

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e validação de método discriminativo de
dissolução para comprimidos revestidos de atorvastatina cálcica
associado a dados *in vivo*.**

JAISON CARLOSSO MACHADO

PORTO ALEGRE, 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento e validação de método discriminativo de
dissolução para comprimidos revestidos de atorvastatina cálcica
associado a dados *in vivo*.**

**Dissertação apresentada por
Jaison Carlosso Machado para
obtenção do grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Profa. Dr. Nadia Maria Volpato

Porto Alegre, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Clarice Madalena Bueno Rolim
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Letícia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Machado, Jaison Carlosso
Desenvolvimento e validação de método discriminativo de dissolução para comprimidos revestidos de atorvastatina cálcica associado a dados in vivo. / Jaison Carlosso Machado. -- 2012.
157 f.

Orientadora: Nadia Maria Volpato.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. correlação in vivo in vitro. 2. dissolução . 3. validação. 4. atorvastatina. I. Volpato, Nadia Maria, orient. II. Título.

Agradecimentos

A profa. Dra. Nadia Maria Volpato pela orientação, incentivo, amizade e dedicação. Estando sempre disposta a ajudar e ensinar.

Aos professores Elfrides Shapoval e Martin Steppe pelo carinho e amizade.

As funcionárias do LCQFar Lorena Frantini e Viviane Anselmo pelo apoio, confiança e colaboração para o desenvolvimento desse projeto.

Aos meus colegas de LEPCQ por terem me recebido muito bem e pelos vários auxílios e discussões sobre diversos temas que vieram enriquecer este trabalho e a minha vida acadêmica.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela confiança, dedicação, carinho e por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos meus irmãos pela amizade, apoio, incentivo e paciência.

A minha namorada Viviane, pelo amor, compreensão, incentivo e companheirismo.

A CNPq, pela concessão da bolsa de estudo, que proporcionou o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Desenvolvimento e validação de método discriminativo de dissolução para comprimidos revestidos de atorvastatina cálcica associado a dados *in vivo*.

A atorvastatina é um dos principais fármacos hipolipemiantes da classe das estatinas, sendo atualmente, prescrita mundialmente para a redução de doenças cardiovasculares. Trata-se de um potente inibidor da enzima HMG – CoA redutase, limitando a síntese de colesterol e triglicerídeos. Mesmo sendo comercializada há praticamente 15 anos, os comprimidos revestidos de atorvastatina não estão inclusos em nenhuma farmacopéia ou compendio oficial, tendo somente uma sugestão de condição para o teste de dissolução proposto pelo FDA. Com base na sua classificação biofarmacêutica e por se tratar de um fármaco muito pouco solúvel em água, a atorvastatina torna-se um possível candidato ao desenvolvimento de um método de dissolução baseado em uma correlação *in vivo/in vitro*. Deste modo, buscou-se desenvolver um método de dissolução associado a dados *in vivo* para comprimidos de atorvastatina. Avaliou-se a solubilidade do fármaco em diferentes meios, o tipo de aparato e a velocidade de agitação. As condições selecionadas foram: equipamento pá a 50 rpm e 900 mL do meio tampão fosfato de potássio pH 6,0. O método de dissolução foi validado utilizando CLAE e espectrofotometria no UV para quantificação do fármaco dissolvido. As condições de dissolução também foram avaliadas quanto ao seu poder discriminativo, empregando-se comprimidos de dois diferentes lotes pilotos de atorvastatina e do produto referência, apresentando resultado satisfatório. Foi necessário a utilização de um fator de escala de tempo, para associar os valores de fração absorvida e fração dissolvida do fármaco, podendo se construir, então, uma correlação *in vivo/ in vitro* nível A, com coeficiente de correlação de 0,9840 para o produto referência e 0,9845 para o piloto B. Sendo assim, o teste de dissolução proposto pode ser utilizado como método discriminativo de controle de qualidade para avaliar o perfil de dissolução da atorvastatina comprimido, bem como no desenvolvimento de novas formulações.

Palavras chave: atorvastatina, dissolução, validação, correlação *in vivo in vitro*.

ABSTRACT

Development and validation of a discriminative dissolution method for atorvastatin calciumcoated tablets associated with in vivo data

Atorvastatin is a major class of lipid-lowering drugs statins, being the most widely prescribed drug in the world to reduce cardiovascular disease. It is a potent inhibitor of HMG - CoA reductase limiting the synthesis of cholesterol and triglycerides. It was approved for use by FDA in 1996 and released in the Brazilian market in 1998. Although marketed for almost 15 years, atorvastatin coated tablet is not included in any compendium official or pharmacopoeia, with only, a condition described by the FDA for the dissolution test. Based on its biopharmaceutical classification and due the very slightly soluble drug in water, atorvastatin becomes a likely candidate for the development of a dissolution test based on *in vivo in/vitro* correlation. Thus, aimed to develop a dissolution method of atorvastatin tablets associated with *in vivo* data. The solubility of the drug in different media, the type of apparatus and stirring speed were evaluated. The conditions used were: Equipment paddle at 50 rpm and 900 ml of dissolution medium containing potassium phosphate buffer pH 6.0. The dissolution method was validated using HPLC and UV spectrophotometric for the quantification of the drug dissolved. The dissolution conditions were also evaluated for their discriminative power, using two different pilot batches of atorvastatin tablets and the reference product, presenting satisfactory results. It was necessary to use a scale factor of time, to associated the values of absorbed fraction and dissolved fraction of the drug, which can be built, a correlation *in vivo/ in vitro* level A, with a correlation coefficient of 0.9840 for the reference product and 0.9845 for the pilot B, respectively. Therefore, the dissolution test proposed can be used as method of discriminating the quality control, and in the development of the new formulations.

Key words: atorvastatin, dissolution, validation, correlation *in vivo in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estrutura química da atorvastatina	21
Figura 3.1 Formação de depósitos de colesterol na artéria coronariana (retirado de http://www.andreiajoao.com.br/wp/?page_id=39 , acessado em dezembro de 2011).	32
Figura 3.2 Vias metabólicas para a síntese do colesterol.....	33
Figura 3.3 Diagrama mostrando como uma pequena cápsula, administrada logo após um sanduíche, flutua sobre o líquido acima da massa sólida.	43
Figura 4.1 Curva média da concentração plasmática <i>versus</i> o tempo da ATV após administração de dose única do produto referência e do PB (n= 61).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Descrição dos parâmetros demonstrados na equação de Noyes-Whitney e seus efeitos na cinética de dissolução.....	40
Tabela 4.1 Condições cromatográficas para o doseamento de atorvastatina cálcica.....	53
Tabela 4.2 Dados dos parâmetros farmacocinéticos da ATV após administração do produto referência, segundo o estudo de bioequivalência...	64
Tabela 4.3 Dados dos parâmetros farmacocinéticos da ATV após administração do PB, segundo o estudo de bioequivalência.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ANOVA – Análise de variância

ASC – Área sob a curva

ATV – Atorvastatina

CIVIV – Correlação *in vivo* - *in vitro*

C_{máx} – Concentração plasmática máxima

CLAE – Cromatografia líquido de alta eficiência

DAD – Detector de arranjo de diodo

DCC – Doença cardíaca coronariana

DPR – Desvio padrão relativo

FA – Fração absorvida

FGS – Fluido gástrico simulado sem enzima

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MeOH – Metanol

OMS – Organização Mundial da Saúde

PA – Piloto A

PB – Piloto B

PR – Produto referência

SCB – Sistema de classificação biofarmacêutica

SQR – Substância química de referência

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1 Aterosclerose	31
3.2 Colesterol.....	32
3.3 Estatinas	33
3.4 Atorvastatina.....	35
3.5 Desintegração e dissolução de formas farmacêuticas sólidas	36
3.6 Absorção	42
3.7 Sistema de Classificação Biofarmacêutica.....	43
3.8 Correlação <i>in vivo/in vitro</i>	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.1 MATERIAL DE ESTUDO	51
4.1.1 Substância química de referência.....	51
4.1.2 Produto farmacêutico de referência	51
4.1.3 Formulações teste	51
4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATORVASTATINA CÁLCICA	52
4.2.1 Solução amostra dos comprimidos de ATV cálcica.....	52
4.2.2 Solução padrão.....	52

4.2.3 Validação do método de doseamento da atorvastatina cálcica por CLAE	52
4.2.3.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico	53
4.2.3.2 Especificidade	53
Excipientes do conteúdo do comprimido (avaliação do placebo).....	54
Hidrólise alcalina.....	54
Hidrólise ácida	54
Oxidação com peróxido de hidrogênio	54
Fotólise	54
Estufa 60 °C.....	55
4.2.3.3 Linearidade.....	55
4.2.3.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	56
4.2.3.5 Exatidão	56
4.2.3.6 Precisão	57
4.2.3.7 Robustez	58
Variação da composição da fase móvel.....	58
Variação da vazão da fase móvel	58
4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO	58
4.3.1 Avaliação da solubilidade da atorvastatina cálcica em diferentes meios.....	58
4.3.2 Ensaio de dissolução	59
4.3.2.1 Cálculo para quantificação da ATV dissolvida	60
4.3.2.2 Avaliação das condições mais discriminantes para o método ...	61

4.3.3 Estabilidade da atorvastatina nas condições do ensaio	61
4.3.4 Método alternativo para avaliação das amostras da dissolução através de espectrofotometria ultravioleta (UV)	61
4.4 TRATAMENTO DE DADOS DO ESTUDO <i>IN VIVO</i>	62
4.4.1 Estudo de bioequivalência	62
4.4.2 Dados do estudo <i>in vivo</i>	63
4.4.3 Obtenção da fração absorvida da dose	64
4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO	65
4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria UV-Visível.....	66
4.5.1.1 Especificidade	66
4.5.1.2 Linearidade.....	66
4.5.1.3 Exatidão/Precisão.....	67
4.5.1.4 Robustez	67
4.5.1.5 Desaeração do meio de dissolução	68
4.5.1.6 Avaliação da presença de filtros	68
4.6 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO	68
4.7 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTOS DE CLAE E UV	69
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo se sabe que existe uma relação linear entre os níveis de colesterol sérico e incidência das doenças cardiovasculares (LAW, 2002), quanto maior o valor de LDL, maior o risco de aterosclerose. As causas da aterosclerose podem ser de origem genética, mas o principal motivo para o acúmulo é comportamental. Obesidade, sedentarismo, tabagismo, hipertensão, colesterol alto e consumo excessivo de álcool são as principais razões para a ocorrência de entupimento das artérias (BRASIL, 2011).

Os principais métodos de tratamento da hiperlipidemia são mudanças na dieta e estilo de vida e a administração de fármacos hipolipemiantes. Os principais grupos de agentes hipolipidêmicos são sequestradores de ácidos biliares, derivados do ácido fíbrico, estatinas, derivados do ácido nicotínico, probucol e ômega-3. As estatinas são os mais eficazes hipolipidêmicos entre todos estes agentes (PASHA *et al.*, 2006).

A atorvastatina (ATV), Figura 1.1, é um potente inibidor da enzima HMG-CoA redutase, atua limitando a taxa de biossíntese desta enzima, demonstrando eficiência tanto na redução do colesterol como de triglicerídeos (MA *et al.*, 2007). A ATV é um fármaco sintético, altamente efetivo na redução do colesterol LDL, da lipoproteína B e triglicerídeos e ainda aumenta o nível do colesterol HDL no tratamento das hiperlipidemias (NIGOVIC *et al.*, 2009).

