

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

JOICE OLIVEIRA BRITO

**INTERAÇÃO NEBIVOLOL-ATORVASTATINA: AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA
EM ESTUDO EXPERIMENTAL**

ALFENAS-MG

2014

JOICE OLIVEIRA BRITO

**INTERAÇÃO NEBIVOLOL-ATORVASTATINA: AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA
EM ESTUDO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

ALFENAS-MG

2014

Brito, Joice Oliveira.

Interação nebivolol-atorvastatina: avaliação farmacocinética em estudo experimental / Joice Oliveira Brito. -- Alfenas, MG, 2014.
103 f. -

Orientadora: Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. Inibidores de Hidroximetilglutaril-CoA Redutases. 2. Betabloqueadores adrenérgicos. 3. Plasma. 4. Farmacocinética. I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli. II. Título.

CDD: 615.7

JOICE OLIVEIRA BRITO

**INTERAÇÃO NEBIVOLOL-ATORVASTATINA: AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA
EM ESTUDO EXPERIMENTAL**

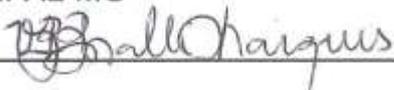
A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques.

Aprovada em 30/06/2014

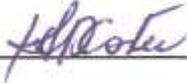
Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

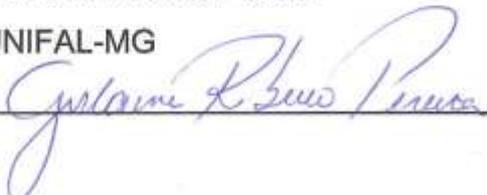
Profa. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa

Instituição: UNIFENAS-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Gislaíne Ribeiro Pereira

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques minha gratidão por ter me acolhido e estado sempre ao meu lado em todos os momentos desta grande conquista.

Ao meu noivo, Éder, pelo carinho e por todos os momentos de apoio e companheirismo incondicional, pois sem sua ajuda não teria alcançado mais esta vitória, a ele minha eterna gratidão.

Aos meus pais e minha irmã Nathalie, pelo apoio incondicional e orações.

À Deus, por ter me dado forças para não desistir e superar os obstáculos.

Às amigas Taila e Juliana, que com paciência e solidariedade me auxiliaram nas atividades do dia-a-dia, transmitindo-me seus conhecimentos.

Aos meus amigos, Angélica, Ana Paula, Sandro, Michele, Camila, Dani, Cris e Katrine pela torcida e amizade, pois sempre tinham aquela palavra amiga para me confortar.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Análises de Toxicantes e Fármacos – LATF, pelo apoio e suporte durante esta jornada.

À UNIFAL-MG pelo apoio financeiro e oportunidade.

À União Química que promoveu com seu apoio técnico e estrutura a realização de parte deste projeto.

E a todos aqueles que sempre estiveram na torcida e que direta ou indiretamente participaram da concretização deste trabalho, o meu sincero Muito Obrigada!

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível!”*

Charles Chaplin

RESUMO

Atualmente, hipertensão e hipercolesterolemia afetam um terço da população mundial. A ocorrência dessas duas patologias concomitantemente é comum, exigindo um regime terapêutico que associe medicamentos para o controle de níveis elevados da pressão arterial e níveis séricos de colesterol. Este estudo propõe a avaliação experimental da interação farmacocinética de um betabloqueador de terceira geração, o nebivolol (NEB), com a atorvastatina (ATV), uma estatina que bloqueia a síntese do colesterol. Para isso, ratos Wistar machos (200-250g, n=6 para cada ponto de colheita) foram tratados em esquema de dose única dos medicamentos, em situação de associação ou não. Duas metodologias analíticas foram desenvolvidas, sendo o preparo de amostra realizado através de extração líquido-líquido, para ambos. O NEB foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (coluna C18) com detecção em ultravioleta (282nm) e a ATV por cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a espectrômetro de massas (coluna XR-ODS/C18). As metodologias analíticas desenvolvidas foram validadas segundo a legislação vigente (ANVISA, RDC27/2012) sendo adequadas à aplicação em estudos farmacocinéticos. As concentrações plasmáticas obtidas foram utilizadas para a modelagem farmacocinética dos perfis para cada grupo avaliado (NEB, ATV e NEB-ATV). Não foi observada qualquer alteração na farmacocinética da ATV nos grupos quando em associação com o NEB. O NEB na situação de associação teve alterações significativas ($p < 0,05$) nos seguintes parâmetros: aumento no *clearance* (7,36 vs 10,79 L/h/kg) e (0,43 vs 0,80 h⁻¹) na constante de eliminação na situação de interação em relação ao grupo controle; e redução (1097,21 vs 745,45ng.h/mL) da $ASC^{0-\infty}$ e (1,62 vs 0,88 h) da meia-vida na situação de interação em relação ao grupo controle. Tais alterações observadas podem causar alterações na farmacodinâmica do NEB uma vez que foi observada a redução de ASC de 32% aproximadamente. Nesta situação, a associação, que é comum na clínica, não é adequada ou candidata para serem utilizadas em uma mesma forma farmacêutica.

Palavras-chaves: Nebivolol. Atorvastatina. Farmacocinética. Plasma.

ABSTRACT

Currently, hypertension and hypercholesterolemia affect a third of the world population. The occurrence of these two diseases concurrently is usual, requiring a treatment regimen involving drugs for the control of elevated blood pressure and serum cholesterol levels. This study proposes an experimental evaluation of pharmacokinetic interaction of third generation beta-blocker, nebivolol (NEB,) with atorvastatin (ATV), a statin that blocks the synthesis of cholesterol. For this, male Wistar rats (200-250g, n = 6 for each sampling point) were treated with single oral dose of both drugs, in association or not. Two analytical methods were developed, and the sample preparation was carried out by liquid-liquid extraction for both of them. The NEB was quantified by high performance liquid chromatography (C18 column) with UV detection (282nm) and ATV by ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometer (column XR-ODS/C18) performance. The developed analytical methods were validated according to current legislation (ANVISA RDC 27/2012) being suitable for application in pharmacokinetic studies. Concentrations obtained were used for modeling of pharmacokinetic profiles for each group evaluated (NEB, ATV and NEB-ATV). No changes were observed on ATV pharmacokinetics when it were combined with the NEB. The association of NEB with ATV showed significant alterations ($p < 0.05$) in the following parameters: increase in *clearance* (7.36 vs 10.79 L/h /kg) and (0.43 vs 0.80 h⁻¹) the elimination constant in interactions compared to the control group; and reduction (1097.21 vs 745.45 ng.h/mL) of AUC^{0-∞} and (1.62 vs 0.88 h) half-life in interactions compared to the control group. These observed alterations may cause changes on NEB pharmacodynamics since AUC reduction was approximately 32%. The association, which is common in clinical practice, is not candidate to be used in the same pharmaceutical form.

Keywords: Nebivolol. Atorvastatin. Pharmacokinetics. Plasma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estruturas químicas dos betabloqueadores.....	21
FIGURA 2 - Estrutura química do nebivolol.....	22
FIGURA 3 - Mecanismo de ação do nebivolol na vasodilatação dos tecidos endoteliais.....	23
FIGURA 4 - Estrutura química da atorvastatina.....	26
FIGURA 5 - Biossíntese do colesterol.....	27
FIGURA 6 - Representação esquemática das inter-relações entre absorção, distribuição, ligação, metabolismo e excreção de um fármaco e sua concentração em seu local de ação.....	29
FIGURA 7 - Cromatograma plasma adicionado de padrão de nebivolol (250 ng/mL) e padrão interno.....	52
FIGURA 8 - Cromatogramas do teste de seletividade. (A) Amostra de <i>pool</i> de plasma branco (B) Amostra de LIQ extraído.....	53
FIGURA 9 - Cromatograma amostra zero (plasma adicionado de padrão interno).....	54
FIGURA 10 - Curva analítica de nebivolol em plasma de ratos.....	56
FIGURA 11 - Cromatograma plasma branco fortificado com padrão de atorvastatina (500 ng/mL) e padrão interno.....	65
FIGURA 12 - Cromatogramas do teste de seletividade. (A) Amostra de <i>pool</i> de plasma branco (B) Amostra de LIQ extraído.....	66
FIGURA 13 - Cromatograma amostra zero (plasma adicionado de padrão interno).....	67
FIGURA 14 - Curva analítica de atorvastatina em plasma de ratos.....	68
FIGURA 15 - (A) Cromatograma amostra do grupo nebivolol (tempo de colheita 1 hora) - (B) Cromatograma amostra do grupo nebivolol-atorvastatina (tempo de colheita 1 hora).....	77
FIGURA 16 - (A) Cromatograma amostra do grupo atorvastatina (tempo de colheita 1,5 hora) – (B) Cromatograma do grupo nebivolol-atorvastatina (tempo de colheita 1,5).....	78
FIGURA 17 - Curva de concentrações plasmáticas <i>versus</i> tempo de	

atorvastatina no grupo atorvastatina (ATV) e grupo
interação (ATV-NEB)..... 83

FIGURA 18 -Curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo de
atorvastatina no grupo atorvastatina (NEB) e grupo
interação (NEB-ATV)..... 84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Equipamentos e materiais utilizados para o desenvolvimento, validação e análise das amostras de nebivolol e atorvastatina.....	36
TABELA 2 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos por UPLC-MS/MS.....	41
TABELA 3 - Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de nebivolol em plasma de ratos.....	56
TABELA 4 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de nebivolol em plasma de ratos por HPLC na faixa de concentração de 10 a 500 ng/mL.....	57
TABELA 5 - Limite de quantificação para nebivolol.....	58
TABELA 6 - Resultados do ensaio de precisão intracorrida e intercorridas relativo ao método analítico de quantificação de nebivolol em plasma de ratos.....	59
TABELA 7 - Resultados do ensaio de exatidão intracorrida e intercorridas relativo ao método analítico de quantificação de nebivolol em plasma de ratos.....	60
TABELA 8 - Recuperação do método analítico desenvolvido para extração de nebivolol em plasma de ratos.....	61
TABELA 9 - Resultados referentes ao teste de estabilidade de curta duração de nebivolol em amostras mantidas a temperatura ambiente por 18 horas.....	62
TABELA 10 - Resultados referentes ao teste de estabilidade de longa duração para nebivolol em amostras mantidas a temperatura de -70 °C por 90 dias.....	62
TABELA 11 - Resultados referentes ao teste de estabilidade de pós-processamento de nebivolol em amostras extraídas mantidas a temperatura ambiente por 12 horas.....	63

Resultados referentes às amostras do teste de	
TABELA 12 - estabilidade de nebivolol em plasma submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento..	63
TABELA 13 - Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos.....	69
TABELA 14 - Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 2 a 1000 ng/mL.....	70
TABELA 15 - Limite de quantificação para atorvastatina.....	70
TABELA 16 - Resultados do ensaio de precisão intracorrída e intercorridas relativo ao método analítico de quantificação de atorvastatina em plasma de ratos.....	71
TABELA 17 - Resultados do ensaio de exatidão intracorrída e intercorridas relativo ao método analítico de quantificação de atorvastatina em plasma de ratos.....	72
TABELA 18 - Recuperação do método analítico desenvolvido para extração de atorvastatina em plasma de ratos.....	73
TABELA 19 - Resultados referentes ao teste de estabilidade de curta duração da atorvastatina em amostras mantidas a temperatura ambiente por 12 horas.....	74
TABELA 20 - Resultados referentes ao teste de estabilidade de longa duração da atorvastatina em amostras mantidas a temperatura de -70 °C por 120 dias.....	74
TABELA 21 - Resultados referentes ao teste de estabilidade de pós-processamento da atorvastatina em amostras extraídas mantidas a temperatura ambiente por 12 horas.....	75
TABELA 22 - Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade da atorvastatina em plasma submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento..	75
TABELA 23 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos após análise dos perfis analisados do grupo tratado com nebivolol (dose única de 8 mg/kg).....	81

TABELA 24 - Parâmetros farmacocinéticos para nebivolol obtidos dos perfis analisados do grupo tratado com atorvastatina-nebivolol (dose única 20 mg/kg – 8 mg/kg), respectivamente.....	81
TABELA 25 - Parâmetros cinéticos avaliados do grupo controle (NEB) comparados aos parâmetros do grupo interação (ATV-NEB) para o nebivolol. Mediana, média (IC 95%), n=6....	82
TABELA 26 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos após análise dos perfis analisados do grupo tratado com atorvastatina (dose única de 20 mg/kg).....	83
TABELA 27 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos para atorvastatina dos perfis analisados do grupo tratado com atorvastatina-nebivolol (dose única 20 mg/kg – 8 mg/kg), respectivamente.....	83
TABELA 28 - Parâmetros cinéticos avaliados do grupo controle (ATV) comparados aos parâmetros do grupo interação (ATV-NEB) para a atorvastatina. Mediana, média (IC 95%), n=6.....	84

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	- Área sob a curva
ATV	- Atorvastatina
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cl_r/f	- <i>Clearance</i> aparente
C _{max}	- Concentração máxima
CQ	- Controle de qualidade
CQA	- Controle de qualidade alto
CQB	- Controle de qualidade baixo
CQM	- Controle de qualidade médio
CV	- Coeficiente de variação
DPa	- Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva analítica
DPR	- Desvio padrão relativo
FDA	- <i>Food and Drug Association</i>
FMN	- Fator de matriz normalizado
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	- Hidroximetil-glutaril-CoenzimaA
IC	- Intervalo de confiança
IC	- Inclinação da curva analítica
Kel	- Constante de eliminação
LD	- Limite de detecção
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
LIQ	- Limite inferior de quantificação
LSQ	- Limite superior de quantificação
min	- minuto
MRFIT	- Multiple Risk Factor Intervention Trial
NEB	- Nebivolol
NO	- Óxido nítrico
OMS	- Organização mundial da saúde
PI	- Padrão interno

RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RP	- Recém-preparada
S/A	- Sociedade anônima
SD	- Desvio padrão
$t^{1/2}$	- Meia-vida
Tmax	- Tempo para atingir concentração máxima
UNIFAL-MG	- Universidade Federal de Alfenas-Minas Gerais
UPLC-MS/MS	- Cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas
VLDL	- Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Nebivolol	20
2.2	Atorvastatina	24
2.3	Farmacocinética	28
2.4	Interações medicamentosas	31
3	JUSTIFICATIVA	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo geral	34
4.2	Objetivos específicos	34
5	MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1	Material	35
5.1.1	<i>Equipamentos e acessórios</i>	35
5.1.2	<i>Soluções padrão</i>	36
5.1.3	<i>Reagentes e soluções</i>	37
5.2	Métodos	38
5.2.1	<i>Protocolo experimental</i>	38
5.2.2	<i>Análise de atorvastatina em plasma</i>	39
5.2.2.1	Extração líquido-líquido.....	39
5.2.2.2	Determinação por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massa.....	39
5.2.3	<i>Análise de nebivolol em plasma</i>	40
5.2.3.1	Extração líquido-líquido.....	40
5.2.3.2	Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência.....	41
5.2.4	<i>Parâmetros de validação analítica</i>	41
5.2.4.1	Seletividade.....	41
5.2.4.2	Efeito residual.....	42
5.2.4.3	Efeito matriz.....	42
5.2.4.4	Limite de detecção.....	42
5.2.4.5	Limite de quantificação.....	43
5.2.4.6	Linearidade.....	43

5.2.4.7	Precisão intra e intercorridas.....	44
5.2.4.8	Exatidão intra e intercorridas.....	45
5.2.4.9	Recuperação.....	46
5.2.5	<i>Testes de estabilidade</i>	47
5.2.5.1	Estabilidade de curta duração.....	48
5.2.5.2	Estabilidade de longa duração.....	48
5.2.5.3	Estabilidade pós-processamento.....	48
5.2.5.4	Estabilidade em ciclos de congelamento de descongelamento..	49
5.2.6	<i>Análise farmacocinética</i>	49
5.2.7	<i>Análise estatística</i>	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1	Desenvolvimento e validação analítica do método bioanalítico para quantificação de nebivolol em plasma de ratos	51
6.1.1	<i>Seletividade</i>	51
6.1.2	<i>Efeito residual</i>	53
6.1.3	<i>Efeito matriz</i>	53
6.1.4	<i>Linearidade</i>	53
6.1.5	<i>Limite de detecção</i>	55
6.1.6	<i>Limite de quantificação</i>	55
6.1.7	<i>Precisão intra e intercorridas</i>	55
6.1.8	<i>Exatidão intra e intercorridas</i>	56
6.1.9	<i>Recuperação</i>	57
6.1.10	<i>Estabilidade</i>	58
6.1.10.1	Estabilidade de curta duração.....	58
6.1.10.2	Estabilidade de longa duração.....	58
6.1.10.3	Estabilidade pós-processamento.....	59
6.1.10.4	Estabilidade em ciclos de congelamento de descongelamento..	59
6.2	Considerações sobre a metodologia bioanalítica desenvolvida para a quantificação de nebivolol	60
6.3	Desenvolvimento e validação analítica do método bioanalítico para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos	62

6.3.1	<i>Seletividade</i>	63
6.3.2	<i>Efeito residual</i>	65
6.3.3	<i>Efeito matriz</i>	65
6.3.4	<i>Linearidade</i>	66
6.3.5	<i>Limite de detecção</i>	67
6.3.6	<i>Limite de quantificação</i>	67
6.3.7	<i>Precisão intra e intercorridas</i>	67
6.3.8	<i>Exatidão intra e intercorridas</i>	68
6.3.9	<i>Recuperação</i>	69
6.3.10	<i>Estabilidade</i>	70
6.3.10.1	Estabilidade de curta duração.....	70
6.3.10.2	Estabilidade de longa duração.....	70
6.3.10.3	Estabilidade pós-processamento.....	71
6.3.10.4	Estabilidade em ciclos de congelamento de descongelamento..	71
6.4	Considerações sobre a metodologia bioanalítica desenvolvida para quantificação de atorvastatina	72
6.5	Análise das amostras	74
7	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE A	100
	APÊNDICE B	101
	APÊNDICE C	102
	APÊNDICE D	103
	ANEXO A	104

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte de mais de 17 milhões de indivíduos a cada ano em todo o mundo. Um em cada três adultos no mundo inteiro, de acordo com o relatório divulgado pela Organização Mundial da Saúde (2012), apresenta hipertensão arterial, uma doença que provoca cerca de metade de todas as mortes por acidente vascular cerebral e doenças cardíacas, sendo o maior fator de risco em doenças cardíacas, infarto, insuficiência cardíaca congestiva, e doenças renais (GRAY, C.L.; NDEFO, U.A., 2008).

Fatores de risco cardiovascular é uma característica biológica ou comportamental que aumenta a probabilidade de incidência de doença cardiovascular. O conceito de fatores de risco cardiovascular surgiu há 50 anos com a publicação do estudo de Framingham (TERRADOS, N.; VALCÁRCEL, G.; VENTA, R., 2010).

Segundo Hobbs et al. (2006) os principais fatores de risco controláveis da doença cardiovascular documentados, são: níveis anormais de lipídeos no plasma (altos níveis de colesterol de baixa densidade e triglicérides, e baixas concentrações de colesterol de alta densidade); hipertensão; tabagismo.

Estudos revelaram que 80-90% dos pacientes com doença cardiovascular apresentam pelo menos um dos três fatores de risco listados (O'MEARA et al., 2004). Outros fatores de risco incluem: idade (acima de 55 anos), gênero masculino, histórico de acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, diabetes mellitus, proteinúria, hipertrofia ventricular e histórico familiar de doenças cardiovasculares (HOBBS et al., 2006).

Estimativas recentes da Organização Mundial da Saúde indicam que concentrações de colesterol total acima de 147 mg/dL (3,8 mmol/L) causam 18% das doenças cerebrovasculares e 56% das doenças cardíacas coronarianas, no mundo todo. Existe também a associação entre hipertensão e doenças cardiovasculares, onde aproximadamente dois terços dos acidentes vasculares cerebrais e a metade dos casos de doenças cardíacas coronarianas ocorrem devido ao aumento da pressão arterial sistólica (OMS, 2002; JOINT NATIONAL

COMMITTEE ON PREVENTION DETECTION, EVALUATION AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE, 2003).

Na hipertensão, existe correlação entre distúrbios no metabolismo lipídico, resistência à insulina, e fibrinólise prejudicada, expressa principalmente com o aumento dos níveis de inibição do ativador de plasminogênio tipo 1 e diminuição da atividade do ativador de plasminogênio nos tecidos (LANDIN, K.; TENGBORN, L.; SMITH, U., 1990; JENG et al, 1996; TOMIJAMA et al., 1998). A disfunção endotelial caracteriza um elo patogênico entre os fatores de risco, cujo agrupamento acelera o processo de aterogênese e sua complicação clínica. Para redução na morbidade e mortalidade, as orientações atuais para o tratamento da hipertensão, enfatizam não apenas atingir valores mais baixos para a pressão arterial, mas também normalizar o colesterol elevado e outros fatores de risco em pacientes hipertensos (CHOBANIAN et al., 2003).

A associação dos medicamentos para tratamento dos fatores de risco como hipertensão e hipercolesterolemia é um exemplo de associação que se faz necessária para a prevenção do avanço das doenças. Para isso, é importante saber o potencial de interação de fármacos frequentemente associados e isso pode ser estimado por suas propriedades farmacocinéticas e/ ou farmacodinâmicas (KLOTZ, U., 2002).

Assim, uma terapia combinada de um anti-hipertensivo e um antilipemiante é sugerida para alcançar níveis séricos adequados para o controle dessas duas comorbidades, a situação ideal para que ocorra aderência melhorada ao tratamento seria de dosagem simultânea em uma mesma forma farmacêutica, uma vez que as terapias convencionais disponíveis para o tratamento de pacientes que apresentam um quadro de hipertensão e hipercolesterolemia muitas vezes não tem a aderência desejada.

A não aderência a terapias prescritas ocorrem em até 50% dos pacientes que interrompem seu regime terapêutico. Os fatores que influenciam a aderência ao tratamento são: conscientização do paciente, custo, diferenças em regimes de dosagem, histórico de doenças cardiovasculares, número de medicações administradas concomitantemente, efeitos colaterais e a não resposta a determinada terapia. Existe uma base de evidências que sugere que simplificando o regime terapêutico e reduzindo o número de medicamentos a adesão ao tratamento pelo paciente será aumentada (HOBBS et al., 2006).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A hipertensão arterial provoca um impacto relevante na qualidade de vida da população por ser um dos principais fatores de risco cardiovascular e o principal fator de risco para o avanço da insuficiência renal (OMS, 1999).

