

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SINVASTATINA EM CÁPSULAS MAGISTRAIS

Hudson Caetano Polonini, Felipe Cerqueira dos Santos, Urias Pardócimo Vaz e Marcos Antônio Fernandes Brandão*

Departamento Farmacêutico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora – MG, Brasil

Nádia Rezende Barbosa Raposo

Departamento de Alimentos e Toxicologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, 36036-330 Juiz de Fora – MG, Brasil

Anderson de Oliveira Ferreira

Ortofarma Laboratório de Controle da Qualidade, BR 040, Empresarial Park Sul, 39, 36120-000 Matias Barbosa – MG, Brasil

Recebido em 23/4/10; aceito em 9/9/10; publicado na web em 8/12/10

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF SIMVASTATIN IN CAPSULES. Simvastatin is an oral anti-hyperlipidemic that has been widely used to reduce the cardiovascular disease risk. There isn't any pharmacopoeic method to assay this drug in capsules. It was proposed and validated a method for determining the content of simvastatin in capsules by UV/visible spectrophotometry ($\lambda = 237$ nm), a more affordable method for the compounding pharmacy. The method was validated for linearity, specificity, range, accuracy, precision, performance, robustness, and limits of detection and quantification.

Keywords: simvastatin; spectrophotometry; validation studies.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DC), dentre as quais figura a doença arterial coronariana (DAC), são um grande problema de saúde pública, uma vez que é a principal causa de morte no mundo. O Brasil acompanha este fenômeno internacional apresentando valores percentuais de mortalidade em torno de 25% para DC, o que representa cerca de 250.000 óbitos ao ano.¹

Desde 1950, se conhece o risco que representam as taxas elevadas de colesterol plasmático para as doenças coronarianas, sendo seu controle plasmático ligado às proteínas de baixa densidade (LDL-col) fundamental para preveni-las. Desde então, a busca por agentes capazes de controlar as taxas de colesterol plasmático desperta o interesse das indústrias farmacêuticas.²

Nesse contexto, a sinvastatina insere-se como um agente hipocolesterolêmico amplamente utilizado. Trata-se de uma lactona inativa que é convertida em seu β,δ -hidroxiácido correspondente (forma ativa), via metabolismo hepático pelo citocromo P450, após administração oral. Este fármaco (Figura 1) é um potente inibidor da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMGCoA) redutase, que catalisa a síntese de colesterol.¹ É comercializada com o nome de Zocor® na forma de comprimidos revestidos nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 mg e como Sinvastacor® na forma de comprimido revestido de 5 mg.³

Além das indústrias farmacêuticas, a sinvastatina também atraiu o interesse das farmácias magistrais, que atualmente manipulam extensivamente o fármaco na forma de cápsulas. Tais farmácias passaram, nos últimos anos, por um processo de expansão no número de medicamentos dispensados, o que pode acarretar riscos para o paciente, caso os requisitos de segurança, qualidade e eficácia não sejam comprovados. Desta forma, é essencial o controle de qualida-

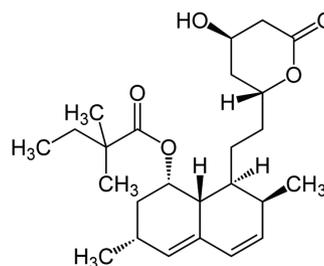


Figura 1. Estrutura química da sinvastatina (CAS 79902-63-9)

de do produto acabado nas farmácias de manipulação, pois um dos parâmetros que mais comumente apresentam desvios da qualidade é a quantidade de princípio ativo determinada no doseamento.^{4,5}

Dentre as monografias de produtos acabados que constam nos compêndios oficiais reconhecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária pesquisados (Farmacopeias Brasileira,⁶ Norte-americana,⁷ Britânica,⁸ Europeia,⁹ Internacional – OMS,¹⁰ Japonesa,¹¹ Mexicana¹² e Portuguesa¹³), bem como em outras farmacopeias não oficiais no Brasil (Chinesa¹⁴ e Indiana¹⁵) não há descrição de método para a sinvastatina em cápsulas. A *United States Pharmacopeia 32*⁷ e a *British Pharmacopoeia 2010*⁸ possuem métodos para o doseamento em comprimidos, ambos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), uma técnica de elevado custo para as farmácias magistrais.

Na literatura consultada, são descritos métodos por cromatografia eletrocínica micelar,¹⁶ voltametria cíclica,¹⁷ CLAE,¹⁸⁻²⁰ espectrofotometria direta²¹ e espectrofotometria derivativa,²² porém todos destinados ao controle de comprimidos, e não cápsulas. Este fato inviabiliza a execução do controle de qualidade das cápsulas manipuladas por estes estabelecimentos.