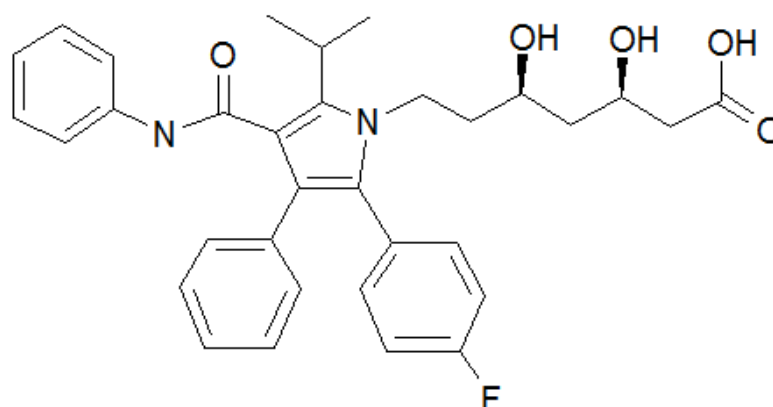


Figura 1.1 Estrutura química da atorvastatina

Os ensaios de dissolução *in vitro* possuem um papel de destaque dentre os diferentes testes de controle de qualidade requeridos para medicamentos.

Estes testes visam assegurar a qualidade lote a lote, orientar o desenvolvimento de novas formulações, garantir a uniformidade da qualidade e o desempenho do medicamento depois de determinadas alterações, além de indicar problemas potenciais de biodisponibilidade e até substituir um estudo de bioequivalência (FDA 1997a; BRASIL 2002b).

Na indústria farmacêutica, o teste de dissolução é muito importante no desenvolvimento de formas sólidas e no controle de qualidade de produtos. Essa grande atenção à cinética de dissolução de formas farmacêuticas sólidas é devido à relação deste fenômeno com a biodisponibilidade de fármacos no organismo (SIEWERT *et al.*; 2003; BROWN *et al.*, 2004), principalmente para moléculas com baixa solubilidade em água, como é o caso da ATV cálcica, onde a existência de potenciais problemas da formulação e tecnológicos, podem resultar em relevante alteração da biodisponibilidade. Uma vez que, a ATV é um fármaco que apresenta estas características físico-químicas, torna-se importante controlar a sua dissolução, de modo a assegurar a disponibilidade *in vivo*.

Alguns estudos de dissolução da atorvastatina foram realizados nos últimos anos (PALEM *et al.*, 2003; AHJEL & LUPULESA, 2009; NARASIAH *et al.*, 2011), cujo foco estava voltado para a avaliação do comportamento físico-químico de diferentes formulações, sem haver qualquer relação com o comportamento do fármaco *in vivo*. Ahjel & Lupulesa (2009) e Narasaiah *et al.* (2011) utilizaram como meio de dissolução 900 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,8 e fluido gástrico simulado pH 1,2, respectivamente, nos seus métodos de dissolução e ambos empregaram o equipamento pá a 50 rpm. Palem *et al.* (2003) seguiram as condições recomendadas pelo FDA.

Portanto, no presente trabalho, pretendeu-se desenvolver um método de dissolução que demonstrasse as características de liberação da ATV de acordo com um modelo de liberação *in vivo*, onde os dados de fração dissolvida foram comparados aos dados de fração absorvida, a fim de se estabelecer uma correlação *in vivo/in vitro*. Esta associação entre os dados de dissolução *in vivo* e *in vitro* para a atorvastatina não foi conduzida em nenhum dos estudos

realizados até o momento, reforçando assim a necessidade de se desenvolver um estudo de dissolução que apresente estas características.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar ensaio de dissolução discriminativo baseado em dados *in vivo* para o controle de qualidade da atorvastatina cálcica na forma de comprimido oral, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria na região do UV-visível, na quantificação do fármaco.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método de doseamento para atorvastatina por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Verificar a solubilidade da atorvastatina em diferentes meios de dissolução;
- Validar o ensaio de dissolução utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria na região do UV-visível;
- Comparar estatisticamente os resultados dos métodos analíticos utilizados no doseamento das amostras referentes ao ensaio de dissolução;
- Validar um ensaio de dissolução discriminativo através do estabelecimento de uma correlação *in vivo* – *in vitro*;
- Comparar os perfis de dissolução do medicamento referência com dois diferentes lotes pilotos a serem testados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aterosclerose

A doença cardiovascular é a principal razão de óbito no mundo ocidental, sendo a aterosclerose a principal razão das doenças cardíacas coronarianas (DCC) e infarto do miocárdio. A hipercolesterolemia é um fator crucial no desenvolvimento da aterosclerose em geral e das DCC, sendo que o risco de progressão da aterosclerose aumenta progressivamente com níveis crescentes de colesterol total ou lipoproteína de baixa densidade. Transtornos genéticos e estilo de vida (sedentarismo e dieta rica em calorias, gordura saturada e colesterol) também contribuem para as dislipidemias vistas nos países desenvolvidos ao redor mundo (LENNERNÄS, 2003; GOODMAN AND GILMAN, 2005).

A elevação da concentração de lipídios no plasma é a manifestação de uma desordem na síntese e degradação de lipoproteínas do plasma. Os principais lipídios relevantes nas hiperlipidemias são o colesterol e os triglicerídeos. O colesterol desempenha um papel crucial na manutenção da integridade das membranas celulares e funções fisiológicas no sangue, incluindo a síntese de hormônios esteróides. Por outro lado, quando presente em excesso, ele é captado pelos fibroblastos e macrófagos, formando na camada íntima da artéria a placa aterosclerótica. Aterosclerose é fortemente determinada pela presença aumentada de lipoproteína de baixa densidade (LDL), cujo principal componente é o colesterol e tem como função transportá-lo para os tecidos periféricos, gerando depósitos de gordura, conforme a Figura 3.1. O colesterol entra na circulação de duas formas principais: absorvido pela ingestão alimentar (via exógena), através de alimentos de origem predominantemente de origem animal e sintetizado pelo fígado (via endógena) (PASHA *et al.*, 2006; SILVA, 2006).

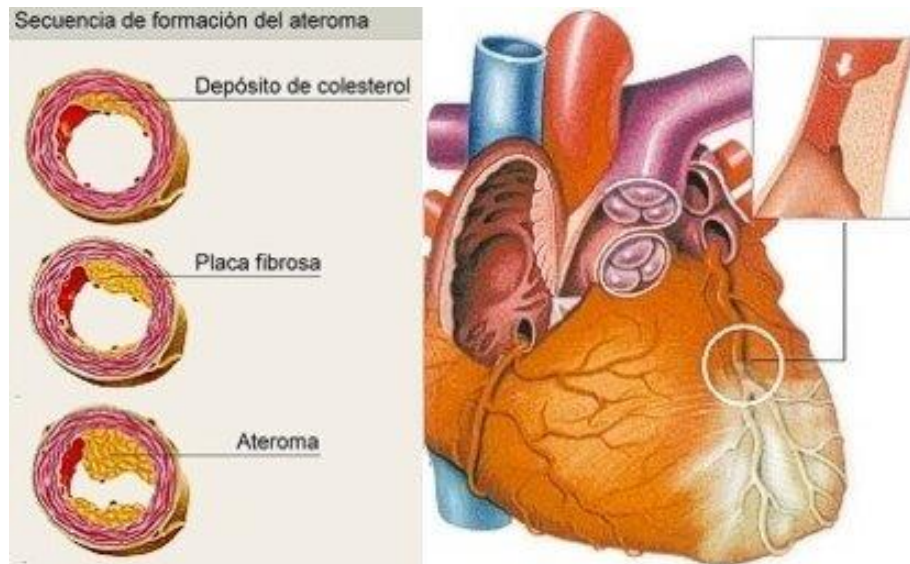


Figura 3.1 Formação de depósitos de colesterol na artéria coronariana (retirado de http://www.andreiajoao.com.br/wp/?page_id=39, acessado em dezembro de 2011).

3.2 Colesterol

O colesterol é sintetizado a partir da acetil-CoA (que pode ser derivada de hidratos de carbono, de aminoácidos ou de ácidos graxos). O fígado é o principal local da síntese do colesterol, mas também pode ser sintetizado no intestino ou em glândulas que produzem hormônios esteróides. Todas as reações biossintéticas ocorrem no compartimento citoplasmático das células, mas algumas das enzimas necessárias estão ligadas às membranas do retículo endoplasmático. A síntese desenvolve-se em três etapas cruciais conforme esquematizado na Figura 3.2.

Primeiramente ocorre a formação do hidroximetilglutaril-CoA (1), logo em seguida a formação do ácido mavelônico (mavelonato) (2) e finalmente a síntese do colesterol (3).

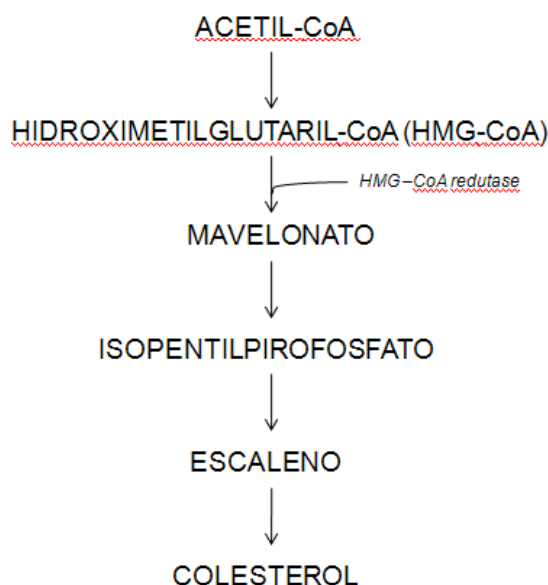


Figura 3.2 Vias metabólicas para a síntese do colesterol

A diminuição da síntese endógena do colesterol no fígado é dependente da capacidade de inibição da enzima HMG-CoA redutase, uma proteína que regula a conversão da HMG-CoA em ácido mavelônico (via do mavelonato). As estatinas, por meio de uma afinidade com o sítio ativo da enzima, por sua semelhança estrutural com a HMG-CoA redutase, ligam-se a enzima, diminuindo a disponibilidade desta na etapa crucial para a sequência de reações que leva a formação do colesterol (FONSECA, 2005; RAHIMI & LEOF, 2007; KRACUN *et al.*, 2009).

3.3 Estatinas

Endo e Kuroda descobriram as estatinas em 1973 quando buscavam metabólitos microbianos que inibissem competitivamente a HMG-CoA redutase. As primeiras estatinas de origem natural, lovastatina, pravastatina e sinvastatina, derivam de extratos fúngicos modificados (DUJOVNE & MORIATRY, 1996). As mais recentes estatinas, fluvastatina, cerivastatina, atorvastatina, (p)itavastatina e rosuvastatina, são compostos totalmente sintéticos (WIERZBICKI *et al.*, 2003; LAWS *et al.*, 2004).

Estatinas como a sinvastatina, lovastatina, fluvastatina e atorvastatina são compostos lipofílicos e, portanto difundem-se livremente para dentro das

células. Em compensação, a pravastatina e a rosuvastatina são compostos hidrofílicos e penetram nas células com auxílio de mecanismos específicos de transporte. Todas as estatinas, com exceção da pravastatina, são largamente ligadas às proteínas plasmáticas (principalmente à albumina) (WIERZBICKI *et al.*, 2003; LAWS *et al.*, 2004). A extensão da absorção das estatinas varia consideravelmente (30 a 98%) e são rapidamente absorvidas logo após a administração por via oral atingindo as concentrações máximas em torno de 4 horas após sua administração (CORSINI *et al.*, 1999).

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

Grandes ensaios clínicos randomizados têm demonstrado que as estatinas reduzem a morbidade e a mortalidade cardiovascular em pacientes com dislipidemia (LAROSA *et al.*, 1999), mesmo naqueles sem doença cardiovascular estabelecida (BRUGTS *et al.*, 2009). As estatinas (3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A – HMG-CoA) constituem a classe de hipolipemiantes mais prescrita em todo o mundo para a redução do risco cardiovascular e progressão anatômica da aterosclerose. Estes benefícios têm sido atribuídos, principalmente, a sua notável diminuição do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL), através do bloqueio da síntese do colesterol pela inibição da enzima HMG-CoA redutase. Entretanto, as estatinas diferem em sua capacidade de inibição da síntese de colesterol em vários aspectos farmacocinéticos como: solubilidade, biotransformação e excreção (FONSECA *et al.*, 2005, MA *et al.*, 2007).

