encontrados são comparáveis aos obtidos em trabalhos descritos na literatura que fazem o uso de métodos cromatográficos.

O método apresentou-se preciso, uma vez que não foram verificadas variabilidade significativas nos resultados obtidos no decorrer de um dia de análise assim como em dias diferentes realizadas por diferentes analistas

O método pode também ser considerado exato para a determinação dos fármacos, pois, os percentuais de recuperação obtidos mostram que os resultados foram satisfatórios e

atendem aos critérios de aceitação da agência regulatória, dessa forma, o método é considerado exato.

Avaliou-se a qualidade de amostras comerciais de diferentes laboratórios e pode-se concluir que todas as amostras que foram analisadas estavam conformes, uma vez que, os resultados obtidos por meio do método desenvolvido foram equivalentes e sem diferenças significativas aos resultados obtidos a partir de um método de determinação já validado e reportado na literatura. Portanto, o método desenvolvido é preciso, exato e confiável para a determinação de ciprofibrato e sinvastatina em formulações farmacêuticas. Ainda, o método mostrou-se capaz de determinar simultaneamente ambos os fármacos em amostras comerciais.

Por fim, o método mostrou-se viável para a determinação de sinvastatina em amostras de fluidos biológicos e amostras ambientais, entretanto, é necessário uma etapa de pré-tratamento dessas matrizes para que seja possível a determinação de ciprofibrato, uma vez que, ele apresenta o mesmo tempo de retenção dos componentes presentes tanto em urina sintética quanto em amostra de água superficial.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento deste trabalho permitiu identificar alguns aspectos que podem vir a ser empregados como temas em trabalhos futuros. Neste sentido, como perspectivas futuras para a continuação dos estudos realizados, pode-se destacar:

- Avaliar o procedimento mais eficiente para o preparo das amostras de urina sintética e água superficial que possibilitem a quantificação com precisão e exatidão aceitáveis para o ciprofibrato;
- Testar o método desenvolvido para amostras reais de fluidos biológicos, tais como urina e plasma sanguíneo;
- Realizar a amostragem de efluentes para determinar ciprofibrato e sinvastatina;
- Avaliar a viabilidade do método em determinar simultaneamente outras classes de fármacos;

REFERÊNCIAS

AHMAD, A., RAISH, M., ALKHARFY, K. M., MOHSIN, K., SHAKEEL, F. Box – Behnken Supported Development and Validation of Robust RP – HPLC Method: An Application in Estimation of Pravastatin in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 61, n. 2, p. 2963 – 2967, 2016

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 899, de 29 de maio de 2003. “**Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05/02/18

ANVISA. Fórum discute estratégias de combate à falsificação de medicamentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 748-749, 2004

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 166, de 24 de julho de 2017. “**Guia para validação de métodos analíticos**”. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15/11/18

ASHFAQ, M., KHAN, I. U., QUTAB, S. S., RAZZAQ, S. N. HPLC Determination of Ezetimibe and Simvastatin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 52, n. 3, p. 1220 – 1223, 2007

ASHFAQ, M., KHAN, I. U., ASGHAR, M. N. Development and Validation of Liquid Chromatographic Method for Gemfibrozil and Simvastatin in Binary Combination. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 53, n. 3, p. 1617 – 1619, 2008

AUGUSTO, F.; RIEDO, C., R., F.; VALENTE, A., L., P.; “**Análise Quantitativa por Cromatografia**”. Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2003

BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Ed. Unicamp, 2001

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer Experimentos**. 3ª edição, Campinas, Editora UNICAMP, p. 480, 2007

BASAVAIHAH, K.; THARPA, K. The Development and Validation of Visible Spectrophotometric Methods for Simvastatin Determination in Pure and The Tablet Dosage Forms. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 14, n. 3, p. 205 – 210, 2008

BAUER, S.; MWINYL, J.; STOECKLE, A.; GERLOFF, T.; ROOTS, I. Quantification of pravastatin in human plasma and urine after solid phase extraction using high performance

liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.818, n.2, p.257-262, 2005. Disponível em: <<http://europepmc.org>>. Acesso em: 06/02/18