*e-mail: marcosbrand@uol.com.br

O objetivo deste trabalho foi validar um método espectrofotométrico rápido, seguro e de baixo custo para determinação do teor de sinvastatina em cápsulas.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e padrão de referência

Cápsulas contendo sinvastatina (10 mg) foram gentilmente fornecidas por Singularis Farmácia de Manipulação Ltda. (São João Nepomuceno, MG). A sinvastatina, substância química de referência Deg (São Paulo, SP), foi padronizada de forma rastreável ao padrão primário da *United States Pharmacopoeia* (Rockville, MD). O solvente usado foi acetonitrila pró-análise (PA) Vetec (Rio de Janeiro, RJ).

A formulação das cápsulas foi: laurilsulfato de sódio 1,0%; amiodoglicolato de sódio 4,0%; dióxido de silício coloidal 0,2%; e lactose mono-hidratada malha 200: celulose microcristalina (3:1, p/p), qsp (quantidade suficiente para) 100,0%.

Os espectros de absorção na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro UV/visível de duplo feixe (Cary 50 Probe, Varian, Palo Alto, CA), com espectro de absorção de 190 a 1100 nm e cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm. O aparelho foi calibrado com acetonitrila PA e as absorvâncias foram lidas em comprimento de onda (λ) de 237 nm.

Métodos

Doseamento de cápsulas de sinvastatina

O conteúdo de 20 cápsulas magistrais de sinvastatina foi homogeneizado e uma quantidade de pó equivalente a 50 mg de sinvastatina foi pesada, transferida para balão volumétrico de 100 mL, solubilizada com acetonitrila e diluída com o mesmo solvente até o volume final do balão. A solução foi agitada mecanicamente por 10 min e filtrada em membrana de celulose com porosidade de 0,45 μ m. Uma alíquota de 1 mL do filtrado foi então transferida para balão volumétrico de 50 mL, o qual teve seu volume completado com acetonitrila (concentração final = 10 μ g mL⁻¹). A absorvância desta solução foi lida em 237 nm, utilizando acetonitrila como branco. O teor de sinvastatina foi calculado pela comparação com a absorvância do padrão secundário preparado sob as mesmas condições descritas. Todos os experimentos foram conduzidos ao abrigo da luz.

Parâmetros analíticos da validação

Conforme a Resolução RE n. 899, de 29/5/2003,²³ que regulamenta a validação de métodos analíticos e bioanalíticos no Brasil, considera-se que este trabalho (determinação de teor) se encontra classificado na categoria de “Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas”. Portanto, foram avaliados os seguintes parâmetros exigidos pela legislação para o método desenvolvido: linearidade e intervalo, especificidade e exatidão, precisão e robustez. Em caráter de complementação, foram determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Linearidade e intervalo

O teste foi realizado a partir de três curvas analíticas, construídas a partir das concentrações de 80, 90, 100, 110 e 120% (faixa de aceitação do produto), de forma a avaliar a relação linear entre a concentração do analito e as absorvâncias obtidas. Para tanto, os dados de cada nível de concentração foram estatisticamente avaliados através de análise de variância (ANOVA) e do valor do coeficiente de correlação da curva analítica. Dessa forma, a linearidade foi avaliada no intervalo de 80-120%, ou seja, de 8-12 μ g mL⁻¹ de sinvastatina na solução final utilizada para leitura espectrofotométrica.

Precisão

O teste de precisão teve o intuito de avaliar o grau de dispersão entre a série de medidas obtidas por um mesmo analista (repetibilidade) e entre dois analistas (precisão intermediária), para soluções na concentração de 100%. A repetibilidade (precisão intraensaio) foi determinada pela análise de 6 replicatas de forma consecutiva e a precisão intermediária também foi realizada em 6 replicatas, mas em 2 dias, por analistas diferentes e em dois períodos do dia.

Especificidade e exatidão

Para determinação da especificidade e da exatidão do método foi realizado um teste de recuperação. A recuperação é a proporção da quantidade do analito que é passível de ser quantificada, sendo que a porcentagem de recuperação é obtida dividindo-se o teor medido do componente adicionado pelo valor efetivamente adicionado e multiplicado por 100.^{24,25}

Para essa determinação foram preparadas 5 soluções padrão de sinvastatina nas concentrações de 80, 90, 100, 110 e 120%, todas com solução placebo (solução com excipiente). As leituras obtidas para estas soluções foram comparadas com uma solução padrão a 100% não contaminada (dita real), a fim de se avaliar a recuperação obtida.