Os principais efeitos adversos devido ao uso das estatinas são a elevação dos níveis da transaminase hepática, miopatia, catarata, distúrbios gastrintestinais, tonteira e visão embaçada (MARTINDALE, 1999; NCEP, 2001). A miopatia associada com a elevação de creatinocinase, dentre todos os fatores, é a de maior significância, sendo caracterizada por mialgia intensa e

fadiga. Não há diferenças significativas entre as estatinas no potencial de causar efeitos adversos. São contra-indicadas, principalmente, na presença de doenças hepáticas (MARON *et al.*, 2000; PASTERNAK *et al.*, 2002).

Devido ao aumento do risco de causar miopatia, as estatinas não são usadas em associação com outras estatinas (MARTINDALE, 1999; PASTERNAK *et al.*, 2002), mas são empregadas associadas a inibidores da absorção do colesterol (ezetimibe) ou outras classes de fármacos como anti-hipertensivos (valsartana) e antitrombóticos (ácido acetilsalicílico).

3.4 Atorvastatina

Dentro da classe das estatinas, a atorvastatina é o derivado com maior eficácia terapêutica. Foi demonstrado que ocorre uma maior redução nos níveis do colesterol LDL e de triglicerídeos quando comparado às outras estatinas (MALINOWSKI, 1998). É a principal molécula entre as estatinas, apresenta-se na forma de sal cálcico do ativo hidróxi ácido, sendo usada entre 10 e 80 mg por dia para o tratamento da hipercolesterolemia familiar moderada ou não familiar grave (CILLA *et al.*, 1996; ERTURK *et al.*, 2003; LENNERNAS, 2003; KHAN & DEGHAN, 2011).

A ATV, (R-(R*R*))⁻²-(4-fluorofenil)-β,δ-dihidroxi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4-((fenilamino)carbonil)-1H-pirrole-1-ácido heptanóico, constitui uma molécula totalmente sintética e sua estrutura difere das estatinas derivadas de fungos, como a lovastatina. É um composto relativamente lipofílico, portanto é facilmente difundido para dentro das células. Sua estrutura química governa a sua solubilidade aquosa, que por sua vez, influencia na absorção, distribuição, metabolismo e excreção (LAWS *et al.*, 2004; PASHA *et al.*, 2006; KRACUN *et al.*, 2009).

ATV é um ácido mono-carboxilado com um pKa de 4,46 e é normalmente usada na forma de sal cálcico triidratado. Apresenta-se sob a forma de pó cristalino insolúvel em soluções aquosas com pH inferior a 4,0. Pouco solúvel em água e tampão fosfato (pH 7,4) e facilmente solúvel em metanol. É instável quando em presença de calor, luz e umidade. Quando se

apresenta sob a forma de comprimidos, pós, grânulos ou em cápsulas corre o risco da forma hidróxi ácida ser convertida na forma lactona. Como a forma ácida possui um ácido livre em sua molécula, ela é cerca de 15 vezes mais solúvel que a forma lactona (HUSSEIN *et al.*, 2011; KHAN & DEGHAN, 2011). *In vivo* a atorvastatina é convertida para a forma de lactona e estas duas formas aparentemente possuem a mesma área sob a curva (ASC) (KEARNEY *et al.*, 1993; KANTOLA *et al.*, 1998).

A ATV é absorvida na forma de ácido livre e sofre metabolismo de primeira passagem o que resulta em concentrações plasmáticas muito baixas. O metabolismo no fígado produz dois metabólitos ativos, o o-hidroxiartovastatina e o p-hidroxiatorvastatina e três metabólitos inativos correspondentes à lactona. Cerca de 70% da atividade inibitória da HMG-CoA redutase é representada pelos metabólitos ativos (PARKE-DAVIS, 2004; NIROGI *et al.*, 2006).

A ATV é rapidamente absorvida após administração via oral, entretanto devido à liberação pré-sistêmica na mucosa gastrointestinal e metabolização no fígado, a fração absorvida e biodisponibilidade absoluta da atorvastatina são aproximadamente 30 e 12% respectivamente (BAHRAMI *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2007).

3.5 Desintegração e dissolução de formas farmacêuticas sólidas

Os comprimidos de administração oral continuam sendo a forma farmacêutica mais utilizada para administração de fármacos. Apesar das vantagens oferecidas por esta forma farmacêutica, os problemas associados a fatores de formulação permanecem até certo ponto desconhecidos. No caso de comprimidos de liberação imediata as propriedades de liberação são principalmente influenciadas pela desintegração da forma farmacêutica sólida e dissolução do fármaco a partir da desintegração das partículas. Em alguns casos, onde a desintegração é lenta, a taxa de dissolução pode depender do processo de desintegração, e nestes casos a desintegração pode influenciar na

liberação sistêmica e, por sua vez, afetar os resultados de biodisponibilidade e bioequivalência (DRESSMAN & KRAMER, 2005).

As mencionadas desintegração e dissolução são parâmetros de grande importância no desenvolvimento estratégico de um produto, com a desintegração sendo considerada muitas vezes um processo de primeira ordem e a dissolução das partículas do fármaco sendo proporcional à diferença de concentração entre a superfície das partículas e a solução constituinte do meio. Geralmente a desintegração reflete o efeito da formulação e das variáveis do processo de produção, enquanto que a dissolução das partículas do fármaco reflete principalmente o efeito da solubilidade e do tamanho de partícula, que são em grande parte propriedades do próprio fármaco, mas também pode ser influenciada significativamente pela formulação e o processo de produção (DRESSMAN & KRAMER, 2005).

A arte e a ciência do ensaio de dissolução percorreram um longo caminho desde a sua criação há mais de 30 anos atrás. Um procedimento de dissolução adequado é um simples e econômico método que pode ser utilizado efetivamente para assegurar produtos farmacêuticos com qualidades aceitáveis e o desempenho do produto. O teste de dissolução encontra aplicação como uma ferramenta no desenvolvimento de um medicamento, no controle em processos de fabricação, para liberação de lotes, como forma de identificar potenciais problemas de biodisponibilidade e avaliar a necessidade de novos estudos de bioequivalência relativo a alterações de escala, alterações pós-registro e para sinalizar possíveis formulações bioequivalentes (DRESSMAN & KRAMER, 2005; CHILUKURI *et al.* 2007).

Pode também nos fornecer informações a respeito da característica biofarmacêutica do produto, tais como a taxa e a extensão da absorção, ou seja, avaliar a capacidade da forma farmacêutica de liberar totalmente o fármaco e simultaneamente indicar como o produto irá se comportar *in vivo*. Seria, portanto, desejável desenvolver ensaios de dissolução que avaliassem a capacidade da forma farmacêutica de liberar totalmente o fármaco e,

simultaneamente, indicar como o produto irá comportar-se *in vivo* (DRESSMAN & LENNERNAS, 2000).

O ensaio de dissolução mede a velocidade e a extensão da quantidade de fármaco que se dissolve, em um meio aquoso, na presença de um ou mais excipientes contidos na forma farmacêutica avaliada (FDA, 1997a; DRESSMAN & KRAMER, 2005). De fato, o teste ou ensaio determina a porcentagem da quantidade de fármaco, em relação ao declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro de um determinado período de tempo, e submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais definidas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; USP 34, 2011).

Os ensaios de dissolução *in vitro* são usados desde o início do desenvolvimento da forma farmacêutica e em todas as fases subsequentes. É empregado para diversos fins e os métodos mais adequados dependem da finalidade específica do teste. Por exemplo, simplicidade e robustez são propriedades essenciais em um método de controle de qualidade, enquanto a relevância fisiológica prevalece sobre estes fatores se o método for utilizado para predições *in vivo* (DRESSMAN & LENNERNAS, 2000).

Os atuais testes de dissolução compendiais foram em sua maior parte desenvolvidos com o objetivo de estudar as propriedades físicas da forma farmacêutica. A primordial preocupação com o teste de controle de qualidade é a utilização de condições em que 100% do fármaco possa ser liberada. Além disso, considerações importantes são a confiabilidade e a reprodutibilidade do teste, e principalmente, a possibilidade de automatizar o ensaio. Conseqüentemente a utilização de meios mais simples é preferido (DRESSMAN & LENNERNAS, 2000).

Quando o teste de dissolução indicar as propriedades biofarmacêuticas da forma farmacêutica, é mais importante que o mesmo simule o ambiente do TGI do que necessariamente atinja a condição *sink* para a liberação do fármaco. Conseqüentemente, nem sempre é possível satisfazer às

necessidades da garantia da qualidade e os aspectos biofarmacêuticos com um teste de dissolução (DRESSMAN & LENNERNAS, 2000).

Existem vários fatores que influenciam o ensaio de dissolução, preponderando o meio dissolvente, a velocidade de agitação e o tipo de equipamento, os quais devem ser atenciosamente observados e investigados, com o intuito de que o mesmo possa ser considerado uma estimativa de dissolução *in vivo* (SKOUG *et al.*; 1997; USP 34, 2011).

A velocidade de dissolução de uma partícula de fármaco é determinada pela velocidade de difusão das moléculas do soluto através de uma camada fina de fármaco-solução que envolve a superfície da partícula, chamada camada de difusão. É a partir dessa camada que as moléculas do fármaco passam através do líquido solvente e entram em contato com as membranas biológicas para serem absorvidas (ABDOU, 2000; ABRAHAMSSON, 2000). De acordo com a equação de Noyes-Whitney (equação 1), descrita pela primeira vez em 1897, onde avaliou-se a velocidade de dissolução para as formas farmacêuticas sólidas:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D \times A (C_s - C)}{h} \quad \text{equação 1}$$

A taxa de dissolução (dc/dt) de um fármaco cristalino é proporcional a sua solubilidade (C_s), área superficial (A) e coeficiente de difusão (D). Também é dependente das condições hidrodinâmicas, mas de uma maneira menos compreendida. O quadro 3.1 comenta cada um dos parâmetros da equação, bem como o efeito na velocidade de dissolução quando alterado algum destes parâmetros.

Quadro 3.1 Descrição dos parâmetros demonstrados na equação de Noyes-Whitney e seus efeitos na cinética de dissolução.

Parâmetro da equação	Comentários	Efeito na velocidade de dissolução
D (constante de difusão do fármaco)	Pode decrescer na presença de substâncias que aumentam a viscosidade do meio	Diminui a velocidade
A (Área superficial da partícula)	Aumenta quando micronizada e em fármacos amorfos	Aumenta a velocidade
h (Espessura da camada de difusão)	Decresce com a agitação crescente no organismo ou na cuba de dissolução	Aumenta a velocidade
C _s (Concentração de saturação)	Alterada em eletrólitos fracos por mudanças no pH.	Aumenta ou diminui a velocidade
C _t (Concentração do fármaco no tempo t)	Diminui com a entrada de fluidos no estomago, pela remoção da fármaco por partição ou absorção	Aumenta a velocidade

O teste de dissolução deve ser um método discriminativo capaz de detectar mudanças na formulação, no processo de fabricação e nas características físico-químicas do fármaco (polimorfismo, estado de hidratação, tamanho de partícula) uma vez que essas alterações podem afetar a solubilidade e o desempenho *in vivo* do produto (USP 34, 2011).

Uma adequada biodisponibilidade oral é um pré-requisito chave para qualquer fármaco administrado via oral ser efetivo sistemicamente. A dissolução (liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica) é de

primordial importância para todas as formas sólidas em geral e para as formas de liberação modificada em particular, podendo ser a etapa limitante para a taxa de absorção dos medicamentos administrados por via oral. Fisico-quimicamente, dissolução é um processo pelo qual uma substância sólida entra numa fase solvente para se obter uma solução (DRESSMAN & KRAMER, 2005).