Historicamente, uma série de fatores como hipercolesterolemia, hipertensão, hiperglicemia, uso de nicotina, sedentarismo, entre outros, estão sendo utilizados para determinar os fatores de risco cardiovascular individual (TERRADOS, N.; VALCÁRCEL, G.; VENTA, R, 2010).

Hipertensão e dislipidemia são dois dos mais comumente concomitantes fatores de risco cardiovasculares; mais de 50% dos pacientes com hipertensão também apresenta um quadro de dislipidemia. Estudos como MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention Trial) reportam que a presença concomitante de hipertensão e hipercolesterolemia resultam em aumento desproporcional no risco de doença cardiovascular, quando comparado à presença de apenas um dos fatores. Estudos clínicos evidenciam que pacientes com hipertensão e com apenas moderada hipercolesterolemia também podem ser beneficiados pelo tratamento com agentes hipolipemiantes. (MASON, P.R., 2005; HOBBS et al., 2006).

As elevações de níveis séricos de colesterol aumentam a pressão sanguínea através da regulação positiva dos receptores da angiotensina tipo 1, com um aumento correspondente da oxidação do colesterol levando a elevação da pressão arterial. Assim o controle do colesterol de baixa densidade (LDL) e da pressão arterial através da coadministração de um anti-hipertensivo e uma estatina tem potencial benéfico no tratamento de doenças cardiovasculares (RUMP et al., 2008).

Colesterol plasmático, lipoproteínas associadas e as apolipoproteínas desempenham um papel significativo no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e subsequente doença coronariana que também são influenciados por fatores genéticos e ambientais. Numerosas avaliações angiográficas demonstraram que a redução dos níveis de colesterol plasmático em pacientes com doença cardíaca coronariana pode retardar significativamente a progressão, e, em alguns casos, causar a regressão, da aterosclerose nestes pacientes. Além disso, os resultados dos ensaios clínicos em diferentes populações de pacientes mostraram

que a redução dos níveis plasmáticos de lipoproteínas pode levar a uma redução de eventos clínicos (BERTOLINI et al., 1997).

Uma abordagem terapêutica integrada para o tratamento concomitante de controle da hipertensão e dos altos níveis de colesterol é recomendado para os pacientes com/ ou de alto risco para doença cardíaca coronariana, ou outras doenças ateroscleróticas (RUMP et al., 2008).

2.1 Nebivolol

Os betabloqueadores estão entre os agentes de primeira escolha para o tratamento da hipertensão em pacientes que não apresentam outras comorbidades, bem como em pacientes hipertensos com outras complicações clínicas, como por exemplo: diabetes, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca. A classe dos betabloqueadores é constituída por fármacos com propriedades farmacológicas muito heterogêneas. O atenolol, um dos mais antigos β_1 -seletivos, betabloqueador hidrofílico, esteve envolvido na maioria dos estudos que relatam efeitos negativos na terapia com betabloqueadores (CHENG, J.W., 2009). Desde a introdução do propranolol, primeiro betabloqueador não seletivo, esta classe de fármacos anti-hipertensivos evoluiu englobando quatro categorias, sendo, β_1/β_2 – bloqueadores não seletivos (propranolol, nadolol); β_1 -bloqueadores seletivos (metoprolol, atenolol, bisoprolol); β -bloqueadores não seletivos com propriedades α_1 -bloqueador (carvedilol, labetalol) e β -bloqueadores com atividade simpatomimética intrínseca (pindolol, acebutolol) (REITER, M.J., 2004). As estruturas moleculares estão representadas na Figura 1.

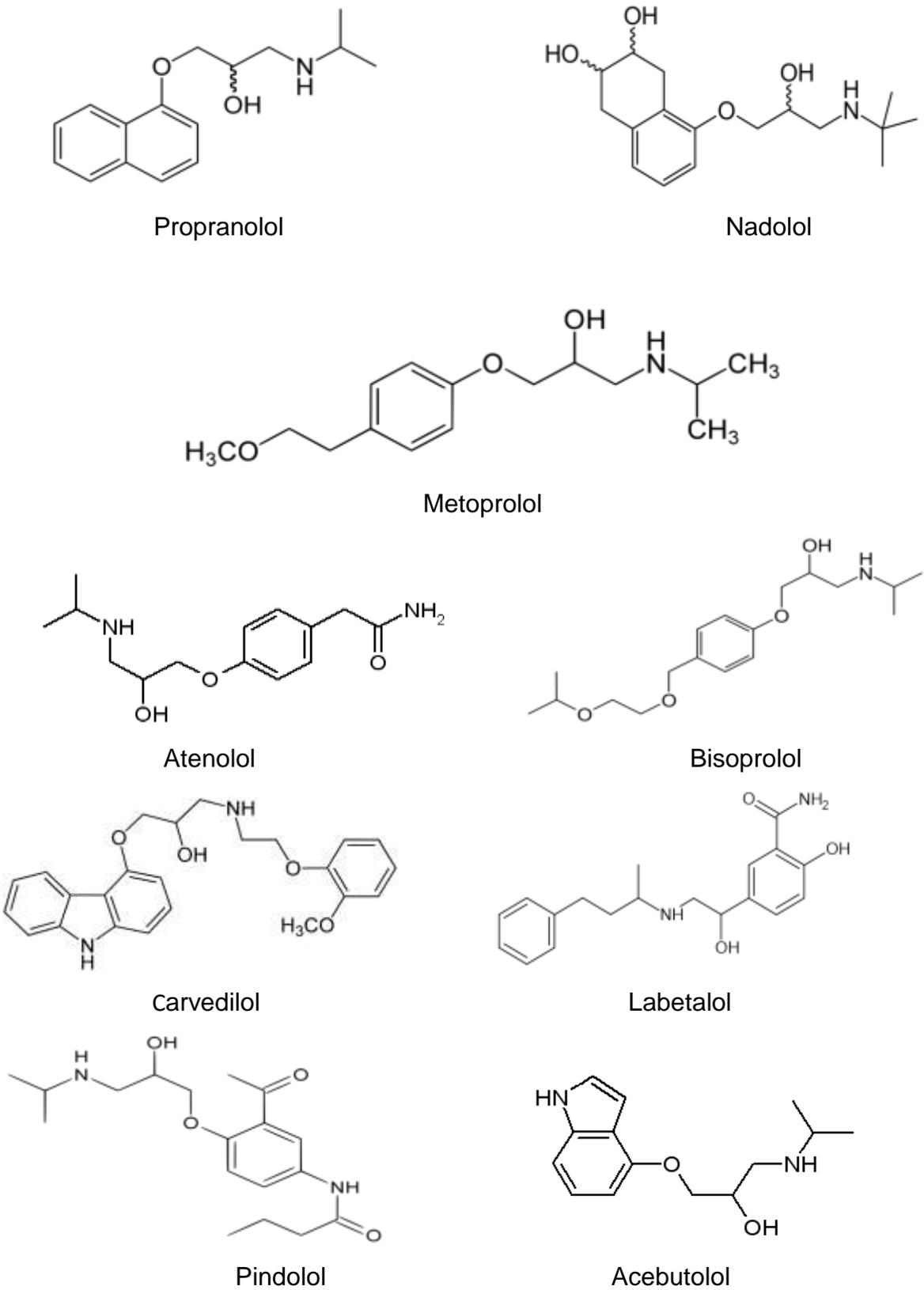


FIGURA 1 - Estruturas químicas dos betabloqueadores.

Fonte: Da autora.

Mais de 40% de pacientes hipertensos não respondem as doses da monoterapia, incluindo betabloqueadores, sendo necessárias alterações para terapias combinadas. A primeira geração de betabloqueadores inibe a ação de receptores β_2 mediando a vasodilatação e ainda melhoram a resposta de receptores alfa. A segunda geração são β_1 seletivos, e não seletivos na produção de efeitos pressores. Atualmente, betabloqueadores de terceira geração combinam ação betabloqueadora cardiosseletiva com efeitos vasodilatadores periféricos (CLEOPHAS et al., 2001).

O nebivolol é um betabloqueador de terceira geração que combina atividade betabloqueadora com ação vasodilatadora via mediação do óxido nítrico. Ao contrário de outros agentes da mesma classe, este fármaco não causa efeitos inotrópicos negativos, mas sim aumenta o débito cardíaco e o volume sistólico, sendo essas ações atribuídas à propriedade arteriodilatadora do nebivolol (IGNARRO et al., 2002).

O fármaco foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da hipertensão em Dezembro de 2007 e também aprovado em outros 76 países do mundo todo. Estudos demonstraram que o nebivolol é eficaz e bem tolerado no tratamento da hipertensão (LINDAMOOD et al., 2011).

O nebivolol, (\pm)-[(S,R,R,R)+(R,S,S,S)]-a,a0-[iminobis(metileno)]bis[6-fluoro-3,4-dihidro-2H-1-benzopirano-2-metanol] (Figura 2), possui fórmula molecular $C_{22}H_{25}F_2NO_4$, peso molecular de 405,435 g/mol, pka de 8,2, sendo um fármaco altamente lipofílico (coeficiente de distribuição octanol/ água, log P= 4,03) (CHEYMOL et al., 1997).

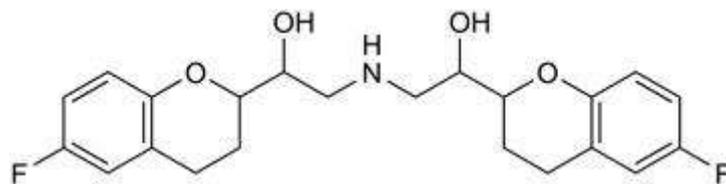


FIGURA 2 - Estrutura química do nebivolol.

Fonte: Da autora.

Como pode ser observada na Figura 2, a molécula de nebivolol possui quatro centros quirais, e está disponível na clínica como uma mistura racêmica, contendo

quantidades idênticas dos enantiômeros *d*-nebivolol (SRRR) e *l*-nebivolol (RSSS) (SELVAN et al., 2007).

O *d*-enantiômero é responsável pela propriedade betabloqueadora enquanto que o *l*-enantiômero promove a liberação de óxido nítrico das células endoteliais, reduzindo a pressão sanguínea pela indução da NO sintase (GEORGESCU et al., 2005; SELVAN et al., 2007), corrige completamente a disfunção endotelial induzida pela angiotensina II (CLEOPHAS et al., 2001). Os efeitos do nebivolol racêmico na função ventricular esquerda são principalmente devido à ação β -bloqueadora do *d*-nebivolol, enquanto o *l*-nebivolol melhora os efeitos hemodinâmicos do *d*-nebivolol. Assim, o nebivolol racêmico reduz a pressão sistólica e diastólica e causa a redução da resistência vascular periférica, sem deprimir a função ventricular esquerda (BORTEL et al., 1996), como demonstra a Figura 3.

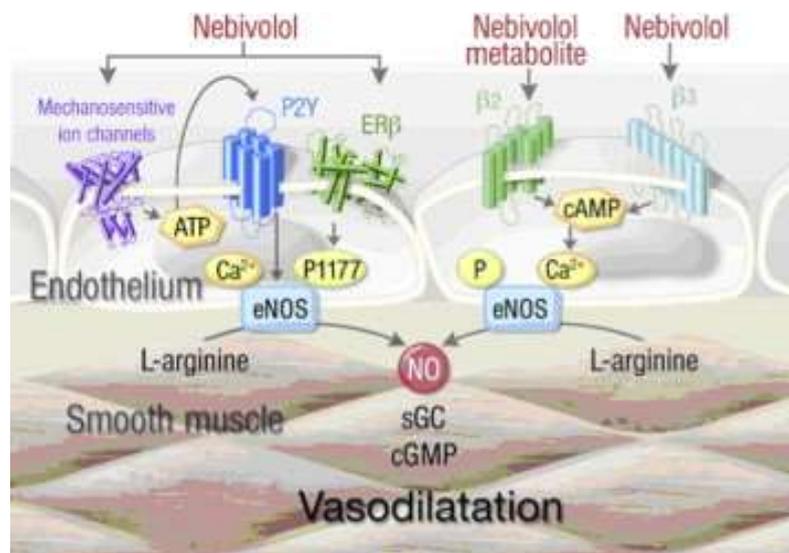


FIGURA 3 - Mecanismo de ação do nebivolol na vasodilatação dos tecidos endoteliais.

Fonte: MUNZEL et al. (2009, p. 1494).

A ação antagonista adrenérgica do nebivolol impede que o agonista natural exerça sua atividade por competição ao receptor β_1 , inibindo diretamente, de modo seletivo, os efeitos das catecolaminas (BORTEL et al., 1996).

Evidências experimentais indicam que o nebivolol tem ação vasodilatadora atribuída ao mecanismo endotélio-dependente envolvendo óxido nítrico. A resposta vasodilatadora do nebivolol em vasculatura do antebraço humano é dependente da via L-arginina/ óxido nítrico em resposta da inibição da *N^Gmetilarginina* (COCKROFT

et al., 1995; DAWES et al., 1999). Outros estudos revelaram que o nebivolol causa vaso relaxamento, através da ativação do metabolismo do fosfato inositol endotelial, mobilização do cálcio intracelular e consequente ativação da NO sintase (IGNARRO et al., 2002).

Weiss, Saunders e Greathouse (2011) mostraram em um estudo de eficácia e tolerância ao nebivolol, comparado a um grupo placebo, significativas reduções de pressão sanguínea diastólica e sistólica, com regulação da pressão arterial em duas semanas após o início da terapia, e a manutenção da pressão sanguínea se prolongou em intervalos de 24 h entre dosagens.

É rapidamente absorvido após administração oral, com concentração máxima plasmática atingida após 0,5 a 3 horas após a ingestão. Sofre metabolismo de primeira passagem onde ocorre a N-desalquilação, glicuronidação e hidroxilação do complexo aromático presente em sua molécula. A desalquilação e hidroxilação envolvem a isoforma CYP2D6 do citocromo P450, em ambos metabolizadores, lentos e extensos. Os metabólitos hidroxilados e glicuronizados do nebivolol são farmacologicamente ativos (LINDAMOOD et al., 2011). A meia-vida estimada para metabolizadores lentos é de 32 horas e de 10 horas para metabolizadores extensivos em humanos (DERY, A.S.; HAMILTON, L.A.; STARR, J.A., 2011).

A biodisponibilidade oral para metabolizadores lentos é de 12% e para extensivos é de 96%, porém essa diferença não é relevante clinicamente. A absorção do nebivolol não é alterada pela ingestão de alimentos, e ambos enantiômeros, *d/l*-nebivolol estão altamente ligados à proteínas plasmáticas (98%), principalmente à albumina. O volume de distribuição para metabolizadores lentos é de 39,4 L/kg e extensivos de 10,1 L/kg (GRAY, C.L; NDEFO, U.A., 2008). A fração da dose excretada na urina sob forma inalterada é menor que 0,05% (CHEYMOL et al., 1997).

2.2 Atorvastatina

A hiperlipidemia é um distúrbio comum caracterizado por VLDL e LDL elevados. Os indivíduos afetados apresentam elevados níveis plasmáticos de colesterol total (250-500 mg / dL) e triglicérides (> 250 mg / dL). Os diferentes

fenótipos compreendendo hiperlipidemia e hiperlipoproteinemia familiar combinada, são muito comuns e estão associados a um risco aumentado para a incidência da aterosclerose e doença cardíaca coronária. Modificações na dieta e a prática de exercícios físicos normalmente não são suficientes para o tratamento e a farmacoterapia geralmente é requerida. A Sociedade Europeia de Aterosclerose e o Programa de Educação Nacional do Colesterol consideram os fibratos e os inibidores da hidroximetilglutaril coenzima A redutase serem efetivos no tratamento da hiperlipoproteinemia familiar combinada (AVISAR, I.; BROOK, J.G.; WOLFOVITZ, E., 2008).

As estatinas são fármacos antilipidêmicos inibidoras da hidroximetilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), uma enzima da via do mevalonato, via metabólica que sintetiza o colesterol. A maioria das estatinas disponíveis (lovastatina, pravastatina, sinvastatina e fluvastatina) reduzem os níveis de LDL e colesterol total (até 48% e 36%, respectivamente) com ação dose dependente, porém apresentam modesta eficácia na redução do triglicérides plasmático (12-17%). Enquanto os fibratos reduzem com eficácia níveis séricos de triglicérides, mas não apresentam uma redução consistente de LDL e colesterol total (7-22%) (PASHA et al., 2006).

Essa classe terapêutica é amplamente empregada no tratamento da hipercolesterolemia, reduzindo níveis séricos de lipídeos, modificando a composição lipoproteica e suprimindo a síntese de colesterol. Ensaios clínicos em larga escala relataram a importância das estatinas na redução da concentração de lipoproteínas de baixa densidade do colesterol e na prevenção de eventos cardiovasculares (LEE et al., 2007; KAPELLE, P.J.W.H.; DALLINGA-THIE, G.M.; DULAART, R.P.F., 2010).

A atorvastatina, cujo nome químico é ácido [R-(R*,R*)]-2-(4-fluorofenil)- β,δ -dihidroxi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4[(fenilamino)carbonil]-1H-pirrol-1-heptanóico (figura 2), possui fórmula molecular $C_{33}H_{35}FN_2O_5$, peso molecular 558,64, pka de 4,5 e log P (octanol/ água) de 5,7. É um potente fármaco inibidor da HMG-CoA redutase, sendo essa uma enzima limitante na biossíntese do colesterol e tem demonstrado ser efetiva no controle do triglicérides (BAHRAMI et al., 2005, LEE et al., 2007). Sua fórmula estrutural esta representada na Figura 4.

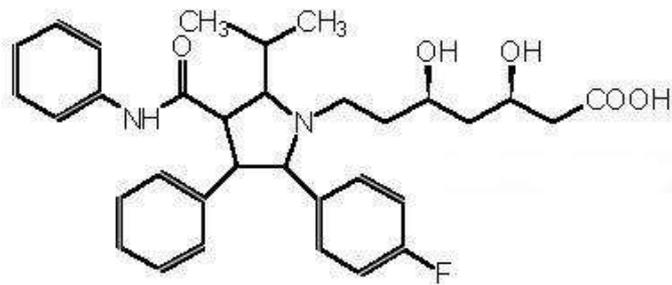


FIGURA 4 - Estrutura química da atorvastatina.

Fonte: Da autora.

É o fármaco de primeira escolha na terapia contra a hipercolesterolemia, com capacidade de reduzir níveis séricos de LDL e colesterol total e também de reduzir significativamente (até 50%) a concentração de triglicérides no plasma; e regula os receptores de lipoproteínas de baixa densidade no fígado, resultando na redução dos níveis de colesterol circulante (AVISAR et al., 2008).

A enzima hepática, HMG-CoA redutase, catalisa a produção de mevalonato, um precursor dos esteróis, etapa crucial na biossíntese do colesterol, isoprenóides e outros lipídeos, e este fármaco possui grande afinidade pelo sítio ativo desta enzima (CORSINI et al., 1999) (Figura 5).

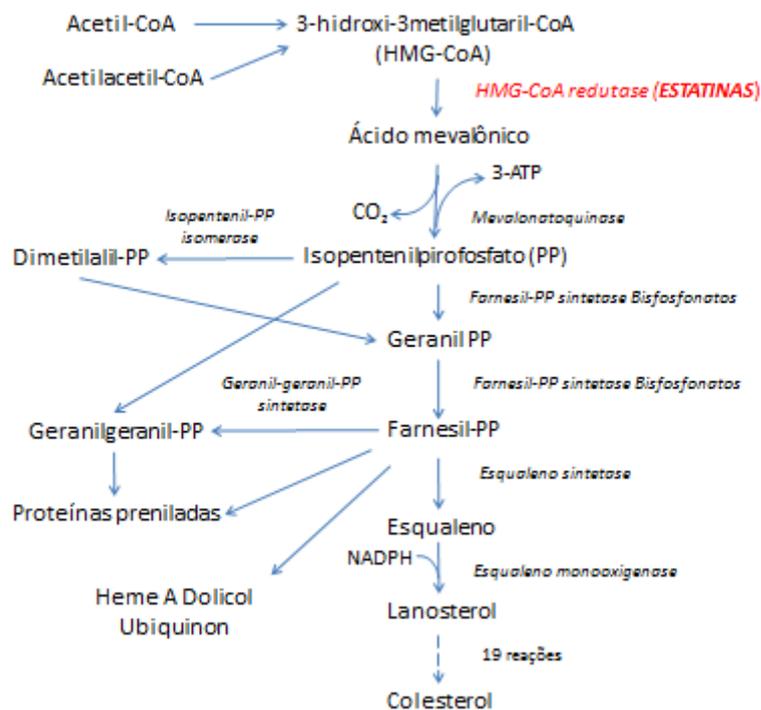


FIGURA 5 - Biossíntese do colesterol.

Fonte: Adaptada de SWANSON e HOHL (2006, p. 16).

Avisar, Brook e Wolfovitz (2008) relataram que em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica e heterozigótica, formas não familiares de hipercolesterolemia e dislipidemia mista, a atorvastatina reduziu o colesterol total, LDL-C e apolipoproteína B. A atorvastatina também reduziu o VLDL-colesterol (lipoproteínas de densidade muito baixa) e os triglicérides, e produzindo aumentos variáveis no HDL-colesterol (lipoproteínas de alta densidade) (FOGARI et al., 2004).

Seu metabolismo é hepático, primordialmente pelo citocromo P450 3A4. A meia vida de eliminação, ao contrário das demais estatinas, é mais extensa, de 15 a 30h em voluntários saudáveis, mas a meia-vida da atividade inibitória para a HMG-CoA redutase é de 20 a 30 horas, devido à contribuição dos metabólitos ativos. Menos de 2% de uma dose de atorvastatina é recuperada inalterada na urina após administração oral. O *clearance* total da atorvastatina é 0,25 L/h/kg, expressando essencialmente a eliminação por biotransformação. Em pacientes idosos as concentrações plasmáticas da atorvastatina se apresentam mais elevadas (aproximadamente 40% para C_{max} e 30% para ASC) em indivíduos idosos saudáveis (65 anos de idade ou mais) do que em adultos jovens (CORSINI et al., 1999).