Robustez

A robustez referente ao preparo da amostra foi avaliada e, para este intento, a legislação brasileira²³ preconiza o estudo da estabilidade da solução analítica, o qual foi realizado com a solução contendo amostra de sinvastatina contaminada com placebo e da solução de padrão secundário, esta última sem contaminação de placebo.²⁶ Este estudo foi realizado através da leitura das soluções imediatamente após o preparo e em intervalos específicos de tempo após o mesmo: 2, 3, 4 e 5 h.

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método proposto foram determinados a partir de três curvas de calibração do padrão e foram calculados a partir das Equações 1 e 2:

$$LD = S 3/a \quad (1)$$

$$LQ = S 10/a \quad (2)$$

nas quais S é o desvio padrão do intercepto com o eixo y e de três curvas de calibração e a é o coeficiente angular da curva analítica.

Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva dos dados, calculando-se a medida da tendência central (média) e medidas de dispersão (desvio padrão, desvio padrão relativo e coeficiente de variação) referentes aos parâmetros avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O intuito deste trabalho foi validar um método acessível ao setor magistral, ou seja, mais facilmente aplicado à rotina de controle da qualidade de produtos magistrais. Desta forma, foi desenvolvido um método espectrofotométrico para o doseamento de sinvastatina em cápsulas, pois a espectrofotometria no UV/visível é uma alternativa mais econômica e de mais fácil execução quando comparada à CLAE.

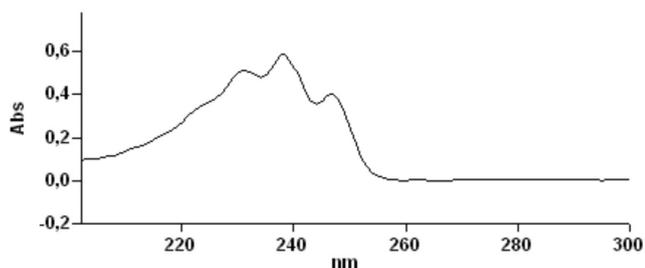
A varredura pelos comprimentos de onda de 200-300 nm de uma solução de cápsulas de sinvastatina em acetonitrila a 10 μ g mL⁻¹ forneceu o espectro de absorção visualizado na Figura 2. O espectro evidencia a não interferência dos excipientes na leitura espectrofotométrica. Pode-se visualizar o pico principal situado em 237 nm,

Tabela 1. Resultados do estudo da linearidade

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 80-120%	Abs média (n=3)	DPR (%)	CV (%)	Fonte de variação	GL	QM	F ₀	F _{crítico}
8,08	0,431	0,002	0,48	Regressão	1	0,084	6120,16	6,410
9,09	0,484	0,001	0,23	Resíduo	13	0,000		
10,10	0,542	0,002	0,42	Linearidade	3	0,000029	3,19	4,830
11,11	0,593	0,001	0,09	Erro Puro	10	0,0000091		
12,12	0,642	0,006	0,91	Total	15	0,006		

Abs = absorvância. DPR = Desvio-padrão relativo. CV = Coeficiente de variação. GL = Graus de liberdade. QM = Quadrado médio.

o qual serviu de base para o cálculo do teor pela comparação da absorvância entre padrão e amostra nesse comprimento de onda. O teor médio encontrado foi de 99,87%.

**Figura 2.** Espectro de absorção de cápsulas de simvastatina no UV

A validação deste método possibilita que se afirme que o mesmo é uma ferramenta eficiente para o controle de qualidade de cápsulas de simvastatina, de modo seguro e confiável analiticamente. Os parâmetros avaliados foram linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, especificidade, exatidão e robustez.

A RE 899/2003²³ preconiza que se avalie a relação linear entre os dados gerados durante o processo de validação, considerando-se que um método linear é aquele que gera resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro do intervalo especificado.²⁷ Deve-se, então, submeter os resultados a testes estatísticos para determinação do coeficiente de correlação (r), interseção com eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo.

Pelo método dos mínimos quadrados, obteve-se a equação da reta $y = 0,0526x + 0,0074$. A análise da regressão linear demonstrou um coeficiente de determinação (R^2) muito próximo da unidade (0,9991), o que sugere a linearidade do método.

Através da análise de variância,^{28,29} pode-se testar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada. Utilizando a razão entre a média quadrática (falha de ajuste) e a média quadrática (erro puro) foi possível verificar se houve falha de ajuste (Tabela 1).