Três categorias de especificações da dissolução *in vitro* são estabelecidas para garantir consistência de qualidade lote-a-lote e para indicar potenciais problemas de biodisponibilidade (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

- *Especificação de um único ponto*

A especificação de um único ponto é adequada para testes de controle de qualidade de rotina, para uniformidade lote-a-lote e para formas farmacêuticas de liberação imediata, contendo fármaco altamente solúvel e que se dissolve rapidamente, (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

- *Especificação de dois pontos*

Além de caracterizar a qualidade do medicamento, também é útil como teste de controle de qualidade de rotina para alguns tipos de medicamentos como, por exemplo, fármacos pouco solúveis em água que se dissolvem lentamente (FDA, 1997a; BRASIL, 2002b).

- *Perfil de dissolução*

A avaliação do perfil de dissolução permite observar como se desenvolve a dissolução do fármaco em função do tempo, sendo assim, é mais conclusiva em relação à dissolução de um único ponto (USP 34, 2011).

A comparação dos perfis de dissolução é útil no caso em que se deseja conhecer o comportamento de dois produtos antes de submetê-los a ensaios de biodisponibilidade relativa/bioequivalência, para isentar as menores dosagens desses estudos e nos casos de alterações pós-registro, além de servir como suporte em outras disposições a respeito do estudo de bioequivalência (FDA, 1997a; BRASIL, 2004).

3.6 Absorção

A maioria dos fármacos que são administrados através da via oral são moléculas pequenas que podem permear a membrana intestinal por difusão passiva transcelular. Este processo é determinado por leis físico-químicas e pelas propriedades das células intestinais. Além de sua permeabilidade através da parede do intestino, a disponibilidade de um fármaco no organismo depende da sua capacidade de dissolver-se nos fluidos gastrintestinais. Isso também pode ser influenciado por fatores fisiológicos e físico-químicos (DRESSMAN & LENNERNAS, 2000).

Quando o processo de dissolução das partículas do fármaco ocorre de forma rápida, a sua velocidade de absorção torna-se primeiramente dependente da sua capacidade de atravessar a membrana gastrintestinal (permeabilidade) e também do esvaziamento gástrico. Entretanto, quando a velocidade de dissolução é lenta, devido às características físico-químicas do fármaco ou da forma farmacêutica, a etapa limitante para a absorção é a velocidade de dissolução (SIRISUTH & EDDINGTON, 2004; AULTON, 2005).

Estudos do efeito da alimentação na absorção de fármacos são realizados, geralmente, no período de desenvolvimento de novos medicamentos. A interação fármaco-alimento é de difícil previsão e ocorre por uma variedade de razões, tais como alterações fisiológicas (motilidade intestinal, fluxo sanguíneo, etc) e/ou físico-químicas (quelação, adsorção etc), podendo aumentar, retardar ou diminuir, ou mesmo não afetar a absorção de fármacos (FILHO & STORPIRITS, 2009). A Figura 3.3 demonstra uma pequena cápsula administrada logo após uma refeição, flutuando sobre o líquido gástrico, acima da massa sólida e aderida à parede estomacal. Este episódio pode levar a diferentes velocidades de liberação do fármaco e conseqüentemente influenciar na absorção do mesmo.

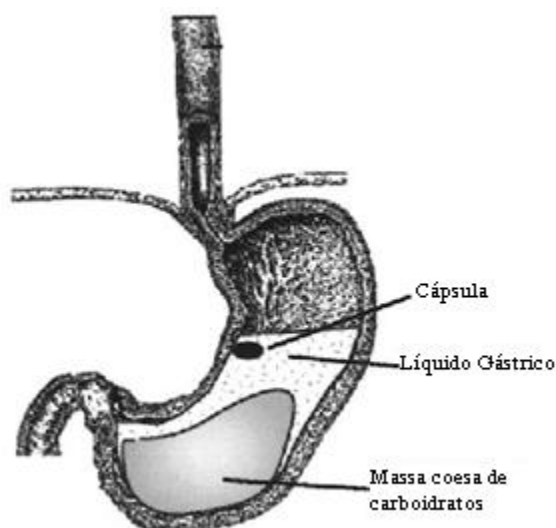


Figura 3.3 Diagrama mostrando como uma pequena cápsula, administrada logo após um sanduíche, flutua sobre o líquido acima da massa sólida.

3.7 Sistema de Classificação Biofarmacêutica

Um sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) de fármacos foi desenvolvido por Amidon e colaboradores em 1995. Tendo como premissa que a solubilidade e a permeabilidade gastrointestinal são características específicas do fármaco, esses autores propuseram que se pode prever, com maior grau de assertividade, que variáveis como formulação, presença de alimentos e esquemas de dosagem irão influenciar a absorção do fármaco (MARTINEZ & AMIDON, 2002).

Atualmente as substâncias ativas farmacêuticas são classificadas em uma das seguintes categorias:

Classe I	Alta solubilidade/alta permeabilidade
Classe II	Baixa solubilidade/alta permeabilidade
Classe III	Alta solubilidade/baixa permeabilidade
Classe IV	Baixa solubilidade/baixa permeabilidade

Esta classificação pode ser utilizada na definição de especificações para o teste de dissolução e também pode ajudar na previsão de se obter correlação *in vivo/in vitro*. Para esta classificação, a solubilidade do fármaco é

determinada por meio da solubilização da maior dose disponível do produto em 250 mL de meio de dissolução com pH na faixa de 1,0 a 7,5. A substância é considerada altamente solúvel quando a maior dose se dissolve em 250 mL ou um volume menor de meio de dissolução. Alta permeabilidade é quando o grau de absorção do fármaco no ser humano é superior a 90% da dose administrada (FDA, 2000).

O conhecimento relacionado à solubilidade, permeabilidade, dissolução e a farmacocinética do fármaco deve ser considerado para a definição de especificações de dissolução (FDA, 1997a).

3.8 Correlação *in vivo/in vitro*

Um desafio que permanece na investigação biofarmacêutica é a correlação de perfis de liberação do fármaco *in vitro* com os dados farmacocinéticos *in vivo*. Correlação *in vivo/in vitro* (CIVIV) foi definida pelo FDA como um “modelo matemático preditivo que descreve a relação entre uma propriedade da forma farmacêutica *in vitro* e uma resposta *in vivo*”. A USP 34 também define CIVIV como sendo “o estabelecimento de uma relação entre uma propriedade biológica, ou um parâmetro derivado de uma propriedade biológica produzida a partir de uma forma farmacêutica e uma propriedade físico-química da mesma forma farmacêutica”. O conceito por trás estabelece que na correlação CIVIV a dissolução *in vitro* pode servir como substituto aos estudos farmacocinéticos em humanos, podendo reduzir o número de estudos de bioequivalência durante a aprovação inicial do processo, bem como nas alterações de escalas e nos pós-registros.

Nos últimos anos os custos de estudos farmacocinéticos têm aumentado drasticamente. Estudos que substituem na totalidade os modelos animais são muitas vezes insatisfatórios. Embora algumas espécies possuam trato gastrointestinal (TGI) semelhantes aos dos seres humanos, diferenças em pequenos elementos podem levar a uma não correlação entre os modelos animais e humanos. Além disso, considerações éticas exigem que o número de animais utilizados em pesquisa deve ser reduzido, portanto há um crescente

interesse no desenvolvimento de testes de dissolução para estabelecer CIVIV (DRESSMAN & LENNERNAS, 2000).

Especificamente, a CIVIV refere-se ao estabelecimento de uma relação racional entre as propriedades biológicas, ou parâmetros derivados destas, produzidas por uma forma farmacêutica e suas propriedades ou características físico-químicas. As propriedades biológicas mais comumente utilizadas são um ou mais parâmetros farmacocinéticos, tais como área sob a curva de concentrações plasmáticas do fármaco *versus* o tempo (ASC) ou concentração plasmática máxima ($C_{máx}$), obtidos após a administração da forma farmacêutica. A característica físico-química mais empregada é o comportamento da dissolução *in vitro* (isto é, porcentagem do fármaco dissolvido sob condições experimentais determinadas). A relação entre as duas propriedades, biológica e físico-química, é então expressa quantitativamente (BRASIL, 2002a).

Normalmente se desenvolve uma CIVIV quando a dissolução do fármaco é a etapa limitante da absorção *in vivo*. É improvável que se possa estabelecer uma correlação para fármacos que apresentam liberação imediata e alta solubilidade em água, onde a velocidade de absorção depende apenas da permeabilidade e do tempo de esvaziamento gástrico. Já para fármacos que possuem baixa solubilidade em água, cuja velocidade de dissolução é a etapa limitante da absorção, existe a possibilidade de se estabelecer uma CIVIV (FDA 1997a; SIRISUTH & EDDINGTON, 2004)

Dois tipos de relacionamentos em geral podem ser estabelecidos entre a dissolução *in vitro* e a biodisponibilidade *in vivo*: (1) CIVIV e (2) associações *in vivo/in vitro*. No primeiro, um ou mais parâmetros *in vitro* são correlacionados com um ou mais parâmetros *in vivo* do produto. No caso das associações *in vivo/in vitro*, o desempenho *in vivo* e *in vitro* de formulações diferentes estão de acordo, mas uma correlação não existe por si só. Também podem existir situações em que nenhuma correlação ou associação é possível entre os dados *in vivo* e *in vitro* (CHILUKURI *et al.*, 2007).

Em casos de desenvolvimento de formulações farmacêuticas, a relação entre a liberação do fármaco *in vitro* e a performance farmacêutica *in vivo* precisam estar dentro dos critérios de aceitação indicados pelo FDA para a indústria.

Quatro níveis de CIVIV são descritos por SHARGEL & YU, 2005; SIRISUTH & EDDINGTON, 2004; UPPOOR, 2001; BRASIL, 2002a e FDA, 1997b.

- *Correlação nível A*

Representa uma relação ponto a ponto entre os dados de fração dissolvida *in vitro*, a partir da forma farmacêutica, e a fração absorvida *in vivo*. É o nível de correlação mais alto. Geralmente esta correlação é linear, entretanto, correlações não - lineares são aceitáveis.

- *Correlação nível B*

Este nível de correlação compara o tempo médio de dissolução *in vitro* com o tempo de residência ou o tempo de dissolução *in vivo*. Não representa uma correlação ponto a ponto, uma vez que a curva de concentração plasmática versus tempo não é completamente descrita pelo tempo médio de residência.

- *Correlação nível C*

Estabelece uma relação entre quantidade de fármaco dissolvido e um parâmetro farmacocinético, como ASC, $T_{m\acute{a}x}$, ou $C_{m\acute{a}x}$. É considerado o nível de correlação mais baixo, não permitindo prever o real desempenho *in vivo* do fármaco.

- *Nível C múltiplo*

É uma correlação que relaciona um ou mais parâmetros farmacocinéticos versus a fração de fármaco dissolvida em vários pontos do perfil de dissolução. Este nível de correlação é mais significativo que o nível C.

De acordo com a literatura, até o presente momento, poucos estudos envolvendo a dissolução da atorvastatina foram realizados. Em 2004 o FDA disponibilizou as condições do ensaio de dissolução para os comprimidos de ATV, sugerindo a utilização do aparato pá a uma rotação de 75 rpm e como meio de dissolução 900 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,8. Alguns autores como Narasaiah e colaboradores (2011), Ahjel & Lupulesa (2009), Kim e colaboradores (2008) e Palem e colaboradores (2003), demonstram condições distintas a fim de serem empregadas nos ensaios de dissolução. Estes testes tem como finalidade avaliar o comportamento das diversas formulações de comprimidos de atorvastatina cálcica, as quais apresentam diferenças quanto à formulação qualitativamente e também alusiva ao processo de fabricação. Porém nenhuma das condições apresentadas levou em consideração as características de dissolução *in vivo* do fármaco, avaliando apenas as características físico-químicas referentes às formulações.