O desenvolvimento de um método para a quantificação de analitos que sofrem interconversão, o primeiro passo, é a otimização de condições que eliminem ou minimizem a interconversão. Para amostras com estrutura química hidróxi-ácida e correspondente forma lactona, é importante manter o pH entre 4 e 5 para diminuir a interconversão. O aumento do pH (maior que 6) facilita a conversão da forma lactona para a ácida (na forma ionizada), enquanto que a diminuição do pH facilita a conversão da forma ácida para lactona ou da lactona para a forma não ionizada. A maioria dos trabalhos utiliza pH em torno de 4,5 (NOVÁKOVÁ et al., 2009).

2.3 Farmacocinética

A farmacocinética se baseia no estudo do movimento de xenobióticos (fármacos, compostos e novas entidades químicas) pelo organismo após sua administração, enquanto que a farmacodinâmica consiste no estudo da relação entre a concentração destes fármacos, compostos e novas entidades químicas introduzidas no organismo com o seus locais de ação, os alvos terapêuticos, por exemplo: receptores, transportadores ou enzimas; e a magnitude da resposta farmacológica (ABDEL-RAHMAN, S.M.; KAUFFMAN, R.E., 2004).

A farmacocinética estuda quantitativamente a cronologia dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação das drogas, representada na Figura 6; sendo a variável básica desse estudo a concentração dos fármacos e seus metabólitos nos diferentes tecidos e excreções do organismo. Esta concentração está correlacionada com a via de administração, com a dose empregada, com a eliminação e varia com o tempo da observação (SILVA, 2002).

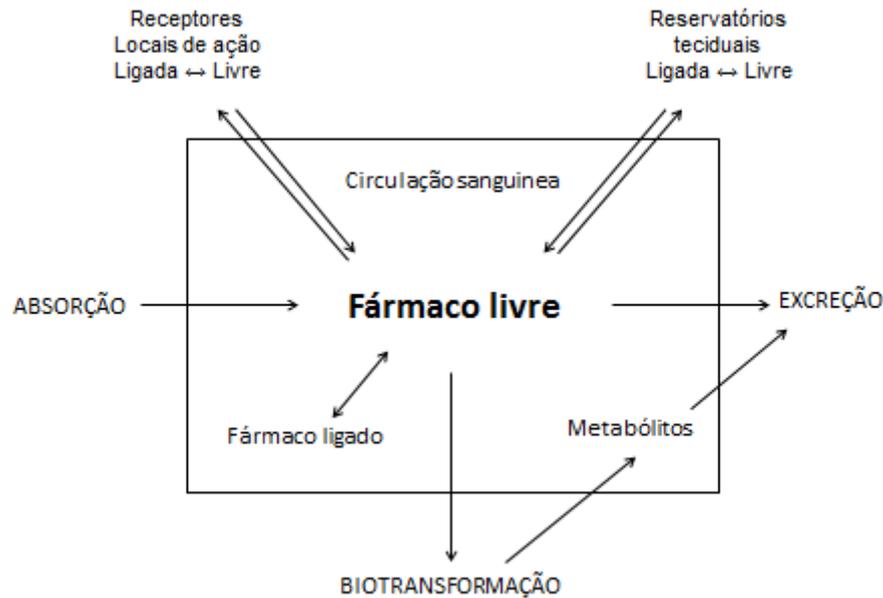


FIGURA 6 - Representação esquemática das inter-relações entre absorção, distribuição, ligação, metabolismo e excreção de um fármaco e sua concentração em seu local de ação.

Fonte: Da autora.

Durante o processo de absorção, o trato gastrointestinal é o local mais extensivamente utilizado para a introdução do fármaco no organismo, sendo a via oral, a mais utilizada para a administração de medicamentos (FAN, J.; LANNON, A.M., 2014). É bem conhecido o número de fatores que influenciam a absorção de fármacos após a administração oral de formas farmacêuticas. A complexa interação entre os eventos de liberação do fármaco, a dissolução, a permeação através do epitélio intestinal e do metabolismo pré-sistêmico na parede do intestino e fígado, determinam a velocidade e extensão da disponibilidade sistêmica do fármaco absorvido (WILLMANN et al., 2010).

A permeabilidade de um composto através de uma membrana é dependente de características, como: lipofilicidade, tamanho, peso molecular e carga; para que possa difundir passivamente pela membrana, porém certos compostos podem ser substrato para transportadores de efluxo limitando sua permeação através da membrana. Grandes compostos, com características polares ou carregados, que tem limitações de permeação nas bicamadas lipídicas da membrana celular, podem

utilizar transporte ativo para absorção, com consumo de energia (BRUNTON, L., 2010).

A ligação do fármaco às proteínas plasmáticas e aos componentes dos tecidos perfundidos é um dos principais fatores farmacocinéticos que determinam a distribuição e a eliminação deste fármaco no organismo. A extensão desta ligação afeta a velocidade de perfusão da concentração do fármaco após sua absorção, e em particular, o tempo de curso das concentrações do fármaco não ligado às proteínas plasmáticas. O fármaco livre constitui a base das atividades farmacológicas dos medicamentos (STEPENSKY, D., 2011).

O volume de distribuição é um parâmetro farmacocinético que reflete a complexidade das vias e dos padrões de distribuição dos fármacos pelo corpo. Numerosos estudos têm acesso a aspectos teóricos e aplicados relacionados com a estimativa do volume de distribuição e seu uso em cálculos farmacocinéticos. Os principais fatores que determinam o valor do volume de distribuição dos fármacos são a extensão e cinética de distribuição de drogas em órgãos e tecidos, e a sua cinética de eliminação (STEPENSKY, D., 2011).

Para a maioria dos fármacos, o metabolismo é a maior via de eliminação. O principal órgão envolvido no metabolismo de xenobióticos é o fígado, no entanto, tecidos extra-hepáticos também podem desempenhar um papel significativo. O intestino (enterócitos e microflora / microbioma), rim, pulmão, plasma, glóbulos vermelhos, placenta, pele e cérebro são locais de metabolização. Em geral, o metabolismo ocorre através de processos enzimáticos que transformam um composto lipofílico em metabólitos mais hidrofílicos, a fim de facilitar a sua excreção na bÍlis ou urina (KWON, Y., 2001).

As reações metabólicas se dividem em dois grupos: reações não sintéticas (fase I) e reações sintéticas (fase II). As reações não sintéticas envolvem a introdução ou exposição de um radical (por exemplo: oxidação, redução e hidrólise). As reações sintéticas conjugam os grupos funcionais dos fármacos ou seus metabólitos (hidroxila, carboxila e amina) aos grupos de substâncias endógenas, como: metila, ácido acético, ácido sulfúrico, ácido glicurônico e aminoácidos, a fim de tornar os metabólitos mais hidrofílicos (SILVA, 2002).

Existem duas principais vias de excreção de xenobióticos e seus metabólitos: a excreção ou *clearance* renal e biliar. Excreção renal inclui normalmente, um ou mais, de três processos distintos: filtração glomerular, secreção tubular e a

reabsorção do lúmen tubular renal. A excreção biliar é um processo que muitas vezes é facilitada por sistemas de transporte ativo localizados na membrana canalicular do hepatócito, uma importante via hepática de eliminação de muitos compostos (KWON, Y., 2001).

A eliminação da droga ocorre através da perfusão de sangue para os órgãos de eliminação, que são geralmente o fígado e o rim. O valor do *clearance* total do composto é um importante parâmetro farmacocinético, pois está diretamente relacionado à biodisponibilidade e a eliminação do fármaco; podendo ser utilizado para determinar a dosagem e a concentração em equilíbrio dinâmico de um fármaco (YAP, C.W.; LI, Z.R.; CHEN, Y.Z., 2006).

2.4 Interações medicamentosas

Interações na administração de diferentes fármacos podem ocorrer quando um agente terapêutico altera a concentração (interações farmacocinéticas) ou o efeito biológico do outro fármaco (interações farmacodinâmicas). Embora seus resultados possam ser tanto positivos (aumento da eficácia) como negativos (diminuição da eficácia, toxicidade ou idiosincrasia), elas são geralmente imprevistas e indesejáveis na farmacoterapia (HAMMES et al., 2008).

As alterações na farmacocinética entre fármacos podem ocorrer nos processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação. As enzimas do sistema CYP450 são responsáveis pela metabolização da maioria dos fármacos. A inibição da atividade enzimática pode resultar em maiores concentrações ou prolongamento da meia-vida do fármaco no organismo, o que pode aumentar o potencial de efeitos tóxicos. A significância clínica de uma interação específica de fármaco, depende do grau de acúmulo do substrato e de sua janela terapêutica (LEUCUTA, S.R.; VLASE, L., 2006).

A associação dos medicamentos para tratamento dos fatores de riscos como hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, depressão dentre outros, são exemplos de associações que se fazem necessárias para prevenção do avanço das doenças. Para isso, é importante saber o potencial de interação de fármacos frequentemente

associados e isso pode ser estimado por suas propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas (KLOTZ, U., 2002).

3 JUSTIFICATIVA

A hipertensão e a hipercolesterolemia são duas comorbidades que afetam uma grande parcela da população mundial. A administração de medicamentos concomitantemente para o tratamento desses dois fatores de risco é muito comum, porém a incidência de não aderência a farmacoterapia é frequente e muitas vezes devido às várias medicações prescritas. Sendo assim, a associação de fármacos em uma mesma forma farmacêutica é interessante para simplificar o regime terapêutico favorecendo a aderência ao tratamento. Através de estudos farmacocinéticos será possível estimar o potencial de interação entre estes fármacos e o alvo do nosso estudo será avaliar a interação farmacocinética entre um anti-hipertensivo (nebivolol) associado a uma estatina (atorvastatina) em um estudo experimental. Como não existem estudos na literatura sobre esta associação, o estudo foi realizado experimentalmente nesta fase para a observação dos possíveis efeitos adversos e minimização de risco a população, apesar de as duas substâncias serem disponíveis no mercado.

4 OBJETIVOS

A dissertação apresenta objetivo geral e específicos a serem estudados.

4.1 Objetivo geral

Avaliar a interação farmacocinética nebivolol-atorvastatina experimentalmente em ratos.

4.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos determinados para o desenvolvimento do estudo foram:

- a) Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de nebivolol e atorvastatina em plasma de ratos;
- b) Avaliar a farmacocinética do nebivolol e da atorvastatina em ratos tratados com doses únicas dos fármacos associados ou não, e a influência de cada um deles na farmacocinética do outro.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Nas metodologias desenvolvidas e validadas foram utilizados o material e métodos descritos nos itens 5.1 e 5.2.

5.1 Material

Todo material utilizado no desenvolvimento e validação estão descritos nos itens a seguir.

5.1.1 *Equipamentos e acessórios*

As etapas de desenvolvimento, validação e aplicação da metodologia para quantificação do nebivolol foram realizadas no Laboratório de controle de qualidade físico-químico da empresa União Química Farmacêutica Nacional S/A através da parceria estabelecida entre a universidade e a iniciativa privada.

As etapas de desenvolvimento, validação e aplicação da metodologia relativa à atorvastatina foram realizadas na UNIFAL-MG.

A Tabela 1 elenca os materiais utilizados no desenvolvimento, validação das metodologias e análise das amostras para nebivolol e atorvastatina.

TABELA 1 - Equipamentos e materiais utilizados para o desenvolvimento, validação e análise das amostras de nebivolol e atorvastatina.

Equipamento/acessório	Marca	Modelo/Descrição	Cidade
Agitador vertical	IKA®	VIBRAX VXR basic	Campinas - SP
Agulha de gavagem	Insight®	IC-810	Ribeirão Preto-SP
Balança analítica	Kern®	410	Una - BA
Balança analítica	Mettler Toledo	AB204S	Barueri-SP
Banho ultrassônico	Unique®	USC-2800 ^a	Indaiatuba-SP
Banho de água	Novatécnica®	NT 265	Piracicaba-SP
Bomba de vácuo	Sparmax®	New pump	São Paulo-SP
Centrífuga	Novatécnica®	NT-811	Piracicaba-SP
Centrífuga	Quimis®	Q222TM16	Piracicaba-SP
Coluna cromatográfica	SHIMADZU®	XR-ODS/C18	São Paulo-SP
Coluna cromatográfica	Waters®	Symmetry (C18)	Irlanda
Freezer (-20°C)	Prosdócimo®	F21-smile	Barueri-SP
Guilhotina	Insight®	EB-271	Ribeirão Preto-SP
Micropipetas	Gilson®	Pipetman	Villiers leBel-França
pHmetro	Tecnopon®	---	Piracicaba-SP
pHmetro	Metrohm®	827	São Paulo-SP
Pré-coluna	Ace®	C8	São Paulo-SP
Seringa	Bayer®	1 mL	São Paulo-SP
Sistema de purificação de água Milli-Q	Millipore®	Direct16	Molsheim-França
Ultrafreezer (- 80°C)	Nuaire®	Glacier	Campinas-SP

Fonte: Da autora.

5.1.2 Soluções padrão

O padrão certificado de cloridrato de nebivolol foi adquirido da Sigma-Aldrich (lote 080M4735V) e o padrão interno, cloridrato de propranolol, foi gentilmente cedido pela empresa União Química Farmacêutica Nacional S/A (lote 1200006407). Foi preparada solução estoque de nebivolol na concentração de 100µg/mL em metanol, e a partir desta foram preparadas as soluções de trabalho que quando utilizadas equivaleram às concentrações de 500, 250, 100, 50, 25 e 10 ng/mL em

plasma. Para o padrão interno foi preparada uma solução, que em plasma equivale a 100 ng/mL.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica para a atorvastatina o padrão utilizado foi cedido pela empresa União Química Farmacêutica Nacional S/A (Lote: 1300003456), bem como o padrão utilizado como padrão interno, sinvastatina (Lote: 1200011234).

Através da solução estoque na concentração de 1 mg/mL, uma diluição intermediária foi preparada na concentração de 100 µg/ mL, partindo-se desta foram preparadas as soluções de trabalho que quando utilizadas equivaleram às concentrações de 1000, 500, 100, 50, 10 e 2 ng/ mL. Para o padrão interno foi preparada uma solução, que em plasma equivale a 500 ng/mL.

5.1.3 Reagentes e soluções

Os reagentes e soluções listados abaixo foram utilizados nas metodologias validadas para nebivolol e atorvastatina:

- Água milli-Q;
- Acetonitrila grau HPLC, Tedia;
- Metanol grau HPLC, Tedia;
- Éter di-etílico grau HPLC, Tedia;
- Diclorometano p.a., J.T.Baker;
- Acetato de etila p.a., Tedia;
- Acetato de amônio p.a., Vetec;
- Fosfato de potássio monobásico p.a., J.T.Baker;
- Fosfato de sódio dibásico p.a., Merck;
- Hidróxido de sódio p.a., Merck;
- Ácido fosfórico p.a., Scharlau;
- Ácido acético p.a., Vetec;
- Solução tampão fosfato 0,03 M, pH 3,2;
- Solução de hidróxido de sódio 0,1 M;
- Solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0;
- Solução acetato amônio 0,5mM, pH 4,0.

5.2 Métodos

As metodologias utilizadas foram desenvolvidas e validadas para aplicação nas amostras obtidas dos grupos experimentais.

5.2.1 *Protocolo experimental*

Foram utilizados ratos machos Wistar de 200 a 250 g (n = 6 para cada ponto de colheita) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Antes do experimento os animais permaneceram no Biotério Institucional por três dias para adaptação, em ambiente com controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração e água. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal institucional sob o número 425/2012 (Anexo A).

Os fármacos foram administrados por gavagem, e o sangue colhido por decapitação. Foram realizados três grupos experimentais:

- a) Grupo Nebivolol: Os animais em estado de jejum de 12 horas receberam por via oral (gavagem) nebivolol racêmico dissolvido em água na dose de 8 mg/kg (WANG et al., 2011). As amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 20, 40 minutos e 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a administração. Como anticoagulante foi utilizada heparina;
- b) Grupo Atorvastatina: Os animais em estado de jejum de 12 horas receberam por via oral (gavagem) atorvastatina dissolvida em água na dose de 20 mg/kg (NEERATI, P.; GADE, J., 2011). As amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 5, 8, 12, 20, 30, 45 minutos e 1,5, 3, 4, 6, 9 horas após a administração. Como anticoagulante foi utilizada heparina;
- c) Grupo Nebivolol + Atorvastatina: Os animais em estado de jejum de 12 horas receberam por via oral (gavagem) nebivolol dissolvida em água na dose de 8 mg/kg e atorvastatina dissolvida em água na dose de 20 mg/kg. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 12, 20, 30,

45 minutos e 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, e 9 horas após administração. Como anticoagulante foi utilizada heparina.

As amostras foram mantidas ao abrigo da luz e acondicionadas a -70 °C até a análise.

5.2.2 *Análise de Atorvastatina em plasma de ratos*

Para a análise de atorvastatina em plasma foi desenvolvida a técnica de extração e otimização dos parâmetros cromatográficos.

5.2.2.1 Extração líquido-líquido

Em um tubo de centrifuga acondicionou-se 500 µL de plasma adicionando 25 µL de padrão interno e 100µL de ácido clorídrico 1%. Por agitação homogeneizou-se a mistura. Posteriormente, procedeu-se a extração com 3mL de acetato de etila em agitador de tubos, tipo vórtex, por 15 minutos e centrifugação por 5 minutos a 2500 g. Uma alíquota de 2 mL da fase orgânica foi separada e submetida a fluxo de nitrogênio em banho de água à 40 °C para concentração do extrato.

5.2.2.2 Determinação por cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massa

A partir da amostra concentrada, ressuspendeu-se o resíduo com 100 µL de fase móvel e injetou-se 10 µL no sistema cromatográfico (sistema cromatográfico UPLC-MS/MS 8030, Shimadzu®). A detecção e quantificação da atorvastatina foram realizadas, por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) acoplada à espectrometria de massa, utilizando para a separação uma coluna analítica C18 (XR-ODS, Shimadzu®) e fase móvel de composição acetato de amônio 0,5 Mm :

acetonitrila (40/60, v/v), com ajuste de pH para 4,0, com ácido acético. O sistema cromatográfico foi submetido a uma vazão de fase móvel a 0,6mL/min.

As condições cromatográficas desenvolvidas e validadas para a metodologia para quantificação de atorvastatina por UPLC-MS/MS estão representadas na Tabela 2.

TABELA 2 - Condições cromatográficas do método bioanalítico desenvolvido para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos por UPLC-MS/MS.

Parâmetros	Descrição
Técnica bioanalítica	UPLC-MS/MS
Detecção	Atorvastatina: 559,20 → 440,05 559,20 → 249,95 559,20 → 275,90 Padrão interno: 419,10 → 199,0 419,10 → 284,95 419,10 → 242,95
Coluna analítica	XR-ODS/C ₁₈
Pré-coluna	ODS(C ₁₈)
Temperatura da coluna	25°C
Fase móvel	Acetonitrila: solução acetato de amônio 0,05 mM, pH 4,0 (60:40 v/v)
Vazão da fase móvel	0,6mL/min
Volume de injeção	10 µL
Linearidade	2-1000 ng/mL
Tempos de retenção	Atorvastatina: 1,28 min Sinvastatina: 3,06 min
Tempo de análise	4,01 min
Tipo de integração	Base-a-base

Fonte: Da autora.

5.2.3 Análise de nebivolol em plasma de ratos

Para a análise de nebivolol em plasma foi desenvolvida a técnica de extração e otimização dos parâmetros cromatográficos.

5.2.3.1 Extração líquido-líquido

A 1,0 mL de plasma foi adicionado 100 µL de padrão interno, 50 µL de hidróxido de sódio 0,1 M, procedendo a extração por agitação em agitador vertical (Q220, Quimis®) de tubos com 4 mL de uma mistura de éter dietílico:diclorometano na proporção de 70:30, v/v; por 3 minutos. Após o tempo de agitação, 3 mL da fração orgânica foi separada e concentrada sob fluxo de nitrogênio em banho de água a 37 °C até a secura. A amostra seca foi ressuspensa com 350 µL de fase móvel, sendo 100 µL utilizados para análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

5.2.3.2 Determinação por cromatografia líquida de alta eficiência

O método analítico foi desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com fase móvel constituída por tampão fosfato 0,03 M e acetonitrila na proporção 1:1, v/v, pH ajustado a 3,2 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min, comprimento de onda a 282 nm em coluna cromatográfica C18 3,9 mm x 150 mm, tamanho de partícula de 5 µm.

5.2.4 *Parâmetros de validação analítica*

As metodologias foram validadas para os analitos nebivolol e atorvastatina com base nas recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC 27/2012.

5.2.4.1 Seletividade

Segundo a RDC 27/2012, a seletividade consiste na capacidade do método de diferenciar e quantificar o analito e PI na presença de outros componentes da amostra. Para sua avaliação foram analisadas amostras de plasma de seis fontes diferentes, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada. Cada amostra de plasma branco foi analisada conforme metodologia analítica desenvolvida neste estudo.

Os resultados obtidos comparados à amostra extraída na concentração do limite de quantificação (LIQ) devem apresentar áreas de picos interferentes no tempo de retenção do analito e do padrão interno inferiores, respectivamente, a 20% da área do LIQ e 5% da área na concentração utilizada, confirmando a seletividade do método.

5.2.4.2 Efeito residual

Para avaliar o efeito residual do método foram realizadas três injeções da amostra branco, uma antes da injeção do limite superior de quantificação (LSQ) e duas após. Para que não exista efeito residual, os resultados foram comparados com os obtidos da amostra processada do LIQ e a resposta dos picos interferentes no tempo de retenção do analito deveriam ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras processadas do LIQ.