Através do teste F, analisou-se a validade da regressão e o modelo linear da curva analítica. Assim, foram comparados valores de F tabelados e calculados. Para avaliar o comportamento linear da curva, foi comparado o F_0 obtido para a linearidade com o $F_{crítico}$ ou $F_{tabelado}$, de forma que para comprovar a linearidade se deve encontrar um valor de F_0 menor que o $F_{crítico}$. Esta relação apresentou um $F_{calculado}$ (F_0) igual a 3,19, abaixo do valor crítico tabelado 4,83. Pode-se afirmar, portanto, com 95% de confiança, que o modelo é linear e está bem ajustado na faixa de concentração estudada.

Para a validade da regressão, também foram comparados valores de F_0 e $F_{crítico}$, de modo que para o coeficiente angular da curva ser diferente de zero se deve ter valores de F_0 maiores que os de $F_{crítico}$. O valor encontrado para F_0 foi 6120,16, muito maior

do que o $F_{crítico}$ 6,410. Assim, concluiu-se que a inclinação da reta não é nula.

A partir da curva analítica foram estimados o limite de detecção, a menor concentração detectável de analito pelo método e o limite de quantificação, a menor concentração quantificável do mesmo.^{7,26,27} Obtiveram-se os seguintes valores: LD = $0,5879 \mu\text{g mL}^{-1}$ e LQ = $1,9597 \mu\text{g mL}^{-1}$, que demonstram a sensibilidade do método, comprovando que o mesmo é adequado aos objetivos propostos.

Outro parâmetro analítico avaliado, a precisão, mede o grau de variação dos resultados apresentados pelo método proposto. Segundo a RE 899/2003,²³ os resultados obtidos para as medições da precisão não podem apresentar variações, que são expressas em coeficiente de variação, superiores a 5%. Conforme pode ser visto nas Tabelas 2 e 3, todos os resultados encontrados se mantiveram dentro do critério de aceitação, sendo o método preciso para ambos os tipos de precisão avaliados. Logo, pode-se afirmar que o método se apresenta preciso intracorrída e intercorrída.

Tabela 2. Resultados do estudo da precisão

Período	Dia 1		Dia 2	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
Analista	1	2	1	2
Abs média	0,564	0,595	0,564	0,595
DP	0,005	0,002	0,005	0,002
CV (%)	0,8	0,2	0,8	0,2

Abs = absorvância. n = 6. DP = Desvio-padrão. CV = coeficiente de variação.

Tabela 3. Resultados do estudo aplicado da precisão

	Intradia				Interdia			
	Dia 1		Dia 2		Dia 1 x Dia 2		Dia 1 x Dia 2	
Analista	1	2	1 x 2	1	2	1	2	
Absorvância média (n=6)	0,577	0,561	0,569	0,589	0,579	0,598	0,578	0,580
DPR (%)	0,015	0,025	0,022	0,015	0,016	0,004	0,015	0,026
CV (%)	2,58	4,46	3,80	2,59	2,85	0,66	2,67	4,46

DPR = Desvio-padrão relativo. CV = coeficiente de variação.

O critério de aceitação para a recuperação obtida para que o método seja considerado exato e específico é de $\pm 2,0\%$,³⁰ ou seja, entre 98,0 e 102,0%. Como a porcentagem de recuperação média foi de 99,88% (Tabela 4), considera-se o método como sendo específico.

De acordo com as normas do ICH (*International Conference on Harmonization*),²⁶ a exatidão pode ser inferida desde que a precisão, linearidade e especificidade sejam estabelecidas. Sendo assim, pode-se afirmar que o método proposto é exato, visto que estes três

Tabela 4. Resultados do teste de recuperação

Concentração teórica (%)	Concentração experimental ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação média (%)
80	8,09 \pm 0,05	100,54 \pm 0,65
90	9,12 \pm 0,09	100,25 \pm 0,34
100	10,12 \pm 0,07	99,44 \pm 0,10
110	11,13 \pm 0,08	99,62 \pm 0,33
120	12,14 \pm 0,04	99,58 \pm 0,37
Média	-	99,88

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3)

Tabela 5. Resultados do estudo da estabilidade da solução analítica

Replicata	Absorvância				
	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h
1	0,609	0,603	0,604	0,603	0,683
2	0,610	0,606	0,607	0,605	0,674
3	0,613	0,609	0,600	0,603	0,673
4	0,612	0,607	0,604	0,604	0,692
5	0,612	0,605	0,603	0,605	0,672
6	0,612	0,605	0,607	0,602	0,704
Média	0,611	0,606	0,604	0,604	0,683
DP	0,002	0,002	0,003	0,001	0,013
CV (%)	0,246	0,337	0,437	0,201	1,880

DP = Desvio-padrão. CV = Coeficiente de variação.

parâmetros foram avaliados. Pela Tabela 4, vê-se que tanto a recuperação média para cada nível de concentração quanto para a média de todos os níveis se situaram de 98,0-102,0%. Assim, entende-se que o método é capaz de medir exatamente a sinvastatina mesmo em presença de outros compostos.