Assim sendo, há cada vez mais uma necessidade de criar ferramentas confiáveis de maneira a correlacionar liberação *in vivo* e *in vitro* do fármaco. Essa ferramenta diminui o período de desenvolvimento de um novo produto farmacêutico, diminui custos e leva a uma melhor qualidade do produto. Um aumento no desenvolvimento das CIVIV indica o valor da CIVIV para a indústria farmacêutica. A CIVIV pode ser utilizada no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos reduzindo assim o estudo em seres humanos durante o desenvolvimento de formulações, sendo o seu principal objetivo servir como um substituto para os testes de biodisponibilidade *in vivo* e apoiar a isenção dos estudos de bioequivalência. A CIVIV sustenta e/ou valida o uso dos métodos de dissolução e as definições da especificação, isto porque inclui relevância *in vivo* para especificações de dissolução *in vitro* (EMAMI, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL DE ESTUDO

4.1.1 Substância química de referência

Como substância química de referência (SQR) utilizou-se atorvastatina cálcica triidratada, lote 039024/2010, gentilmente cedido por um laboratório colaborador. O teor de 99,85% foi devidamente avaliado a partir do padrão de atorvastatina cálcica triidratada USP identificado pelo lote 1044516.

4.1.2 Produto farmacêutico de referência

Comprimidos revestidos de atorvastatina cálcica (referência), lote 0691060, foram obtidos junto ao mercado local para os testes *in vitro*.

Cada comprimido revestido do produto referência (PR) de atorvastatina cálcica 80 mg contém: Atorvastatina cálcica, carbonato de cálcio, celulose microscristalina, lactose monoidratada, croscarmelose sódica, polissorbato 80, hiprolose, estearato de magnésio, corante branco Opadry® (hipromelose, macrogol, dióxido de titânio e talco), emulsão simeticona (simeticona, estearato emulsificante, ácido sórbico e água).

4.1.3 Formulações teste

Duas formulações teste de comprimidos revestidos de atorvastatina cálcica, piloto A (PA) e piloto B (PB), mais os placebos das duas respectivas formulações, também foram gentilmente cedidos pelo laboratório colaborador do projeto.

Cada comprimido dos lotes piloto PA e PB de atorvastatina cálcica contém: atorvastatina cálcica, carbonato de cálcio, celulose microscristalina, lactose, croscarmelose sódica, polissorbato 80, hidroxipropilmetilcelulose, estearato de magnésio, corante branco Opadry YS-7003 e emulsão simeticonada.

O que difere entre as formulações PA e PB é a quantidade de croscarmelose sódica, com uma diferença de 3,0% de uma formulação em relação à outra.

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATORVASTATINA CÁLCICA

4.2.1 Solução amostra dos comprimidos de ATV cálcica

Transferiu-se quantitativamente o equivalente a 25 mg de ATV a partir de um pool de vinte comprimidos, para balão volumétrico de 50 mL, com auxílio de um diluente (metanol:água – 50:50 v/v). A solução foi homogeneizada, filtrada e armazenada sob-refrigeração e protegida da luz por um período não superior a sete dias.

4.2.2 Solução padrão

A solução estoque foi preparada pesando-se exatamente 25,86 mg da substância química de referência de atorvastatina cálcica triidratada, correspondente a 25,0 mg de atorvastatina e diluída com diluente, metanol:água (50:50 v/v), obtendo uma concentração de 500 µg/mL. A solução estoque permaneceu armazenada por um período não superior a sete dias, protegida da luz e a uma temperatura entre 2 – 8 °C.

4.2.3 Validação do método de doseamento da atorvastatina cálcica por CLAE

Para análise do fármaco utilizou-se cromatógrafo líquido modelo Shimadzu (Kyoto, Japão) composto de uma bomba LC-20AT, detector de arranjo de diodos (DAD), sistema controlador CBM 20A, desgaseificador prominence DGU-20A₅, forno para coluna CTO-20AC e um auto-injetor SIL-20AC. Os dados foram obtidos e processados utilizando software LC Solution.

Foram utilizados reagentes grau CLAE e água ultrapura obtida por sistema MILLI-Q PLUS (Millipore®, Milford, MA, EUA). As condições cromatográficas selecionadas no método de doseamento da atorvastatina por CLAE estão representadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Condições cromatográficas para o doseamento de atorvastatina cálcica

Coluna	Xbridge C ₁₈ 250 x 4,6 mm 5 µm
Fase móvel	Tampão acetato de sódio pH 4,2:acetonitrila (45:55)
Diluente	Água:metanol (50:50 v/v)
Deteção	Ultravioleta (λ 245 nm)
Volume de injeção	20µL
Vazão	1,0mL/minuto

O método analítico por CLAE para quantificação da atorvastatina foi validado com base na resolução RE 899 (BRASIL, 2003) e o guia de validação de métodos analíticos (ICH, 2005). Os parâmetros de validação avaliados foram especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

4.2.3.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico

Para que os parâmetros cromatográficos ficassem bem definidos testes preliminares foram realizados. Onde se avaliou os seguintes parâmetros: fator cauda (T), fator capacidade (K), números de pratos teóricos (N) e a resolução (R) entre o pico da atorvastatina e o pico do degradado em solução de HCl 0,1M.

4.2.3.2 Especificidade

Para a avaliação da especificidade do método, a atorvastatina SQR foi avaliada quanto à presença dos excipientes nos comprimidos e aos seus produtos de degradação, sendo submetida a condições de estresse com o objetivo de forçar a formação de produtos de degradação.

A especificidade foi comprovada pela separação de todos potenciais compostos interferentes frente ao pico da atorvastatina com uma resolução adequada. Verificou-se também a pureza do pico cromatográfico do fármaco, com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD).

As condições de degradação forçada às quais o fármaco foi submetido e os preparos das soluções analisadas estão descritos a seguir.

Excipientes do conteúdo do comprimido (avaliação do placebo)

Para a análise de seletividade foram utilizados os excipientes do PB, devido à formulação qualitativa ser a mesma em relação ao PA e aos comprimidos do produto referência.

Hidrólise alcalina

Partiu-se de uma solução de atorvastatina SQR (500 µg/mL) em diluente. Transferiu-se 4,0 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com NaOH 1,0M. Homogeinizou-se a amostra e deixou-se em repouso por um período de 24 horas. O branco foi preparado sob as mesmas condições descritas acima.

Hidrólise ácida

Partiu-se de uma solução de atorvastatina SQR (500 µg/mL) em diluente. Transferiu-se 4,0 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com HCl 0,1M. Homogeinizou-se a amostra e deixou-se em repouso por 3 horas. O branco foi preparado sob as mesmas condições descritas acima.

Oxidação com peróxido de hidrogênio

Partiu-se de uma solução de atorvastatina SQR (500 µg/mL) em diluente. Transferiu-se 4,0 mL desta solução para balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com H₂O₂ 30%. Agitou-se a solução e deixou-se em repouso por um período de 3h. Um branco foi preparado sob as mesmas condições descritas acima.

Fotólise

Adicionou-se em uma cubeta de quartzo, 2 mL da solução de atorvastatina SQR (500 µg/mL) em diluente, que permaneceu em repouso por um período de 24 horas, exposto à lâmpada de radiação UVA 352 nm e UVC

254 nm em câmaras espelhadas (100x16x16 cm). Uma solução controle foi preparada sob as mesmas condições, porém foi envolta com papel alumínio.

Após este período transferiu-se quantitativamente todo o conteúdo da cubeta para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente. Este procedimento foi realizado tanto para a amostra teste como a amostra controle.

Estufa 60 °C

Transferiu-se 4,0 mL da solução de atorvastatina SQR (500 µg/mL) em diluente, para um balão volumétrico de 20 mL (100µg/mL) e completou-se o volume com diluente. Colocou-se em estufa pré-aquecida a 60 °C e deixou-se em repouso por 24 horas.

4.2.3.3 Linearidade

A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas padrão da ATV SQR em diluente contendo oito níveis de concentração.

A partir de uma solução de atorvastatina SQR contendo 500 µg/mL e com o auxílio de bureta, alíquotas de 0,4; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mL foram transferidas para balão volumétrico de 20 mL; o volume do balão foi completado com diluente. Assim obteve-se os pontos da curva, respectivamente, 10; 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175 µg/mL. Cada ponto da curva foi injetado no sistema cromatográfico em triplicata.

A curva padrão foi realizada em três dias diferentes, as áreas dos picos foram medidas e usadas para a construção da curva analítica. A regressão linear foi verificada por meio do método dos mínimos quadrados utilizando o programa computacional Microsoft Excel® 2007 e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através na análise de variância (ANOVA).

4.2.3.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção e quantificação foi calculado a partir dos dados obtidos de acordo com a equação da reta da curva padrão, pelas equações apresentadas a seguir:

$$LD = \frac{3,3 \times s}{b} \quad \text{equação 2}$$

$$LQ = \frac{10 \times s}{b} \quad \text{equação 3}$$

Onde:

S = desvio padrão do intercepto

b = coeficiente de regressão linear

4.2.3.5 Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada em três níveis de concentração (80%, 100% e 120% da concentração de trabalho) por meio da adição de quantidades conhecidas de padrão ao placebo.

Para avaliação da exatidão, foram preparadas três soluções estoques pesando-se, separada e exatamente, cerca de 25 mg de atorvastatina SQR e mais a quantidade de placebo correspondente ao conteúdo de 80 mg de cada comprimido de atorvastatina. Transferiu-se para balões volumétricos de 50 mL e adicionou-se cerca de 30 mL de diluente. As amostras foram submetidas ao ultrassom por 30 minutos e os volumes dos balões completados com os respectivos solventes. Alíquotas de 4,0; 5,0 e 6,0 mL das soluções estoques foram transferidas, para balões volumétricos de 25 mL e os volumes foram completados com diluente, estas foram denominadas como A1, A2 e A3.

Também preparou-se uma solução de atorvastatina SQR (500 µg/mL) em diluente e a partir dela transferiu-se alíquotas de 4,0 mL; 5,0 mL e 6,0 mL para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com diluente, estas foram denominadas como P1, P2 e P3.

Todas as soluções foram preparadas em triplicata e para cada solução foram realizadas três determinações. Os resultados da exatidão foram expressos em porcentagem de recuperação do fármaco adicionado ao placebo.

4.2.3.6 Precisão

A precisão do método foi realizada em três dias diferentes, através de seis ensaios diários completos do doseamento. Foi verificada a repetibilidade e a precisão intermediária do método nas amostras de atorvastatina comprimido. Para a repetibilidade seis determinações da amostra a 100 µg/mL foram utilizadas, já para a precisão intermediária, utilizou-se as seis amostras a 100 µg/mL preparadas por analistas diferentes, em três dias consecutivos.

As amostras foram preparadas como a seguir: Pesaram-se 20 comprimidos de atorvastatina cálcica e realizou-se o peso médio. Foram triturados estes 20 comprimidos e feito um pool, de onde se pesou o equivalente a 25,0 mg de atorvastatina e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. As amostras foram dissolvidas com o diluente, homogeneizadas e filtradas através de papel quantitativo. A partir destas soluções transferiu-se 4,0 mL para balão volumétrico de 20 mL e o volume do balão foi completado com diluente (100 µg/mL). Em cada um dos dias preparou-se uma solução padrão na mesma concentração da amostra.

Os resultados da precisão foram avaliados pelo desvio padrão relativo (DPR) da porcentagem em relação ao valor declarado. A concentração de atorvastatina foi calculada de acordo com a equação 4:

$$\% = \frac{A_a \times C_{SQR}}{A_{SQR} \times C_{Teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

C_a = Concentração teórica do fármaco na solução amostra (µg/mL);

A_a = Área absoluta obtida para a solução amostra;

C_{SQR} = Concentração da SQR (µg/mL);

A_{SQR} = Área absoluta obtida para a SQR

4.2.3.7 Robustez

A robustez do método analítico foi avaliada modificando-se deliberadamente as condições cromatográficas estabelecidas como: variação da composição e vazão da fase móvel.

Variação da composição da fase móvel

Variações na proporção de acetonitrila (ACN) e tampão acetato de sódio pH 4,2 foram avaliadas nas seguintes proporções - ACN:tampão (58:42) e ACN:tampão (42:58). Injetou-se uma solução de atorvastatina SQR a 100 µg/mL em triplicata. Os seguintes parâmetros cromatográficos foram avaliados: tempo de retenção, assimetria, fator capacidade, número de pratos teóricos e área absoluta.