BIGHETTI, E. J. B.; PATRICIO, P. R.; CASQUERO, A. C.; BERTI, J. A.; OLIVEIRA, H. C. F. Ciprofibrate increases cholesteryl ester transfer protein gene expression. And the indirect reverse cholesterol transport to the liver. *Lipids in Health and Disease*. **BioMed Central**, v. 8 (1), n. 50, p. 1 – 9, 2009

BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS JR , B. R. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu (II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. **Química Nova**, v.30, n.3, p.548-553, 2007

BRASIL. Lei 8.072, de 25 de julho de 1990. Dispõe sobre os crimes hediondos, nos termos do art. 5º, inciso XLIII, da Constituição Federal, e determina outras providências. **Diário Oficial da União**. 26 jul 1990:14303

BRASIL. Portaria nº 2.814, de 29 de maio de 1998. Estabelece procedimentos a serem observados pelas empresas produtoras, importadoras, distribuidoras e do comércio farmacêutico, objetivando a comprovação, em caráter de urgência, da identidade e qualidade de medicamento, objeto de denúncia sobre possível falsificação, adulteração e fraude. **Diário Oficial da União**. 01 jun 1998; Seção1:13

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Indicadores e dados básicos - Brasil – 2009**. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br>>. Acesso em: 15/09/17.

BRASIL. Ministério da Saúde. Uma Análise da Situação da Saúde e das Doenças Transmissíveis Relacionadas à Pobreza. **Saúde Brasil**, Brasília, DF, 2014

BRASIL, Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2016 Saúde Suplementar: **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico [recurso eletrônico]**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. Brasília: Ministério da Saúde , 2017

BREITKREITZ, M. C. **Otimização Simultânea de Variáveis de Processo e Mistura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. 2007, 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2007

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C.; “**As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**”. Tradução: Augusto Langeloh. Revisão técnica: Almir Lourenço da Fonseca. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p. 877 - 885, 893 - 902

CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 15/02/18

CHAPMAN, M. J.; “Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidemia and future perspectives”. **Atherosclerosis**, v.171, n.1, p. 1 – 13, 2003

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. “**Introdução a Métodos Cromatográficos**”. São Paulo: Editora Unicamp. 7ª ed, p. 16-18; 187-195, 1997

Conselho Regional de Química IV Região – SP. **Conceitos Fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)**. São José do Rio Preto, 2010. Disponível em: <<http://www.crq4.org.br>>. Acesso em: 03/02/18

DASH, R. N.; HABIBUDDIN, M.; HUMAIRA, T.; PATEL, A. A. Application of quality by design for the optimization of an HPLC method to determine ezetimibe in a supersaturable self-nanoemulsifying formulation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, n. 8, p. 874 – 885, 2014

DASTKHOON, M., GHAEDI, M., ASFARAM, A., ARABI, M., OSTOVAN, A., GOUDARZI, A. Cu@SnS/SnO₂ nanoparticles as novel sorbent for dispersive micro solid phase extraction of atorvastatin in human plasma and urine samples by high-performance liquid chromatography with UV detection: Application of central composite design (CCD). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 42 – 49, 2017

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several responses variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980

DOGAN, T. B.; USLU, B.; OZKAN, B. A. Investigation of electrochemical behavior of lipid lowering agente atorvastatin calcium in aqueous media and its determination from pharmaceutical dosage forms and biological fluids using boron-doped Diamond and glassy carbono electrodes. **Combinatorial Chemistry & High Through put Screening**, v. 10, n. 7, p. 571 - 582, 2007

DONG, M. W. “**Modern HPLC for practicing scientists**”. Wiley Interscience Massachusetts, 2006

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 7th ed., **Council of Europe**. Strasbourg: EDQM, 2013.