5.2.4.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi feito utilizando-se oito matrizes biológicas distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. As matrizes foram processadas e em seguida adicionou-se solução de PI e analito nas mesmas concentrações de CQB e CQA, com $n=8$ para cada CQ. O cálculo do efeito dos componentes sobre o analito foi realizado de acordo com a fórmula descrita abaixo. São aceitos valores de CV para o fator de matriz normalizado (FMN) menor que 15%.

$$FMN = \frac{\text{resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{resposta do analito em solu\c{c}\~{a}o/resposta do PI em solu\c{c}\~{a}o}}$$

5.2.4.4 Limite de detec\c{c}\~{a}o

O limite de detec\c{c}\~{a}o \u00e9 a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, por\u00e9m n\u00e3o necessariamente quantificado, sob as condi\c{c}\~{o}es experimentais estabelecidas (BRASIL, 2012).

Este par\u00e2metro pode ser calculado segundo a f\u00f3rmula:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde,

DPa = desvio padr\u00e3o do intercepto com o eixo do Y da curva anal\u00edtica

IC = inclina\c{c}\~{a}o da curva anal\u00edtica

5.2.4.5 Limite de quantifica\c{c}\~{a}o

O limite de quantifica\c{c}\~{a}o foi determinado atrav\u00e9s da aplica\c{c}\~{a}o do m\u00e9todo de extra\c{c}\~{a}o desenvolvido de tal forma que o analito fosse quantificado na menor concentra\c{c}\~{a}o poss\u00edvel com coeficiente de varia\c{c}\~{a}o (CV) $\leq 20\%$. Sua determina\c{c}\~{a}o foi realizada por meio de 6 replicatas, considerando sua adequada visualiza\c{c}\~{a}o cromatogr\u00e1fica.

5.2.4.6 Linearidade

- *Nebivolol*

A partir da solução estoque de nebivolol (100 µg/mL), diluições foram preparadas nas concentrações de 100, 250, 500, 1000, 2500 e 5000 ng/mL em metanol. Para o padrão interno, é utilizada uma solução diluída na concentração de 1000 ng/mL.

A curva analítica foi construída através do enriquecimento de 1 mL do *pool* de plasma branco com 100 µL das diluições do padrão de nebivolol, supracitadas; e 100 µL da solução do padrão interno, submetendo as amostras ao processo de extração líquido-líquido.

A correlação entre a resposta obtida do equipamento cromatográfico e a concentração nominal dos padrões foi realizada a partir de 6 replicatas das concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ng/mL, sendo a concentração de 10 ng/mL o limite de quantificação.

- *Atorvastatina*

A partir da solução estoque de atorvastatina (1000 µg/mL) em metanol, preparou-se uma solução intermediária de 100 µg/mL, e a partir desta, as diluições de trabalho foram preparadas nas concentrações de 0,02, 0,2, 1,0, 2,0, 10,0 e 20 µg/mL, em metanol. Para o padrão interno, é utilizada uma solução diluída na concentração de 10,0µg/mL.

A curva analítica foi construída através do enriquecimento de 500 µL do *pool* de plasma branco com 25 µL das diluições do padrão de atorvastatina, citadas anteriormente; e 25 µL da solução de padrão interno, submetendo as amostras ao processo de extração líquido-líquido.

A correlação entre a resposta obtida do equipamento cromatográfico e a concentração nominal dos padrões foi realizada a partir de 6 replicatas das concentrações de 2, 10, 50, 100, 500 e 1000 ng/mL, sendo a concentração de 2 ng/mL o limite de quantificação.

O método de regressão linear foi aplicado, sendo o melhor modelo estatístico que explica os dados obtidos, para os métodos analíticos de nebivolol e atorvastatina.

Foram considerados adequados valores de coeficiente de correlação superiores ou iguais a 0,99.

5.2.4.7 Precisão intra e intercorridas

A precisão avalia, em idênticas condições de ensaio, o grau de repetibilidade entre os resultados individuais de análises quando um processo é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea.

Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR).

Nas diferentes concentrações de CQ avaliados foram considerados valores adequados quando estes foram inferiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, sendo calculado segundo a fórmula:

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

- *Nebivolol*

O parâmetro de precisão intracorrida foi avaliado através da análise, em um mesmo dia, de 6 replicatas de amostras de plasma adicionados de solução padrão nas concentrações de 25, 100 e 250 ng/mL, sendo estes os controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA), respectivamente, adicionados de padrão interno. A precisão intercorridas foi estabelecida da mesma forma que a precisão intracorrida, porém realizada em 3 dias diferentes.

- *Atorvastatina*

O parâmetro de precisão intracorrida foi avaliado através da análise, em um mesmo dia, de 6 replicatas de amostras de plasma adicionados de solução padrão nas concentrações de 10, 380 e 750 ng/mL, sendo estes os controles de qualidade baixo, médio e alto (CQB, CQM e CQA), respectivamente, adicionados de padrão interno. A precisão intercorridas foi estabelecida da mesma forma que a precisão intracorrida, porém realizada em 3 dias diferentes.

5.2.4.8 Exatidão intra e intercorridas

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor nominal, da mesma forma que a precisão, estabelecendo condições idênticas de ensaio, em uma amostra homogênea.

A exatidão é adequada quando se encontra na faixa de 85% a 115% (80% a 120% para o LIQ). Considerou-se que o desvio entre as replicatas dos CQs avaliados não deveriam ser superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%, sendo calculado segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Concentração média determinada}}{\text{Concentração nominal}} \times 100$$

- *Nebivolol*

Para avaliar a concordância entre o valor determinado e o valor real foram analisadas as concentrações de 25, 100 e 250 ng/mL (CQB, CQM e CQA), em 6 replicatas, analisadas em um mesmo dia (exatidão intracorrída), e em 3 dias diferentes (exatidão intercorridas).

- *Atorvastatina*

Para avaliar a concordância entre o valor determinado e o valor real foram analisadas as concentrações de 10, 380 e 750 ng/mL (CQB, CQM e CQA), em 6 replicatas, analisadas em um mesmo dia (exatidão intracorrída), e em 3 dias diferentes (exatidão intercorridas).

5.2.4.9 Recuperação

A eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos

resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

A recuperação foi determinada através da comparação entre as razões das áreas das amostras em que os padrões foram adicionados antes da extração com aqueles adicionados posteriormente.

- *Nebivolol*

A recuperação do método de extração desenvolvido foi avaliada através de 3 replicatas de plasma branco adicionado de padrões, nas concentrações de 25, 100 e 250 ng/mL (CQB, CQM e CQA). As amostras foram submetidas ao método de extração e em paralelo, outras 3 replicatas foram analisadas, porém com a adição dos padrões e PI após a etapa da extração, para cada concentração.

- *Atorvastatina*

A recuperação do método de extração desenvolvido foi avaliada através de 3 replicatas de plasma branco adicionado de padrões, nas concentrações de 10, 380 e 750 ng/mL (CQB, CQM e CQA). As amostras foram submetidas ao método de extração e em paralelo, outras 3 replicatas foram analisadas, porém com a adição dos padrões e PI após a etapa da extração, para cada concentração.

5.2.5 *Testes de estabilidade*

A estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado (BRASIL, 2012).

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante o manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas. As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência (BRASIL, 2012).

Devem ser empregadas apenas amostras cujo resultado da análise imediatamente após sua preparação estiver dentro de $\pm 15\%$ do valor nominal. A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% (quinze por cento) da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal. (BRASIL, 2012).

5.2.5.1 Estabilidade de curta duração

As amostras do estudo de estabilidade de curta duração devem ser processadas e analisadas após permanecerem a temperatura ambiente, ou na temperatura de processamento estabelecida para o método bioanalítico, por tempo superior ao que as amostras em estudo serão mantidas nas mesmas condições durante o estudo (BRASIL, 2012).

Foram mantidas as amostras por um período de 12 horas em temperatura ambiente até o início da extração. O resultado destas foi comparado com os resultados das amostras recém-preparadas.

5.2.5.2 Estabilidade de longa duração

As amostras de CQ, de baixa e alta concentrações, foram processadas e analisadas após serem armazenadas durante o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra em estudo e a análise da última, sendo considerado adequado desvios entre $\pm 15\%$ do valor nominal.

A temperatura de conservação utilizada no estudo foi de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, mesma temperatura a que foram armazenadas as amostras em estudo, em ultra-freezer.

5.2.5.3 Estabilidade pós-processamento

O ensaio que determina a estabilidade pós-processamento faz-se necessário em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção.

A estabilidade foi determinada para o analito em estudo e o PI na amostra processada para análise, na temperatura sob a qual o teste foi realizado e por período de tempo superior à duração da corrida analítica. Três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico foram avaliadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas, sendo considerados adequados desvios entre $\pm 15\%$ do valor nominal.

5.2.5.4 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

A estabilidade do processo de congelamento e descongelamento das amostras foi determinada após três ciclos de congelamento e descongelamento. Foram utilizadas amostras em triplicata das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico (CQs), nas seguintes condições: as amostras foram congeladas em ultra-freezer à $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas à temperatura de armazenamento, por 12 horas e, assim sucessivamente, até

contemplar os três ciclos, quantificando-se o analito nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas, sendo considerado adequado desvios entre $\pm 15\%$ do valor nominal.

5.2.6 *Análise farmacocinética*

A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight Corp, Mountain View, Calif, EUA). Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente. Os dados de concentração plasmática *versus* tempo após a administração oral do nebivolol e atorvastatina foram analisados por metodologia compartimental. A área sob a curva, concentração plasmática *versus* tempo ($ASC^{0-\infty}$) foi determinada pelo método linear trapezoidal do tempo zero até a última amostra coletada e extrapolada até o infinito dividindo-se a última concentração quantificada pela constante velocidade de eliminação.

O software WinNonlin gerou as estimativas iniciais e os limites superiores e inferiores para a correta estimativa final dos parâmetros farmacocinéticos (GABRIELSON, J.; WEINER, D., 2000). As estimativas finais incluem a constante velocidade de eliminação (k_{el}), a meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) e o *clearance* total aparente (Cl_T/f). os parâmetros C_{max} e t_{max} foram calculados utilizando as equações padrão do software.

5.2.7 *Análise estatística*

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software GraphPad Instat[®] (GraphPad Software, CA, USA) para obtenção da mediana, média, erro padrão da média e intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Foi realizado o teste de Mann-Whitney bicaudal para dados não pareados na aquisição dos dados. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos do desenvolvimento e validação dos analitos nebivolol e atorvastatina, bem como a análise das amostras dos grupos em estudo (nebivolol, atorvastatina e interação) foram discutidos separadamente, como segue.

6.1 Desenvolvimento e validação analítica do método bioanalítico para quantificação de nebivolol em plasma de ratos

O método desenvolvido mostrou-se adequado para a quantificação de nebivolol através da avaliação dos parâmetros de validação aos quais a metodologia foi submetida, tais como, seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade.

Na Figura 7 estão demonstrados o cromatograma de plasma branco extraído adicionado de padrão de nebivolol na concentração de 250 ng/mL e padrão interno.

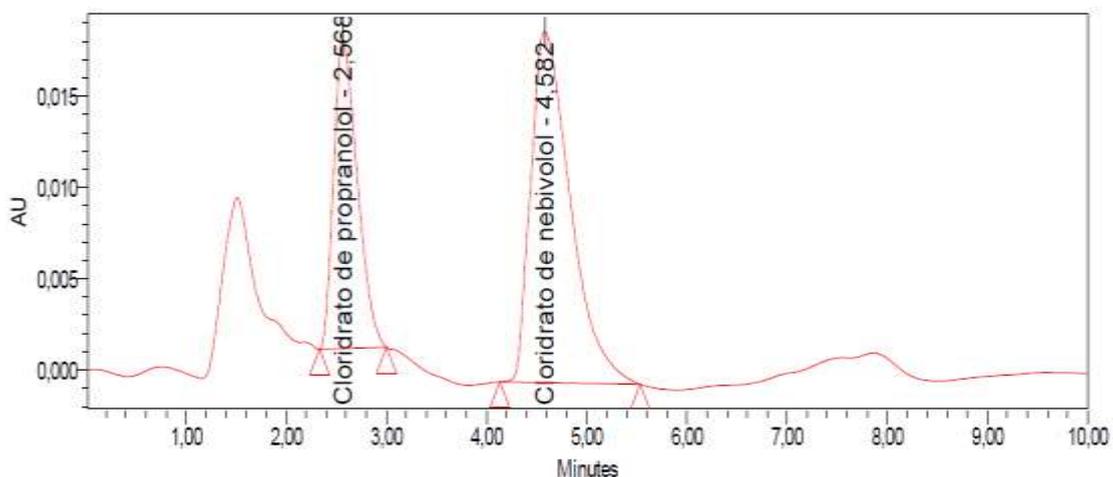


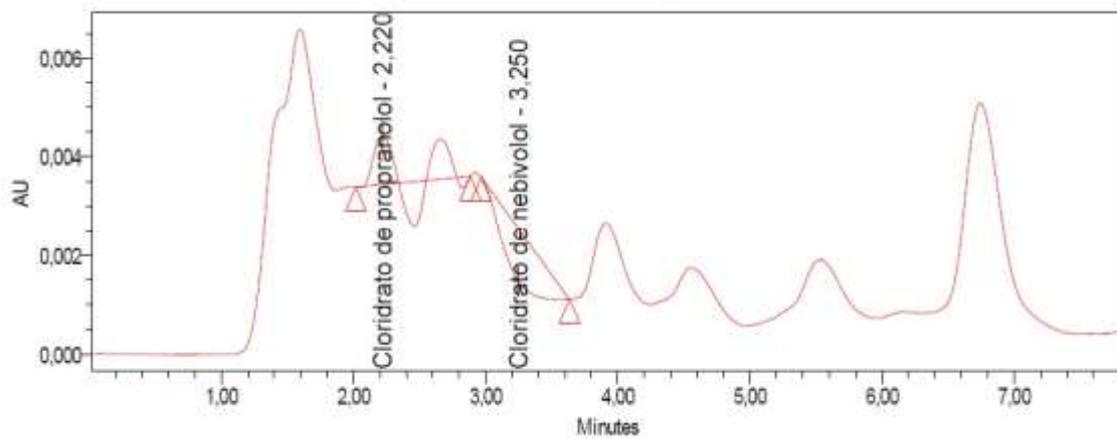
FIGURA 7 - Cromatograma plasma adicionado de padrão de nebivolol (250 ng/mL) e padrão interno.

Fonte: Da autora.

6.1.1 Seletividade

Como pode ser observado nos cromatogramas da Figura 8, não foi verificada a presença de picos de interferentes nos tempos de retenção do analito e do padrão interno com áreas maiores que respectivamente, 20% a área do LIQ e 5% da área do padrão interno na concentração utilizada, para as amostras de plasma branco normais, lipêmico e hemolisado. Os sinais observados são de baixa intensidade e não interferem no método desenvolvido e validado.

(A)



(B)

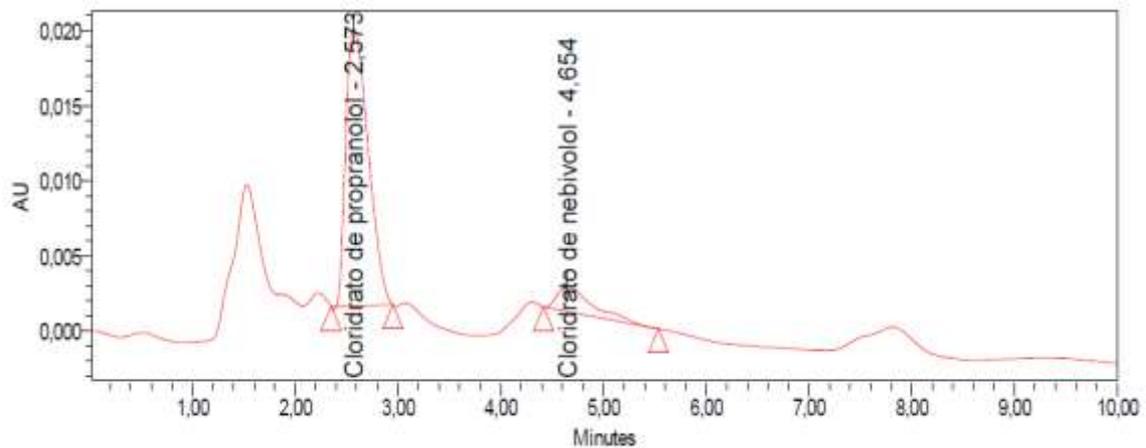


FIGURA 8 – Cromatogramas do teste de seletividade. (A) Amostra de *pool* de plasma branco
(B) Amostra de LIQ extraído.

Fonte: Da autora.

A Figura 9 mostra a amostra zero, plasma branco adicionada de padrão interno, identificando o tempo de retenção do mesmo.

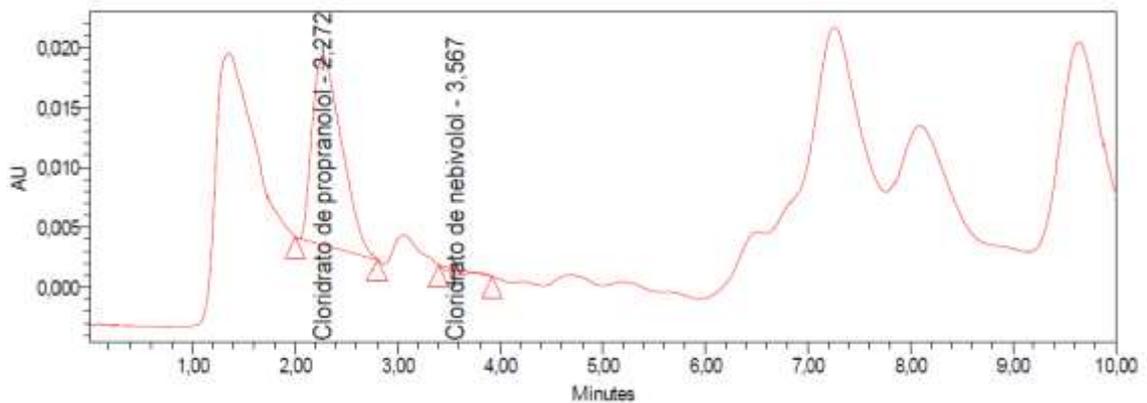


FIGURA 9 – Cromatograma amostra zero (plasma adicionado de padrão interno).

Fonte: Da autora.

6.1.2 Efeito residual

Após duas injeções do LSQ, as amostras de branco foram analisadas observando-se a não ocorrência de efeito residual nos tempos de retenção dos analitos, aproximadamente 2,27 min e 3,57 min para o nebivolol e PI, respectivamente.

6.1.3 Efeito matriz

Através da análise de oito replicatas de matriz biológica (normais, hemolisadas e lipêmicas) foram calculados os coeficientes de variação para o fator de matriz normalizado (FMN) para CQs de concentração baixa e alta. Os resultados estão expressos na Tabela 3.

TABELA 3 - Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de nebivolol em plasma de ratos.

Concentração	CQB (25 ng/mL)	CQA (250 ng/mL)
CV(%)	8,2	6,9

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100].

Fonte: Da autora.

6.1.4 Linearidade

O parâmetro de linearidade foi definido na faixa de concentração de 10 (LIQ) a 500 ng/mL, uma vez que Sanaee et al (2013) utilizou o intervalo de 10 a 100 ng/mL. A concentração de 500 ng/mL foi definida como limite de quantificação superior devido à dose administrada nos animais neste estudo ser quatro vezes maior a de Sanaee et al. (2013).

O modelo de regressão linear foi utilizado para obtenção dos valores de coeficiente angular, linear e de determinação para o nebivolol. O valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99, indicando adequada linearidade na faixa de concentração de trabalho.

A curva analítica está representada na Figura 10 e os parâmetros relativos à curva analítica estão representados na Tabela 4.

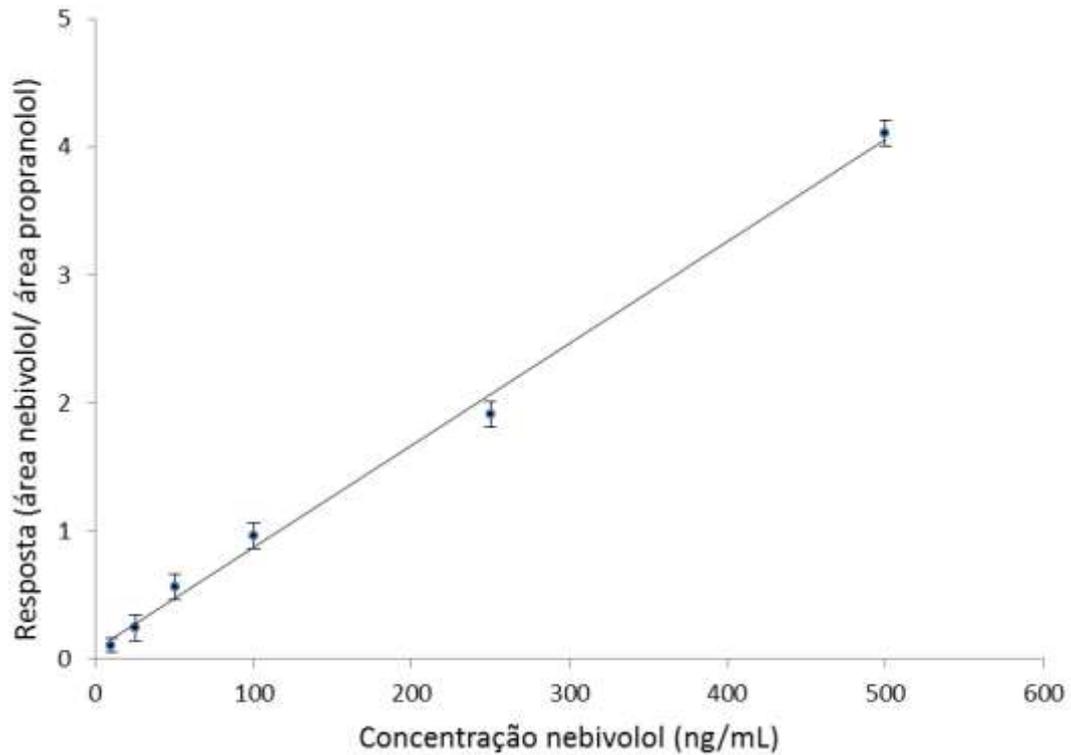


FIGURA 10 – Curva analítica de neбиволol em plasma de ratos.

Fonte: Da autora.

TABELA 4 – Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de neбиволol em plasma de ratos por HPLC na faixa de concentração de 10 a 500 ng/mL.