Variação da vazão da fase móvel

Modificou-se a vazão da fase móvel para 0,8 mL/min e 1,2 mL/min. Injetou-se, em triplicata, no sistema cromatográfico uma solução de atorvastatina SQR a 100 µg/mL. Os seguintes parâmetros cromatográficos relativos ao pico da ATV foram avaliados: tempo de retenção, assimetria, fator capacidade, número de pratos teóricos e área absoluta.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

4.3.1 Avaliação da solubilidade da atorvastatina cálcica em diferentes meios

A solubilidade da atorvastatina cálcica SQR foi realizada em diversos meios de dissolução, levando em consideração a faixa de pH fisiológico e o pKa da molécula. Os seguintes meios foram analisados: água, HCl 0,1M; fluido gástrico sem enzima (FGS) pH 1,2; tampão citrato pH 3,0; tampão acetato pH 4,0 e o tampão fosfato de potássio pH 5,0; 6,0 e 6,8.

Em diversos tubos de ensaio adicionou-se aproximadamente 10 mL de cada meio a ser testado e transferiu-se uma quantidade em excesso de atorvastatina cálcica SQR para cada um dos tubos, que permaneceram

aquecidos a $37 \pm 0,5$ °C e sob agitação magnética por um período de 24 horas. Após este período as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm e o sobrenadante filtrado com filtro de papel quantitativo. Alíquotas de 2 mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, diluídas com diluente e injetadas no CLAE. Todos os meios foram preparados em duplicata.

A solubilidade da atorvastatina cálcica SQR (Cs), em cada meio analisado, foi calculada de acordo com a equação 5.

$$C_s = \left(\frac{A_a}{A_p} \times C_p \right) \times \frac{10}{2} \quad \text{equação 5}$$

Onde:

Aa = Área absoluta obtida para a amostra;

Ap = Área absoluta obtida para o padrão;

Cp = Concentração do padrão ($\mu\text{g/mL}$).

Os valores obtidos de concentração de atorvastatina cálcica SQR, em $\mu\text{g/mL}$, foram multiplicados pelo fator de diluição, fornecendo a concentração de saturação da ATV em cada um dos meios nas condições empregadas.

4.3.2 Ensaio de dissolução

O desenvolvimento e a validação do teste de dissolução foram realizados utilizando um dissolutor Vankel® VK 7010, equipado com multi-banho ($n = 8$), amostrador múltiplo automatizado VK 8000 e bomba peristáltica bidirecional.

Os ensaios de dissolução foram desenvolvidos utilizando os equipamentos USP 1 (cesta) nas velocidades de 75 e 100 rpm e USP 2 (pá) a 50 e 75 rpm com 900 mL de meio de dissolução a $37 \pm 0,5$ °C. A influência do pH no meio de dissolução também foi avaliada.

Alíquotas de 5 mL foram coletadas nos tempos: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, gerando curvas de perfil de dissolução *versus* tempo para cada uma das condições testadas. Um filtro de 35 μm foi acoplado ao

amostrador automático, usado para filtrar as amostras durante cada coleta realizada. Não houve reposição do volume amostrado.

4.3.2.1 Cálculo para quantificação da ATV dissolvida

A partir das áreas da solução padrão e solução amostra e também da concentração do padrão ($\mu\text{g/mL}$) para o método por CLAE, se obtêm a concentração de ATV dissolvida na cuba que multiplicada pelo volume de meio, fornece a massa dissolvida real para cada tempo de coleta (equação 6). Para o método por UV utilizou-se as absorvâncias das soluções padrão e amostra.

$$m_{diss}(t) = \left(\frac{Aa}{Ap} \cdot C_p \right) \cdot V_c \quad \text{equação 6}$$

A massa retirada de ATV, em um determinado tempo, para cada uma das cubas foi calculada através da concentração de atorvastatina dissolvida na cuba multiplicada pelo volume amostrado de cada cuba (equação 7).

$$m_{ret}(t) = C_c(t) \cdot V_a \quad \text{equação 7}$$

A massa total dissolvida para um determinado tempo foi obtida através da soma da massa dissolvida mais o somatório das massas retiradas nos últimos tempos de coletas (equação 8).

$$m_{TOTdiss}(t) = m_{diss}(t) + \sum_{i=1}^{t-1} m_{ret}(t) \quad \text{equação 8}$$

Para se alcançar a porcentagem total dissolvida em determinado tempo de coleta, dividiu-se a massa total dissolvida para este tempo pela dose do fármaco e este valor foi multiplicado por 100 (equação 9).

$$\%_{diss}(t) = \frac{m_{TOTdiss}(t)}{Dose} \cdot 100 \quad \text{equação 9}$$

Onde:

V_c = volume do meio de dissolução presente nas cubas (mL)

V_a = volume de alíquota retirada da cuba (mL)

A_a e A_p = áreas absolutas das soluções amostra e padrão

C_p = concentração da solução padrão ($\mu\text{g/mL}$)

4.3.2.2 Avaliação das condições mais discriminantes para o método

Para avaliar qual dos dois meios de dissolução propostos proporcionasse uma maior capacidade discriminante do método de dissolução em estudo, plotou-se, em um gráfico, os valores de fração dissolvida e absorvida *versus* o tempo. Esta avaliação foi realizada para o tampão fosfato de potássio pH 6,0 e para o tampão fosfato pH 6,8, a fim de, graficamente, comparar e demonstrar qual meio possui uma maior semelhança entre os perfis de dissolução *in vitro* e de absorção *in vivo*, conseqüentemente avaliar aquele com maior capacidade discriminante.

4.3.3 Estabilidade da atorvastatina nas condições do ensaio

Seis comprimidos do produto referência foram submetidos ao teste de dissolução nas condições previamente selecionadas. As amostras foram coletadas após 2 horas de dissolução e injetadas nos tempos 0, 12 e 24 horas.

4.3.4 Método alternativo para avaliação das amostras da dissolução através de espectrofotometria ultravioleta (UV)

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Visível com duplo feixe (Shimadzu, Kyoto, Japão), modelo UV-1800, equipado com cubetas de quartzo de um centímetro com largura de banda espectral ($1 \pm 0,2$ nm), comprimento de onda com precisão de $\pm 0,1$ nm. Software UV Probe versão 2.33 (Shimadzu) foi utilizado para controle de instrumentos, aquisição e análise de dados.

As condições espectrofotométricas para a validação do método UV-Visível foram selecionadas a partir de ensaios preliminares com soluções da ATV cálcica SQR, dos comprimidos e da solução placebo, a fim de se determinar o comprimento de onda (λ) mais adequado.

Os parâmetros utilizados para a validação do método por UV foram: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

4.4 TRATAMENTO DE DADOS DO ESTUDO *IN VIVO*

Para o desenvolvimento de um método de dissolução discriminativo para os comprimidos revestidos de atorvastatina cálcica e de uma correlação *in vivo/in vitro*, utilizou-se dados *in vivo* relativos às formulações referência (PR) e PB, candidato a genérico, gentilmente cedidos pelo laboratório colaborador do projeto. Os valores dos dados *in vivo* foram obtidos através de um estudo de bioequivalência realizado pelo Laboratório Synchronphar – Assessoria e desenvolvimento de projetos clínicos s/s Ltda, em julho de 2010.

4.4.1 Estudo de bioequivalência

O objetivo do estudo de bioequivalência foi caracterizar a taxa e a extensão da biodisponibilidade das formulações PB e PR de ATV cálcica 80 mg, após a administração de uma dose única nas condições de jejum, em voluntários sadios de ambos os sexos e avaliar a bioequivalência destas duas formulações.

Para realização deste estudo um planejamento de experimento monocêntrico, aberto, aleatorizado, cruzado, composto por dois tratamentos (R e T) de dois períodos e duas sequências (RT e TR) foi empregado, com administração em dose única, em condição de jejum, nas quais os voluntários receberam em cada período distinto, o PB ou a formulação do produto referência (PR).

Para o estudo de bioequivalência das duas diferentes formulações, o tamanho da amostra foi calculado para obter um poder do teste igual ou superior a 80%. Assim sendo um total de 64 voluntários foi selecionado, destes 61 concluíram o estudo.

4.4.2 Dados do estudo *in vivo*

A curva média da concentração plasmática *versus* o tempo para a atorvastatina PR e PB, no estado de jejum pode ser visualizada na Figura 4.1, após a administração de uma dose de 80 mg de atorvastatina cálcica.

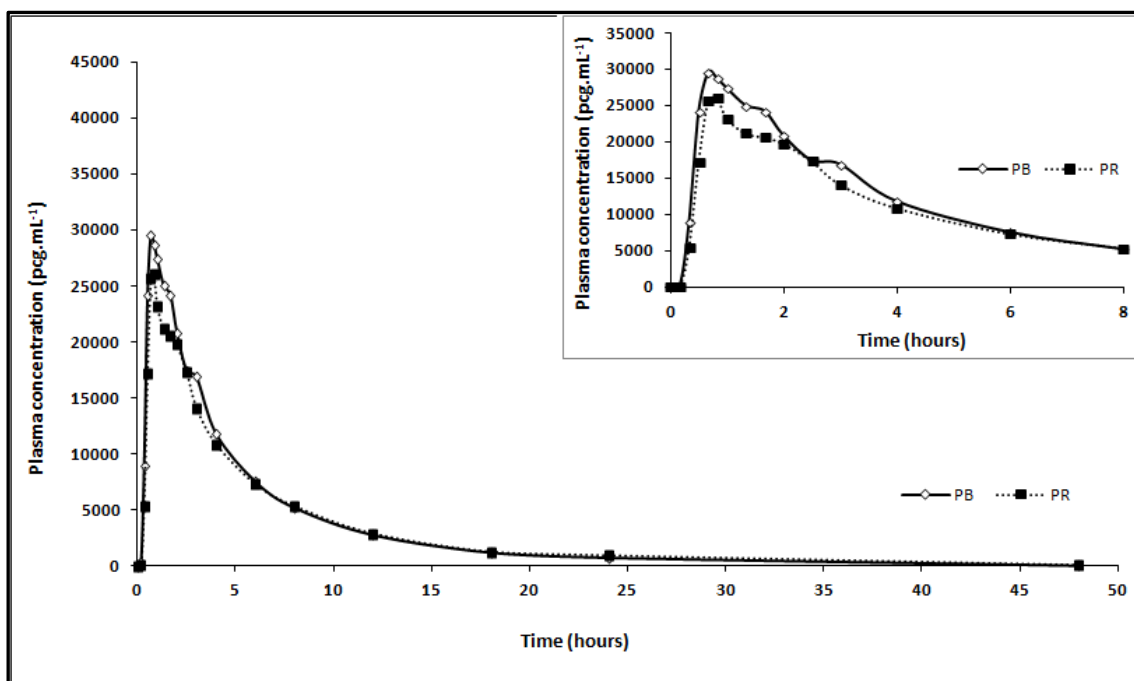


Figura 4.1 Curva média da concentração plasmática *versus* o tempo da ATV após administração de dose única do produto referência e do PB (n= 61).

Os valores dos parâmetros farmacocinéticos do PR e PB da ATV podem ser visualizados nas Tabelas 4.2 e 4.3.

Tabela 4.2 Dados dos parâmetros farmacocinéticos da ATV após administração do produto referência, segundo o estudo de bioequivalência.

Parâmetro	Média	DP	EP	Mínimo	Mediana	Máximo	CV%
Kel	0,1329	0,054	0,0069	0,0301	0,1227	0,3647	40,609
t1/2	6,1626	3,1085	0,398	1,9004	5,6487	23,0124	50,4412
tmax	1,1261	0,7648	0,0979	0,33	0,83	4	67,9149
Cmax	38589,4918	17556,7007	2247,90	8002	36674	86419	45,4961
ASCo-t	132405,237	59547,9674	7624,33	54371,4	113477	295988,2	44,974
ASCo-inf	141104,157	60834,0026	7788,99	64145,5	119413	308310,5	43,1128
%ASC	93,289	4,57	0,5851	77,8082	94,6739	98,4932	4,8988

Fonte: Relatório estatístico referente ao estudo de bioequivalência realizado pelo laboratório Synchophar.