FARMACOPEIA Brasileira. 5ª edição, **Volume II**, Brasília, 2010

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

HEFNAWY, M., AL-OMAR, M., JULKHUF, S. Rapid and sensitive simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin from their combination Drug products by monolithic sílica high-performance liquid chromatographic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n.3, p. 527 – 534, 2009

HELLWIG, F. M. **Desenvolvimento de Método Indicativo da Estabilidade, Ensaio de Dissolução e Estudo Preliminar da Estabilidade e Citotoxicidade do Ciprofibrato em Formas Farmacêuticas**. 2014, 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, 2014

HÜTTEMANN, H.; BLASCHKE, G. Achiral and chiral determination of ciprofibrate and its glucuronide in human urine by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 729, n. (1-2), p. 33-41, 1999

http://www.merck.com.br/country.br/pt/images/Sinvastatina_Bula_Profissional_14.11.17_tcm512_141281.pdf?Version>. Acesso em: 15/12/17.

IBGE: Pesquisa Nacional de Saúde: 2013: “**Acesso e utilização dos serviços de saúde, acidente e violências: Brasil, grandes regiões e unidades de federação**”/ IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. – Rio de Janeiro: IBGE, 2015

INTERFARMA, “**Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa**”. Guia 2017. Disponível em: < <https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2017/dados-do-setor> >. Acesso em: 05/02/18

JAIN, N.; JAIN, R.; SWAMI, H.; PANDEY, S.; JAIN, D. K. Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Simvastatin and Ezetimibe in Bulk Drug and its Combined Dosage Form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, Issue 1, p. 170 – 175, 2009

JAIN, P. S., JIVANI, H. N., KHATAL, R. N., SURANA, S. J. Stability – Indicating HPLC Determination of Ciprofibrate in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Form. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**, v. 18, n. 1, p. 95 – 101, 2012

JANARDHANAN, S., MANAVALAN, V., 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**, v.9, p. S1378 – S1387, 2012

KAJINAMI, K.; TAKEKOSHI, N.; SAITO, Y.; Pitavastatin: efficacy and safety profiles of a novel synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. **Cardiovascular Drug Review**, v.21, n.3, p.199-215, 2003.

KIM, B., BAN, E., PARK, J., SONG, Y., KIM, C. Determination of Simvastatin in Human Plasma by Column-Switching HPLC with UV Detection. **Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 19, p. 3089 – 3102, 2004

KOMORSKY – LOVRIC, S.; NIGOVIC, B. Electrochemical characterization of simvastatin by abrasive stripping and square-wave voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, vol. 593, n. (1-2), p. 125 – 130, 2006

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Rima, São Carlos, São Paulo, 2004

LAUBE, N., MOHR, B., HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1-2, p. 367-374, 2001

LEWIS, G. A.; MATHIEU, D.; PHAN-TAN-LUU, R. **Pharmaceutical Experimental Design**. Nova York, Marcel Dekker, 1999

MANO, R. **Os inibidores da HMG-CoA redutase – As vastatinas**, 2005. Disponível em: <<http://www.manuaisdecardiologia.med.br/>>. Acesso em: 03/02/18.

MAZZARESE, R.; AHUJA, I. N. S.; DONG, M. W. **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**. Chapter 20, Elsevier, Amsterdam, 2005

MENDES, N.N. Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica do Teor de Atorvastatina Cálcica em Insumo Farmacêutico Ativo e em comprimidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **INCQS/FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, 2010.

MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 18 ed. Withouse Station: Merck, 2010. Disponível em: <<https://www.rsc.org/merck-index>>. Acesso em: 02/02/2018

Merck Index. Ciprofibrate. 13a .ed. New Jersey: Merck & CO. Inc., 2001.402p. Disponível em: <http://www.merck.com.br/country.br/pt/images/Ciprofibrato_Bula_Profissional_11.09.17_tm512_169632.pdf?Version=>. Acesso em 05/02/18

MUKHTAR, R.Y.A.; REID, J.; REVKLESS, J.P.D. Pitavastatin. **International Journal of Clinical Practice**, v. 59, n. 2, p. 239-252, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com>>. Acesso em: 03/02/18.