Parâmetro	Valor
Coefficiente angular (a)	0,0080
Coefficiente linear (b)	0,0739
Coefficiente de correlação linear (r)	0,9979

Fonte: Da autora.

6.1.5 Limite de detecção

O limite de detecção estimado para o método foi de 5 ng/mL, adequado para a realização do estudo.

6.1.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação obtido na metodologia desenvolvida foi de 10 ng/mL, com coeficiente de variação $\leq 20\%$, e apresentou precisão e exatidão satisfatórias, conforme Tabela 5.

TABELA 5 – Limite de quantificação para nebivolol.

Limite de quantificação	Precisão (%)	Exatidão (%)
10 ng/mL	9,7	97,2

Fonte: Da autora.

6.1.7 Precisão intra e intercorridas

A precisão do método variou entre 9,2 e 14,8% para as amostras analisadas na mesma corrida (intra corridas) e entre 10,6 a 13,0% para as amostras analisadas em corridas diferentes (intercorridas).

A Tabela 6 mostra os valores de coeficiente de variação (CV) para os ensaios de precisão intra e intercorridas para as concentrações de 25, 100 e 250 ng/mL (CQB, CQM e CQA).

TABELA 6 – Resultados do ensaio de precisão intracorrída e intercorrídas relativo ao método analítico de quantificação de nebivolol em plasma de ratos.

Concentração	CQB 25 ng/mL			CQM 100 ng/mL			CQA 250 ng/mL		
Média intracorrída (ng/mL)	22,5	27,5	23,6	112,5	96,9	92,1	287,5	225,2	239,5
Precisão intracorrída (CV%), n=6	9,2	13,4	14,3	10,1	9,6	10,0	9,3	10,5	14,8
Média intercorrídas (ng/mL)	24,5			100,5			251,4		
Precisão intercorrídas (CV%), n=3	10,7			10,6			13,0		

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100].

Fonte: Da autora.

Os resultados de precisão estão de acordo com os desvios aceitos pela resolução que guia esta validação (BRASIL, 2012).

6.1.8 Exatidão intra e intercorrídas

A exatidão do método analítico variou entre 90,1 e 115,0% para as amostras analisadas na mesma corrida (intracorrída) e entre 98,1 a 100,5% para as amostras analisadas em corridas diferentes (intercorrídas).

A Tabela 7 mostra os valores de coeficiente de variação (CV) para os ensaios de exatidão intra e intercorrídas para as concentrações de 25, 100 e 250 ng/mL (CQB, CQM e CQA).

TABELA 7 – Resultados do ensaio de exatidão intracorrida e intercorridas relativo ao método analítico de quantificação de nebivolol em plasma de ratos.

Concentração	CQB 25 ng/mL			CQM 100 ng/mL			CQA 250 ng/mL		
Exatidão intracorrida (%) (n=6)	90,0	110,0	94,4	112,5	96,9	92,1	115,0	90,1	95,8
Exatidão intercorridas (%) (n=3)	98,1			100,5			100,3		

% = (concentração média determinada/concentração nominal)x100.

Fonte: Da autora.

Os resultados de exatidão estão de acordo com os desvios aceitos pela resolução utilizada como guia desta validação (BRASIL, 2012).

6.1.9 Recuperação

Na determinação da recuperação do método para o nebivolol, conforme descrito por Sanaee et al (2013), a extração com a mistura dos solventes éter etílico/diclorometano mostrou-se eficaz na purificação da amostra e é um processo simples de extração, com tempo adequado de evaporação do solvente extrator, minimizando o tempo de preparo da amostra.

Assim como a precisão e a exatidão o ensaio de recuperação foi obtido através da análise de amostras em sextuplicata nas concentrações de 25, 100 e 250 ng/mL (CQB, CQM e CQA). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 – Recuperação do método analítico desenvolvido para extração de nebivolol em plasma de ratos.

Concentração	Recuperação (%)
25 ng/mL (CQB)	83,1
100 ng/mL (CQM)	90,2
250 ng/mL (CQA)	95,9

Fonte: Da autora.

A recuperação de nebivolol determinada pelo método indica que o procedimento de extração é eficiente para o analito em estudo.

6.1.10 Estabilidade

O estudo de estabilidade inclui os testes de estabilidade de curta e longa duração, pós-processamento e em ciclos de congelamento e descongelamento.

6.1.10.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em duas concentrações, baixa e alta, em triplicata para nebivolol. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (24°C) por 18 horas. Após este período as amostras foram processadas e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras recém-preparadas (RP) e analisadas imediatamente.

As amostras mostraram-se estáveis em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 2,0% e 3,3%, respectivamente (Tabela 9).

TABELA 9 – Resultados referentes ao teste de estabilidade de curta duração de nebivolol em amostras mantidas a temperatura ambiente por 18 horas.

Amostra	CQB RP	CQB 18h	CQA RP	CQA 18h
	25 ng/mL	25 ng/mL	250 ng/mL	250 ng/mL
Média	24,6 ng/mL	23,9 ng/mL	259,9 ng/mL	248,0 ng/mL
CV (%)	12,3	11,9	6,7	10,8
Desvio (%)	2,0		3,3	

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$.

Fonte: Da autora.

6.1.10.2 Estabilidade de longa duração

A estabilidade de longa duração também se deu através da análise de amostras em duas concentrações, baixa e alta, em triplicata. As amostras ficaram acondicionadas por 90 dias a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a data da análise.

Quando comparados os resultados com as amostras recém-preparadas obteve-se desvios de 1,9% e 0,8%, para as concentrações baixa e alta, respectivamente (Tabela 10).

TABELA 10 – Resultados referentes ao teste de estabilidade de longa duração para nebivolol em amostras mantidas a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias.

Amostra	CQB RP	CQB 90 dias	CQA RP	CQA 90 dias
	25 ng/mL	25 ng/mL	250 ng/mL	250 ng/mL
Média	25,2 ng/mL	25,9 ng/mL	248,6 ng/mL	245,9 ng/mL
CV (%)	13,4	6,8	8,7	4,5
Desvio (%)	1,9		0,8	

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$.

Fonte: Da autora.

6.1.10.3 Estabilidade pós-processamento

As amostras avaliadas no teste de estabilidade pós-processamento foram preparadas e extraídas, ficando acondicionadas a temperatura ambiente (24°C) por 12 horas.

Como pode-se observar na Tabela 11, as amostras apresentaram-se estáveis, com desvios abaixo de 15%.

TABELA 11 – Resultados referentes ao teste de estabilidade de pós-processamento de nebivolol em amostras extraídas mantidas a temperatura ambiente por 12 horas.

Amostra	CQB RP	CQB 12h	CQA RP	CQA 12h
	25 ng/mL	25 ng/mL	250 ng/mL	250 ng/mL
Média	24,2 ng/mL	23,5 ng/mL	247,6 ng/mL	255,6 ng/mL
CV (%)	11,2	13,6	7,7	8,9
Desvio (%)	2,1		2,2	

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100].

Fonte: Da autora.

6.1.10.4 Estabilidade em ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento mantiveram-se estáveis. Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de qualidade recém preparadas, nas concentrações baixa e alta e estão representados na Tabela 12.

TABELA 12 – Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade de nebivolol em plasma submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostra	CQB RP	CQB 3º ciclo	CQA RP	CQA 3º ciclo
	25 ng/mL	25 ng/mL	250 ng/mL	250 ng/mL
Média	25,7 ng/mL	23,7 ng/mL	258,9 ng/mL	245,3 ng/mL
CV (%)	9,0	14,3	12,8	10,7
Desvio (%)	5,7		3,8	

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100].

Fonte: Da autora.

6.2 Considerações sobre a metodologia bioanalítica desenvolvida para quantificação de nebivolol

O método de quantificação por cromatografia líquida de alta ou ultra performance com detecção por espectrometria de massas é muito utilizada para a determinação de nebivolol em amostras de matriz biológica (SELVAN et al. 2007; LINDAMOOD et al., 2011; NANDANIA et al., 2013; NEVES et al. 2013). No entanto, a metodologia desenvolvida neste trabalho, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta, como nos estudos de Aboul-Enein e Ali (2001) e Sanaee et al. (2013), demonstrou ser eficiente na detecção e quantificação de nebivolol, apresentando limites de detecção (5 ng/mL) e quantificação (10 ng/mL) adequados para estudos de farmacocinética.

Na otimização das condições cromatográficas, foram testados os comprimentos de onda de 254 e 282 nm, encontrando melhor detecção a 282 nm (SAHOO et al., 2009). Para a separação cromatográfica Ramakrshna et al. (2005) e Sahoo et al. (2009) também utilizaram coluna cromatográfica C18, como neste trabalho.

A fase móvel utilizada composta por solução tampão fosfato 0,03 M, pH 3,2 : acetonitrila na proporção de 50:50 (v/v), proporcionou melhor eluição dos analitos (KHANDELWAL et al., 2011).

A análise cromatográfica apresentou tempos de retenção de 2,56 e 4,56 minutos para o padrão interno e o nebivolol, respectivamente, demonstrando uma adequada resolução entre os analitos de interesse, e também pequeno tempo de análise (10 minutos), o que é primordial para um estudo farmacocinético, devido ao grande número de amostras a serem analisadas.

O uso de padrão interno é essencial em cromatografia. Tal substância deve possuir propriedades físico-químicas semelhantes as do analito de interesse, desta forma não interferir na sua eluição (GERHARDS et al., 1999). O método analítico empregou como padrão interno o cloridrato de propranolol, analito de mesma classe terapêutica, quimicamente semelhante ao nebivolol, sendo ambos extraídos nas mesmas condições.

Bertera et al. (2012) em seu estudo, a determinação e quantificação de nebivolol em plasma de ratos, com detecção por fluorescência obteve limite de

quantificação de 200 ng/mL, evidenciando menor sensibilidade do que a metodologia desenvolvida neste trabalho, onde a faixa linear abrange as concentrações de 10 ng/mL (LIQ) a 500 ng/mL.

A metodologia apresentou um baixo limite de quantificação com adequada precisão e exatidão, e o processo de extração demonstrou-se rápido e de baixo custo devido ao pequeno volume de solventes utilizados.

O modelo de regressão linear foi utilizado para obtenção dos valores de coeficiente angular, linear e de determinação para o nebivolol. O valor do coeficiente de correlação linear foi maior que 0,99, indicando adequada linearidade na faixa de concentração de trabalho.

Os dados de precisão e exatidão intra e intercorridas apresentaram-se inferiores a 15%, demonstrando adequada repetibilidade do método, conforme preconizado pelo guia de validação da ANVISA (BRASIL, 2012).

O ensaio de recuperação apresentou resultados acima de 80%, demonstrando adequada eficiência de extração, eliminando interferentes da matriz biológica.

Na estabilidade de curta duração as amostras ficaram expostas a temperatura ambiente por 18 horas em bancada e mostraram-se estáveis através dos resultados obtidos com a análise das amostras de CQ em concentrações baixa e alta. Após a análise da última amostra dos grupos em estudo para o nebivolol, as amostras de CQ foram analisadas e também se mantiveram estáveis, no período de 90 dias (estabilidade de longa duração). Para avaliar a estabilidade pós-processamento as amostras de CQ processadas mantiveram-se estáveis por 12 horas e também reproduziram resultados satisfatórios após três ciclos de congelamento e degelo.

6.3 Desenvolvimento e validação analítica do método bioanalítico para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos

O método desenvolvido mostrou-se adequado, tal como aquele desenvolvido para o nebivolol, para a quantificação de atorvastatina através da avaliação dos parâmetros de validação aos quais a metodologia foi submetida, tais como,

seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade (BRASIL, 2012).

Na Figura 11 estão demonstrados o cromatograma de plasma fortificado com padrão de atorvastatina na concentração de 500 ng/mL e padrão interno submetido a procedimento de extração.

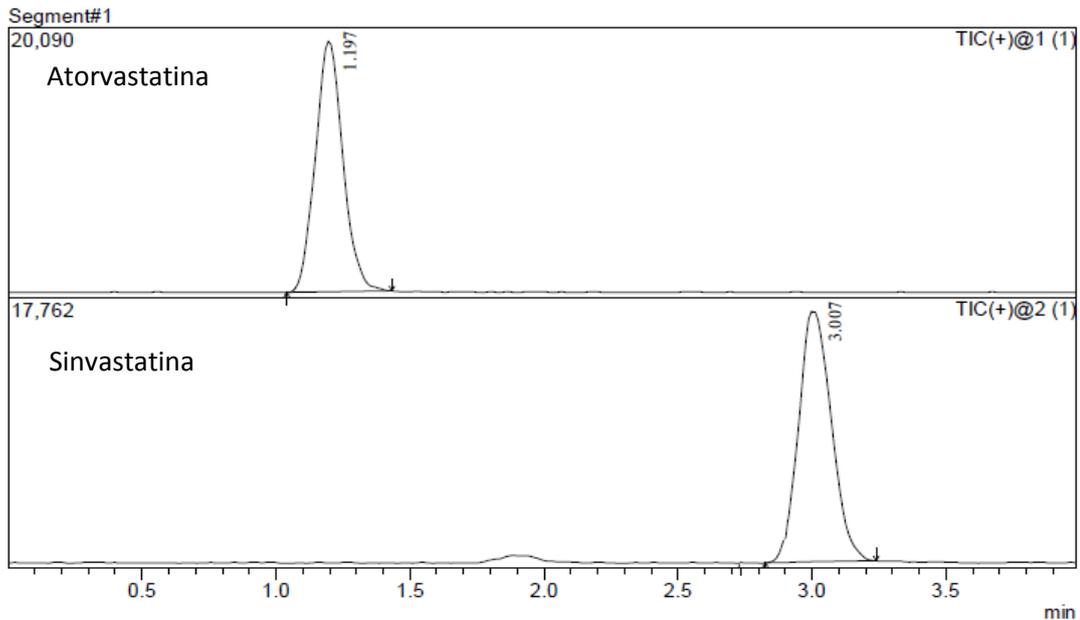


FIGURA 11 – Cromatograma de plasma branco fortificado com padrão de atorvastatina (500 ng/mL) e padrão interno.

Fonte: Da autora.

6.3.1 Seletividade

Como pode ser observado na Figura 12, não foram verificados a presença de picos de interferentes nos tempos de retenção do analito e do padrão interno com áreas maiores que respectivamente, 20% a área do LIQ e 5% da área do padrão interno na concentração utilizada, para as amostras de plasma branco normais, lipêmico e hemolisado. Ressalta que os sinais da figura 12A são de baixa intensidade.

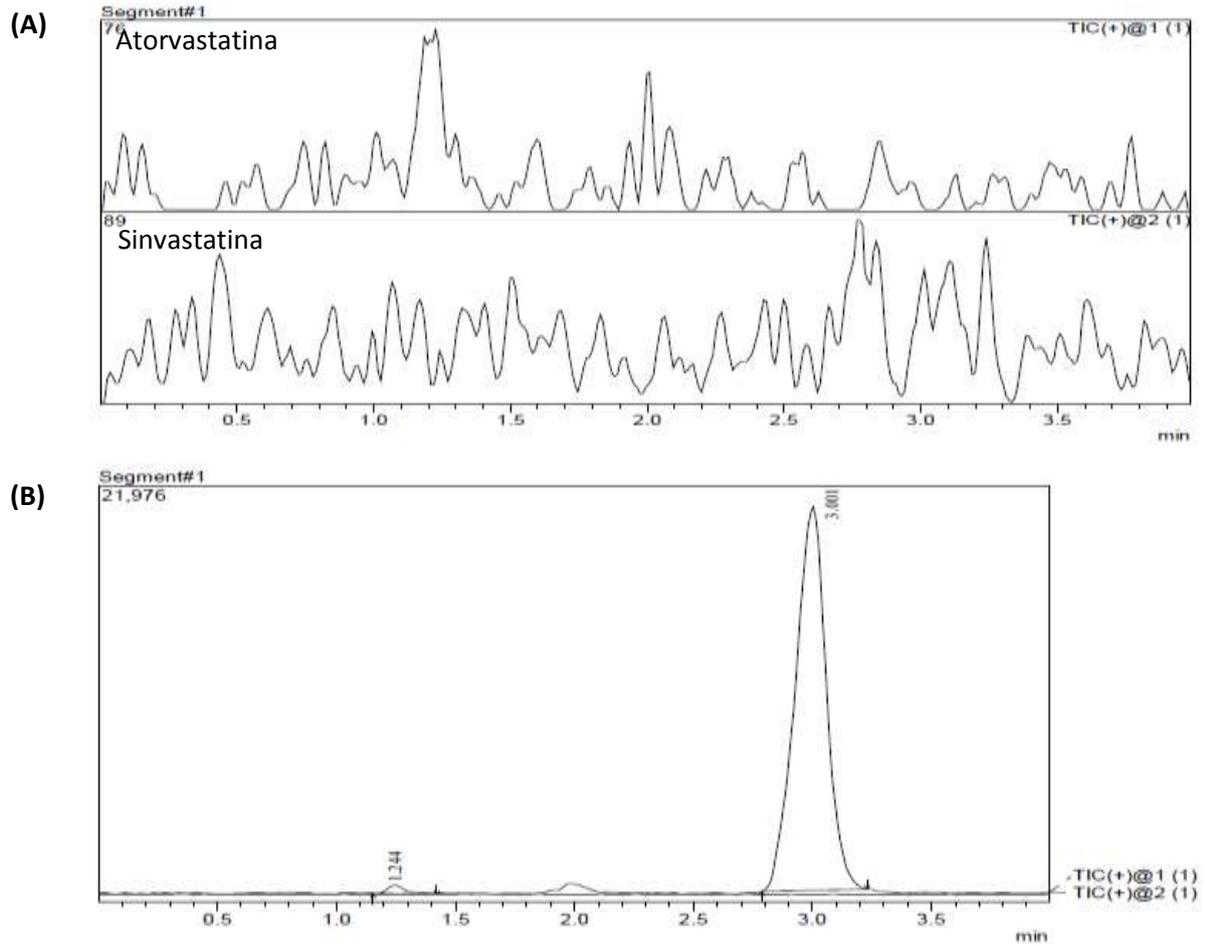


FIGURA 12 – Cromatogramas do teste de seletividade. (A) Amostra de *pool* de plasma branco (B) Amostra de LIQ extraído.

Fonte: Da autora.

A Figura 13 mostra a amostra zero, plasma branco adicionada de padrão interno, identificando o tempo de retenção do mesmo.

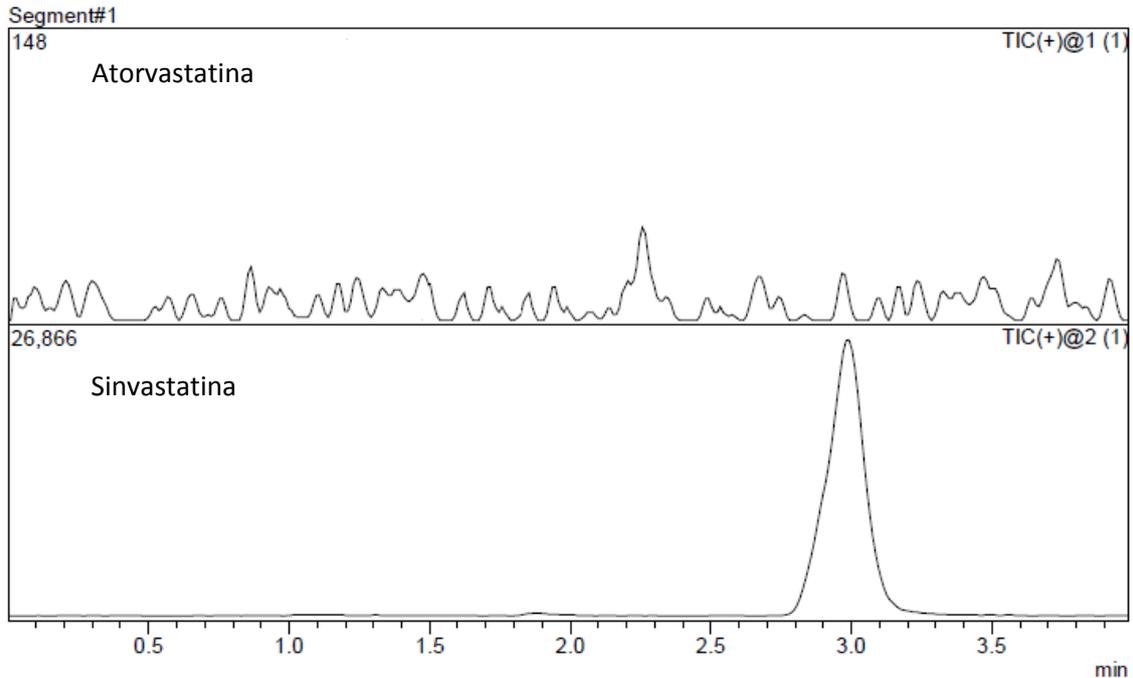


FIGURA 13 – Cromatograma amostra zero (plasma adicionado de padrão interno).

Fonte: Da autora.

6.3.2 Efeito residual

Antes e após duas injeções do limite superior de quantificação (LSQ), as amostras de branco foram analisadas observando-se a não ocorrência de efeito residual nos tempos de retenção dos analitos, aproximadamente 1,28 min e 3,06 min para a atorvastatina e PI, respectivamente.

6.3.3 Efeito matriz

Através da análise de oito replicatas de matriz biológica (normais, hemolisadas e lipêmicas) foram calculados os coeficientes de variação para o fator de matriz normalizado (FMN) para CQs de concentração baixa e alta. Os resultados estão expressos na Tabela 13.

TABELA 13 - Efeito matriz referente ao método analítico para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos.

Concentração	CQB (10 ng/mL)	CQA (380 ng/mL)
CV(%)	12,8	5,9

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$.

Fonte: Da autora.

6.3.4 Linearidade

O método mostrou-se linear na faixa de concentração de 2 a 1000 ng/mL, com coeficiente de correlação superior a 0,99; assim como a metodologia desenvolvida por Dong et al. (2008).

O modelo de regressão linear foi utilizado para obtenção dos valores de coeficiente angular, linear e de determinação para a atorvastatina.

A curva analítica está apresentada na Figura 14 e os parâmetros relativos à curva analítica estão representados na Tabela 14.