Para o estudo da robustez, foi avaliada a estabilidade da solução analítica. Pelos resultados mostrados na Tabela 5, vê-se que as soluções se mantiveram estáveis por até 4 h após o preparo. Apesar de ter havido interferência nas leituras no intervalo de tempo 5 h, pode-se depreender que o método é robusto, pois dentro de 4 h foi possível determinar quantitativamente o fármaco, de modo que os teores encontrados foram próximos aos obtidos na determinação da precisão.

CONCLUSÕES

Nas condições descritas, o método espectrofotométrico para determinação quantitativa de sinvastatina em cápsulas se mostra de acordo com os parâmetros de validação exigidos pela legislação brasileira vigente. O método é, portanto, adequado para análises de rotina de controle de qualidade de cápsulas magistrais contendo sinvastatina, visto ser simples, rápido, seguro e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

- Carvalho, G. Q.; Alfenas, R. C. G.; *Rev. Nutr.* **2008**, *21*, 577.
- Brasil, Ministério da Saúde; *Portaria SAS n. 1015*, de 20/12/2002, http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/informes/SAS_P1.015_02informes.doc, acessada em Março 2010.
- <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/lista.pdf>, acessada em Fevereiro 2010.
- Meneghini, L. Z.; Adams, A. I. H.; *Rev. Bras. Farm.* **2007**, *88*, 67.
- Baracat, M. M.; Montanher, C. L. S.; Kubacki, A. C.; Martinez, R. M.; Zonta, G. A. N.; Duarte, J. C.; Nery, M. M. F.; Gianotto, E. A. S.; Georgetti, S. R.; Casagrande, R.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, *28*, 427.
- Farmacopéia Brasileira*, 4ª ed., Atheneu: São Paulo, 2003.
- The United States Pharmacopeia*, 32nd ed., United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2009.
- British Pharmacopoeia 2010*, The Stationery Office: London, 2009.
- European Pharmacopoeia*, 6th ed., Council of Europe: Strasbourg, 2008.
- The International Pharmacopoeia*, 3rd ed., World Health Organization: Geneva, 1994.
- The Japanese Pharmacopoeia*, 15th ed., <http://jpdn.nihs.go.jp/jp15e/>, acessada em Junho 2010.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*, 8ª ed., Secretaría de Salud: México, D.F., 2004.
- Farmacopeia Portuguesa*, 8ª ed., Infarmed: Lisboa, 2005.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, Peoples's Medical Publishing House: Beijing, 2005.
- Indian Pharmacopoeia*, Controller of Publications: Delhi, 1996.
- Srinivasu, M. K.; Raju, A. N.; Reddy, G. O.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *29*, 715.
- Coruh, Ö.; Özkan, S. A.; *Pharmazie* **2006**, *61*, 285.
- Gandhimathi, M.; Ravi, T. K.; Varghese, A.; Ninan, A.; *Ind. Drugs* **2003**, *4*, 707.
- Abu-Nameh, E. S. M.; Shawabkeh, R. A.; Ali, A.; *J. Anal. Chem.* **2006**, *61*, 63.
- Nováková, L.; Šatinský, D.; Solich, P.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 352.
- Arayne, M. S.; Sultana, N.; Hussain, F.; Ali, S. A.; *J. Anal. Chem.* **2007**, *62*, 536.
- Wang, L.; Asgharnejad, M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *21*, 1243.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; RE n° 899, de 29/5/2003; *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, Ministério da Saúde: Brasil, 2003.
- Valente Soares, L. M.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2001**, *60*, 79.
- Ribani M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- ICH; *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Q2B(R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 2005.
- Shahir, G. A.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 57.
- Montgomery, D. C. Em *Design and Analysis of Experiments*; Montgomery, D. C., ed.; Wiley: New York, 2000, p. 177-185.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4ª Ed., Bookman: Porto Alegre, 2010.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI); *Validación de Métodos Analíticos*, 2001, p. 23-125.