NASCIMENTO, G. N. L.; ROSA, D. L.; NISHIJO, H.; FERREIRA, T. A. A. Validation of a spectrophotometric method to determine ciprofibrate content in tablets. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 23 – 29, 2011.

National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **Circulation**, v.106, n.25, p. 3143 – 3421, 2002

NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Tradução: Ana Beatriz Gorini da Veiga, et al. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p. 859-875.

NEUE, U. D.; HPLC Columns, Theory, Technology and Practice, **Wiley-VCH Publishers**: New York, 1997

OLIVEIRA, P. R.; BERNARDI, L. S.; SILVA, M. A. S.; MURAKAMI, F. S. Avaliação da qualidade e equivalência farmacêutica de comprimidos contendo 10 mg de sinvastatina. **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 393-400, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Cardiovascular Diseases (CVDs)**. Fact Sheet n. 317, 2011; Atualizado em Maio de 2017.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA (PAHO). Diretrizes para o desenvolvimento de medidas de combate a medicamentos falsificados. **Escritório Regional para as Américas da Organização Mundial da Saúde**. Brasília, 2005. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=746-

diretrizes-para-o-desenvolvimento-medidas-combate-a-medicamentos-falsificados-6&category_slug=medicamentos-tecnologia-e-pesquisa-075&Itemid=965 >. Acesso em 06/02/18

OTTO, M. Chemometrics – **Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry** Weinheim, Wiley, 1999

PERALTA, Z.; P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 10, n. 2, p. 106 - 110, 2005.

PEREIRA-FILHO, E. R., POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Employment of factorial design for optimization of pyrolysis and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p.246-253, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 05/02/18.

PHANEEMDRA, D., NAGAMALLESWARI, G. Chromatographic and Spectrophotometric Methods for Simultaneous Determination of Simvastatin and Sitagliptin in Combined Dosage Form. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 3, p. 1170 – 1175, 2015

POLIDORO, A. **Estudo da síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente cardiovasculares contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico**. 2013, 212f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos Área de Insumos Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, SP, 2013.

POLONINI, H.C.; SANTOS F. C; VAZ, U. P.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B.; FERREIRA, A. O. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de simvastatina em cápsulas magistrais. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 516-519, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000300026 >. Acesso em: 05/02/18

Pubchem, **Open Chemistry Database**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 05/02/2018

RAMADAN, A. A.; MANDIL, H.; SABOUNI, J. Determination of Atorvastatin Calcium in Pure and Its Pharmaceutical Formulations Using Iodine in Acetonitrile by UV-Visible Spectrophotometric Method. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 9, p. 427 – 433, 2015.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R. J. Eliminação e farmacocinética de fármacos. In: Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. **Farmacologia, 6ª edição**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2007. p.113-27

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SAEED, A. M., NAJMA, S., ZEESHAN, M. A., HINA, S. High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Pioglitazone, Gliquidone, Rosuvastatin and Simvastatin in Formulations and Human Serum. **Chin. J. Chem.**, v. 28, n. 10, p. 1998—2002, 2010

SAKAC, M. C.; VUJIC, Z.; BRBORIC, J.; KUNTIC, V.; MARKOVIC, S. U. An Improved HPLC Method with the Aid of a Chemometric Protocol: Simultaneous Determination of Atorvastatin and Its Metabolites in Plasma. **Molecules**. V. 18; p. 2469 – 2482, 2013.

SANTOS, R.D. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 77, Suppl. 3. São Paulo, 2001

SILVA, T. D. **Desenvolvimento de Métodos Analíticos e de Formulações para Estatinas**. 2009, 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

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

SOURI, E.; AMANLOU, M. Development and Validation of a Derivative Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Simvastatin and Ezetimibe. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, n. S1, p.197-202, 2010

SPOSITO, AC, CARAMELLI, B., FONSECA, F.A., BERTOLAMI, M.C., AFIUNE Neto A., SOUZA A.D., et al. / Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol.**, v. 88, supl. 1, p. 2 - 19, 2007.

STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K.; LEITERSDORF, E.; FRUCHART, J. C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, v. 98, Is. 19, p. 2088-2093, 1998

STUDER, M.; BRIEL, M.; LEIMENSTOLL, B.; GLASS, T. R.; BUCHER, H. C. “Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality. A systematic Review. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, n. 7 p. 725-730, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15824290> >. Acesso em: 05/02/2018.

SULTANA, H.; ARAYNE, M. S.; NAVEED, S. Simultaneous Determination of Enalapril and Statin's in Pharmaceutical Formulations by RP-HPLC. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 56, n. 3, p. 734 – 737, 2011

TAKEDA, H. H.; JANEGITZ, B. C.; MEDEIROS, R. A.; MATTOSO, O. F. F. Differential pulse voltammetric determination of ciprofibrate in pharmaceutical formulations using a glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a poly(allyamine hydrochloride) film. **Sensors and Actuators B**, v. 161, Is. 1, p. 755 – 760, 2012

THARPA, K.; BASAVAIAH, K.; RAJEDRAPRASAD, N.; VINAY, K. B.; HIRIYANNA, S. G. Sensitive spectrophotometric assay of simvastatin in pharmaceuticals using permanganate. **Brasilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 1, 2010.

TOBERT, J.A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 7, p. 517-526, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com>>. Acesso em: 06/02/2018.

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

U.S. Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), **Reviewer Guidance**. "Validation of Chromatographic Methods", 1994

XAVIER, H. T. Associação de medicamentos: estatinas e fibratos. Divisão de Moléstias Cardiovasculares – Faculdade de Ciências Médicas de Santos – UNILUS, **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. Volume 85, Suplemento V, p. 34-35, 2005.

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

WERKEMA, M. C. C.; AGUIAR, S. Planejamento e análise de experimentos: como identificar e avaliar as principais variáveis influentes em um processo. Belo Horizonte: **Fundação Christiano Ottoni**, 1996, 294 p. ISBN 858544729

WERMUTH, C.G. Primary Exploration of Structure-Activity Relationships. In: WERMUTH, C.G., ed. **The Practice of Medicinal Chemistry**. Academic Press: San Diego, 1996, p.243-295.

WOOD, D.; BACKER, G. D., FAERGEMAN, O.; GRAHAM, I.; MANCIA, G.; PYÖRÄLÄ, K. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the second joint task force of european and other societies on coronary prevention. **Atherosclerosis**, v. 19, n. 7, p. 1434 - 1503, 1998.

World Health Organization. **Guidelines for the development of measures to combat counterfeit drugs**. Department of Essential Drugs and Other Medicines World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1999

World Health Organization. **Substandard and falsified medical products**. January, 2018. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> >. Acesso em 05/02/18

YAMAMOTO, A.; MATSUZAWA, Y.; YOKOYAMA, S.; FUNAHASHI, T.; YAMAMURA, T.; KISHINO, B.I. Effects of probucol on xanthomata regression in familial hypercholesterolemia. **American Journal of Cardiology**, v.57, Is.16, p. 29H-35H, 1986. Disponível em: <<http://content.onlinejacc.org>>. Acesso em: 20/12/17.

ZHAO, L., ZHAO, P., WANG, L., MA, X., HOU, X., LI, F. A dispersive liquid-liquid microextraction method based on the solidification of a floating organic drop combined with HPLC for the determination of lovastatin and simvastatin in rat urine. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 6, p. 895 – 900, 2014

ZECEVIC, M.; JOCIC, B.; ZIVANOVIC, L.; PROTIC, A. Application of Multicriteria Methodology in the Development of Improved RP-LC-DAD for Determination of Rizatriptan and Its Degradation Products. **Chromatographia**, v. 68, n. 11, p. 911–918, 2008

ZEPON, K.M.; FRATONI, G.; BERNARDI, L.S.; REMOR, K.V.T. Validação de Metodologia Analítica para Doseamento e Estudo da Equivalência Farmacêutica de Comprimidos de Sinvastatina 20 mg. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, n. 2, p. 43 – 57, 2013