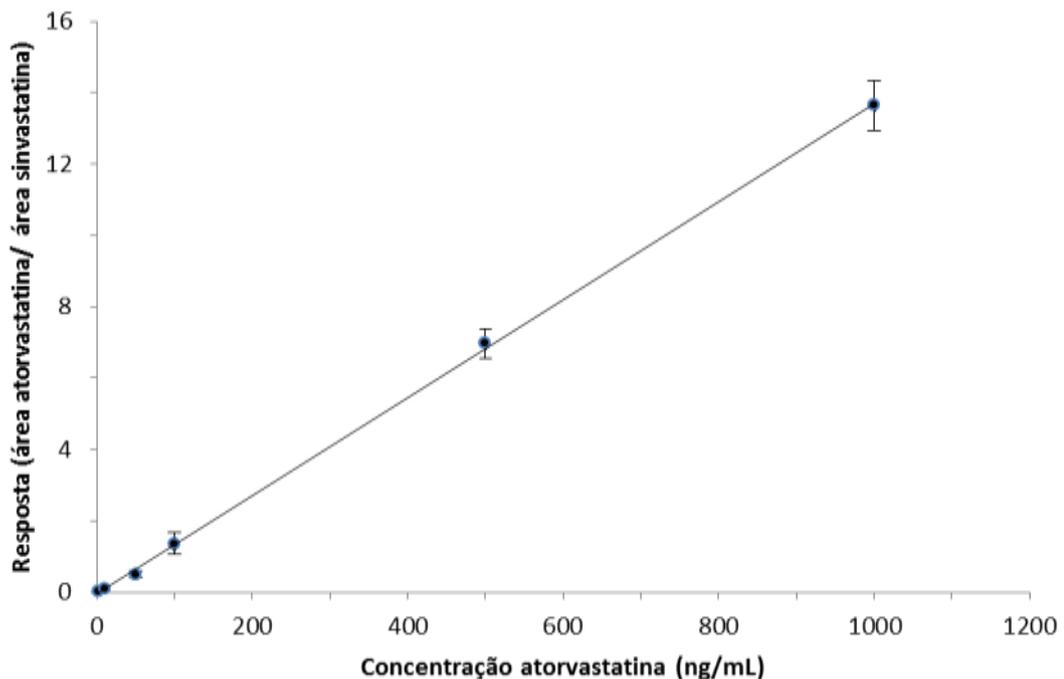


FIGURA 14 – Curva analítica de atorvastatina em plasma de ratos.

Fonte: Da autora.

TABELA 14 – Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de atorvastatina em plasma de ratos por UPLC-MS/MS na faixa de concentração de 2 a 1000 ng/mL.

Parâmetro	Valor
Coeficiente angular (a)	0,0138
Coeficiente linear (b)	0,0501
Coeficiente de correlação linear (r)	0,9999

Fonte: Da autora.

6.3.5 Limite de detecção

O limite de detecção estimado para o método foi de 0,4 ng/mL, adequado para a realização do estudo.

6.3.6 Limite de quantificação

O limite de quantificação obtido na técnica de extração desenvolvida foi de 2 ng/mL, com coeficiente de variação $\leq 20\%$, e apresentou precisão e exatidão satisfatórios, conforme Tabela 15.

TABELA 15 – Limite de quantificação para atorvastatina.

Limite de quantificação	Precisão (%)	Exatidão (%)
2 ng/mL	14,7	83,2

Fonte: Da autora.

6.3.7 Precisão intra e intercorridas

O coeficiente de variação para a precisão variou entre 5,0 e 15,0% para as amostras analisadas na mesma corrida (intracorridas) e entre 10,7 a 14,6% para as amostras analisadas em corridas diferentes (intercorridas).

A Tabela 16 mostra os valores de coeficiente de variação (CV) para os ensaios de precisão intra e intercorridas para as concentrações de 10, 380 e 750 ng/mL (CQB, CQM e CQA).

TABELA 16 – Resultados do ensaio de precisão intracorrida e intercorridas relativo ao método analítico de quantificação de atorvastatina em plasma de ratos.

Concentração	CQB 10 ng/mL			CQM 380 ng/mL			CQA 750 ng/mL		
Média intracorrida (ng/mL)	8,6	10,9	8,9	361,9	446,6	341,1	784,8	805,8	657,0
Precisão intracorrida (CV%), n=6	15,0	12,6	13,8	10,7	11,5	5,0	12,5	6,2	14,6
Média intercorridas (ng/mL)	9,4			383,2			749,2		
Precisão intercorridas (CV%), n=3	13,2			14,6			10,7		

CV = coeficiente de variação [(SD/ média) x 100].

Fonte: Da autora.

Os resultados de precisão estão de acordo com os desvios aceitos pela resolução que guia esta validação (BRASIL, 2012).

6.3.8 Exatidão intra e intercorridas

O coeficiente de variação para a exatidão variou entre 85,5 e 117,5% para as amostras analisadas na mesma corrida (intracorridas) e entre 94,3 a 100,8% para as amostras analisadas em corridas diferentes (intercorridas).

A Tabela 17 mostra os valores de coeficiente de variação (CV) para os ensaios de exatidão intra e intercorridas para as concentrações de 10, 380 e 750 ng/mL (CQB, CQM e CQA).

TABELA 17 – Resultados do ensaio de exatidão intracorrida e intercorridas relativo ao método analítico de quantificação de atorvastatina em plasma de ratos.

Concentração	CQB 10 ng/mL			CQM 380 ng/mL			CQA 750 ng/mL		
Exatidão intracorrida (%)n=6	85,5	108,5	88,9	95,2	117,5	89,8	104,6	107,4	87,6
Exatidão intercorridas (%)n=3	94,3			100,8			99,9		

% = (concentração média determinada/concentração nominal)x100.

Fonte: Da autora.

Os resultados de exatidão estão de acordo com os desvios aceitos pela resolução que guia esta validação (BRASIL, 2012).

6.3.9 Recuperação

Na determinação da recuperação do método para a atorvastatina, conforme descrito por Dong et al. (2008), a extração com acetato de etila mostrou-se eficaz e um processo simples de extração, com bom tempo de secagem do solvente extrator, minimizando o tempo de preparo da amostra.

Assim como a precisão e a exatidão o ensaio de recuperação foi obtido através da análise de amostras em sextuplicata nas concentrações de 10, 380 e 750 ng/mL (CQB, CQM e CQA). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 – Recuperação do método analítico desenvolvido para extração de atorvastatina em plasma de ratos.

Concentração	Recuperação (%)
CQB 10 ng/mL	80,4
CQM 380 ng/mL	86,7
CQA 750 ng/mL	84,9

Fonte: Da autora.

A recuperação de atorvastatina determinada pelo método indica que o procedimento de extração é eficiente para o analito em estudo.

6.3.10 Estabilidade

O estudo de estabilidade inclui os testes de estabilidade de curta e longa duração, pós-processamento e em ciclos de congelamento e descongelamento.

6.3.10.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em duas concentrações, baixa e alta, em triplicata para atorvastatina. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 12 horas. Após este período as amostras foram processadas e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras recém-preparadas (RP) e analisadas imediatamente.

As amostras mostraram-se estáveis em ambas concentrações, baixa e alta, com desvios de 6,8% e 1,4%, respectivamente (Tabela 19).

TABELA 19 – Resultados referentes ao teste de estabilidade de curta duração da atorvastatina em amostras mantidas a temperatura ambiente por 12 horas.

Amostra	CQB RP	CQB 12h	CQA RP	CQA 12h
	10 ng/mL	10 ng/mL	750 ng/mL	750 ng/mL
Média	9,8 ng/mL	8,9 ng/mL	761,7 ng/mL	746,5 ng/mL
CV (%)	8,9	6,4	3,2	7,8
Desvio (%)	6,8		1,4	

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$.

Fonte: Da autora.

6.3.10.2 Estabilidade de longa duração

A estabilidade de longa duração também se deu através da análise de amostras em duas concentrações, baixa e alta, em triplicata. As amostras ficaram acondicionadas por 120 dias a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a data da análise.

Quando comparados os resultados com as amostras recém-preparadas obteve-se desvios de 3,1% e 1,3%, para as concentrações baixa e alta, respectivamente (Tabela20).

TABELA 20 – Resultados referentes ao teste de estabilidade de longa duração da atorvastatina em amostras mantidas a temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 dias.

Amostra	CQB RP	CQB 120 dias	CQA RP	CQA 120 dias
	10 ng/mL	10 ng/mL	750 ng/mL	750 ng/mL
Média	9,2 ng/mL	8,8 ng/mL	753,9 ng/mL	740,5 ng/mL
CV (%)	4,5	7,2	3,2	7,8
Desvio (%)	3,1		1,3	

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$.

Fonte: Da autora.

6.3.10.3 Estabilidade de pós-processamento

As amostras avaliadas no teste de estabilidade pós-processamento foram preparadas e extraídas, ficando acondicionadas a temperatura ambiente por 12 horas.

Como pode se observar na Tabela 21, as amostras apresentaram-se estáveis, com desvios abaixo de 15%.

TABELA 21 – Resultados referentes ao teste de estabilidade de pós-processamento da atorvastatina em amostras extraídas mantidas a temperatura ambiente por 12 horas.

Amostra	CQB RP	CQB 12h	CQA RP	CQA 12h
	10 ng/mL	10 ng/mL	750 ng/mL	750 ng/mL
Média	10,1 ng/mL	9,4 ng/mL	758,3 ng/mL	751,8 ng/mL
CV (%)	9,6	6,8	4,7	7,7
Desvio (%)	5,1		0,6	

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$.

Fonte: Da autora.

6.3.10.4 Estabilidade de ciclos de congelamento e descongelamento

As amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento mantiveram-se estáveis. Os resultados obtidos foram comparados com as amostras de controle de qualidade recém preparadas, nas concentrações baixa e alta e estão representados na Tabela 22.

TABELA 22 – Resultados referentes às amostras do teste de estabilidade da atorvastatina em plasma submetidas a sucessivos ciclos de congelamento e descongelamento.

Amostra	CQB RP	CQB 3° ciclo	CQA RP	CQA 3° ciclo
	10 ng/mL	10 ng/mL	750 ng/mL	750 ng/mL
Média	8,8 ng/mL	8,0 ng/mL	755,6 ng/mL	739,8 ng/mL
CV (%)	9,8	11,6	10,4	12,5
Desvio (%)	6,7		13,0	

CV = coeficiente de variação $[(SD/ \text{média}) \times 100]$.

Fonte: Da autora.

6.4 Considerações sobre a metodologia bioanalítica desenvolvida para quantificação de atorvastatina

Muitos métodos para quantificação de atorvastatina e seus metabólitos em matriz biológica (plasma e soro) já foram publicados (BULLEN, W.W.; MILLER, R.A.; HAYES, R.N., 1998; LAU et al., 2006; DONG et al., 2008; NOVÁKOVÁ et al., 2009; MACWAN et al., 2011; MALEKINEJAD et al., 2013; PARTANI et al., 2014).

Diversas técnicas empregadas incluem métodos eletroquímicos, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção em ultravioleta ou acoplada a espectrometria de massas, inibição enzimática, cromatografia a gás, entre outras. Sem dúvidas, a espectrometria de massa tornou-se o método de escolha para a quantificação de baixas concentrações de fármacos e seus metabólitos em matrizes biológicas devido sua detectabilidade elevada (PARTANI et al., 2014).

No presente trabalho, a técnica de cromatografia líquida de ultra performance acoplada a espectrometria de massas foi aplicada para a quantificação de atorvastatina em plasma de ratos para estudo de interação farmacocinética. No desenvolvimento da metodologia um passo importante é a escolha do padrão interno a ser utilizado. Para a análise da atorvastatina o padrão interno escolhido foi a sinvastatina, fármaco de mesma classe terapêutica, de estrutura molecular semelhante ao analito. A sinvastatina foi adicionada nas etapas de pré-tratamento das amostras. Os resultados da análise do padrão interno são utilizados para estabelecer uma razão entre a resposta do analito em relação a do padrão interno, possibilitando assim, minimizar os erros decorrentes de possíveis perdas durante o preparo das amostras (CAUSON, R., 1997).

Como técnica de preparo de amostra, a extração líquido-líquido é a mais amplamente empregada nos estudos de interação farmacocinética. Nos trabalhos de Lau et al. (2006) e Dong et al., (2008) observa-se a utilização desta técnica para extração da atorvastatina e eliminação dos interferentes presentes em matrizes biológicas, sendo esta técnica também utilizada neste estudo, utilizando o solvente acetato de etila como solvente extrator.

O desenvolvimento de um método para a quantificação de analitos que sofrem interconversão, o primeiro passo, é a otimização de condições que eliminem ou minimizem a interconversão. Para amostras com estrutura química hidróxi-ácida

e correspondente forma lactona, é importante manter o pH entre 4 e 5 para minimizar a interconversão. O aumento do pH (maior que 6) facilita a conversão da forma lactona para a ácida (na forma ionizada), enquanto que a diminuição do pH facilita a conversão da forma ácida para lactona ou da lactona para a forma não-ionizada. A maioria dos trabalhos utiliza pH em torno de 4,5 (NOVÁKOVÁ et al., 2009).

A escolha das massas a serem monitoradas pelo equipamento, para o analito e padrão interno no modo MRM, foi realizada durante a otimização das condições no espectrômetro de massas. Selecionou-se a massa mais abundante de cada analito sendo elas: 559,2 → 440,1 para atorvastatina e 419,1 → 199,0 para o padrão interno (NOVÁKOVÁ et al., 2009).

Para a eluição do analito e padrão interno no sistema cromatográfico, a fase móvel empregada foi composta de acetonitrila e solução de acetato de amônio 0,05 mM, pH 4,0, na proporção de 60:40, v/v. A vazão de trabalho da fase móvel foi de 0,6 mL/ minuto, com tempos de retenção de 1,28 min para atorvastatina e 3,06 min para o padrão interno.

Para aplicação da metodologia desenvolvida, foi realizada a validação dos parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, exatidão e estabilidade; tais parâmetros foram definidos pelo guia de validação para métodos bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2012). Os resultados obtidos para a validação foram satisfatórios, atendendo aos limites estabelecidos pela legislação.

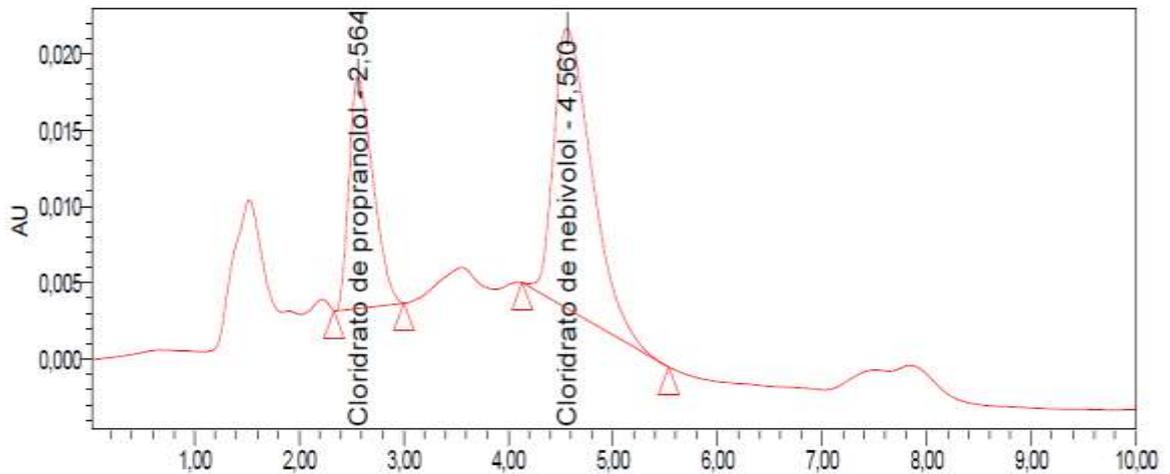
As amostras de CQ, nas concentrações avaliadas para a validação, em temperatura ambiente mantiveram-se estáveis por 12 horas (estabilidade de curta duração). Durante o período de 120 dias (longa duração) essas amostras ficaram armazenadas em ultra freezer a -70°C mantendo-se estáveis quando analisadas após este período. Para amostras de CQ processadas, a estabilidade foi adequada para 12 horas até a análise cromatográfica, assim como para os resultados obtidos após três ciclos de degelo. O teste de estabilidade para a atorvastatina em plasma foi satisfatório para proceder com as análises das amostras obtendo assim resultados confiáveis.

6.5 Análise das amostras

As amostras de plasma obtidas experimentalmente foram tratadas conforme metodologia analítica desenvolvida e validada para os analitos nebivolol e atorvastatina.

Na Figura 15 estão representados os cromatogramas das amostras de plasma de ratos quantificadas para o nebivolol, nos dois grupos de tratamento, no tempo de colheita de uma hora.

(A)



(B)

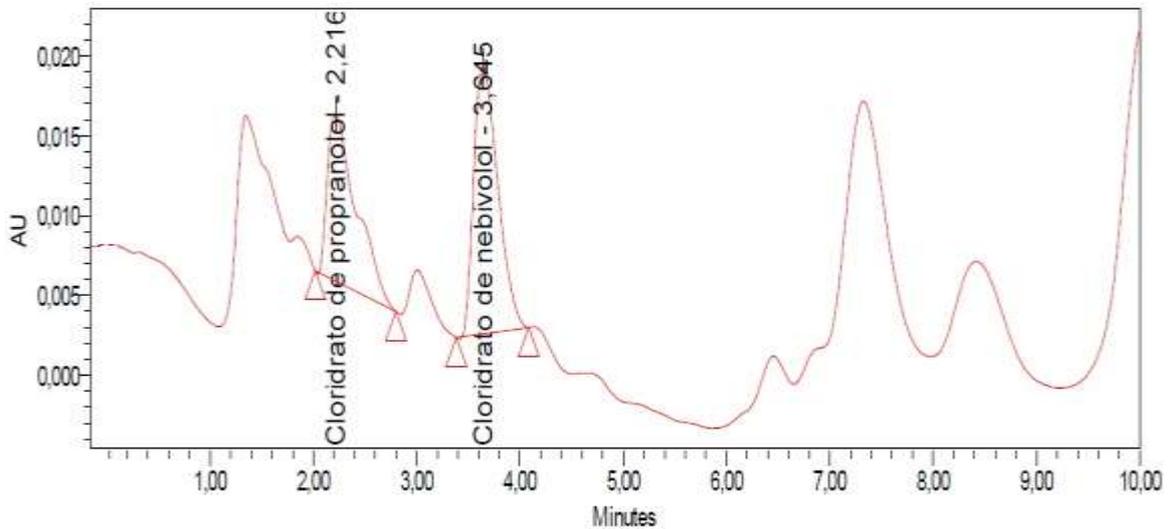


FIGURA 15 – (A) Cromatograma amostra do grupo nebivolol (tempo de colheita 1 hora) - (B) Cromatograma amostra do grupo nebivolol-atorvastatina (tempo de colheita 1 hora).

Fonte: Da autora.

Na Figura 16 estão representados os cromatogramas das amostras de plasma de ratos quantificadas para a atorvastatina, nos dois grupos de tratamento, no tempo de colheita de 1,5h.

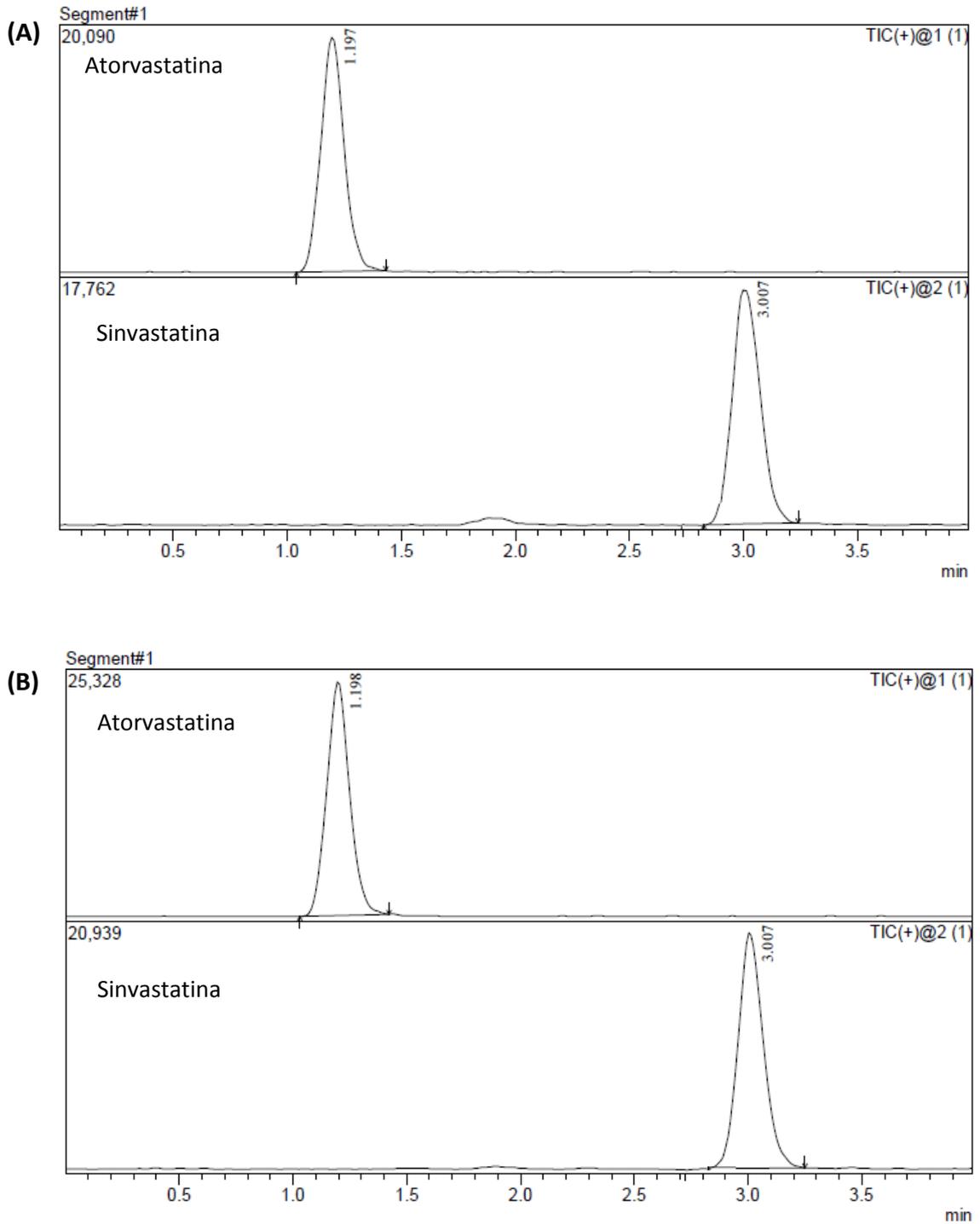


FIGURA 16 – (A) Cromatograma amostra do grupo atorvastatina (tempo de colheita 1,5 hora) - (B) Cromatograma amostra do grupo nebivolol-atorvastatina (tempo de colheita 1,5 hora).