Tabela 4.3 Dados dos parâmetros farmacocinéticos da ATV após administração do PB, segundo o estudo de bioequivalência.

Parâmetro	Média	DP	EP	Mínimo	Mediana	Máximo	CV%
Kel	0,1454	0,0653	0,0084	0,0428	0,136	0,3868	44,9034
t1/2	5,7263	2,8228	0,3614	1,7918	5,0961	16,2068	49,2948
tmax	1,2136	0,8967	0,1148	0,33	0,83	4	73,8843
Cmax	47504,902	27007,415	3457,9451	16821	42237	175524	56,8518
ASCo-t	141590,81	57291,121	7335,3764	76161,7	123040,05	346626,09	40,4625
ASCo-inf	149281,7	57533,963	7366,4691	79528,477	134215,17	350380,28	38,5405
%ASC	94,443	3,8108	0,4879	75,3571	95,4996	98,9285	4,035

Fonte: Relatório estatístico referente ao estudo de bioequivalência realizado pelo laboratório Synchophar.

4.4.3 Obtenção da fração absorvida da dose

Através de modelagem matemática utilizando o programa de regressão não linear Scientist[®] versão 2.0 (MicroMath[®]) pode-se obter os pontos experimentais médios da curva de concentração plasmática *versus* tempo. Foi utilizado o modelo de dois compartimentos aberto descrito pela equação 10 e os parâmetros foram usados para estimar os pontos dos dados de concentração plasmáticos intermediários.

$$Cp = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} - C \cdot e^{-Ka \cdot t} \quad \text{equação 10}$$

Onde:

Cp = concentração plasmática

α = constante de distribuição

β = constante de eliminação
 K_a = constante de absorção
 t = tempo de administração da dose

O método de Loo-Riegelman foi utilizado para calcular a fração da dose absorvida (FA), de acordo com a equação 11 (SHARGEL *et al.*, 2005).

$$\frac{FA}{FA^\infty} = \frac{C_p + k_{10} \cdot [AUC]_0^t + C_t}{K_{10} \cdot [AUC]_0^\infty} \quad \text{Equação 11}$$

Onde:

FA = Fração absorvida em um determinado tempo t ;

FA_∞ = Fração absorvida no tempo infinito;

C_p = Concentração plasmática no tempo t ;

C_t = Concentração tecidual aparente;

ASC = Área sob a curva.

Os dados obtidos de fração absorvida, tanto do PR como do PB, foram utilizados juntamente com os valores de fração dissolvida adquiridos através do método de dissolução proposto, com o intuito de se obter uma correlação *in vivo*/*in vitro*.

4.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

O teste de dissolução *in vitro* faz parte das especificações farmacopeicas para o controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas de uso oral. Entretanto, com normas bem definidas de bioequivalência, de biodisponibilidade e do sistema de classificação biofarmacêutica, o teste de dissolução passou de tradicional teste de controle de qualidade para teste substituto de estudos de bioequivalência *in vivo* (FDA, 1997a; DRESSMAN e KRAMER, 2005).

O método de dissolução para comprimidos de atorvastatina cálcica foi validado de acordo com o guia do ICH (2005) e com a USP 34 <1092> The dissolution procedure (2011).

4.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria UV-Visível.

Para validação do método de dissolução, tanto por CLAE como por UV-Visível, avaliaram-se os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Também foi avaliada a possível interferência do uso de filtros e a presença de bolhas no meio de dissolução, através de CLAE.

4.5.1.1 Especificidade

A especificidade foi avaliada com base no placebo do PB, o qual possui a mesma fórmula qualitativa do PR, porém sem a substância ativa.

O placebo referido acima foi adicionado em três cubas contendo 900 mL do meio de dissolução selecionado pré-aquecido a $37 \pm 0,5$ °C e agitado durante 90 minutos a 150 rpm, utilizando o equipamento pá. Alíquotas de 5 mL foram coletadas e analisadas por CLAE e UV-Visível.

A especificidade do método por CLAE foi verificada através da avaliação da pureza de pico, utilizando-se do detector PDA. Para o método por UV-Visível, um espectro da solução padrão e placebo, diluídos no meio de dissolução, foram traçados na faixa de 200 a 400 nm.

4.5.1.2 Linearidade

Para a construção da curva padrão foi preparada, em diluente MeOH: água (50:50 v/v), uma solução estoque contendo 500 µg/mL de ATV cálcica SQR. A linearidade do método foi avaliada na faixa de 10,0 a 150,0 µg/mL para o método por CLAE e de 1,0 a 15,0 µg/mL para o UV-Visível, utilizando o meio de dissolução selecionado como o segundo diluente. Foram obtidos os pontos da curva, respectivamente: 10, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL para o método por CLAE e 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5 e 15,0 µg/mL para o método por UV-Visível.

As soluções foram injetadas em triplicata, todos os dias, durante três dias consecutivos por CLAE, bem como as leituras por UV. As curvas padrão foram obtidas a partir da área absoluta e dos valores de absorvância

versus a concentração de ATV cálcica SQR ($\mu\text{g/mL}$). A linearidade foi verificada por análise de regressão linear, a qual foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA).

4.5.1.3 Exatidão/Precisão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, onde quantidades conhecidas de ATV cálcica SQR foram adicionadas às cubas de dissolução contendo placebo. A partir de uma solução de 20 mg/mL de ATV cálcica SQR, diluída em metanol, alíquotas de 1,0; 4,0 e 5,0 mL foram adicionadas às cubas de dissolução contendo 900 mL de meio de dissolução e agitadas através de pás a 150 rpm por 60 minutos.

As amostras foram coletadas, filtradas, diluídas no meio de dissolução selecionado e analisadas por CLAE e UV. As concentrações finais teóricas foram de 22,22; 88,89 e 111,11 $\mu\text{g/mL}$ para o método por CLAE e 2,22; 8,89 e 11,11 $\mu\text{g/mL}$ para o UV. Este estudo foi realizado em três dias consecutivos.

A fim de avaliar a repetibilidade do método, as mesmas soluções empregadas nos teste de recuperação foram utilizadas para avaliar a precisão do método. A precisão intermediária foi realizada através da realização de dois perfis de dissolução, nas condições selecionadas, em dias diferentes por dois analistas diferentes. A repetibilidade foi estabelecida com base no desvio padrão relativo (DPR) dos resultados da exatidão e a precisão intermediária na diferença do valor médio de cada um dos pontos para os dois perfis de dissolução.

4.5.1.4 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de pequenas modificações no pH do meio de dissolução selecionado. Realizou-se perfis de dissolução onde as porcentagens de liberação do fármaco obtidas com as modificações do pH (5,8 e 6,2) foram comparadas, através do teste *t-student*, com as porcentagens de liberação obtidas com o pH do tampão na condição normal (pH 6,0).

4.5.1.5 Desaeração do meio de dissolução

O meio de dissolução selecionado foi desaerado através de aquecimento a 42°C e em seguida submetido à filtração a vácuo. Os perfis de dissolução obtidos com o meio desaerado e não desaerado foram comparados a fim de avaliar a necessidade de desaeração.

4.5.1.6 Avaliação da presença de filtros

Em um béquer contendo 200 mL do meio de dissolução selecionado, mantido a $37 \pm 0,5$ °C e sob agitação magnética por duas horas, foi adicionado uma quantidade de placebo equivalente ao peso médio de um comprimido e em seguida adicionou-se uma quantidade ATV cálcica SQR para uma concentração final de 250 µg/mL. Alíquotas de 10 mL foram retiradas, filtradas com auxílio de um filtro de 35 µm e após diluiu-se em metanol:água (50:50 v/v) para obter uma solução com concentração final de 100 µg/mL. Em seguida filtrou-se novamente a amostra em filtro de nylon 0,45 µm. O mesmo procedimento foi realizado para as outras alíquotas da mesma solução, porém estas foram centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm ao invés de serem filtradas e o seu sobrenadante foi utilizado. Todas as amostras foram analisadas através de CLAE. Os resultados obtidos para as amostras filtradas foram comparados com as amostras centrifugadas, a fim de avaliar a interferência da presença dos filtros.

4.6 AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE DISSOLUÇÃO

Os perfis de dissolução obtidos para o PR e os pilotos A e B foram comparados através de uma abordagem de modelo independente que inclui o fator de diferença ($f1$) e o fator de similaridade ($f2$) (FREITAG, 2001). Os fatores $f1$ e $f2$ foram determinados utilizando as seguintes equações:

$$f1 = \left\{ \left[\frac{\sum_{t=1}^n (R_t - T_t)}{\sum_{t=1}^n R_t} \right] \right\} \cdot 100 \quad \text{equação 12}$$

$$f2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right] \cdot 100 \right\} \quad \text{equação 13}$$

Onde:

n = número de tempos de coleta

T_t = valor de porcentagem dissolvida da formulação teste, no tempo t

R_t = valor de porcentagem dissolvida da formulação referência, no tempo t

O critério para que os dois perfis sejam considerados semelhantes são que os valores de f_1 estejam entre 0 a 15 e os de f_2 entre 50 a 100.

4.7 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTOS DE CLAE E UV

O uso dos métodos de CLAE e UV, a fim de avaliar a liberação de ATV nos ensaios de dissolução, foi comparado empregando o teste *t-student*, para demonstrar a equivalência entre as mesmas. Os valores utilizados foram retirados de cada um dos pontos dos perfis de dissolução da precisão intermediária realizada na validação do método de dissolução.

5. CONCLUSÕES

- ◆ O método de quantificação para atorvastatina empregado através de CLAE demonstrou ser altamente satisfatório no que se refere à especificidade, linearidade, exatidão e robustez. Atingindo um tempo de análise consideravelmente reduzido e viável para ser aplicado na rotina, na quantificação da atorvastatina em amostras dos ensaios de dissolução.

- ◆ A validação do ensaio de dissolução por CLAE e por espectrofotometria UV mostrou-se adequado sendo específico, linear, preciso, exato e robusto para ambos os métodos. Sendo que o método proposto por UV configura-se como uma excelente alternativa extremamente vantajosa e viável visto a redução da quantidade de solventes, a facilidade de operação e o tempo reduzido de análise.

- ◆ Não observou-se interferência dos filtros de coleta e da desaeração do meio de dissolução no processo de dissolução.

- ◆ A análise comparativa dos métodos de doseamento por CLAE e UV demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos sendo, portanto, considerados equivalentes para a determinação quantitativa da atorvastatina.

- ◆ A atorvastatina mostrou-se estável por 24 horas nas condições do ensaio de dissolução.

- ◆ Uma correlação nível A pode ser estabelecida entre a fração absorvida e a fração dissolvida, através de um fator de escala tempo, tanto para a formulação do produto referência como para o piloto B. Através do equipamento pá a 50 rpm e 900 mL de tampão fosfato de potássio 50 μ M pH 6,0 a $37 \pm 0,5$ °C.

- ◆ As condições estabelecidas para o teste de dissolução refletiram o comportamento da absorção do fármaco *in vivo*, além de demonstrar uma dissolução completa para o PR e o PB e uma dissolução limitada do PA, demonstrando que o método é discriminativo para as formulações propostas.

♦ A comparação entre os perfis de dissolução entre o PR, PA e PB, empregando o fator de diferença (f1) e o fator de semelhança (f2), demonstrou a semelhança entre os perfis do PR e PB, porém uma elevada diferença em relação ao PA, como já se esperava devido à diferença de agente desintegrante presente nas duas formulações piloto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHJEL, S. W.; LUPULEASA, D. Enhancement of solubility and dissolution rate of different forms of atorvastatin calcium in direct compression tablet formulas. **Farmacia**. v. 57, n. 3, p. 290-300, 2009.

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

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

BRANDÃO, A. P. Tratando a hipertensão arterial, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares - Adalat Insight Study. **Revista Brasileira de Cardiologia**. v. 2, n.5, p. 181-183, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 482 – Guia para estudos de correlação in vivo in vitro (CIVIV). **Diário Oficial da União**. Brasília, 19 de Março de 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 483 – Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas Orais de Liberação Imediata (FFSOLI). **Diário Oficial da União**. Brasília, 19 de Março de 2002b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 de Maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 310 – Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**. Brasília, 01 de Setembro de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Tecnologia da informação a serviço do SUS**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>, acessado em dezembro de 2011.

BRASIL. Saúde: Saúde do Homem – Doenças cardiovasculares. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/sobre/saude/saude-do-homem/doencas-cardiovasculares>, acessado em dezembro de 2011.

BROCKMEIER, D. In vitro--in vivo correlation of dissolution, a time scaling problem? Transformation of in vitro results to the in vivo situation, using theophylline as a practical example. **European Journal of Clinical Pharmacology**. v. 28, n. 3, p. 291-300, 1985.

BRUGTS, J. J.; YETGIN, T.; HOEKS, S. E.; GOTTO, A. M.; SHEPHERD, J.; WESTENDORP, R. G.; DE CRAEN, A. J.; KNOPP, R. H.; NAKAMURA, H.; RIDKER, P.; VAN DOMBURG, R.; DECKERS, J. W. The benefits of statins in people without established cardiovascular disease but with cardiovascular risk factors: meta-analysis of randomised controlled trials. **British Medical Journal**. v. 30, p. 1-8, 2009.

BROWN, C. K.; CHOKSHI, H. P.; NICKERSON, B.; REED, R. A.; ROHRS, B. R.; SHAH, P. A. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. **Pharmaceutical Technology**. p. 56 -65, 2004.

CHILUKURI, D. M.; SUNKARA, G.; YOUNG, D. Pharmaceutical product development. In vivo in vitro correlation. New York, Informa Healthcare USA, p. 1 – 81, 2007.

CILLA, D. D. JR.; WHITFIELD, L. R.; GIBSON, D. M.; SEDMAN, A. J.; POSVAR, E. L. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v. 60, n. 6, p. 687-95. 1996.

CORSINI, A.; BELLOSTA, S.; BAETTA, R.; FUMAGALLI, R.; PAOLETTI, R.; BERNINI, F.; New insights the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology and Therapy**. n.84, p. 413 – 428. 1999.

DRESSMAN, J. B.; KRAMER, J. Pharmaceutical Dissolution Testing. New York, Informa Healthcare USA, p. 2 – 33, 2005.

DRESSMAN, J. B.; LENNERNAS, H. Oral Drug Absorption Prediction and Assessment. Marcel Dekker, Inc. New York. 2000.

EMAMI, J. In vitro - In vivo correlation: From theory to applications. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v. 9, n. 2, p.169-189, 2006.

ERTÜRK. S.; AKTAŞ. E. S.; ERSOY. L.; FIÇICIOĞLU. S. An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. n. 33, v. 5, p. 1017-23, 2003.

F. BRAS.: Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Fiocruz. Rio de Janeiro, 2010.

FDA Reviewer Guidance: Validation of chromatographic Methods, 1994.

FDA Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville, 1997a.

FDA, Guidance for Industry. Extended release oral dosage forms: Development, evaluation and application of in vivo/in vitro correlations. Rockville, 1997b.

FDA Guidance for Industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Rockville, 2000.

FONSECA, F. A. H. Farmacocinéticas das estatinas. **Arquivos brasileiros de cardiologia**. v. 85, p. 9-14, 2005.

FREITAG, G. Guidelines on dissolution profile comparison, **Drug Information Journal**. v. 35, p. 865-874, 2001.

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

HANSON, R.; GRAY, V. Handbook of Dissolution Testing. Pharmaceutical Technology Publications, Springfield, Oregon, 1982.

HODJEGAN, R. A.; SHIRAN, M. R.; TUCKER, G. T.; CONWAY, B. R.; IRWIN, W. J.; SHAW, L. R.; GRATTAN, T. J. A New Rapidly Absorbed Paracetamol Tablet Containing Sodium Bicarbonate. II. Dissolution Studies and In Vitro/In Vivo Correlation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 28, n. 5, p. 533-543, 2002.

HUSSEIN, A. K.; IBRAHIM, M. A.; AMIN, M. A.; AHMED, O. A. A.; AFOUNA, M. I. Improved in vitro dissolution parameters and in vivo hypolipidemic efficiency of atorvastatin calcium through the formation of hydrophilic inclusion complex with cyclodextrins. **Drug Development Research**. v. 72, n. 5, p. 379–390, 2011.

ICH – Harmonized Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1) In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.

JAMZAD, S. & FASSIHI, R. Role of surfactant and pH on dissolution properties of fenofibrate and glipizide – A technical note. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. n. 2, v. 7, p. E1-E6, 2006.

KANTOLA, T.; KIVISTÖ, K. T.; NEUVONEN, P. J. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. v. 64, n. 1, p. 58-65. 1998.

KEARNEY, A. S.; CRAWFORD, L. F.; MEHTA, S. C.; RADEBAUGH, G. W.; The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981. **Pharmaceutical Research**. v, 10, n. 10, p. 1461-1465, 1993.

KHAN, F. N.; DEHGHAN, M. H. Enhanced bioavailability of atorvastatin calcium from stabilized gastric resident formulation. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. v. 12, n. 4, p.1077-86, 2011.

KIM, M. S.; JIN, S. J.; KIM, J. S.; PARK, H. J.; SONG, H. S.; NEUBERT, R. H. H.; HWANG S. J. Preparation, characterization and in vivo evaluation of amorphous atorvastatin calcium nanoparticles using supercritical antisolvent (SAS) process. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 69, n.2, p. 454 – 465, 2008.

KRACUN, M.; KOCIJAN, A.; BASTARDA, A.; GRAHEK, R.; PLAVEC, J.; KOCJAN, D.; Isolation and structure determination of oxidative degradation products of atorvastatin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.50, n. 5, p. 729-36, 2009.

LAW, M. R.; WALD, N. J. Risk factor thresholds: their existence under scrutiny. **British Medical Journal**. v. 324, p. 1570–1576, 2002.

LAROSA, J. C.; HE, J.; VUPPUTURI, S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of the American Medical Association**. v. 282, n. 24, p. 2340-2346, 1999.

LAWS, P. E.; SPARK, J. I.; COWLED, P. A.; FITRIDGE, R. A. The role of statins in vascular disease. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**. v. 27, p. 6 -16, 2004.

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

LÖBENBERG, R.; KRÄMER, J.; SHAH, M. P.; AMIDON, G. L.; DRESSMAN, J. B. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: dissolution behavior of glibenclamide. **Pharmaceutical Research**. v. 17, p. 439–44, 2000.

MA, L.; DONG, J.; CHEN, X. J.; WANG, G. J. Development and validation of atorvastatin by LC-ESI-MS and application in bioequivalence research in healthy Chinese volunteers. **Chromatographia**. v. 65, p. 737 – 741, 2007.

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

MARON, D. J.; FAZIO, S.; LINTON, M. F. Current perspectives on statins. **Circulation**, v. 101, p. 207 - 213, 2000.

MARTINDALE The complete drug reference. 32a ed. London: Pharmaceutical Press, p. 2314, 1999.

MARTINEZ, M. N.; AMIDON, G. L. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. **Journal of clinical pharmacology**. v. 42, p. 620 – 643, 2002.

NARASIAH, L. V.; JIMIDI, P.; GOLI, V. Enhancement of dissolution rate of atorvastatin calcium using solid dispersions by dropping method. **International Journal of PharmTech Research**. v. 3, n. 2, p. 652-659, 2011.

National Cholesterol Education Program Expert Panel - NCEP. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult treatment Panel III). 2001. Disponível em <<http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3xsum.pdf>> Acesso em: 11 nov. 2011.

NIROGI, R. V.; KANDIKERE, V. N.; SHUKLA, M.; MUDIGONDA, K.; MAURYA, S.; BOOSI, R.; ANJANEYULU, Y. Simultaneous quantification of atorvastatin and active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using rosuvastatin as internal standard. **Biomedical Chromatography**. v. 20, n. 9, p. 924-36, 2006.

NIGOVIC, B., DAMIC, M., INJAC, R., GLAVAC, N. K., STRUKELJ, B. Analysis of atorvastatin and related substances by MEKC. **Chromatographia**. v. 69, p. 1299-1305, 2009.

NOORY, C.; TRAN, N.; OUDERKIRK, L.; SHAH, V. Steps for development of a dissolution test for sparingly water-soluble drug products. **Dissolution technologies**, n. 3, p. 1-4, 2000.

PALEM, C. R.; PATEL, S.; POKHARKAR, V. B. Solubility and stability enhancement of atorvastatin by cyclodextrin complexation. **PDA Journal of pharmaceutical science and technology**. v. 63, n. 3, p. 217-225, 2009.

PARKE-DAVIS (2004) Product information: Lipitor (Atorvastatin Calcium). Parke-Davis (Division of Pfizer Inc.), Ann Arbor, MI.

PASTERNAK, R. C; SMITH, S. C.; BAIREY-MERZ, C. N.; GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; LENFANT, C. ACC/AHA/NHLBI Clinical Advisory on the Use and Safety of Statins. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2002.

PHARM. FORUM: <1092> The Dissolution Procedure: Development and Validation, v. 30, n. 1, p. 351 – 363, 2004.

POLLI, J.E.; REKHI, G.S.; SHAH, V.P. Methods to compare dissolution profiles. **Drug Information Journal**. v. 30, p. 1113 – 1120, 1996.

QURESHI, A. S. Developing Discriminatory Drug Dissolution Tests and Profiles: Some Thoughts for Consideration on the Concept and Its Interpretation. **Dissolution Technologies**. 2006.

RAHIMI, R. A.; LEOF, E. B. TGF- β signaling: A tale of two responses. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 102, n. 3, p. 593–608, 2007.

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

SCHIECKER, G.; SCHMIDT, C.; FUCHS, S.; EHINGER, A.; SUNDOW, J.; KISSEL, T. In vitro and in vivo correlation of buserelin release from biodegradable implants using statistical moment analysis. **Journal of controlled release**. n. 94, p. 25 – 37, 2004.

SHAH, V. P.; KONECNY, J. J.; EVERETT, R. L.; MCCULLOUGH, B.; NOORIZADEH, A. C.; SKELLY, J. P. In vitro dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of solubilizers. **Pharmaceutical Research**. v. 6, p. 612–8, 1989.

SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. K.; SHAH, V. P. FIP/AAPS Guidelines to dissolution / in vitro release testing of novel / special dosage forms. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. v. 4, n. 1, p. 43-52, 2003.

SILVA, PENILDON. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, p. 1374, 2002.

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, W. In vitro – in vivo correlation: Definitions and Regulatory Guidance. **International Journal of Generic Drugs**. Disponível em: <http://www.locumusa.com>. Arquivo acessado em 18 de Setembro de 2011.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THIES, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para o desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Journal of Pharmacy Technology**. n. 1, p. 34-43, 1997.

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

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

STORPIRTS. S.; RODRIGUES. D. In vitro evaluation of dissolution proprieties and degradation products of omeprazole in enteric-coated pellets. **Drug Development Industrial Pharmaceutical**, v.24, n.11, p.1101 – 1107, 1998.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. Ciências Farmacêuticas. Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan Ltda. 2009. Cap. 14, p. 155-156.

UPPOOR, V. R. S, Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations. **Journal of controlled Release**. v. 72, p. 127 – 132, 2001.

USP 34. THE UNITED STATES Pharmacopoeia 34th ed. Rockville: United States Pharmacopeial convention, 2011.

WHO, Cardiovascular diseases, disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acessado em dezembro de 2011a.

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