Fonte: Da autora.

Na Tabela 23 estão expressos os valores calculados dos parâmetros farmacocinéticos avaliados para os perfis analisados de área sob a curva (ASC), concentração máxima (Cmax), tempo máximo (tmax), meia-vida ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (Kel) para o grupo tratado com dose única de nebivolol na concentração de 8 mg/kg.

TABELA 23 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos após análise dos perfis analisados do grupo tratado com nebivolol (dose única de 8 mg/kg).

Parâmetros	Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	Perfil 4	Perfil 5	Perfil 6
tmax (h)	1,14	1,09	1,00	0,92	1,06	0,68
Cmax (ng/mL)	278,34	278,36	330,41	328,62	353,39	350,34
ASC ^{0-∞} (ng.h/mL)	1015,61	971,10	1153,92	1142,14	1279,63	1020,92
Cl/ F (L/Kg/h)	7,88	8,24	6,93	7,00	6,25	7,84
$t_{1/2}$ (h)	1,57	1,49	1,61	1,74	1,70	1,59
Kel (h ⁻¹)	0,44	0,46	0,43	0,40	0,41	0,44

Fonte: Da autora.

Para o grupo tratado com dose única de atorvastatina (20 mg/kg) e nebivolol (8 mg/kg), administrados concomitantemente, avaliaram-se os mesmos parâmetros farmacocinéticos que para o grupo anterior, a fim de avaliar se houve alguma interação farmacocinética entre os fármacos em estudo, em relação ao nebivolol (Tabela 24).

TABELA 24 – Parâmetros farmacocinéticos para nebivolol obtidos dos perfis analisados do grupo tratado com atorvastatina-nebivolol (dose única 20 mg/kg – 8 mg/kg), respectivamente.

Parâmetros	Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	Perfil 4	Perfil 5	Perfil 6
tmax (h)	1,13	1,05	1,02	1,15	1,24	1,09
Cmax (ng/mL)	389,14	302,43	261,51	267,66	214,53	250,33
ASC ^{0-∞} (ng.h/mL)	770,92	818,13	713,93	800,05	699,43	670,58
Cl/ F (L/Kg/h)	10,38	9,78	11,22	9,99	11,44	11,93
$t_{1/2}$ (h)	0,90	0,90	0,87	0,76	0,83	1,01
Kel (h ⁻¹)	0,77	0,77	0,80	0,91	0,84	0,69

Fonte: Da autora.

Através da avaliação estatística dos dados em mãos, pode-se observar que houve significância estatística quando comparadas as médias, considerando-se $p < 0,05$ (Tabela 25).

TABELA 25 – Parâmetros cinéticos avaliados do grupo controle (NEB) comparados aos parâmetros do grupo interação (ATV-NEB) para o neбиволол. Mediana, média (IC 95%), n=6.

Parâmetro	NEB	NEB-ATV
Cmax (ng/mL)	329,53 319,92(284,53-355,37)	264,61 280,94(217,84-344,01)
tmax (h)	1,03 0,98(0,81-1,16)	1,11 1,12(1,03-1,20)
Cl/ F (L/h/Kg) *	7,42 7,36(6,57-8,14)	10,80 10,79(9,89-11,70)
$t_{1/2}$ (h) *	1,60 1,62(1,49-1,74)	0,88 0,88(0,79-0,97)
Kel (h ⁻¹) *	0,43 0,43(0,41-0,45)	0,79 0,80(0,72-0,87)
ASC ^{0-∞} (ng.h/mL) *	1081,51 1097,21(975,83-1218,63)	742,13 745,45(682,94-807,81)

* Teste de Mann-Whitney, bicaudal para dados não pareados, $p < 0,05$.

Fonte: Da autora.

Na Tabela 26 estão expressos os valores calculados dos parâmetros farmacocinéticos avaliados para os perfis analisados de área sobre a curva (ASC), concentração máxima (Cmax), tempo máximo (tmax), meia-vida ($t_{1/2}$) e constante de eliminação (Kel) para o grupo tratado com dose única de atorvastatina na concentração de 20 mg/kg.

TABELA 26 – Parâmetros farmacocinéticos obtidos após análise dos perfis analisados do grupo tratado com atorvastatina (dose única de 20 mg/kg).

Parâmetros	Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	Perfil 4	Perfil 5	Perfil 6
t _{max} (h)	0,20	0,18	0,19	0,19	0,20	0,20
C _{max} (ng/mL)	638,63	450,64	443,75	783,56	533,69	399,71
ASC ^{0-∞} (ng.h/mL)	852,50	631,99	612,79	633,03	615,24	526,05
CI F (L/Kg/h)	11,73	16,31	15,79	15,82	16,25	19,01
t ¹ / ₂ β (h)	1,90	2,85	1,91	1,94	1,91	1,54
β (h ⁻¹)	0,37	0,24	0,36	0,36	0,36	0,45

Fonte: Da autora.

Para o grupo tratado com dose única de atorvastatina (20 mg/kg) e nebivolol (8 mg/kg), administrados concomitantemente, avaliaram-se os mesmos parâmetros farmacocinéticos que para o grupo anterior, a fim de avaliar se houve alguma interação farmacocinética entre os fármacos em estudo, em relação à atorvastatina (Tabela 27).

TABELA 27 - Parâmetros farmacocinéticos obtidos para atorvastatina dos perfis analisados do grupo tratado com atorvastatina-nebivolol (dose única 20 mg/kg – 8 mg/kg), respectivamente.

Parâmetros	Perfil 1	Perfil 2	Perfil 3	Perfil 4	Perfil 5	Perfil 6
t _{max} (h)	0,20	0,28	0,13	0,21	0,21	0,24
C _{max} (ng/mL)	1373,53	859,62	436,24	381,52	416,75	457,37
ASC ^{0-∞} (ng.h/mL)	1594,42	1083,12	631,81	459,39	358,76	368,75
CI F (L/Kg/h)	6,27	9,23	15,82	21,76	27,87	27,11
t ¹ / ₂ β (h)	2,03	1,81	2,38	1,74	2,33	1,32
β (h ⁻¹)	0,34	0,38	0,29	0,40	0,30	0,52

Fonte: Da autora.

Através da avaliação estatística dos dados em mãos, pode-se observar que não há significância estatística quando comparadas as médias, considerando-se p < 0,05, para os parâmetros a seguir (Tabela 28).

TABELA 28 – Parâmetros cinéticos avaliados do grupo controle (ATV) comparados aos parâmetros do grupo interação (ATV-NEB) para a atorvastatina. Mediana, média (IC 95%), n=6.

Parâmetro	ATV	ATV-NEB
C _{max} (ng/mL)	492,21	446,84
	541,73(388,84-694,52)	654,22(240,53-1067,84)
t _{max} (h)	0,19	0,21
	0,19(0,19-0,20)	0,21(0,16-0,26)
Cl/F (L/h/Kg)	16,04	18,80
	15,82(13,37-18,28)	18,02(8,46-27,57)
t ^{1/2} β (h)	1,91	1,92
	2,01(1,55-2,47)	1,93(1,52-2,35)
β (h ⁻¹)	0,36	0,36
	0,36(0,29-0,43)	0,37(0,28-0,46)
ASC ^{0-∞} (ng.h/mL)	626,92	545,64
	646,71(532,84-760,73)	749,41(230,73-1268,02)

* Teste de Mann-Whitney, bicaudal para dados não pareados, p< 0,05.

Fonte: Da autora.

Na Figura 17 está representada a curva média das concentrações de atorvastatina para grupo controle e grupo interação, demonstrando a equivalência para os dois grupos.

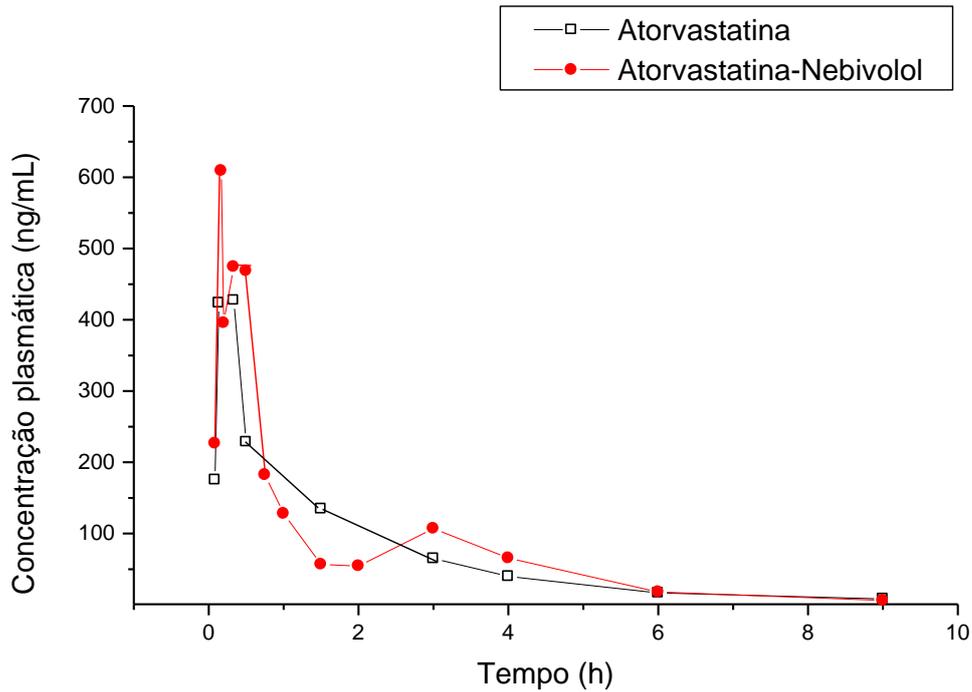


FIGURA 17 - Curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo de atorvastatina no grupo atorvastatina (ATV) e grupo interação (ATV-NEB).

Fonte: Da autora.

Na Figura 18 está representada a curva média das concentrações de neбиволol para grupo controle e grupo interação, demonstrando o decaimento das concentrações plasmáticas devido à interação farmacocinética.

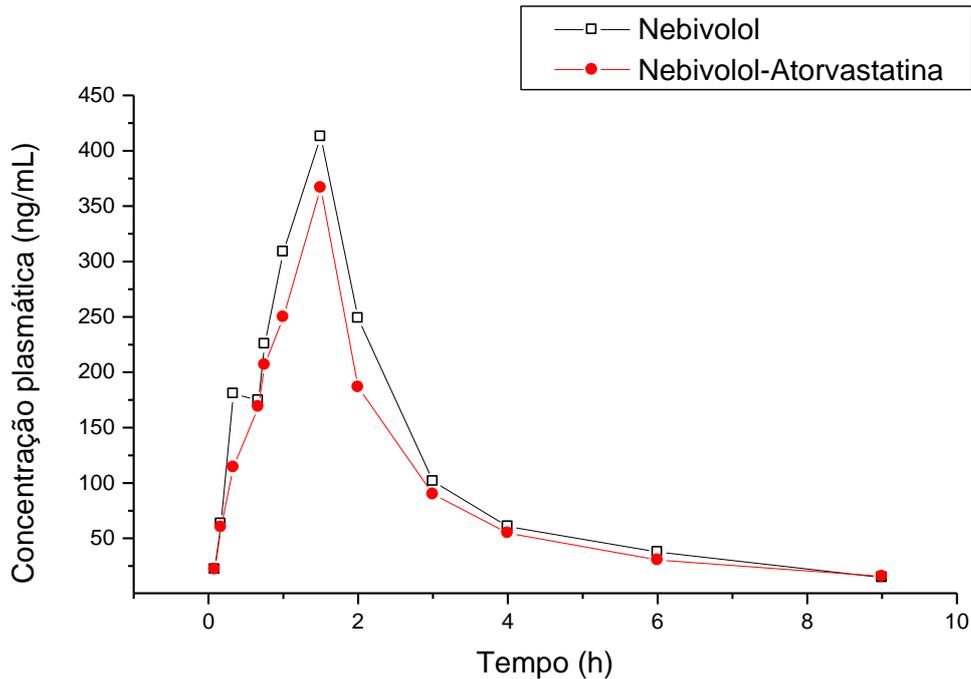


FIGURA 18 - Curva de concentrações plasmáticas *versus* tempo de nebivolol no grupo nebivolol (NEB) e grupo interação (NEB-ATV).

Fonte: Da autora.

Os analitos nebivolol e atorvastatina foram quantificados, em plasma de ratos, em seus respectivos grupos controle (grupo nebivolol e grupo atorvastatina) e também no grupo interação, onde foram administrados concomitantemente. Após realizar todas as análises das amostras dos grupos, através da concentração plasmática obtida em cada amostra para cada um dos analitos, construíram-se os perfis farmacocinéticos, gerados com o auxílio do software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight, EUA).

Cada perfil forneceu os parâmetros cinéticos, como: área sob a curva ($ASC^{0-\infty}$), *clearance*, meia-vida ($t^{1/2}$), constante de eliminação (K_{el}), concentração máxima (C_{max}), tempo para atingir C_{max} (t_{max}), utilizados para a determinação de ocorrência ou não de interação farmacocinética.

Os dados de cada parâmetro citado, para cada analito em seu grupo, foram comparados estatisticamente, utilizando-se o teste de Mann Whitney, bicaudal para dados não pareados, considerando o nível de significância, $p < 0,05$.

Na comparação das médias dos parâmetros farmacocinéticos, para atorvastatina, quantificada no grupo atorvastatina e grupo nebivolol-atorvastatina,

não houve diferença com significância estatística, evidenciando a não influência do nebivolol na farmacocinética da atorvastatina. Porém, na comparação dos parâmetros área sob a curva, *clearance*, meia-vida e constante de eliminação para nebivolol, houve alteração significativa.

O *clearance* do nebivolol, quando administrado em associação com a atorvastatina, aumentou, de 7,36 L/h/kg para 10,79 L/h/kg, com consequente aumento da constante de eliminação, de $0,43\text{h}^{-1}$ para $0,80\text{h}^{-1}$, diminuição da meia-vida, de 1,62 h para 0,88 h, alterando a área sob a curva, de 1097,22 ng.h/mL para 745,42 ng.h/mL, que foi menor para nebivolol quantificado no grupo interação em comparação ao grupo controle.

O nebivolol é metabolizado pelo citocromo P450, por sua isoforma 2D6, por reações de N-desalquilação, glicuronidação e hidroxilação do complexo aromático presente em sua estrutura molecular. Segundo Van Peer, Snoeck e Woestenborghs (1991) e Kamali et al. (1997) estima-se que haja contribuição significativa da ação da isoforma 3A4 na etapa da N-desalquilação no metabolismo do nebivolol. Esta informação foi inferida através de alteração da farmacocinética da atorvastatina em interação com a cimetidina. Kamali et al. (1997) consideram a cimetidina inibidor de CYP3A4; porém a cimetidina inibe o CYP2C11 e também o CYP2C6, mas não tem nenhum efeito nas atividades mediadas por CYP2A1, CYP2B ou CYP3A (LEVINE et al., 1998).

A atorvastatina é um inibidor competitivo seletivo de HMG-CoA redutase, utilizado para o tratamento da hiperlipidemia. É metabolizado pelas isoenzimas hepáticas CYP3A4 e 3A5 (LENNERNAS, H., 2003).

Neerati e Gade (2011), em seu estudo de interação farmacocinética entre atorvastatina e gliburida em ratos, relataram a redução do *clearance* (281,95 vs 202,26 mL/h/Kg) e o aumento da $ASC^{0-\infty}$ (382,35 vs 588,53 ng.h/mL) de gliburida, quando ambos fármacos foram administrados em associação. A gliburida é metabolizada pelas isoformas CYP 2D9 e 3A4.

No estudo de interação farmacocinética e farmacodinâmica entre atorvastatina e cilostazol em ratos, Vats et al. (2012) relataram a ocorrência da ação inibitória da atorvastatina sobre a isoforma CYP3A, demonstrado na alteração da $ASC^{0-\infty}$ (1235,0 vs 3680,69 ng.h/mL) para cilostazol, fármaco metabolizado pela isoforma CYP3A4.

Considerando os resultados farmacocinéticos obtidos neste estudo, a biodisponibilidade do nebivolol foi reduzida na situação de associação com a atorvastatina. Desde que o nebivolol é metabolizado pelo CYP2D6 e a atorvastatina pelo CYP3A4, a interação não foi no metabolismo. Outro aspecto a ser considerado em relação às alterações observadas, em particular a área sob curva, se a atorvastatina inibisse a metabolização do nebivolol CYP3A4, a ASC do nebivolol em associação seria maior em relação ao grupo controle, e não o oposto, como observado neste estudo.

Ressalta-se ainda que processos onde ocorra indução envolvem síntese proteica, e não seriam evidenciados em estudo de administração oral em dose única; estes precisariam de uma administração prévia, múltipla, para indução. Este princípio também descarta a possibilidade de indução da proteína de efluxo, P-gP, pela atorvastatina, que é indutora da P-gP (HASLAM et al., 2008), e poderia ter diminuído a biodisponibilidade do nebivolol, se este fosse substrato da P-gP. Não há dados que comprovem se o nebivolol é substrato para P-gP (VEVERKA, A.; SALINAS, J.L., 2007), além disso, a indução não acontece em dose única.

Na interação farmacocinética deve-se considerar a relevância da competição por transportadores na distribuição dos fármacos pelo organismo, pois a atorvastatina e o nebivolol são altamente ligados a proteína plasmática, a albumina, na ordem de 98% de ligação para ambos os fármacos (KAMALI et al., 1997; SANAE et al., 2013), podendo ocorrer neste caso, competição por ligação a proteína plasmática.

A diminuição da ligação à proteína plasmática em fármacos administrados em associação é normalmente resultante de um deslocamento do mesmo sítio de ligação à proteína (OTAGIRI, M., 2005). A interação entre a varfarina e fármacos com atividade anti-inflamatória como fenilbutazona é bem descrita na literatura (HARDER, S.; THURMANN, P., 1996; OSAWA et al., 2005; HATAKEYAMA et al., 2010) e aumenta a atividade do anticoagulante, pelo aumento de sua fração livre e consequentemente aumenta o *clearance* da varfarina também.

Sendo assim, sugerimos que as alterações observadas em nosso estudo possam ter acontecido devido a competição dos fármacos por ligação à albumina plasmática, sendo que a atorvastatina deslocou o nebivolol do sítio de ligação, aumentando sua excreção e diminuindo a biodisponibilidade. A comprovação desta sugestão poderia ser realizada em etapas futuras em estudos centrados na

dosagem da fração livre dos fármacos e não dosados em concentração total, como neste método.

Desta maneira, a administração concomitante destes medicamentos não deve ser considerada segura na clínica devido à interação farmacocinética observada, que em regime de dose múltipla, pode apresentar relevância farmacodinâmica. São necessários estudos complementares para elucidação do mecanismo de interação.

7 CONCLUSÃO

Através da análise minuciosa dos dados obtidos no desenvolvimento desta dissertação, pode-se concluir que:

- a) As metodologias analíticas desenvolvidas e validadas para determinação e quantificação de nebivolol e atorvastatina em plasma apresentaram parâmetros adequados para aplicação em estudos farmacocinéticos;
- b) A associação de nebivolol com atorvastatina não modificou a farmacocinética do agente redutor de colesterol *in vivo*;
- c) A atorvastatina aumentou o *clearance* do nebivolol e conseqüentemente reduziu sua biodisponibilidade em 32% aproximadamente.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, S.M.; KAUFFMAN, R.E. The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding dose–response. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.44, p.111–36, 2004.

ABOUL-ENEIN, H.Y.; ALI, I. Studies on the effects of alcohols on the chiral discrimination mechanisms of amylose stationary phase on the enantioseparation of nebivolol by HPLC. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 48, p. 175-188, 2001.

AVISAR, I.; BROOK, J.G.; WOLFOVITZ, E. Atorvastatin monotherapy vs. combination therapy in the management of patients with combined hyperlipidemia. **European Journal of Internal Medicine**. v. 19, n. 3, p. 203-208, 2008.

BAHRAMI, G. et al. Determination of atorvastatin in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with uv detection. **Journal of Chromatography B**, v. 826, n. 1-2, p. 41-45, 2005.

BERTERA, F.M. et al. Effects of nebivolol on beat-to-beat and short-term blood pressure variability in spontaneously hypertensive rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, p. 833-843, 2012.

BERTOLINI, S. et al. Efficacy and safety of atorvastatin compared to pravastatin in patients with hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, n. 130, p. 191-197, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 27**, de 17 de maio de 2012. Guia para validação de métodos bioanalíticos. 2012.

BRUNTON, L. (Ed.). Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: Mc Gran-Hill, 2010.**

BULLEN, W.W.; MILLER, R.A.; HAYES, R.N. Development and validation of a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin, and para-hydroxy atorvastatin in human, dog and rat plasma. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, p. 55-66, 1999.

CAUSON, R. Validation of chromatography methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications**, v. 689, n.1, p. 175-180, 1997.

CHAN, T.Y.K.; WOO, K.S.; NICHOLLS, M.G. The application of nebivolol in essential hypertension: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **International Journal of Cardiology**, v. 35, n. 3, p. 387-395, 1992.

CHENG, J.W. Nebivolol: a third generation β -blocker for hypertension. **Clinical Therapeutics**, v. 31, n. 3, p. 447-462, 2009.

CHEYMOL, G. et al. Pharmacokinetic study and cardiovascular monitoring of nebivolol in normal and obese subjects. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 493-498, 1997.

CLEOPHAS, T.J. et al. Long-term efficacy of nebivolol monotherapy in patients with hypertension. **Current Therapeutic Research**, v. 62, n. 6, p. 451-461, 2001.

COCKROFT, J.R. et al. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 2, n. 274, p. 1067-1071, 1995.

CORSINI, A. et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, n. 3, p. 413-428, 1999.

DAWES, M. et al. The vasodilator action of nebivolol in forearm vasculature of subjects with hypertension. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 3, n. 48, p. 460-463, 1999.

DERY, A.S.; HAMILTON, L.A.; STARR, J.A. Nebivolol for the treatment of heart failure. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 68, p.879-886, 2011.

DONG, J. et al. Effects of cyclosporine A and itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 29, n. 10, p. 1247-1252, 2008.

FAN, J.; LANNOY, A.M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, p. 83-120, 2014.

FOGARI, R. et al. Effect of amlodipine–atorvastatin combination on fibrinolysis in hypertensive hypercholesterolemic patients with insulin resistance. **American Journal of Hypertension**, v. 17, n. 9, p. 823-827, 2004.

GABRIELSON, J.; WEINER, D. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications. **Swedish Pharmaceutical Press**, Estocolmo, 2000.

GEORGESCU, A. et al. The cellular mechanisms involved in the vasodilator effect of nebivolol on the renal artery. **European Journal of Pharmacology**, v. 508, n. 1-3, p. 159-166, 2005.

GERHARDS, P. et al. **GC/MS in clinical chemistry**, p. 241, 1999.

GRAY, C.L.; NDEFO, U.A. Nebivolol: a new antihypertensive agent. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 15, p. 1125-1133, 2008.

HAMMES, J.A. et al. Prevalência de potenciais interações medicamentosas droga-droga em unidades de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 20, p 349-354, 2008.

HARDER, S.; THURMANN, P. Clinically important drug interactions with anticoagulants. An update. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 30, p. 416-444, 1996.

HASLAM, I.S. et al. Induction of P-glycoprotein and function in human intestinal epithelial cells (T84). **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p. 850-861, 2008.

HATAKEYAMA, Y. et al. Risks and benefits of combined use of bucolome and warfarin in anticoagulation therapy. **International Heart Journal**, v.51, p. 399-403, 2010.

HOBBS, R.F.D. et al. Can combining different risk interventions into a single formulation contribute to improved cardiovascular disease risk reduction? Rationale and dosing for an international, open-label program to assess the effectiveness of a single pill (amlodipine/atorvastatin) to attain recommended target levels for blood pressure and lipids (The JEWEL Program). **International Journal of Cardiology**, v. 110, n. 2, p. 242-250, 2006.

IGNARRO, L.J. et al. Nebivolol: a selective β_1 -adrenergic receptor antagonist that relaxes vascular smooth muscle by nitric oxide and cyclic GMP-dependent mechanisms. **Nitric Oxide Biology and Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 75-82, 2002.

JENG J.R. et al. Impaired fibrinolysis and insulin resistance in patients with hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 9, p. 484-490, 1996.

JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE: National High Blood Pressure Education Program. **JNC 7 Express: the seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Institutes of Health**, p. 03-5233, 2003.

KAMALI, F. et al. A pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction study between nebivolol and the H₂-receptor antagonists cimetidine and ranitidine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, p. 201-204, 1997.

KAPELLE, P.J.W.H.; DALLINGA-THIE, G.M.; DULAART, R.P.F. Atorvastatin treatment lowers fasting remnant-like particle cholesterol and LDL subfraction cholesterol without affecting LDL size in type 2 diabetes mellitus: relevance for non-HDL cholesterol and apolipoprotein B guideline targets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, n.1, p. 89-94, 2010.

KHANDELWAL, N. et al. RP-HPLC method for estimation of nebivolol in pharmaceutical dosage form. **International Journal of ChemTech Research**, v.1, n.1, p. 290-292, 2011.

KLOTZ, U. Interaction potential of lercanidipine, a new vasoselective dihydropyridine calcium antagonist. **Drug Resistance**, v. 52, n.3, p.155-61, 2002.

KWON, Y. **Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics, and drug metabolism for industrial scientists**. Nova York: Kluwer Academic/Plenum, 2001.

LANDIN, K.; TENGBORN, L.; SMITH U. Elevated fibrinogen and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in hypertension are related to metabolic risk factors for cardiovascular disease. **Journal of Internal Medicine**, v. 227, p. 273-278, 1990.

LAU, Y.Y. et al. Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxy metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first-pass effect from hepatic uptake transporters, and intestinal and hepatic metabolism. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 7, p. 1175-1181, 2006.

LEE, S. H. et al. Comparison of the efficacy and tolerability of pitavastatin and atorvastatin: an 8-week, multicenter, randomized, open-label, dose-titration study in Korean patients with hypercholesterolemia. **Clinical Therapeutics**, v.29, n. 11, p.2365-2373, 2007.

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

LEUCUTA, S.R.; VLASE, L. Pharmacokinetics and Metabolic Drug Interactions. **Current Clinical Pharmacology**, v.1, p.5-20, 2006.

LEVINE, M. et al. *In vivo* cimetidine inhibits hepatic CYP2D6 and CYP2C11 but not CYP1A1 in adult male rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, n. 2, p. 493-499, 1998.

LINDAMOOD, C. et al. Effects of commonly administered agents and genetics on nebivolol pharmacokinetics: drug-drug interaction studies. **Journal Clinical Pharmacology**, v. 51, p. 575-585, 2011.

MACWAN, J.S. et al. Development and validation of a sensitive, simple, and rapid method for simultaneous quantitation of atorvastatin and its acid and lactone metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 423-433, 2011.

MALEKINEJAD, H. et al. Effects of silmaryn on the pharmacokinetics of atorvastatin in diabetic rats. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. Publicado online em **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. Disponível em springerlink.com. Acesso: 23/03/2014.

MASON, P.R. A rationale for combination therapy in risk factor management: a mechanistic perspective. **American Journal of Medicine**, v.118, n.12A, p.54-61, 2005.

NANDANIA, J. et al. Quantitative determination of nebivolol from human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 923, n. 924, p.110-119, 2013.

NEERATI, P.; GADE, J. Influence of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in normal and diabetic rats. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v. 42, n. 3, p. 285-289, 2011.

NEVES, D.V. et al. Stereoselective analysis of nebivolol isomers in human plasma by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application in pharmacokinetics. **Journal of Chromatography B**, v. 940, p. 47- 52, 2013.

NOVÁKOVÁ, L. et al. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2093-2103, 2009.

O'MEARA, J.G. et al. Ethnic and sex differences in the prevalence, treatment, and control of dyslipidemia among hypertensive adults in the GENOA study. **Archives Internal Medicine**, v.164, n. 8, p.1313, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE: The World Health Report: reducing risks, promoting healthy life. **World Health Organization**. 2002.

OSAWA, M. et al. Usefulness of coadministration of bucolome in warfarin therapy: pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis using outpatient prescriptions. **International Journal of Pharmacology**, v. 293, p. 43-49, 2005.

PARTANI, P. et al. Simultaneous quantitation of atorvastatin and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography/(-) electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 26-36, 2014.

OTAGIRI, M. A molecular function study on the interactions of drugs with plasma proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 5435-5443, 2005.

PASHA, K. et al. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors-atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and *in vitro* metabolism studies. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 282-293, 2006.

RAMAKRISHNA, N. V. S. et al. Rapid Qualification of nebivolol in human plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p.1006-1039, 2005.

REITER, M.J.; Cardiovascular Drug Class Specificity: β -Blockers. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, n. 1, p. 11-33, 2004.

RUMP, L.C. et al. Coadministration of valsartan 160 and 320 mg and simvastatin 20 and 40 mg in patients with hypertension and hypercholesterolemia: A multicenter, 12-week, double-blind, double-dummy, parallel-group superiority study. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 10, p.1782-1793, 2008.

SAHOO, M. K. et al. RP-HPLC Method for the estimation of nebivolol in tablet dosage form. **E-Journal of Chemistry**, v.6, n.3, p. 915-919, 2009.

SANAEE, F. et al. Pharmacokinetics of nebivolol in the rat: low oral absorption, loss in the gut and systemic stereoselectivity. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 34, n. 6, p. 312-320, 2013.

SELVAN, P.S. et al. Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartan in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 858, n. 1-2, p. 143-150, 2007.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.524.

STEPENSKY, D. Use of unbound volumes of drug distribution in pharmacokinetic calculations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 91–98, 2011.

SWANSON, K.M.; HOHL, R.J. Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. **Current Cancer Drug Targets**, v. 6, p. 15-37, 2006.

TERRADOS, N.; VALCÁRCEL, G.; VENTA, R. New cardiovascular risk factors and physical activity. **Apunts Medicina de L'Esport**, v. 45, n. 167, p. 201-208, 2010.

TOMIJAMA, H. et al. Relationship between endothelial function and fibrinolysis in early hypertension. **Hypertension**, v. 31, p. 321–327, 1998.

VAN PEER, A.; SNOECK, E.; WOESTENBORGHS, R. Clinical pharmacokinetics of nebivolol. A review. **Drug Investigation**, v. 3, n. 1, p. 25-30, 1991.

VATS, R. et al. Drug-drug interaction study to assess the effects of atorvastatin co-administration on pharmacokinetics and anti-thrombotic properties of cilostazol in male Wistar rats. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 33, p. 455-465, 2012.

VEVERKA, A.; SALINAS, J.L. Nebivolol in the treatment of chronic heart failure. **Vascular Health and Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 647-654, 2007.

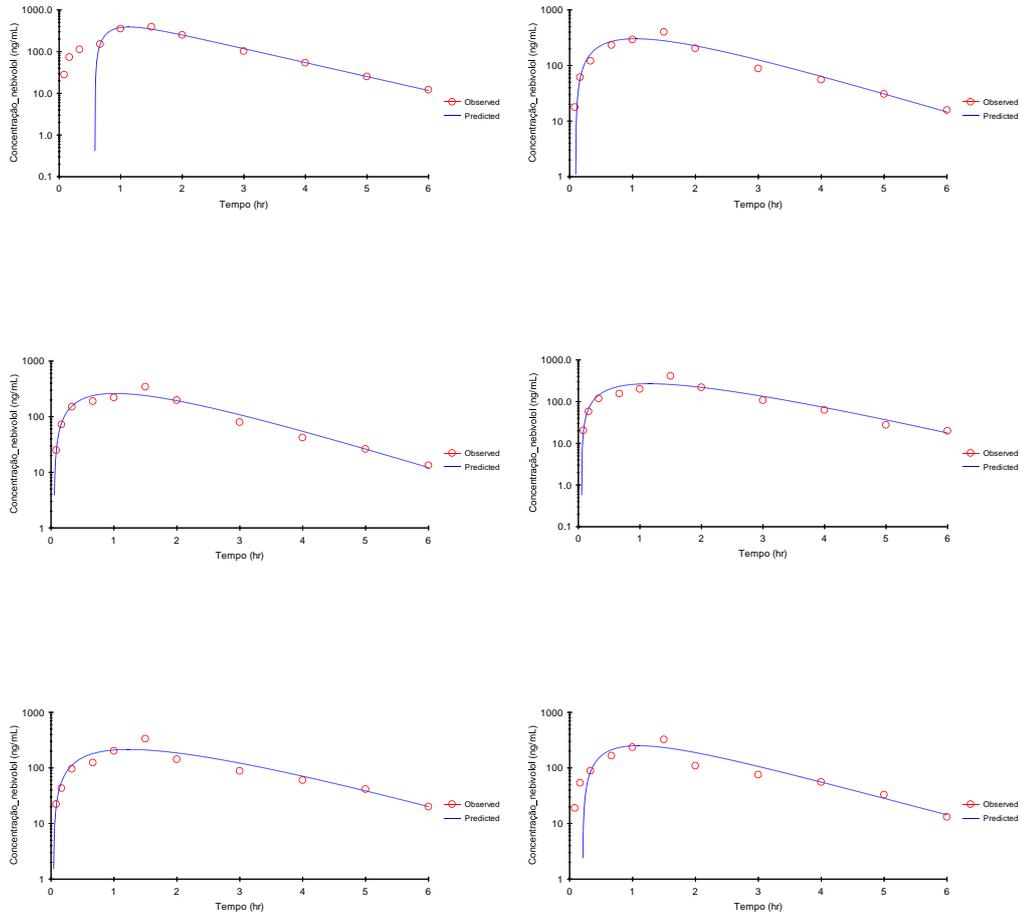
WANG, Y. et al. The effect of nebivolol on asymmetric dimethylarginine system in spontaneously hypertension rats. **Vascular Pharmacology**, v. 54, n.1-2, p. 36-43, 2011.

WEISS, R.J.; SAUNDERS, E.; GREATHOUSE, M. Efficacy and tolerability of nebivolol in stage I-II hypertension: a pooled analysis of data from three randomized, placebo-controlled monotherapy trials. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 9, p. 1150-1161, 2011.

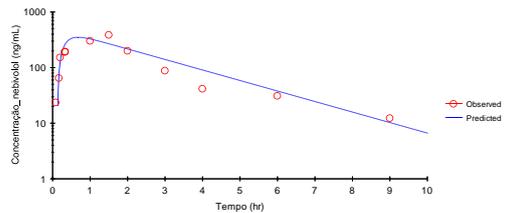
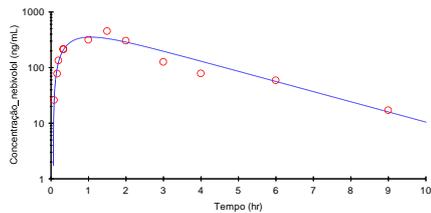
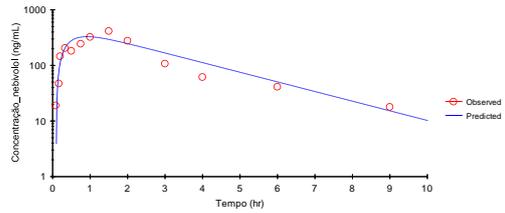
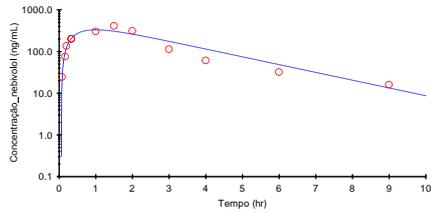
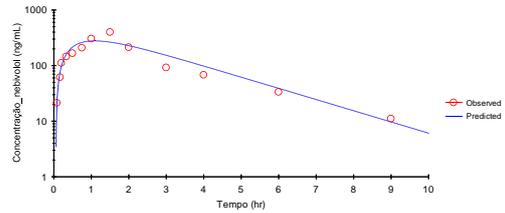
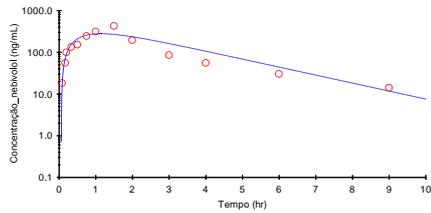
WILLMANN, S. et al. Mechanism-based prediction of particle size-dependent dissolution and absorption: Cilostazol pharmacokinetics in dogs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 83-94, 2010.

YAP, C.W.; LI, Z.R.; CHEN, Y.Z. Quantitative structure–pharmacokinetic relationships for drug clearance by using statistical learning methods. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 24, p. 383–395, 2006.

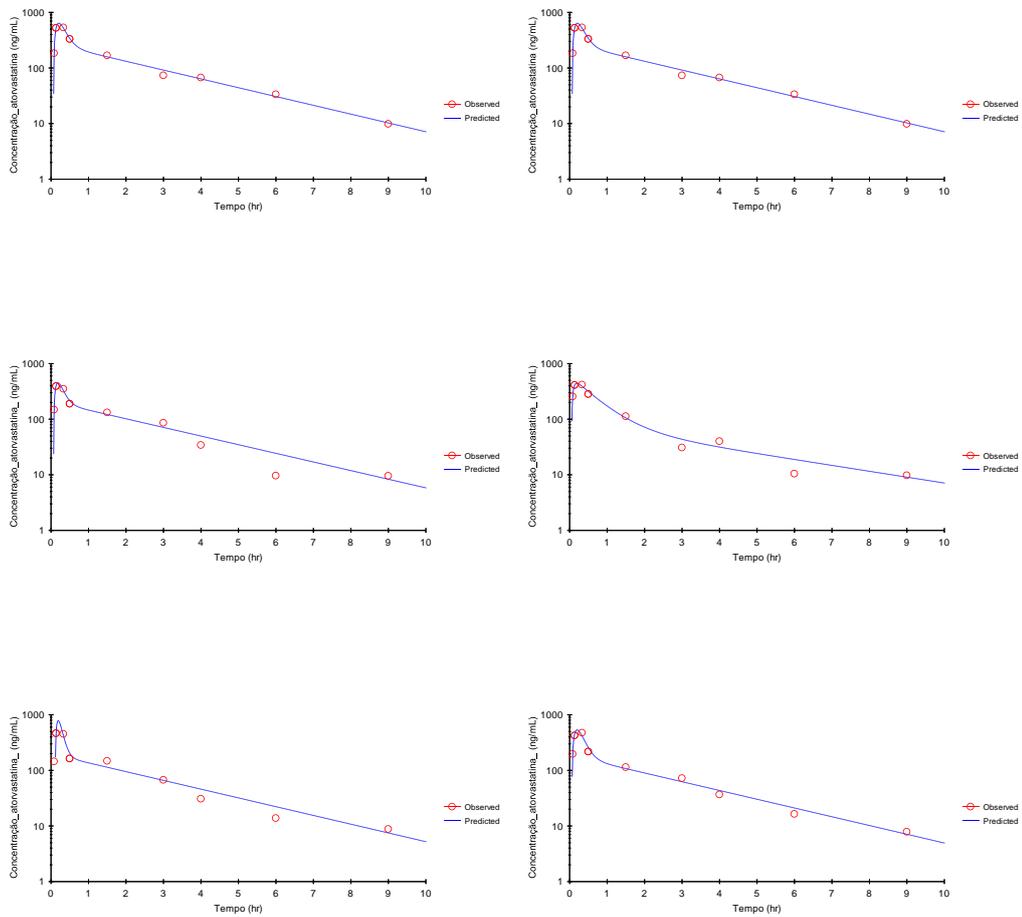
APÊNDICE A - Gráficos gerados pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight, EUA) das concentrações obtidas das amostras que compõem os perfis farmacocinéticos analisados para neбиволол (grupo neбиволол), descrevendo um comportamento monocompartimental, n=6.



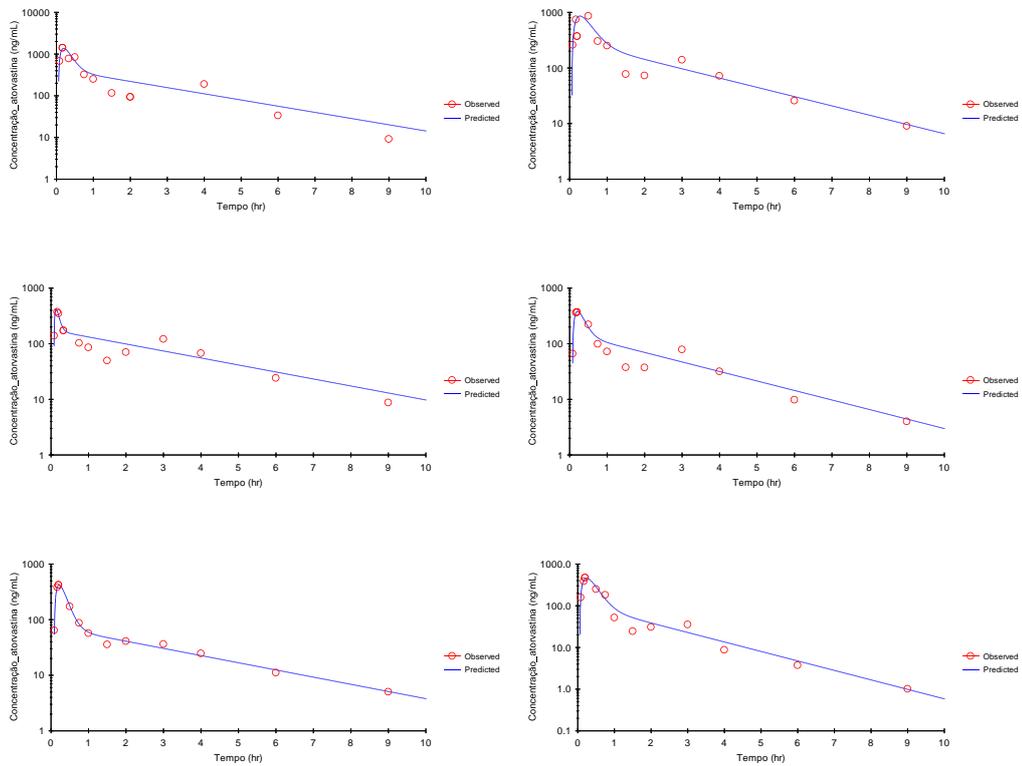
APÊNDICE B - Gráficos gerados pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight, EUA) das concentrações obtidas das amostras que compõem os perfis farmacocinéticos analisados para nebivolol (grupo nebivolol-atorvastatina), descrevendo um comportamento monocompartimental, $n=6$.



APÊNDICE C - Gráficos gerados pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight, EUA) das concentrações obtidas das amostras que compõem os perfis farmacocinéticos analisados para atorvastatina (grupo atorvastatina), descrevendo um comportamento bicompartimental, n=6.



APÊNDICE D - Gráficos gerados pelo software WinNonlin versão 4.0 (Pharsight, EUA) das concentrações obtidas das amostras que compõem os perfis farmacocinéticos analisados para nebivolol (grupo nebivolol-atorvastatina), descrevendo um comportamento bicompartimental, n=6.



ANEXO A



Alfenas, 15 de agosto de 2012.

Prof^a. Vanessa Bergamin Boralli Marques

Prezada Professora:

O projeto sob sua coordenação, registro nº 425/2012, intitulado “Interação farmacocinética neбиволо-atorvastatina em estudo experimental” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento', written over a horizontal line.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG