

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUNA ASSIS GONÇALVES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE MALEATO DE ENALAPRIL E
HIDROCLOROTIAZIDA EM ASSOCIAÇÃO, UTILIZANDO CLAE COM
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL E POR UV COM
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**



CURITIBA

2015

LUNA ASSIS GONÇALVES

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE MALEATO DE ENALAPRIL E
HIDROCLOROTIAZIDA EM ASSOCIAÇÃO, UTILIZANDO CLAE COM
PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL E POR UV COM
CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, departamento de Farmácia, setor Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Cristina L. B. Trindade

CURITIBA

2015

Gonçalves, Luna Assis

Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em associação, utilizando CLAE com planejamento experimental fatorial e por UV com calibração multivariada / Luna Assis Gonçalves. - Curitiba, 2015. 98 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Angela Cristina L. B. Trindade

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. CLAE. 2. Espectroscopia UV. 3. Calibração multivariada. 4. Maleato de enalapril. 5. Hidroclorotiazida. I. Trindade, Angela Cristina L. B. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1

TERMO DE APROVAÇÃO

LUNA ASSIS GONÇALVES

Título: "Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de maleato de enalapril e hidrocloreotiazida em associação, utilizando CLAE-UV com planejamento experimental fatorial e espectroscopia na região do ultravioleta aliada à calibração multivariada"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

Angela C. B. Trindade

Prof^a. Dr^a. Angela Cristina Leal Badaró Trindade
Orientadora

João Cleverton Gasparetto

Dr. Joao Cleverton Gasparetto
Universidade Federal do Paraná

Iara Messerschmidt

Prof^a. Dr^a. Iara Messerschmidt
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 26 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos recebidas.

Ao meu companheiro de todas as horas Leandro. Seu amor e compreensão foram fundamentais para conclusão dessa fase na minha vida.

À minha família, Nalusa, José e Luan, que mesmo longe sempre estiveram presente nessa caminhada.

À minha orientadora professora Dr^a Angela Trindade, pela paciência, apoio e por ter contribuído com sua experiência para minha formação profissional e pessoal.

Aos queridos amigos da pós-graduação, Helena, Cássio, Lori, Suzane, Fernanda, Mariana, Letícia, Rômulo, Flávia, Thaís, Laiza e Gabriella que tornaram esse período mais leve e divertido.

Aos amigos do Desenvolvimento Analítico do Grupo Boticário, Sandra, Juliana, Patrícia, Andrea, Carlos, Eduardo, Alessandra, Shariel, Leoni e Alex que me deram força pra concluir essa etapa.

Ao Mário e Camilla pela grande contribuição nesse trabalho. A ajuda e apoio de vocês foram fundamentais.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo e ao Programa de Pós-Graduação pela oportunidade de concretizar meu desejo de ser Mestre.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

O Maleato de Enalapril (ME), um inibidor da enzima conversora da angiotensina, e a Hidroclorotiazida (HCTZ), um diurético tiazídico, são comumente usados em associação para redução da pressão arterial, no tratamento e controle da hipertensão arterial sistêmica. A associação de fármacos é importante para a adesão ao tratamento, porém constitui-se em um desafio para o controle de qualidade. Por esse motivo, esse trabalho de dissertação teve por objetivo desenvolver e validar métodos para a quantificação de ME e HCTZ por meio de duas técnicas distintas: CLAE-UV e espectrofotometria no ultravioleta (UV) aliada a calibração multivariada usando PLS. A primeira é sensível e seletiva, ideal para quantificação simultânea dos fármacos e suas impurezas. A segunda é uma técnica rápida e de baixo custo, possível de ser implantada em pequenas indústrias (controle de produção) e farmácias de manipulação. Para o desenvolvimento do método por CLAE-UV utilizou-se o planejamento fatorial para fase de otimização. A cromatografia foi realizada em coluna C8 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) à temperatura de 48°C. A fase móvel consistiu em acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50) e fluxo de 1,8 mL.min⁻¹ em modo de eluição isocrático. Na validação o método se mostrou seletivo, preciso (DPR<5%), linear ($r>0,99$) e exato. O método foi aplicado com sucesso na determinação de teor de ME e HCTZ em amostras comerciais. As análises por espectrofotometria no UV aliada a calibração multivariada foram realizadas na região de 200 a 400 nm com uma resolução de 1 nm. Os dados foram tratados no *software* PLS-Toolbox 6.5 que opera em ambiente Matlab. O melhor modelo foi obtido utilizando todo o espectro (200 a 400 nm), com pré-processamento de primeira derivada e espectros centrados na média, com duas variáveis latentes. O conjunto de calibração constituiu de 29 amostras e o de validação de 10 amostras, sendo que não foi observada nenhuma amostra anômala. Os valores de RMSEC e RMSEP para ME foram de 0,086 e 0,081 μ g.mL⁻¹ e para HCTZ de 0,090 e 0,074 μ g.mL⁻¹. Na validação o método mostrou-se linear, preciso, com inverso da sensibilidade analítica na ordem de 10⁻³ μ g.mL⁻¹. O modelo apresentou boa capacidade preditiva da concentração dos fármacos nas amostras comerciais de comprimidos, sendo que as amostras analisadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa às analisadas por CLAE-UV ($p>0,05$). Por fim os métodos desenvolvidos podem ser considerados rápidos e eficientes para o controle de qualidade de ME e HCTZ em forma farmacêutica sólida.

Palavras-Chave: CLAE, Espectroscopia UV, Calibração multivariada, Maleato de Enalapril, Hidroclorotiazida.

ABSTRACT

The Enalapril Maleate (ME), an inhibitor of angiotensin converting enzyme, and the Hydrochlorothiazide (HCTZ), a thiazide diuretic, are commonly used in combination to reduce blood pressure, treatment and control of hypertension. The drug combination is important for treatment adherence, but constitutes a challenge for the quality control. Therefore, this dissertation aimed to develop and validate methods for the quantification of ME and HCTZ through two different techniques: HPLC-UV and ultraviolet spectrophotometry (UV) allied to multivariate calibration using PLS. The first is sensible and selective, ideal for simultaneous quantification of drugs and their impurities. The second is a rapid and low cost technique, that can be implemented in small industries (production control) and compounding pharmacies. The method by HPLC-UV was developed using experimental design for optimization phase. Chromatography was performed on C8 column (250 x 4.6 mm; 5 μm) at a temperature of 48°C. The mobile phase consisted of acetonitrile: phosphoric acid solution pH 2.5 (50:50) at flow rate 1.8 mL min⁻¹ in isocratic elution mode. In the validation, method was selective, precise (RSD <5%), linear ($r > 0.99$) and accurate. The method was successfully applied to the determination of ME and HCTZ content in commercial samples. The analyzes by UV spectrophotometry combined with multivariate calibration was performed in the region of 200 to 400 nm with a resolution of 1 nm. Data were processed in the PLS-Toolbox 6.5 software operating in Matlab. The best model was obtained using the entire spectrum (200 to 400 nm) with first derivative pre-processing plus mean centered spectra, with two latent variables. The calibration set consisted of 29 samples and 10 samples for validation, and observed no abnormal sample. The RMSEP and RMSEC values were 0.086 and 0.081 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ME and 0.090 and 0.074 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for HCTZ. The method was linear, precise, with inverse of analytical sensitivity on the order of 10^{-3} $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The model showed good predictive ability of the concentration of the drugs in commercial samples of tablets, and the samples analyzed showed no statistically significant difference to the analyzed by HPLC-UV ($p > 0.05$). Finally the methods developed can be considered fast and efficient for quality control of ME and HCTZ in solid dosage form.

Key words: HPLC, UV Spectroscopy, Multivariate calibration, Enalapril maleate, Hydrochlorothiazide.

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----------|---|----|
| QUADRO 1 | FATORES DE RISCO PARA HAS | 20 |
| QUADRO 2 | CLASSES DE ANTI-HIPERTENSIVOS PARA USO CLÍNICO... | 21 |
| QUADRO 3 | DESCRIÇÃO DOS PADRÕES UTILIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DOS MÉTODOS..... | 51 |
| QUADRO 4 | DESCRIÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE COMPRIMIDOS CONTENDO A ASSOCIAÇÃO MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA..... | 51 |
| QUADRO 5 | DESCRIÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS..... | 52 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| FIGURA 1 | SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E MECANISMO VASOPRESSOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA..... | 22 |
| FIGURA 2. | ESTRUTURA DO MALEATO DE ENALAPRIL..... | 22 |
| FIGURA 3 | ESTRUTURA DO ENALAPRILATO..... | 22 |
| FIGURA 4. | O NÉFRON..... | 24 |
| FIGURA 5. | ESTRUTURA DA HIDROCLOROTIAZIDA..... | 24 |
| FIGURA 6. | DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UM CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA..... | 28 |
| FIGURA 7. | (A) CAMPO ELETROMAGNÉTICO. O CAMPO ELÉTRICO OSCILA EM UM PLANO PERPENDICULAR AO CAMPO MAGNÉTICO. (B) SOMENTE AS OSCILAÇÕES DO CAMPO ELÉTRICO SÃO MOSTRADAS. A AMPLITUDE DA ONDA É O COMPRIMENTO DO VETOR DE CAMPO ELÉTRICO NO PONTO MÁXIMO DA ONDA, ENQUANTO O COMPRIMENTO DA ONDA É A DISTÂNCIA ENTRE DOIS MÁXIMOS SUCESSIVOS..... | 35 |
| FIGURA 8. | O ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO COM SUAS REGIÕES E RESPECTIVAS ENERGIAS E EFEITOS MOLECULARES..... | 35 |
| FIGURA 9. | RESUMO DOS NÍVEIS ENERGÉTICOS ELETRÔNICOS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PRÓXIMO..... | 36 |
| FIGURA 10. | REPRESENTAÇÃO DAS MATRIZES X E Y..... | 40 |
| FIGURA 11. | REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DA PROPRIEDADE DE ORTOGONALIDADE DO NAS..... | 46 |
| FIGURA 12. | PLANEJAMENTO PARA AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO..... | 62 |
| FIGURA 13. | ESPECTRO DE MASSAS DO PRODUTO DA HIDRÓLISE ALCALINA DO MALEATO DE ENALAPRIL..... | 66 |
| FIGURA 14. | PERFIL DE SUPERFÍCIE: RESOLUÇÃO ENTRE HIDROCLOROTIAZIDA E ENALAPRIL NA TEMPERATURA DE 40°C..... | 72 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 15. PERFIL DE SUPERFÍCIE: RESOLUÇÃO ENTRE HIDROCLOROTIAZIDA E ENALAPRIL NA TEMPERATURA DE 48°C..... | 73 |
| FIGURA 16. CROMATOGRAMA..... | 74 |
| FIGURA 17. LINEARIDADE DO MALEATO DE ENALAPRIL POR CLAE-UV.. | 77 |
| FIGURA 18. LINEARIDADE DA HIDROCLOROTIAZIDA POR CLAE-UV..... | 76 |
| FIGURA 19. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA..... | 80 |
| FIGURA 20. ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA MISTURA MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA..... | 81 |
| FIGURA 21. GRÁFICO RMSECV PARA MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA POR NÚMERO DE VARIÁVIS LATENTES..... | 81 |
| FIGURA 22. AVALIAÇÃO DE <i>OUTLIERS</i> NO MODELO POR UV ATRAVÉS DOS RESÍDUOS DE STUDENT X <i>LEVERAGE</i> | 83 |
| FIGURA 23. AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PARA O MALEATO DE ENALAPRIL PELA RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE REFERÊNCIA VS. VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS..... | 86 |
| FIGURA 24. AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PARA A HIDROCLOROTIAZIDA PELA RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE REFERÊNCIA VS. VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS..... | 86 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 1. | TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O AJUSTE DE UM MODELO..... | 33 |
| TABELA 2. | FATORES E SUAS VARIAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO ESTRELA..... | 54 |
| TABELA 3 | PLANEJAMENTO ESTRELA PARA OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA..... | 55 |
| TABELA 4 | PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA TESTE DE SELETIVIDADE..... | 56 |
| TABELA 5 | PREPARO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO..... | 59 |
| TABELA 6 | PARÂMETROS MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO CLAE-UV..... | 59 |
| TABELA 7 | CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO..... | 61 |
| TABELA 8 | CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO..... | 62 |
| TABELA 9 | RESPOSTAS OBTIDAS NOS CROMATOGRAMAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... | 68 |
| TABELA 10 | RESPOSTAS OBTIDAS NOS CROMATOGRAMAS DAS REPLICATAS DO PONTO CENTRAL..... | 69 |
| TABELA 11 | COEFICIENTES DE REGRESSÃO DOS MODELOS OBTIDOS PELO SOFTWARE STATISTICA..... | 69 |
| TABELA 12 | PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PARA ASSIMETRIA DE PICO DA HIDROCLOROTIAZIDA..... | 70 |
| TABELA 13 | PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PARA RESOLUÇÃO ENTRE OS PICOS DO ENALAPRILATO DE HIDROCLOROTIAZIDA..... | 70 |
| TABELA 14 | PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PARA RESOLUÇÃO ENTRE OS PICOS DA HIDROCLOROTIAZIDA E DO MALEATO DE ENALAPRIL..... | 71 |
| TABELA 15 | RESULTADOS DOS PARÂMETROS ASSIMETRIA DO PICO (A_s), RESOLUÇÃO (R_s) E LARGURA DOS PICOS (w) NAS CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA O MÉTODO..... | 74 |

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 16 | RESULTADO DO TESTE DE SELETIVIDADE PARA O MÉTODO POR CLAE..... | 75 |
| TABELA 17 | RESULTADOS DOS TESTES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO..... | 75 |
| TABELA 18 | RESULTADOS DO TESTE DE LINEARIDADE PARA O MÉTODO POR CLAE..... | 76 |
| TABELA 19 | ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO POR CLAE-UV..... | 77 |
| TABELA 20 | RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO (REPETITIVIDADE)..... | 77 |
| TABELA 21 | RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA | 78 |
| TABELA 22 | RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO PARA O MÉTODO POR CLAE..... | 78 |
| TABELA 23 | RESULTADOS DA ROBUSTEZ DO MÉTODO POR CLAE | 79 |
| TABELA 24 | RESULTADOS DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO..... | 79 |
| TABELA 25 | RESUMO DOS PARÂMETROS ANALISADOS PARA O MELHOR MODELO PARA O MÉTODO POR UV..... | 84 |
| TABELA 26 | PORCENTAGENS DE VARIÂNCIA NOS BLOCOS X E Y E ERROS RELATIVOS PARA O MODELO DESENVOLVIDO..... | 84 |
| TABELA 27 | FIGURAS DE MÉRITO MULTIVARIADAS PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO..... | 85 |
| TABELA 28 | AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE NO MÉTODO POR UV | 86 |
| TABELA 29 | RESULTADOS DA PRECISÃO INTRACORRIDA (REPETITIVIDADE) PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO..... | 87 |
| TABELA 30 | RESULTADOS DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO..... | 87 |
| TABELA 31 | RESULTADOS DA ROBUSTEZ RELACIONADA À TEMPERATURA NO MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO..... | 88 |
| TABELA 32 | RESULTADOS DA ESTABILIDADE DOS FÁRMACOS PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO..... | 88 |

| | | |
|-----------|---|----|
| TABELA 33 | RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM AMOSTRA COMERCIAL PELOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS..... | 89 |
|-----------|---|----|

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| CV | Coeficiente de Variação |
| DPR | Desvio Padrão Relativo |
| ECA | Enzima Conversora de Angiotensina |
| iECA | Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina |
| FTIR | Espectrômetria no IV com Transformada de Fourier |
| HAS | Hipertensão Arterial Sistêmica |
| HCTZ | Hidroclorotiazida |
| ICH | International Conference on Harmonisation |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| ME | Maleato de Enalapril |
| MLR | Regressão Linear Múltipla |
| NAS | Sinal Analítico Líquido |
| PA | Pressão Arterial |
| PC | Componente Principal |
| PC1 | Primeira Componente Principal |
| PC2 | Segunda Componente Principal |
| PCA | Análise de Componente Principais |
| PCR | Regressão de Componentes Principais |
| PLS | Mínimos Quadrados Parciais |
| r | Coeficiente de Correlação |
| r ² | Coeficiente de Determinação |
| RMSECV | Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada |
| RMSEP | Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão |
| RPD | Desvio Padrão de Previsão |
| SA | Sensibilidade Analítica |
| SDV | Standard Deviation of Validation |
| SEL | Seletividade |

| | |
|-----|--------------|
| SEN | Sensibilidad |
| UV | Ultravioleta |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 18 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 | HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA | 19 |
| 3.2 | TERAPÊUTICA | 20 |
| 3.2.1 | Maleato de Enalapril | 21 |
| 3.2.2 | Hidroclorotiazia | 23 |
| 3.2.3 | Associação Maleato de Enalapril e Hidroclorotiazida | 25 |
| 3.3 | MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS | 26 |
| 3.4 | MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS | 27 |
| 3.4.1 | Cromatografia à líquido de alta eficiência | 27 |
| 3.5 | PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS | 29 |
| 3.6 | ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA | 34 |
| 3.7 | CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA | 37 |
| 3.7.1 | Detecção de amostras anômalas | 41 |
| 3.8 | VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CLAE-UV | 42 |
| 3.8.1 | Seletividade | 42 |
| 3.8.2 | Linearidade | 43 |
| 3.8.3 | Limite de Detecção e Quantificação | 43 |
| 3.8.4 | Intervalo | 43 |
| 3.8.5 | Precisão | 44 |
| 3.8.6 | Exatidão | 44 |
| 3.8.7 | Robustez | 45 |
| 3.9 | VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA | 45 |
| 3.9.1 | Figuras de Mérito | 47 |
| 3.9.1.1 | Seletividade | 47 |
| 3.9.1.2 | Linearidade | 47 |
| 3.9.1.3 | Limite de Detecção e Quantificação | 47 |
| 3.9.1.4 | Sensibilidade | 48 |
| 3.9.1.5 | Sensibilidade Analítica | 48 |
| 3.9.1.6 | Precisão | 48 |
| 3.9.1.7 | Exatidão | 49 |
| 3.9.1.8 | Teste para erro sistemático (bias) | 49 |
| 3.9.1.9 | Desvio Residual de Previsão | 50 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 4.1 | MATERIAL | 52 |
| 4.1.1 | Padrões analíticos e amostras comerciais | 52 |
| 4.1.2 | Equipamentos e Consumíveis | 53 |
| 4.1.3 | Reagentes e Solventes | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-UV..... | 54 |
| 4.2.1 Estudo de solubilidade dos fármacos..... | 54 |
| 4.2.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho..... | 54 |
| 4.2.3 Síntese do enalaprilato..... | 54 |
| 4.2.4 Otimização do método cromatográfico..... | 55 |
| 4.2.5 Validação do método por CLAE-UV..... | 56 |
| 4.2.5.1 Seletividade..... | 56 |
| 4.2.5.2 Linearidade e intervalo..... | 58 |
| 4.2.5.3 Limite de detecção e quantificação..... | 58 |
| 4.2.5.4 Precisão..... | 58 |
| 4.2.5.5 Exatidão..... | 59 |
| 4.2.5.6 Robustez..... | 60 |
| 4.2.5.7 Teste de estabilidade..... | 61 |
| 4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO UV-PLS..... | 61 |
| 4.3.1 Planejamento das amostras..... | 61 |
| 4.3.2 Preparo das amostras e aquisição dos espectros de ultravioleta..... | 64 |
| 4.3.3 Construção dos modelos de calibração multivariada..... | 64 |
| 4.3.3.1 Detecção de amostras anômalas..... | 64 |
| 4.3.4 Validação do método UV-PLS..... | 65 |
| 4.3.4.1 Linearidade..... | 65 |
| 4.3.4.2 Precisão..... | 65 |
| 4.3.4.3 Sensibilidade Analítica..... | 66 |
| 4.4 DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM AMOSTRAS REAIS..... | 66 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 67 |
| 5.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-UV..... | 67 |
| 5.1.1 Estudo de solubilidade dos fármacos..... | 67 |
| 5.1.2 Síntese do enalaprilato..... | 67 |
| 5.1.3 Desenvolvimento do método CLAE-UV..... | 68 |
| 5.1.4 Planejamento Experimental Fatorial..... | 69 |
| 5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-UV..... | 75 |
| 5.2.1 Seletividade..... | 75 |
| 5.2.2 Limite de detecção e quantificação..... | 76 |
| 5.2.3 Linearidade e intervalo..... | 76 |
| 5.2.4 Precisão..... | 78 |
| 5.2.5 Exatidão..... | 79 |
| 5.2.6 Robustez..... | 79 |
| 5.2.7 Estabilidade da solução de trabalho..... | 80 |
| 5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR UV COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA..... | 81 |
| 5.3.1 Análises dos espectros de absorção eletrônica..... | 81 |
| 5.3.2 Avaliação dos modelos multivariados..... | 83 |
| 5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR UV..... | 85 |
| 5.5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS CLAE-UV E UV-PLS..... | 89 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 91 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 93 |

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a doença mais frequente na população mundial adulta sendo um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares, como o acidente vascular cerebral (AVC), infarto do miocárdio e morte cardíaca súbita. A HAS é a principal contribuinte para insuficiência cardíaca, insuficiência renal e aneurisma dissecante da aorta (BRUNTON *et al.*, 2006). No Brasil, em 2012, 24,3% da população foi diagnosticada como hipertensa e, de acordo com a pesquisa da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), o diagnóstico é maior em mulheres (26,9%) do que em homens (21,3%) (BRASIL, 2013).

A HAS possui fatores genéticos, sendo a transmissão genética de caráter poligênico e autossômica dominante e ambientais. No entanto, os fatores ambientais, como estilo de vida e alimentação, possuem maior influência para o aumento da pressão arterial (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

Para o tratamento da hipertensão é considerada a utilização de medicamentos isolados ou em terapias combinadas. Grande parte dos portadores de hipertensão não responde bem a monoterapia, tornando a associação de medicamentos muito importante para o tratamento, trazendo vários benefícios para o paciente, como diminuição das vezes em que se administra a medicação, controle mais rápido da pressão arterial, maior segurança devido à utilização de menores doses dos medicamentos e menores ocorrências de efeitos adversos (GRADMAN *et al.*, 2010). A associação mais utilizada para tratamento de HAS é a formada por um inibidor da enzima conversora de angiotensina, como o enalapril, e um diurético, tal como a hidroclorotiazida (PIERIN *et al.*, 2001).

Na indústria farmacêutica, o controle de qualidade de matérias-primas e produto acabado é fundamental para garantir a qualidade e segurança dos produtos. O desenvolvimento de técnicas analíticas instrumentais aplicadas ao controle de qualidade de fármacos tem sido de grande importância principalmente para área industrial que necessita de técnicas rápidas, sensíveis e seletivas.

A maioria dos métodos para doseamento de fármacos em formas farmacêuticas descritos na literatura envolvem métodos de separações químicas e

físicas, como a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). A capacidade de um método cromatográfico de identificar e quantificar as espécies separadas é determinada por vários fatores. O planejamento experimental fornece uma poderosa ferramenta estatística para a descoberta desses fatores e para a otimização das respostas obtidas. O planejamento experimental em cromatografia pode ser usado para mostrar a falta de efeitos significativos em estudos de robustez, para identificar fatores (variáveis) significativos e otimizar uma resposta com relação a estes fatores durante o desenvolvimento do método. Essa abordagem para desenvolvimento de método se mostra superior a tradicional forma empírica, sendo possível se alcançar a condição ótima de análise com um menor número de experimentos (HIBBERT, 2012).

O uso de espectroscopia na região do ultravioleta (UV) também é bastante difundido para análise de fármacos, porém sua utilização muitas vezes se restringe a formas farmacêuticas com apenas um fármaco. O doseamento de associações de fármacos ficaria comprometido pela interferência espectral que um fármaco poderá gerar no espectro do outro ativo. O uso da calibração multivariada, uma técnica que explora toda a informação obtida pelas técnicas espectroscópicas, se mostrou um método rápido e eficiente para determinação de substâncias em amostras complexas, mesmo na presença de interferências espectrais (BARTHUS *et al.*, 2007).

Assim, tendo em vista que a associação farmacêutica de maleato de enalapril e hidroclorotiazida tem sido cada vez mais empregada na terapia anti-hipertensiva, a falta de um método mais robusto e otimizado para a quantificação simultânea destes por cromatografia a líquido e de um método mais acessível para controle de processo em indústrias farmacêuticas, bem como para farmácias magistrais, neste trabalho foram desenvolvidos e validados dois métodos para quantificação simultânea de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em comprimidos: um método por CLAE com planejamento experimental para otimização e outro por espectroscopia na região do ultravioleta com calibração multivariada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método por CLAE utilizando planejamento experimental e um método por espectroscopia na região do ultravioleta aliada à calibração multivariada para o controle de qualidade de comprimidos contendo a associação de maleato de enalapril e hidroclorotiazida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para quantificação simultânea de maleato de enalapril e hidroclorotiazida, na presença de enalaprilato, em forma farmacêutica sólida (comprimidos) por CLAE utilizando planejamento experimental fatorial;
- Desenvolver um método para quantificação simultânea de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em forma farmacêutica sólida (comprimidos) empregando espectroscopia na região do ultravioleta e calibração multivariada;
- Validar os métodos desenvolvidos;
- Aplicar os métodos desenvolvidos em produtos comerciais contendo a associação farmacêutica;
- Comparar os resultados do método desenvolvido por espectroscopia na região do ultravioleta com o método por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A pressão arterial pode ser definida como o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (MALTA *et al*, 2009). A HAS configura-se um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. A HAS ocorre quando os valores de pressões sistólicas e diastólicas estão acima dos valores considerados normais, 14 mmHg e 90 mmHg, respectivamente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

Estima-se que 50% das pessoas com pressão alta não sabem disso, e dos que sabem apenas 25% são aderentes ao tratamento. Atualmente a hipertensão atinge 30% da população brasileira, sendo responsável por 40% de infartos, 80% dos casos de acidente vascular cerebral e 25% dos casos de insuficiência renal terminal. No Brasil, as doenças cardiovasculares são ainda responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2014).

Os estudos clínicos demonstraram que a detecção, o tratamento e o controle da HAS são fundamentais para a redução dos eventos cardiovasculares. No Brasil, 14 estudos populacionais dos últimos 15 anos revelaram baixos índices de controle da pressão arterial (19,6%). Os melhores níveis de tratamento e controle foram obtidos em áreas de cobertura do Programa de Saúde da Família. Os esforços dos profissionais de saúde, das sociedades científicas e das agências governamentais são fundamentais para se atingir as metas de tratamento e controle da HAS (ROSÁRIO *et al*, 2009; JARDIM *et al*, 2007).

Os fatores de risco para HAS estão representados no Quadro 1.

| Fatores de Risco para HAS |
|--|
| Idade: Relação direta e linear da PA com a idade |
| Gênero e etnia: Prevalência entre homens e mulheres é semelhante. A HAS é duas vezes mais prevalente em indivíduos de cor não-branca. |
| Excesso de peso e obesidade: O excesso de peso se associa com maior prevalência de HAS desde idades jovens. A obesidade central também se associa em PA. |
| Ingestão de sal: Ingestão excessiva de sódio tem sido correlacionada com elevação da PA. |
| Ingestão de álcool: Ingestão de álcool por períodos prolongados de tempo pode aumentar a PA e a mortalidade cardiovascular. |
| Sedentarismo: Atividade física reduz a incidência de HAS. |
| Fatores socioeconômicos: No Brasil, a HAS é mais prevalente entre indivíduos com menor escolaridade. |

QUADRO 1 – FATORES DE RISCO PARA HAS (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

3.2 TERAPÊUTICA

A terapia de controle da pressão arterial a ser adotada para cada paciente varia de acordo com a estratificação de risco, que avalia fatores como valores da pressão arterial, presença de fatores de risco cardiovascular, lesões em órgãos-alvo, doenças cardiovasculares já presentes e a meta de valores de pressão arterial que é pretendida com o tratamento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

O tratamento não medicamentoso é recomendado em todos os estágios da hipertensão. Mudanças no estilo de vida são entusiasticamente recomendadas na prevenção primária da HAS, pois reduzem a PA bem como a mortalidade cardiovascular (LEWINGTON *et al*, 2002; RAINFORTH *et al*, 2007). Hábitos saudáveis de vida, como alimentação saudável, consumo controlado de sódio e álcool, ingestão de potássio, combate ao sedentarismo e os tabagismo, devem ser adotados desde a infância e adolescência.

O objetivo principal do tratamento medicamentoso da HAS é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares. Desta maneira, os anti-hipertensivos devem além de reduzir da PA, reduzir os eventos cardiovasculares fatais e não-fatais e, se possível, a taxa de mortalidade (KANDEL, 1996; PADWAL; STRAUS; McALISTER, 2001).

Alguns aspectos para a escolha do medicamento anti-hipertensivo devem ser observados, como a eficiência do medicamento por via oral, sendo este seguro e bem tolerado e com relação custo/benefício favorável ao paciente e a administração em menor número possível de doses, com preferência para dose única diária.

Várias classes de medicamentos do grupo dos anti-hipertensivos estão disponíveis para o tratamento da HAS (Quadro 2). Qualquer um dos medicamentos destas classes pode ser utilizado desde que resguardadas as indicações e as contraindicações específicas.

| Classes de anti-hipertensivos para uso clínico |
|--|
| Diuréticos. Ex: hidroclorotiazida, furosemida |
| Inibidores adrenérgicos - Agonistas alfa-2 centrais. Ex: clonidina, alfametildopa. Bloqueadores beta-adrenérgicos. Ex: atenolol Bloqueadores alfa-1 adrenérgicos. Ex: doxazosina |
| Vasodilatadores diretos. Ex: hidralazina |
| Bloqueadores de canais de cálcio. Ex: anlodipino, felodipino |
| Inibidores da enzima conversora da angiotensina. Ex: captopril, enalapril |
| Bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II. Ex: losartana, telmisartana |
| Inibidor direto da renina. Ex: alisquireno |

QUADRO 2 – CLASSES DE ANTI-HIPERTENSIVOS PARA USO CLÍNICO (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

3.2.1 Maleato de Enalapril

O maleato de enalapril (ME) faz parte da classe dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA). Os iECA bloqueiam a transformação da angiotensina I em II no sangue e nos tecidos através da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Figura 1). A angiotensina II causa vasoconstrição das artérias e veias, levando ao aumento da PA (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

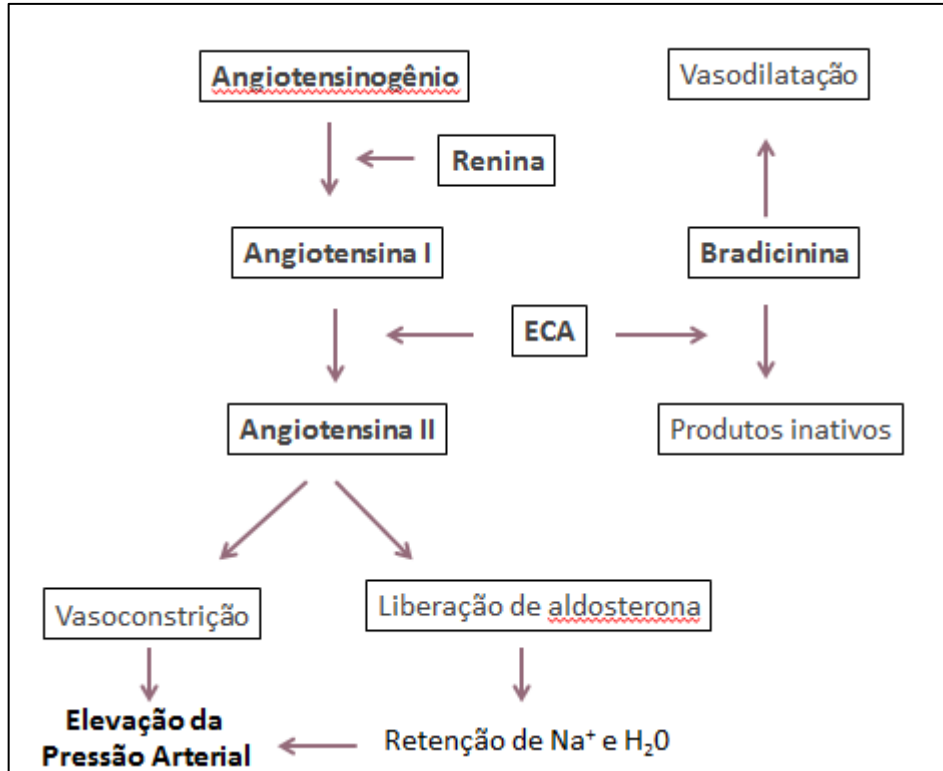


FIGURA 1 - SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E MECANISMO VASOPRESSOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA.

O ME é um pró-fármaco, que é rapidamente hidrolisado no fígado em enalaprilato, sendo este a forma ativa do fármaco (Figuras 2 e 3). O enalapril por si só possui pouca atividade farmacológica. A excreção do ME e do enalaprilato é principalmente por via renal.

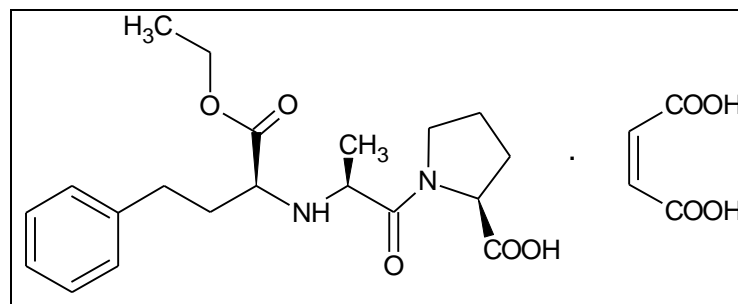


FIGURA 2 - ESTRUTURA DO MALEATO DE ENALAPRIL.

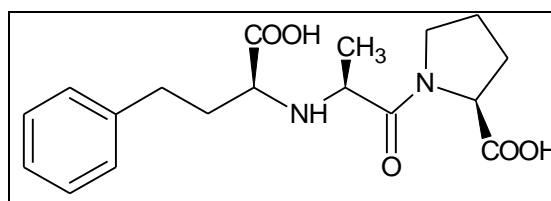


FIGURA 3 - ESTRUTURA DO ENALAPRILATO

Algumas reações adversas são atribuídas aos iECA, como tosse seca, alteração do paladar e, mais raramente, reações de hipersensibilidade com erupção cutânea e edema angioneurótico (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

O ME apresenta-se como um pó cristalino branco, ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel em metanol e solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos (Farm. Bras. V, 2010).

Várias metodologias para doseamento do ME em formas farmacêuticas são descritas na literatura. A Farmacopeia Brasileira 5ª edição tem como método de doseamento a cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção no ultravioleta. Alguns métodos na literatura apresentam alternativas, como o doseamento espectrofotométrico na região do ultravioleta (SIMONA *et al*, 2012; BARAKA *et al*, 2008), quimiluminescência (AL-ARFAJ *et al*, 2009), densitometria (WYSZOMIRSKAET *al*, 2010), entre outros.

3.2.2 Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético tiazídico. O mecanismo de ação dos diuréticos se relaciona com seus efeitos diuréticos e natriuréticos, com diminuição do volume extracelular. Os diuréticos tiazídicos atuam no túbulo distal no néfron (Figura 4), inibindo a reabsorção de Na^+/Cl^- e aumentando moderadamente a eliminação de urina. Eles são os únicos diuréticos que também atuam como vasodilatadores sanguíneos, o que também ajuda a diminuir a PA. (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

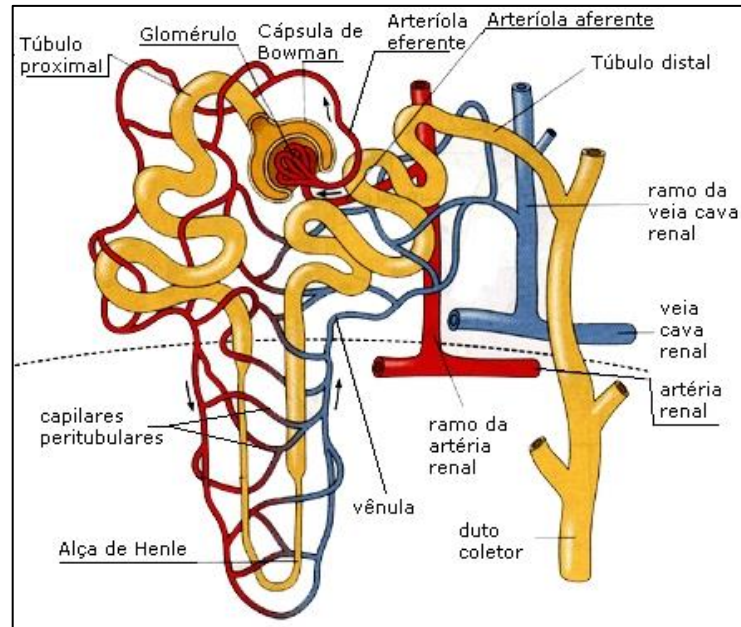


FIGURA 4 - O NÉFRON.

A HCTZ (Figura 5) apresenta-se como pó cristalino branco e inodoro, muito pouco solúvel em água e solúvel em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos (Farm. Bras. V, 2010).

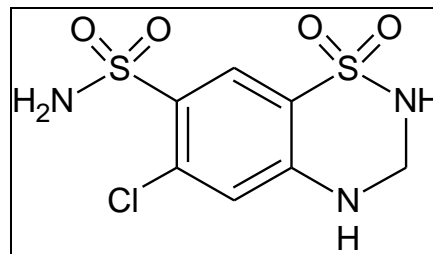


FIGURA 5 - ESTRUTURA DA HIDROCLOROTIAZIDA.

Dentre as metodologias encontradas na literatura para doseamento de HCTZ estão a espectrofotometria de absorção no ultravioleta citada pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, cromatografia a líquido de alta eficiência (PRASAD; SANTHOSH; SREE 2011), voltametria (BOZAL *et al*, 2013) e espectrofluorimetria (OMAR, 2010).

3.2.3 Associação maleato de enalapril e hidroclorotiazida.

O objetivo central da terapia anti-hipertensiva é diminuir os riscos associados à elevação da PA sem adversamente afetar a qualidade de vida do paciente. Alguns ensaios clínicos mostraram que normalmente não é possível atingir valores normais de PA com um único agente. Como a HAS é multifatorial, um bom mecanismo para controlar o aumento da PA é interferir em mais de um mecanismo pressor (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2010).

A racionalidade da terapia combinada é baseada na coadministração de dois ou mais agentes anti-hipertensivos cuidadosamente selecionados. O requerimento fundamental para qualquer combinação é a evidência de que ela diminuirá a PA em um nível melhor do que a monoterapia individual de seus componentes. Deve-se combinar agentes que interfiram em mecanismos distintos, pois a administração de dois ou mais fármacos irá resultar em uma parcial ou completa adição dos efeitos de diminuição da PA. Em geral, a combinação de dois fármacos de classes complementares é aproximadamente cinco vezes mais efetiva para diminuição da PA do que aumentar a dose de apenas um fármaco (WALD *et al.*, 2009).

A maioria dos anti-hipertensivos produzem efeitos adversos de acordo com a dose. Altas doses na monoterapia levam a maiores efeitos adversos. Nessas condições, uma menor dose do agente em combinação com outro anti-hipertensivo é preferível para minimizar efeitos adversos mesmo quando não houver alguma vantagem na diminuição da PA (GRADMAN *et al.*, 2010).

A aderência ao tratamento em longo prazo é necessária para o controle da PA. Um estudo mostrou que a aderência está inversamente relacionada com o número de medicamentos prescritos e que a aderência ao tratamento cai drasticamente com o aumento do número de doses administradas por dia (FUNG *et al.*, 2007). Desta maneira, em muitos pacientes, a combinação de fármacos em um único comprimido promove maior aderência, por reduzir a quantidade de administrações e simplificar o regime de tratamento.

No mercado farmacêutico mundial, existem diversas associações de fármacos anti-hipertensivos, combinando diversas classes terapêuticas. Dentre as associações de maior emprego, estão aquelas que contêm enalapril, na forma do

maleato, e a hidroclorotiazida. No Brasil, essa associação é comercializada com o nome fantasia de Co-Renitec® ou na forma do medicamento genérico.

Métodos para doseamento simultâneo de ME e HTZ aplicáveis no controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas ainda não estão descritos em documentos oficiais (farmacopeias), apenas na literatura científica, sendo eles cromatografia a líquido de alta eficiência (PAWAR *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2011; USLU; ÖZDEN, 2013; VENKATARAMANA *et al.*, 2013; VIDYADHARA *et al.*, 2014), eletroforese capilar (HILLAERT; DE GRAUWE; VAN DEN BOSSCHE, 2001) e espectrofotometria no ultravioleta por primeira derivada (EL WALILY *et al.*, 1995) e segunda derivada (CARLUCCI; DI GIUSEPPE; MAZZEO, 1993). Os métodos encontrados na literatura para quantificação da associação por CLAE, na maioria das vezes quantifica o maleato ao invés do enalapril, e quando quantifica o enalapril, utiliza altas temperaturas de forno de coluna (60°C), o que diminui a vida útil das colunas cromatográficas. O método por UV com calibração multivariada apresenta vantagens sobre os métodos univariados por UV: utiliza maior quantidade de informação espectral, melhorando o resultado; dispensa a utilização de padrão na rotina de análise. Além disso, o desenvolvimento de métodos cromatográficos e espectrofotométricos otimizados e com menores custos contribuiria para a inclusão destes em compêndios oficiais, visto que esta associação é uma das mais empregadas na terapêutica anti-hipertensiva.

3.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

De acordo com a ANVISA, controle de qualidade é um “conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos... para que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade” (BRASIL, 2010). Na indústria farmacêutica, o controle de qualidade é “responsável pelas atividades referentes à amostragem, às especificações e aos ensaios, bem como à organização, à documentação e aos procedimentos de liberação que garantam que os ensaios sejam executados e que os materiais e os produtos terminados não sejam aprovados até que a sua qualidade tenha sido julgada satisfatória.” (BRASIL, 2010).

As técnicas analíticas atendem as mais variadas necessidades da indústria farmacêutica, sendo utilizadas tanto em controle de processo como em controle de produto acabado. O uso dessas técnicas para a quantificação dos fármacos nos medicamentos produzidos é crucial para garantir a qualidade do produto e uma maior segurança aos seus usuários.

Dentre as técnicas utilizadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas podemos destacar a cromatografia a líquido de alta eficiência (BHUSHAN, 2006; BAING, 2006; LOUHAICHI, 2009), cromatografia em fase gasosa (ALZAGA, 2007), cromatografia de alta eficiência em camada delgada (ODOVIC, 2012; VENKATACHALAM; CHATTERJEE, 2007), eletroforese capilar (FELIX, FERREIRA, 2012; AZZAM; ABOUL-ENEIN, 2013) e espectrofotometria na região do ultravioleta (PATIL *et al*, 2009). A cromatografia a líquido de alta eficiência é a técnica mais utilizada na rotina da indústria farmacêutica, sendo um método eficaz e preciso. A espectrofotometria na região do ultravioleta também é bastante utilizada, sendo uma técnica mais simples que a cromatografia, porém com algumas limitações quando se trata de associações de fármacos devido a possível sobreposição espectral e dificuldade de detectar um produto de degradação.

3.4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.4.1 Cromatografia a líquido de alta eficiência

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é uma técnica poderosa capaz de separar misturas de analitos semelhantes quimicamente. Atualmente é uma técnica bastante difundida e consolidada em diversas áreas, como a área química e farmacêutica.

A cromatografia a líquido é um processo de separação na qual uma mistura de amostras é distribuída entre duas fases na coluna. Uma fase é estacionária, enquanto a outra passa através dessa. A cromatografia a líquido de alta eficiência é um tipo de cromatografia à líquido que emprega colunas recheadas como fase estacionária e um líquido como fase móvel, eluído sob altas pressões. É capaz de separar e analisar quantitativamente diversos tipos de amostras, em minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O equipamento é composto, no mínimo, dos seguintes elementos: reservatório de solvente, linha de transferência, bomba de alta pressão, injetor de amostras, coluna, detector e um sistema de aquisição e avaliação dos dados, como mostra a Figura 6 (MEYER, 2004).

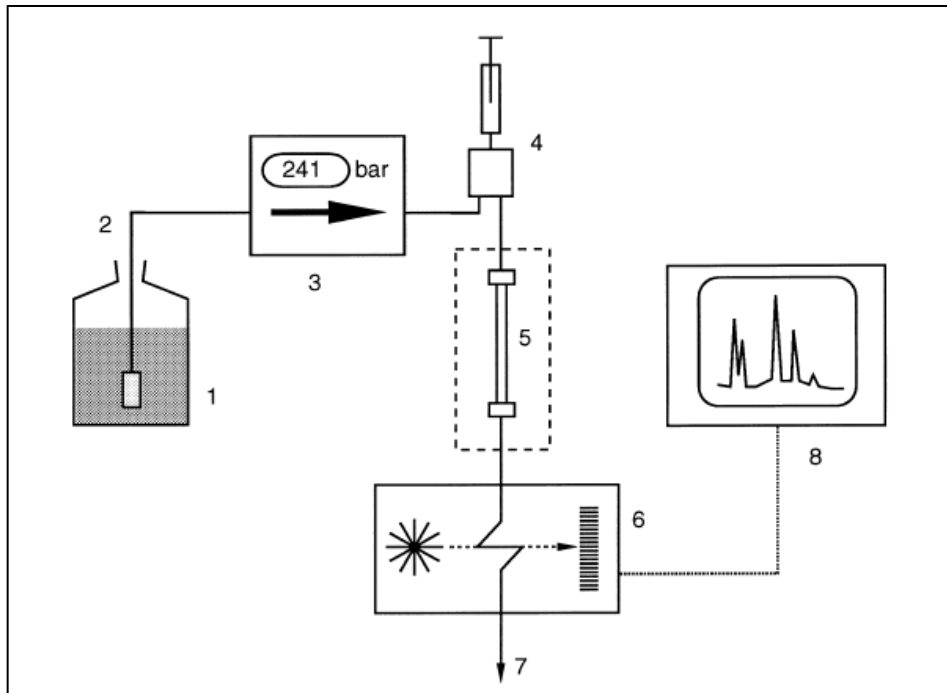


FIGURA 6: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UM CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA. 1 - RESERVATÓRIO DE SOLVENTE; 2 - LINHA DE TRANSFERÊNCIA; 3 - BOMBA DE ALTA PRESSÃO; 4 - INJETOR DE AMOSTRA; 5 - COLUNA (COM TERMOSTATO); 6 - DETECTOR; 7 - DESCARTE; 8 - COMPUTADOR PARA AQUISIÇÃO DOS DADOS (MEYER, 2004).

O tipo de CLAE é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária. Estes incluem partição ou cromatografia líquido-líquido, adsorção ou cromatografia líquido-sólido, troca iônica ou cromatografia de íons, cromatografia por exclusão, cromatografia por afinidade e cromatografia quiral (SKOOG, 2006).

Cromatografia de partição é um termo utilizado para descrever o modo onde a fase estacionária é menos polar que a fase móvel. A fase estacionária de sílica fundida é quimicamente ligada a grupos *n*-alcanos com 8 ou 18 carbonos, ou com grupos fenila. Neste modo, os analitos mais apolares são mais retidos na superfície da fase estacionária. A fase móvel consiste em uma mistura de água ou tampão aquoso, com um solvente orgânico miscível em água, como metanol ou acetonitrila. A água e os solventes orgânicos devem apresentar elevado grau de pureza,

evitando assim interferência de impurezas nas análises. O sucesso da cromatografia por partição depende de um equilíbrio adequado entre as forças intermoleculares existentes entre os três participantes no processo de separação: o analito e as fases móvel e estacionária. Um detector para cromatografia a líquido deve ser capaz de reconhecer quando um analito é eluído da coluna. Os detectores mais amplamente usados são baseados na absorção da radiação ultravioleta ou visível. Os instrumentos mais modernos usam arranjos lineares de fotodiodos que podem adquirir um espectro completo à medida que o analito deixa a coluna (SKOOG, 2006; MEYER, 2004).

3.5 PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS

O planejamento fatorial representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. É uma poderosa ferramenta estatística que possibilita a otimização de variáveis, avaliando simultaneamente o efeito de cada uma a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (BUTTON, 2005; PERALTA-ZAMORA; MORAIS; NAGATA, 2005).

Normalmente, a avaliação de variáveis experimentais é realizada de maneira univariada, onde o efeito de cada uma é avaliado de maneira independente. Essa abordagem apresenta desvantagens como alto gasto de tempo para otimização e a negligência das interações que possam existir entre duas ou mais variáveis que podem afetar o processo em questão (CUNICO *et al*, 2008).

A utilização dessa ferramenta permite alcançar o máximo de eficiência, minimizando desperdício e custos, pois é possível realizar experimentos mais inteligentes que fornecem o máximo de informações com o mínimo de esforço.

Alguns conceitos são fundamentais para compreensão adequada do tema, alguns deles estão listados a seguir (HIBBERT, 2012):

- Desenho experimental: Técnica estatística para planejar, conduzir, analisar e interpretar dados de experimentos.
- Resposta: Objeto de estudo ou de otimização. Ex: número de pratos teóricos, tempo de retenção, resolução entre picos.

- Fator: Variável do sistema em estudo. Fatores podem ser contínuos ou discretos, por exemplo, temperatura da coluna, concentração de fase orgânica, fase estacionária.
- Nível do fator: Condições de operação dos fatores investigados nos experimentos. Normalmente indicador por nível baixo (-) e nível alto (+).
- Efeito: mudança na resposta quando se muda o nível baixo do fator para o nível mais alto.
- Efeito de interação: Situação onde o efeito de um fator depende do nível do outro fator.
- Modelo: Equação que relaciona a resposta com os fatores. Em planejamento fatorial de experimentos o modelo estatístico é do tipo $y=b_0+b_1x_1$, sendo b_0, b_1, \dots, b_n efeitos de cada fator na resposta.

Em um planejamento fatorial completo todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores são realizadas. São L^k combinações de k fatores em L níveis. O número de ensaios necessários para realizar um planejamento L^k aumenta rapidamente com o valor de k . Em alguns casos, a informação desejada pode ser obtida a partir de um número de ensaios bem menor, correspondente a uma fração do número de ensaios do planejamento completo. Esse tipo de planejamento denomina-se de planejamento fatorial fracionado (HIBBERT, 2012).

Esse tipo de abordagem para realização de experimentos possui vantagens como redução do número de ensaios sem perder a qualidade da informação, possibilidade de se estudar simultaneamente várias variáveis e separar seus efeitos, e representação do processo estudado por meio de expressões matemáticas (BUTTON, 2005).

Através do planejamento fatorial é possível construir superfícies de respostas com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem é feita ajustando-se modelos simples, normalmente lineares ou quadráticos, às respostas obtidas com planejamentos fatoriais.

Para todo modelo construído é necessário examinar os resíduos para se analisar a qualidade do ajuste do modelo. O método mais utilizado para avaliar numericamente a qualidade de ajuste de um modelo é a análise de variância.

A análise de variância de um modelo requer primeiramente, a decomposição algébrica dos desvios das respostas observadas com relação à resposta da média

global, de acordo com a equação 1. A primeira parte da decomposição $(\hat{y}_i - \bar{y})$ representa o desvio da previsão feita pelo modelo para o ponto \hat{y}_i , em relação à média global, \bar{y} . A segunda parcela $(y_i - \hat{y}_i)$ é a diferença entre o valor observado e o valor previsto. No caso de um modelo bem ajustado, a segunda parte da equação deve ser pequena (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i) \quad (\text{Equação 1})$$

Para expressar esta comparação em termos quantitativos, eleva-se a equação 1 ao quadrado e faz-se o somatório sobre todos os pontos do modelo. A soma de quadrados dos desvios chama-se somas quadráticas (S.Q.). Assim temos:

$$\begin{aligned} & [\text{S. Q. em torno da média}] = \\ & [\text{S. Q. devida à regressão } (SQ_R)] + [\text{S. Q. residual } (SQ_r)] \quad (\text{Equação 2}) \end{aligned}$$

A interpretação dá-se da seguinte maneira: uma parte da variação total das observações y_i em torno da média \bar{y} é descrita pela equação de regressão e o restante é representado pelos resíduos. Quanto maior a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo e menor os resíduos. O ajuste do modelo pode ser quantificado pela equação 3:

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_r} \quad (\text{Equação 3})$$

R^2 é o coeficiente de determinação do modelo. Quanto mais perto de 1 estiver R^2 , melhor o ajuste do modelo às respostas observadas.

Para cada soma quadrática, é associado um número de graus de liberdade, sendo que para SQ_R o número de graus de liberdade é igual ao número de parâmetros do modelo menos um, e para SQ_r é dado pela diferença entre o número de observações e o número de parâmetros estimados. A divisão das somas quadráticas pelos seus números de graus de liberdade resulta nas médias quadráticas (MQ's). As MQ's são utilizadas para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa. A razão entre as médias quadráticas MQ_R e MQ_r segue uma distribuição F, neste caso é possível comparar com o valor de F tabelado

no nível de confiança desejado. A regressão é estatisticamente significativa quando o valor de MQ_R/MQ_r é maior que o valor de F tabelado. Além do valor de F, é necessário realizar a análise da distribuição dos resíduos, que por sua vez deve ser aleatória (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Caso o experimento forneça respostas em replicatas, é possível utilizá-las para obtenção do erro aleatório. Usando esta estimativa, tem-se um critério quantitativo para julgar se o modelo escolhido é uma boa representação das observações. Cada resíduo pode ser decomposto algebricamente em dois termos, que quando elevados ao quadrado e somando todas as observações teremos:

$$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \quad (\text{Equação 4})$$

O somatório de $(y_{ij} - \bar{y}_i)$ reflete apenas a dispersão em cada nível das respostas repetidas em torno de suas próprias médias. Esse termo está relacionado com erro aleatório e é chamado de soma quadrática devida ao erro puro (SQ_{ep}). O somatório seguinte depende do modelo e fornece uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas, sendo, portanto, chamado de soma quadrática devida à falta de ajuste (SQ_{faj}). É possível então escrever a equação acima da seguinte maneira:

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad (\text{Equação 5})$$

A divisão das SQ's pelos seus respectivos graus de liberdade resulta nas médias quadráticas, cujos valores são possíveis comparar para avaliar a falta de ajuste do modelo. A SQ_{ep} possui $n_i - 1$ graus de liberdade, logo para SQ_{faj} o número de grau de liberdade é igual ao grau de liberdade da SQ_r menos o da SQ_{ep} . A razão entre MQ_{faj}/MQ_{ep} é usada para avaliar se o modelo está ou não bem ajustado às observações. Se MQ_{faj}/MQ_{ep} for maior que o F tabelado no nível de confiança desejado significa que o modelo possui falta de ajuste e não é adequado para representar as observações (BARROS-NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2003).

Na Tabela 1 está descrito resumidamente o cálculo para as SQ's, os graus de liberdade e as MQ's para cada fonte de variação. Também este representado a

fórmula para cálculo da porcentagem de variação explicada pelo modelo e a porcentagem máxima de variação possível de ser explicada.

TABELA 1 - TABELA DE ANÁLISE DA VARIÂNCIA PARA O AJUSTE DE UM MODELO

| Fonte de Variação | Soma Quadrática | Número de g.l. | Média Quadrática |
|---------------------------------|---|----------------|-------------------------------------|
| Regressão | $\sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ | $p - 1$ | $MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$ |
| Resíduos | $\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$ | $n - p$ | $MQ_r = \frac{SQ_{Rr}}{n - p}$ |
| Falta de ajuste | $\sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$ | $m - p$ | $MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$ |
| Erro puro | $\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$ | $n - m$ | $MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$ |
| Total | $\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$ | $n - 1$ | |
| % de variação Explicada | $\frac{SQ_R}{SQ_T}$ | | |
| % de máxima variação explicável | $\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$ | | |

NOTA: g.l.: GRAUS DE LIBERDADE; n_i : NÚMERO DE REPETIÇÕES NO NÍVEL i ; m : NÚMERO DE NÍVEIS DISTINTOS DA VARIÁVEL INDEPENDENTE; p : NÚMEROS DE PARÂMETROS DO MODELO.

Um modelo de superfície resposta linear é representado numericamente pelos coeficientes (b) e pelo valor dos fatores (X), utilizados na construção do modelo. Na Equação 6, Y representa a resposta a ser avaliada, b₀ é o coeficiente de intercepto do modelo, b₁, b₂ e b_n são os coeficientes relacionados a cada fator utilizado para construir o modelo e X₁, X₂ e X_n os valores dos fatores (-1, 0, +1) para a determinação do Y desejado.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n \quad (\text{Equação 6})$$

Para um modelo quadrático a equação é semelhante ao modelo linear. A Equação 7 representa o modelo quadrático com dois fatores. Os coeficientes b_{11} e b_{22} são os coeficientes quadráticos do modelo e o coeficiente b_{12} é o coeficiente de interação de segunda ordem. Nem todos os coeficientes precisam estar presentes do modelo, para isso é feita uma avaliação de significância estatística de cada um para a construção dos modelos. Os que não apresentarem significância estatística poderão ser excluídos da construção dos modelos sem perda de ajuste.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (\text{Equação 7})$$

3.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA

A espectroscopia é a ciência que estuda as interações da radiação eletromagnética com a matéria e é baseada na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas de interesse. A radiação eletromagnética é uma forma de energia que pode ser descrita como uma onda. As ondas luminosas consistem em campos magnéticos e elétricos oscilantes, perpendicularmente orientados, com propriedades como comprimento de onda, frequência, velocidade e amplitude (Figura 7). O comprimento de onda, λ , é a distância entre dois máximos vizinhos. A frequência, ν , é o número de oscilações completas que a onda realiza em um segundo. Os métodos espectrométricos são classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvido na medida e cada região gera um efeito em uma molécula (Figura 8) (SKOOG, 2006; HARRIS, 2005).

Existe uma variedade de métodos espectroscópicos, dentre os quais, se destaca a espectroscopia na região do ultravioleta. A espectroscopia na região do ultravioleta é uma das técnicas espectroscópicas mais amplamente empregadas na análise quantitativa de amostras, devido à robustez, ao custo relativamente baixo e também devido ao grande número de aplicações onde pode ser utilizada (ROCHA; TEIXEIRA, 2004), como para compostos orgânicos, inorgânicos e sistemas bioquímicos. Trata-se de uma técnica consolidada, de fácil implementação, baixo custo e boa sensibilidade (SKOOG, 2006). Infelizmente, a baixa seletividade faz com

que a sua aplicabilidade fique seriamente comprometida quando há necessidade de se analisar matrizes complexas.

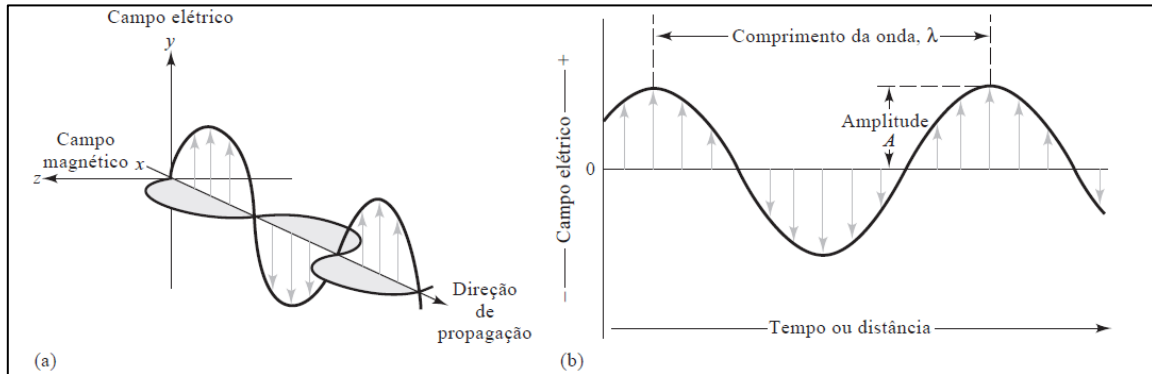


FIGURA 7 - (A) CAMPO ELETROMAGNÉTICO. O CAMPO ELÉTRICO OSCILA EM UM PLANO PERPENDICULAR AO CAMPO MAGNÉTICO. (B) SOMENTE AS OSCILAÇÕES DO CAMPO ELÉTRICO SÃO MOSTRADAS. A AMPLITUDE DA ONDA É O COMPRIMENTO DO VETOR DE CAMPO ELÉTRICO NO PONTO MÁXIMO DA ONDA, ENQUANTO O COMPRIMENTO DA ONDA É A DISTÂNCIA ENTRE DOIS MÁXIMOS SUCESSIVOS (SKOOG, 2008)

| Frequência maior Comprimento de onda mais curto | Comprimento de onda (λ) cm | Região | Energia kJ/mol | Efeitos moleculares |
|--|--|--------------------|-------------------|------------------------|
| | 10^{-9} | raios gama | 10^7 | ionização |
| | 10^{-7} | raios X | 10^5 | |
| | 10^{-5} | UV vácuo | 10^3 | |
| | 10^{-4} | UV próximo | | transições eletrônicas |
| | 10^{-3} | visível | 10^2 | vibrações moleculares |
| | 10^{-1} | Infravermelho (IR) | 10 1 | |
| | 10^1 | microondas | 10^{-2} | movimento de rotação |
| | Frequência menor Comprimento de onda mais longo | 10^2 | rádio | 10^{-4} |
| 10^4 | 10^{-6} | | | |

FIGURA 8 - O ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO COM SUAS REGIÕES E RESPECTIVAS ENERGIAS E EFEITOS MOLECULARES (WADE, 2008)

A espectroscopia na região do ultravioleta é baseada na absorção da luz capaz de levar a molécula do estado fundamental para o estado excitado, ou de seu relaxamento do estado excitado, para o estado fundamental, segundo a Figura 9. Portanto está relacionada com a estrutura eletrônica das moléculas, ou seja,

promove os elétrons de orbitais de baixa energia para orbitais de maior energia, ou seja, níveis eletrônicos diferentes (HARRIS, 2005).

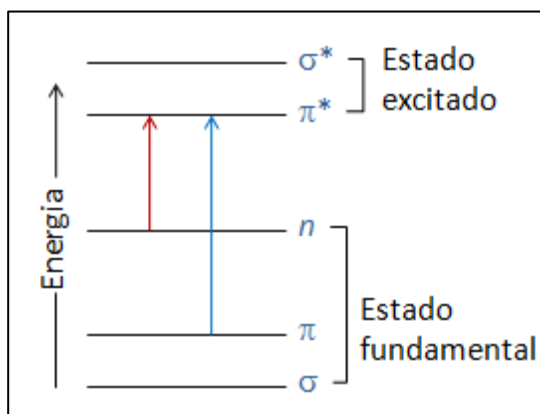


FIGURA 9 - RESUMO DOS NÍVEIS ENERGÉTICOS ELETRÔNICOS NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA PRÓXIMO. AS TRANSIÇÕES $n \rightarrow \pi^*$ E $\pi \rightarrow \pi^*$ ESTÃO REPRESENTADAS (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1997).

Os grupos responsáveis pela absorção da luz nesse tipo de espectroscopia são chamados cromóforos, que são grupos insaturados (contendo elétrons π) com ou sem participação de grupos com elétrons livres (n).

O espectro no UV é um gráfico da medida de intensidade da luz versus uma propriedade da luz. Por convenção, o eixo x é plotado com o comprimento de onda, e o eixo y é representado por absorvância (A).

A absorvância, uma grandeza adimensional, é diretamente proporcional à concentração da espécie que absorve a luz. A quantificação pela técnica de espectroscopia no UV está baseada na lei de Beer-Lambert, na qual a absorção depende da concentração das moléculas adsorventes e da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção, logo, temos a Equação 8 (SKOOG, 2006). A concentração da amostra, c , é expressa em mols por litro. O caminho óptico, b , é expresso em centímetros. A grandeza ϵ é conhecida como absorvância molar e é expressa nas unidades $\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$, o que torna o produto ϵbc adimensional (HARRIS, 2005).

$$A = \epsilon bc \quad (\text{Equação 8})$$

Grande parte dos fármacos apresenta um sinal bastante intenso na região ultravioleta, o que faz com que a sua determinação *via* espectroscopia no UV seja viável. Adicionalmente, a sua validação costuma ser mais simples e efetiva, em

relação, por exemplo, a métodos fundamentados em cromatografia a líquido de alta eficiência (MADAN *et al*, 2005). Porém, muitos compostos absorvem na mesma região do espectro, motivo pelo qual os métodos espectroscópicos apresentam baixa seletividade. A espectrofotometria foi muito beneficiada com a introdução de processos multivariados e têm sido amplamente aplicada na análise de formas farmacêuticas contendo vários fármacos e excipientes absorvendo nas mesmas regiões do espectro.

3.7 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A quimiometria é uma disciplina da química que utiliza metodologias de análise estatística, matemática e computacional com o objetivo de planejar ou selecionar experimentos de maneira otimizada e também para fornecer o máximo de informação química através da análise dos dados obtidos (FERREIRA, 1999; HOPKE, 2003). A quimiometria é considerada a área mais recente da química analítica, e desde que ela surgiu foram desenvolvidos alguns métodos que tornaram possível o processamento e interpretação dos dados que antes não poderiam ser analisados. A utilização dos métodos quimiométricos permite, além de outras coisas, a identificação de amostras, análise de misturas complexas sem a necessidade de processos de separação e possibilidade de determinar simultaneamente vários analitos (FERREIRA, 1999).

A determinação de um analito em uma amostra é feita de forma indireta, relacionando uma grandeza obtida pela análise, como a absorbância, com a concentração do analito de interesse. Para isso, modelos de calibração são desenvolvidos a fim de se obter uma função matemática que seja capaz de relacionar dois grupos de variáveis, uma delas denominada de dependente (Y) e outra denominada de independente (X). Os parâmetros do modelo são chamados de coeficientes de regressão (b), sendo estes determinados matematicamente a partir de dados experimentais.

$$Y = f(X) = Xb \quad (\text{Equação 9})$$

Usualmente, são utilizados modelos de calibração univariados, conhecidos também como calibração de ordem zero, ou seja, apenas uma medida instrumental

para cada amostra de calibração é utilizada. No caso de alguns métodos espectrométricos, por exemplo, apenas a absorvância em um comprimento de onda é utilizada para cálculo de concentração do analito. Para que esse tipo de calibração seja válido o sinal escolhido deve representar somente a espécie química em estudo, não sofrendo de interferência de outras substâncias. Esse tipo de calibração, além de subutilizar a informação fornecida pela técnica de análise, dificulta e às vezes torna inviável a determinação de amostras onde os componentes apresentam interferência espectral (PIMENTEL, 1996; BRO, 2003).

Os modelos de calibração multivariada possuem como um dos principais objetivos utilizar toda informação contida na análise, utilizando mais de uma resposta instrumental, a fim de estabelecer uma relação entre os sinais analíticos e a propriedade de interesse, no caso, a concentração da substância química estudada. Com a calibração multivariada é possível a determinação de componentes em misturas, eliminar ou minimizar efeitos de possíveis interferentes, compensar ruídos e ainda diminuir algumas etapas necessárias para o preparo da amostra, levando a uma economia de tempo e diminuindo os custos com análises (MARTENS, 1989).

Vários métodos de regressão vêm sendo utilizados na química analítica para a construção de modelos de calibração multivariada. Os métodos mais conhecidos para isso são regressão linear múltipla (*Multiple Linear Regression*, MLR), regressão de componentes principais (Principal Components Regression, PCR), e o mais utilizado, mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares*, PLS). A diferença entre os métodos está na maneira como os coeficientes de regressão são obtidos, sendo que cada um deles apresenta suas especificidades que tornam o método mais ou menos adequado, conforme o tipo de análise necessária.

A base para a maioria dos métodos de tratamento de dados multivariados é o PCA (*Principal Components Analysis*) que consiste na manipulação de matrizes de dados com o objetivo de substituir as muitas variáveis, absorvância em vários comprimentos de onda, por exemplo, em um número menor de fatores denominados de componentes principais (PC). Resumindo, o PCA permite reduzir os dados, minimizando a dimensionalidade da matriz, sem perda de informações relevantes. Isso é feito através da transformação das variáveis originais, por meio de uma construção de um conjunto de combinações lineares. O objetivo principal é estabelecer um número mínimo de PC's, capazes de "explicar" os dados originais. A

Primeira Componente Principal (PC1) representa a maior variância entre as variáveis dependentes e independentes, pois proporciona uma melhor interpretação do conjunto de dados. A Segunda Componente Principal (PC2) possui caráter complementar que permite explicar a variância não explicada pela componente anterior (conceito de ortogonalidade). Em geral, podem ser calculadas tantas componentes principais quanto o número de variáveis originais. No entanto, o objetivo é selecionar um pequeno número delas, com capacidade de explicar a variação dos dados relevante.

Para que o modelo possa ser construído é necessário que os dados estejam organizados em duas matrizes. A matriz das variáveis independentes $X_{(n,m)}$ é composta pelo espectro ou outro registro de sinal analítico, onde cada linha (n) representa uma amostra, e cada coluna (m) representa um comprimento de onda específico. A outra matriz é das variáveis dependentes $Y_{(n,p)}$, que é composta pelas concentrações do analito, sendo cada linha (n) representada pelas diferentes amostras e as colunas (p) representadas pelas concentrações do analito (Figura 10).

O PLS, que tem como base o PCA, é o método mais difundido e se destaca pela sua robustez. Nesse modelo, a calibração pode ser realizada mesmo na presença de interferentes, não havendo necessidade de conhecimento dos mesmos. O objetivo do PLS é estabelecer uma relação linear entre as duas matrizes, a espectral X com os valores de referência na matriz Y. O PLS decompõe as matrizes originais X e Y em vetores de “scores” e “loadings”, sendo que “scores” representam a projeção das amostras no conjunto de PCs enquanto os “loadings” são o peso com que cada variável original contribui para a elaboração das novas PCs. O processo de modelagem no PLS ocasiona pequenas distorções dos PCs, de modo que eles perdem a ortogonalidade, levando a pequenas redundâncias de informação. Essas redundâncias fazem com que os mesmos não sejam mais componentes principais (que são ortogonais) e sim variáveis latentes (BEEBE; KOWALSKI, 1987).

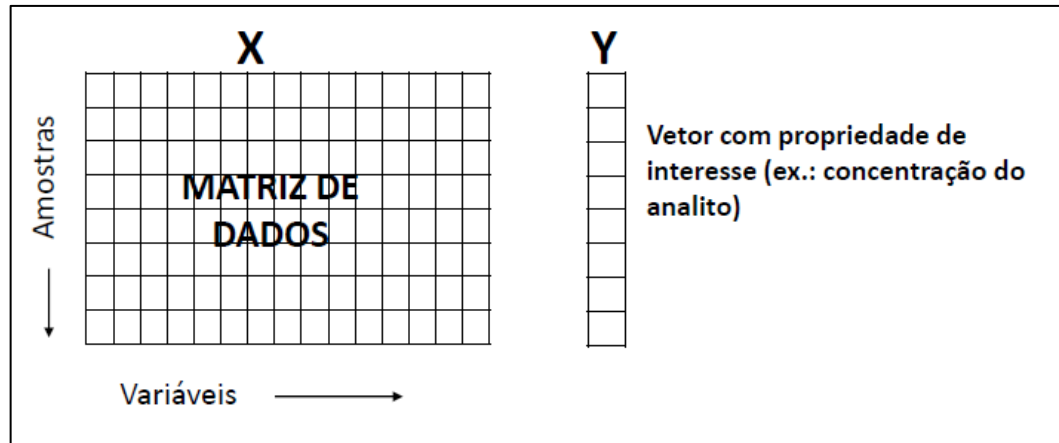


FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO DAS MATRIZES X E Y

O processo de calibração multivariada pode ser dividido em três fases, a calibração, a validação e a previsão. Na fase de calibração são construídos os modelos matemáticos, na fase de validação esses modelos são avaliados utilizando ferramentas estatísticas, e na previsão o modelo matemático é aplicado para prever as concentrações ou propriedades de amostras de propriedade desconhecida desconhecida.

Para a fase da calibração é necessário obter um conjunto de amostras das quais se conhece a propriedade de interesse, sempre obtido por um método de referência. As amostras devem ser representativas para que se possam realizar futuras previsões. Após o registro do sinal analítico, é necessária a realização de um pré-processamento dos dados, onde é possível minimizar as possíveis contribuições não desejadas dos sinais que diminuem a capacidade de previsão dos modelos. Os pré-processamentos mais utilizados são: centrar os dados na média, e derivatização e alisamento pelo algoritmo Savitzky-Golay (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009). Centrar os dados na média consiste em calcular a média da intensidade para cada comprimento de onda espectral e depois, subtrair esta média de todas as intensidades. Assim, as coordenadas são movidas para o centro dos dados, facilitando a percepção de diferenças nas intensidades relativas das variáveis (SOUZA; POPPI, 2012). Após o pré-processamento, seleciona-se o modelo que melhor estabelece a relação entre o sinal instrumental e a propriedade desejada.

Para se encontrar o número mais adequado de variáveis latentes (VL) em um modelo, é possível utilizar o método de validação cruzada utilizando o sistema de “*leave-one-out*”. Esse método consiste em tirar uma amostra do conjunto de calibração e o modelo é então construído com as demais. A amostra retirada é

adicionada novamente ao conjunto de calibração, sendo a amostra seguinte retirada, e assim sucessivamente. O procedimento é repetido até que todas as amostras tenham sido retiradas do conjunto inicial, obtendo-se no final m modelos com $m-1$ amostras cada um. Em cada modelo, a concentração da amostra que foi retirada é prevista e por comparação com o valor esperado é calculado o erro de previsão. A raiz quadrada da soma do quadrado dos erros de validação cruzada (RMSECV) é calculada. O cálculo é realizado para cada componente, e os resultados de RMSECV são plotados em um gráfico em função do número de VL. O número de VL de menor RMSECV é escolhido para a construção dos modelos (SOUZA; POPPI, 2012).

É fundamental assegurar a capacidade de previsão do modelo escolhido. Para isso é realizada a validação, que consiste no estudo quantitativo dos resultados da aplicação do modelo em novas amostras, que não participaram da etapa de calibração. As amostras da validação devem ser representativas das amostras de calibração e das futuras amostras a serem analisadas com o modelo no futuro. A concentração dessas amostras deve ser conhecida para poder verificar a relação destas e daquelas previstas pelo modelo. É calculado a raiz quadrada da soma do quadrado dos erros de previsão (RMSEP) para estimar o erro médio de previsão. (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

3.7.1 Detecção de amostras anômalas.

Entre as amostras de calibração assim como entre as da validação, é possível que existam amostras anômalas, chamadas de *outliers*. Os *outliers* são amostras que possuem um comportamento muito diferente do conjunto de dados do modelo e sua ocorrência pode ser devido a erros operacionais ou instrumentais. A presença desse tipo de amostra pode conduzir a modelos com baixa capacidade de previsão, produzindo assim altos valores de erros de previsão. Quando essas amostras anômalas estão presentes no conjunto de validação, influenciam os resultados, normalmente levando a resultados que indicam que o modelo não é adequado ou que sua capacidade preditiva é baixa. Desta maneira, a detecção dessas amostras é fundamental para a otimização dos conjuntos de calibração e validação, sendo que a sua exclusão permite a construção de modelos mais eficientes, precisos e com melhor capacidade de previsão (SENA, 2007).

Um meio robusto para detecção de amostras anômalas consiste na avaliação gráfica de resíduos de Student x *leverage*. Os resíduos de Student indicam se as amostras possuem distribuição normal, e graficamente, deve-se ter atenção com amostras que ultrapassem o valor limite de $\pm 2,5\%$. O *leverage* representa o grau que uma amostra está distante de média do conjunto de dados, ou seja, a influência de uma amostra no modelo construído. O limite é calculado como $3 \text{ VL}/n$, sendo VL o número de variáveis latentes e n o número de amostras utilizadas.

Uma amostra poderá ser considerada anômala caso ultrapasse os limites tanto de resíduo de Student quando de *leverage*.

3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CLAE-UV

Após o desenvolvimento de um método analítico, a sua implementação envolve um processo de avaliação que demonstre sua eficiência na rotina de análises, no caso, é necessário que seja realizada a validação. De maneira geral, a validação consiste na averiguação da garantia de um desempenho adequado para as condições de trabalho através de estudos estatísticos (BRASIL, 2003).

A validação pode ser realizada através da determinação de alguns parâmetros conhecidos como figuras de mérito. O número de figuras de mérito e o nível que deve ser atingido em cada uma delas variam dependendo de onde o método será aplicado, do seu propósito ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito. As principais figuras de mérito são exatidão, precisão, seletividade, linearidade, razão sinal/ruído, limite de detecção, limite de quantificação, robustez e intervalo de confiança.

A validação de métodos cromatográficos encontra-se descrita na RE nº 899 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na categoria I para análises quantitativas de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2003).

3.8.1 Seletividade

É a capacidade que um método possui de avaliar de forma inequívoca uma determinada substância em uma mistura complexa (GIL; BATISTA FILHO, 2007).

3.8.2 Linearidade

Esse parâmetro avalia se os resultados obtidos através do método são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (ICH, 2005).

A correlação entre o sinal analítico medido e a concentração do analito é expressa através de uma curva analítica. Os coeficientes da curva analítica podem ser obtidos através do método de regressão linear, o qual gera a seguinte equação $y = ax + b$, onde y é a resposta analítica, x é concentração, a é coeficiente angular e b é o coeficiente linear.

3.8.3 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito que pode ser detectada em uma amostra, enquanto que limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão utilizando-se um determinado procedimento experimental.

O LD para métodos como CLAE pode ser determinado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base. Já o LQ pode ser determinado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.8.4 Intervalo

O intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. O intervalo é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicado a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

De acordo com a RE nº 899/2003, o intervalo para determinação quantitativa do analito em formas farmacêuticas deve ser de 80 a 120% da concentração teórica do teste.

3.8.5 Precisão

A precisão expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou, como é também conhecida, coeficiente de variação (CV%) de acordo com a equação que segue.

$$\text{DPR} = \text{CV} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

A precisão é dividida em três níveis:

- Repetibilidade: avalia a concordância dos dados em um curto período de tempo, sendo esses ensaios realizados por um único analista. A repetibilidade pode ser avaliada com três amostras de concentrações diferentes cobrindo a faixa útil do modelo de calibração, sendo que cada amostra deve ser determinada em triplicata ou seis determinações da concentração aceita como nominal (BRASIL, 2003; ICH, 2005).
- Precisão intermediária: avalia a concordância entre resultados do mesmo laboratório, porém, obtidos por analistas e/ou equipamentos diferentes e em dias diferentes. Ela representa a variabilidade dos dados obtidos em um mesmo laboratório (BRASIL, 2003)
- Reprodutibilidade: é obtida por meio de ensaios interlaboratoriais. Esse tipo de precisão é importante em casos de padronização de procedimentos analíticos para a inclusão em farmacopéias (BRASIL, 2003).

3.8.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos nesse método em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Para o ensaio de exatidão em formas farmacêuticas a metodologia empregada contempla a adição de quantidade conhecida de fármaco a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, quando não for possível, podem ser adicionados padrões ao próprio medicamento (BRASIL, 2003).

3.8.7 Robustez

Esse parâmetro refere-se à capacidade de um método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003).

Para métodos cromatográficos, a robustez pode ser avaliada através de modificações na composição e pH da fase móvel, variações na temperatura da coluna cromatográfica e variações de fluxo da fase móvel (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

3.9 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

A validação de métodos cromatográficos e espectrofotométricos com dados de natureza univariados já é bem consolidada por órgãos reguladores nacionais e internacionais, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), *International Conference on Harmonisation* (ICH), entre outros. Entretanto, a validação de modelos multivariados ainda é pouco descrita e quase não se tem documentos oficiais para auxiliar na validação. Nesses últimos anos, vem sendo publicados trabalhos que descrevem procedimentos e propostas de como esta validação deve ser realizada. Como exemplo, a norma E-1655-05 da ASTM (*American Society for Testing and Materials*) descreve especificamente o desenvolvimento e a validação de modelos de calibração multivariada aplicados à espectroscopia no infravermelho (ASTM, 2012).

O sinal analítico líquido (NAS - *Net Analyte Signal*) é um conceito muito importante para cálculo das figuras de mérito na calibração multivariada. O NAS é

definido como a parte do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos demais compostos na amostra e pode ser representado geometricamente conforme representado na Figura 11.

O vetor NAS pode ser relacionado com o vetor dos coeficientes de regressão, b , de um modelo de calibração inversa multivariada, como o PLS:

$$||\text{NAS}|| = \frac{1}{||b||} \quad (\text{Equação 11})$$

O NAS possibilita separar a parte específica do sinal analítico total diretamente proporcional à propriedade de interesse, permitindo assim o cálculo de algumas figuras de mérito, como seletividade, sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

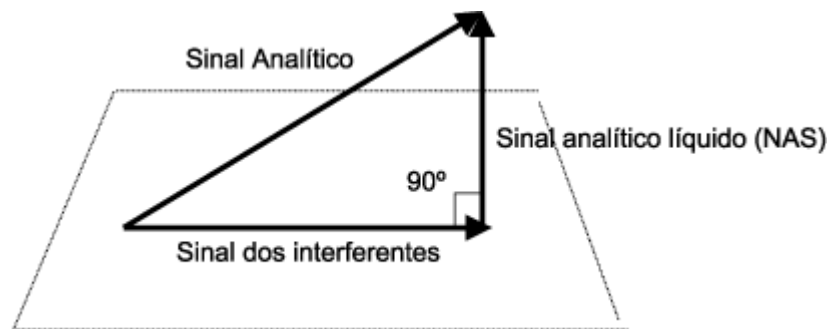


FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DA PROPRIEDADE DE ORTOGONALIDADE DO NAS (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Alguns parâmetros como exatidão, precisão e robustez podem ser estimados de maneira bastante similar aos métodos de calibração univariada. Por outro lado, a estimativa de parâmetros como linearidade, sensibilidade, seletividade e intervalos de confiança não pode ser comparada a esses métodos tradicionais (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

3.9.1 Figuras de mérito

3.9.1.1 Seletividade

A exigência de um sinal analítico seletivo, presente nos guias de validação oficiais, não se aplica a métodos quimiométricos, portanto, a seletividade (SEL) não possui significado prático para validação analítica de métodos multivariados (ASTM, 2012). A SEL pode ser calculada de acordo com a Equação 12, sendo que $\|\mathbf{nas}_i\|$ significa a norma do vetor NAS e $\|\mathbf{x}_i\|$ a norma do respectivo espectro. Seu resultado indica a fração do sinal analítico que foi utilizada para predição da propriedade de interesse.

$$SEL = \frac{\|\mathbf{nas}_i\|}{\|\mathbf{x}_i\|} \quad (\text{Equação 12})$$

3.9.1.2 Linearidade

A avaliação dessa figura de mérito é um problema na calibração multivariada utilizando PLS, pois as variáveis são decompostas pelos componentes principais. Considerando-se, então, a impossibilidade de se obter uma curva de calibração para modelos multivariados, a linearidade pode ser avaliada através do coeficiente de correlação (r) do ajuste entre os valores de referência e preditos (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012). Apenas o valor de r não é capaz de assegurar a linearidade do modelo, sendo necessário também verificar a aleatoriedade nos resíduos.

3.9.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) de um método analítico indica as menores concentrações da espécie de interesse que podem ser detectadas e quantificadas, respectivamente. Esses parâmetros podem ser calculados como se segue (ε : ruído instrumental) (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007):

$$LD = 3 \frac{\|\varepsilon\|}{\|\mathbf{NAS}\|} \quad (\text{Equação 13})$$

$$LQ = 10 \frac{||\varepsilon||}{||NAS||} \quad (\text{Equação 14})$$

3.9.1.4 Sensibilidade

A sensibilidade (SEN) pode ser definida como a fração do sinal responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (BRAGA; POPPI, 2004).

$$SEN = ||NAS|| \quad (\text{Equação 15})$$

3.9.1.5 Sensibilidade analítica

O inverso da sensibilidade analítica (γ), a qual não é abordada em normas ou guias de validação, apresenta-se como a sensibilidade do método em função da unidade de concentração utilizada, podendo ser definida como o inverso da razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental (ε) (SENNA *et al*, 2007). O inverso da sensibilidade analítica indica a menor diferença de concentração entre as amostras que pode ser distinguidas pelo método.

$$\gamma = SEN/||\varepsilon|| \quad (\text{Equação 16})$$

O vetor ε pode ser estimado por 15 replicatas do branco, avaliando os valores do desvio padrão do sinal para cada comprimento de onda.

3.9.1.6 Precisão

A precisão expressa o grau de concordância entre os resultados obtidos de uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou, como é também conhecida, coeficiente de variação (CV%) de acordo com a equação que segue.

$$DPR = CV = (DP/CMD)100 \quad (\text{Equação 17})$$

A precisão é dividida em três níveis:

- Repetibilidade: avalia a concordância dos dados em um curto período de tempo, sendo esses ensaios realizados por um único analista. A repetibilidade pode ser avaliada com três amostras de concentrações diferentes cobrindo a faixa útil do modelo de calibração, sendo que cada amostra deve ser determinada em triplicata ou seis determinações da concentração aceita como nominal (BRASIL, 2003; ICH, 2005).
- Precisão intermediária: avalia a concordância entre resultados do mesmo laboratório, porém, obtidos por analistas e/ou equipamentos diferentes e em dias diferentes. Ela representa a variabilidade dos dados obtidos em um mesmo laboratório (BRASIL, 2003)
- Reprodutibilidade: é obtida por meio de ensaios interlaboratoriais. Esse tipo de precisão é importante em casos de padronização de procedimentos analíticos para a inclusão em farmacopéias (BRASIL, 2003).

3.9.1.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico expressa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro ou de referência (ASTM, 2012). Na calibração multivariada a exatidão é expressa através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP - do inglês, *Root Mean Squares Error of Prediction*), dada pela Equação 11.

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\sum[(y' - y)^2/n]} \quad (\text{Equação 18})$$

Na equação acima, n representa o número de amostras do conjunto de validação, y' e y correspondem respectivamente aos valores de referência e aos previstos pelo modelo.

3.9.1.8 Teste para erro sistemático (*bias*)

O erro sistemático são as componentes do erro que não são aleatórias, afetando assim algumas figuras de mérito como exatidão e precisão (BRAGA; POPPI, 2004). A norma E1655-05 da ASTM recomenda a investigação de erros sistemáticos em modelos de calibração multivariada através de um teste t com 95% de confiança, para as amostras de validação. Com o teste é possível avaliar se o *bias* presente no modelo é significativo. Para esse teste, primeiro calcula-se um *bias* médio para o conjunto de validação através da equação que segue, onde y_i^{ref} são os valores de concentração das amostras de referência, \hat{y}_i são os valores de concentração das amostras preditas e $n\vartheta$ o número de amostras do conjunto de validação.

$$Bias = \sum_{i=1}^{n\vartheta} \frac{(y_i^{ref} - \hat{y}_i)}{n\vartheta} \quad (\text{Equação 19})$$

A seguir, calcula-se o desvio padrão dos erros de validação (SDV – do inglês, *Standard Deviation of Validation*) e, por final, o valor de t.

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum [(y_i^{ref} - \hat{y}_i) - bias]^2}{n\vartheta - 1}} \quad (\text{Equação 20})$$

$$t = \frac{|bias| \sqrt{n\vartheta}}{SDV} \quad (\text{Equação 21})$$

Caso o valor de t calculado for menor que o valor de t tabelado para $n\vartheta - 1$ graus de liberdade com 95% de confiança, há a evidência que o erro sistemático presente no modelo multivariado não é significativo, podendo ser considerado insignificante.

3.9.1.9 Desvio Residual de Previsão

O desvio residual de previsão (RPD, *Residual Prediction Deviation*) representa quão bem o modelo de calibração prevê o conjunto de amostras, sendo a forma mais apropriada para comparar e avaliar o desempenho de diferentes métodos em termos relativos. RPD representa a relação entre a variação natural (desvio padrão) das amostras de calibração e validação em relação aos prováveis erros que ocorrem durante a validação cruzada e previsão (FERREIRA; BRAGA; SENNA, 2012). O RPD é calculado para os conjuntos de calibração e validação de acordo com as seguintes equações:

$$RPD_{cal} = SD_{cal}/RMSECV \quad (\text{Equação 22})$$

$$RPD_{val} = SD_{val}/RMSEP \quad (\text{Equação 23})$$

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1. Padrões analíticos e amostras comerciais

As informações sobre os padrões analíticos (substâncias químicas de referência) de ME e HCTZ utilizados nesta dissertação estão citados no Quadro 3.

| Padrão Analítico | Teor | Lote | Fabricante |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------------|
| Maleato de enalapril | 100,1% | 1029 | Fiocruz/INCQS |
| Hidroclorotiazida | 99,7% | V2F01 | Fiocruz/INCQS |

QUADRO 3 - DESCRIÇÃO DOS PADRÕES ANALÍTICOS MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA.

A amostra comercial do medicamento referência industrial foi adquirida pelo orientador em farmácia comercial de Curitiba-PR, sendo sua composição, teor declarado de ativos, data de fabricação e validade apresentadas no Quadro 4.

| Lote | Composição de ativos | Teor declarado | Fabricação/Validade |
|-------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| NB120 | Maleato de enalapril | 10 mg | F: Maio 2013 |
| | Hidroclorotiazida | 25 mg | V: Maio 2015 |

QUADRO 4 - DESCRIÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE COMPRIMIDOS CONTENDO A ASSOCIAÇÃO MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA.

As matérias-primas dos fármacos (maleato de enalapril e hidroclorotiazida) foram adquiridas em farmácia de manipulação de Curitiba-PR. Os teores das matérias-primas frente aos padrões foram determinados de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Os teores encontrados estão relatados no Quadro 5, assim como os fornecedores e lotes das matérias-primas.

| Matéria Prima | Teor | Lote | Fornecedor |
|----------------------|-------------|-------------|-------------------|
| Maleato de enalapril | 99,84% | 5112-10-215 | Pharma Nostra |
| Hidroclorotiazida | 98,23% | 101110 | Valdequimica |

QUADRO 5 - DESCRIÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA

4.1.2 Equipamentos e consumíveis

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, precisão analítica de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Cromatógrafo Agilent 1100 Series, equipado com detector DAD;
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);
- Medidor de pH de bancada digital HI8519N Hanna;
- Espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1800, com cubetas de quartzo de 1 cm de comprimento;
- Purificador de água Milli-Q-Millipore, A10 Gradiente (Milford,EUA).

4.1.3 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados para as análises foram acetonitrila grau HPLC, metanol grau HPLC e água ultrapura obtida através do sistema Milli-Q-Millipore (Milford, EUA). O reagente usado foi o ácido fosfórico p.a.

4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-UV

4.2.1 Teste de solubilidade dos fármacos

Inicialmente, avaliou-se o emprego de acetonitrila, solução de ácido fosfórico pH 2,5 e acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v) como diluente no preparo das soluções estoque. Para esta avaliação, soluções dos padrões analíticos foram preparadas nas concentrações adequadas para análise. Foram pesados 25,0 mg de ME e 62,5 mg de HCTZ e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, utilizando acetonitrila pura, solução de ácido fosfórico pH 2,5 ou mistura acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v) como diluentes. As soluções foram mantidas em banho ultrassom por 10 minutos, para solubilização dos fármacos, seguida de repouso por duas horas à temperatura de 23°C. Em seguida, as soluções foram avaliadas individualmente quanto à formação ou não de sólidos em suspensão (avaliação visual). A ausência de precipitados indicou que a solubilidade no solvente é adequada à finalidade.

4.2.2 Preparo das soluções estoque e de trabalho

Para obtenção das soluções estoque, cada fármaco foi pesado em balança analítica e solubilizados separadamente em acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v), atingindo-se concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ para ME e de 1,25 mg.mL⁻¹ para HCTZ. Estas soluções foram armazenadas em frascos âmbar, sob refrigeração a 4°C.

As soluções de trabalho foram obtidas a partir da diluição da solução estoque com acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v). Estas soluções foram preparadas conforme a necessidade do experimento a ser realizado.

4.2.3 Síntese do enalaprilato

O principal produto de degradação do maleato de enalapril, o enalaprilato, foi obtido através da hidrólise alcalina do ME. Uma solução de hidróxido de sódio 0,1 molL⁻¹ (200 mL), contendo 2 mgmL⁻¹ de maleato de enalapril, foi colocada em um balão de fundo redondo, acoplado a um condensador de refluxo, e mantida sob

refluxo por duas horas (BHARDWAJ; SINGH, 2007). Em seguida, a solução foi diluída e analisada por espectroscopia de massas.

4.2.4 Otimização do método cromatográfico

A otimização cromatográfica foi conduzida utilizando-se duas colunas cromatográficas: Agilent ZORBAX C8 (250 x 4,6 mm; 5 μm) e Agilent ZORBAX C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), utilizando diferentes proporções de solução de ácido fosfórico pH 2,5 e acetonitrila. Após a escolha da coluna baseado na literatura, foram modificados os demais parâmetros: fluxo, temperatura e volume de injeção.

Os cromatogramas foram obtidos empregando soluções de trabalho contendo 22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de maleato de enalapril e 55 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. As concentrações de trabalho foram estabelecidas de acordo com as respostas obtidas através dos cromatogramas e de acordo com a combinação de doses existentes no mercado.

Após a escolha da coluna e dos demais parâmetros, realizou-se um planejamento fatorial para estudo de comportamento e otimização do método.

O planejamento fatorial foi realizado com o auxílio do software *Statistica 10.0* (StatSoft, Oklahoma, Estados Unidos), do tipo estrela, com três fatores, sendo estes: proporção de acetonitrila na fase móvel, temperatura da coluna e fluxo. As variações definidas para cada fator estão mostradas na Tabela 2. Na Tabela 3 estão representadas as análises geradas pelo planejamento. Foram realizadas três replicatas do ponto central para determinação do erro experimental.

TABELA 2 - FATORES E SUAS VARIAÇÕES PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL DO TIPO ESTRELA

| Fatores | $-\sqrt{3}$ | -1 | 0 | 1 | $\sqrt{3}$ |
|---|-------------|-----|-----|-----|------------|
| % Acetonitrila | 18 | 25 | 35 | 45 | 52 |
| Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | 36 | 40 | 45 | 50 | 53 |
| Fluxo ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) | 1,0 | 1,2 | 1,5 | 1,8 | 2,0 |

TABELA 3 - PLANEJAMENTO ESTRELA PARA OTIMIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA

| Análise | % Acetonitrila | Temperatura | Fluxo |
|---------|----------------|-------------|-------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | -1 | -1 | 1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | -1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | $-\sqrt{3}$ | 0 | 0 |
| 10 | $\sqrt{3}$ | 0 | 0 |
| 11 | 0 | $-\sqrt{3}$ | 0 |
| 12 | 0 | $\sqrt{3}$ | 0 |
| 13 | 0 | 0 | $-\sqrt{3}$ |
| 14 | 0 | 0 | $\sqrt{3}$ |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |

4.2.5 Validação do método

A validação do método por CLAE-UV foi realizada de acordo com a RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003).

4.2.5.1 Seletividade

A seletividade foi determinada pelo método da adição de padrão, através da comparação de duas curvas analíticas, sendo uma obtida com soluções dos padrões de maleato de enalapril e hidroclorotiazida, e outra obtida através da fortificação de uma amostra de comprimido com as soluções dos padrões.

Inicialmente, soluções padrão contendo 17,6, 19,8, 22,0, 24,2 e 26,50 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de maleato de enalapril e 44,0, 49,5, 55,0, 60,5 e 66,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de

hidroclorotiazida foram preparadas em triplicata e analisadas por CLAE-UV (curva padrão).

Posteriormente, uma amostra de comprimido foi fortificada para os mesmos níveis de concentração das soluções padrão. Para isso, dez comprimidos da associação (teor declarado de 10 mg de maleato de enalapril e 25 mg de hidroclorotiazida) foram pesados e pulverizados. Do pó dos comprimidos foi retirada uma alíquota referente a 0,44 mg de maleato de enalapril e 1,10 mg de hidroclorotiazida e transferida para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 15 mL de solução acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v) e a amostra foi sonicada por 30 minutos e mantida sob agitação mecânica por mais 30 minutos. Dessa amostra foram retirados volumes suficientes para se alcançar 80% da concentração de trabalho dos fármacos ($17,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ME e $44,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de HCTZ) e transferidos para cinco vials. Por fim, em cada vial foi adicionada quantidade suficiente de solução padrão de maneira que ao final fossem obtidas as mesmas concentrações das curvas analíticas dos padrões, de acordo com a Tabela 4. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata, para construção da curva amostra+padrões, após análise por CLAE-UV.

TABELA 4: PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA TESTE DE SELETIVIDADE

| Ponto da curva (% do ponto central) | Quantidade inicial de ME (μg) | Quantidade inicial de HCTZ (μg) | Padrão adicionado de ME (μg) | Padrão adicionado de HCTZ (μg) | Conc. final de ME ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Conc. final de HCTZ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) |
|-------------------------------------|--|--|---|---|---|---|
| 80% | 17,6 | 44,0 | Sem adição | Sem adição | 17,6 | 44,0 |
| 90% | 17,6 | 44,0 | 2,2 | 5,5 | 19,8 | 49,5 |
| 100% | 17,6 | 44,0 | 4,4 | 11,0 | 22,0 | 55,0 |
| 110% | 17,6 | 44,0 | 6,6 | 16,5 | 24,2 | 60,5 |
| 120% | 17,6 | 44,0 | 8,8 | 22,0 | 26,4 | 66,0 |

A seletividade foi avaliada através de teste t (para um intervalo de 95% de confiança) comparando-se a média dos coeficientes angulares obtidos entre as duas curvas (curva padrão e curva amostra+padrões).

4.2.5.2 Linearidade e intervalo

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração, em triplicata, para cada um dos fármacos. Para o maleato de enalapril, a linearidade foi determinada na faixa de 15,4 a 28,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (70 a 130%), e para a hidroclorotiazida, de 38,5 a 71,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (70 a 130%).

Para cada composto uma curva analítica foi gerada a fim de confirmar a relação linear entre as áreas dos picos dos analitos *versus* a concentração dos analitos. As curvas de calibração foram construídas empregando o método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear. O coeficiente angular, o intercepto e o coeficiente de correlação (r) foram calculados como parâmetros da regressão.

O intervalo de trabalho considerado para o maleato de enalapril e para a hidroclorotiazida foi de 80 a 120% em relação ao ponto central, 22,0 e 55,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

4.2.5.3 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados pela relação sinal/ruído. As soluções estoque de padrões dos fármacos do maleato de enalapril e hidroclorotiazida foram inicialmente diluídas 1:100 v/v em fase móvel. A partir dessa diluição, outras foram realizadas até obter a relação de 10 vezes o sinal/ruído para determinação do LQ e 3 vezes o sinal/ruído para determinar o LD. O ensaio foi realizado em triplicata para as concentrações que atingiram os parâmetros pretendidos.

4.2.5.4 Precisão

O ensaio de precisão foi realizado em dois níveis: precisão intracorrida (repetitividade) e precisão intercorrida (intermediária). A avaliação da repetitividade foi conduzida por um mesmo analista, no mesmo dia e no mesmo equipamento. Em contrapartida, a precisão intermediária foi realizada dois dias após a repetitividade e foi conduzida por um analista diferente no mesmo equipamento.

Todos os ensaios de precisão foram realizados com as concentrações de 17,6, 22,0 e 26,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de maleato de enalapril e de 44,0; 55,0 e 66,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de

hidroclorotiazida sendo todas as amostras preparadas em triplicatas. Por fim, a precisão foi expressa em função do desvio padrão relativo entre as áreas obtidas para cada nível de concentração.

4.2.5.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de adição de padrão utilizando-se três níveis de concentração para cada fármaco, em triplicata.

Inicialmente, foi elaborada uma curva analítica em triplicata para cada fármaco nas faixas de concentração de 17,6 a 26,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de maleato de enalapril e de 44,0 a 66,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. Esta curva analítica foi utilizada para determinar a concentração de todas as amostras analisadas.

Foram preparadas nove soluções iguais com os comprimidos. Para isto, foram pesados e pulverizados 10 comprimidos da amostra industrial na dosagem 10 mg de maleato de enalapril e 25 mg de hidroclorotiazida por comprimido. Pesou-se 11,0 mg do pó (quantidade equivalente a 0,550 mg de maleato de enalapril e 1,375 mg de hidroclorotiazida) e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL, ao qual foram adicionados 15 mL de solução acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v). O balão foi colocado em banho de ultrassom por 30 minutos e depois agitado mecanicamente a 50 rpm por mais 30 minutos. O volume do balão foi completado com solução acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v). As nove amostras foram analisadas e sua concentração estabelecida através das curvas analíticas construídas no início do teste.

A segunda etapa da exatidão consistiu em fortificar a matriz de comprimidos com os padrões de maleato de enalapril e hidroclorotiazida. Para cada uma das nove soluções de amostras, mediu-se um volume equivalente a 11,0 μg de maleato de enalapril e 27,5 μg de hidroclorotiazida e transferiu-se para vials. A esses vials foram adicionadas quantidade de soluções padrão suficiente para se alcançar as concentrações de 80, 100 e 120% de cada fármaco, em triplicata, conforme a Tabela 5. As soluções obtidas foram analisadas por CLAE-UV.

TABELA 5 - PREPARO DAS AMOSTRAS FORTIFICADAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO

| Fármaco | Nível de Conc. (%) | Quantidade na matriz (μg) | Quantidade de padrão adicionado (μg) | Concentração final para análise ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) |
|----------------------|---------------------------|--|---|---|
| Maleato de enalapril | 80 | 11,0 | 6,6 | 17,6 |
| | 100 | 11,0 | 11,0 | 22,0 |
| | 120 | 11,0 | 15,4 | 26,4 |
| Hidroclorotiazida | 80 | 27,5 | 16,5 | 44,0 |
| | 100 | 27,5 | 27,5 | 55,0 |
| | 120 | 27,5 | 38,5 | 66,0 |

O resultado da exatidão foi expresso pela porcentagem de recuperação, a partir do cálculo da quantidade de fármaco em cada amostra fortificada através da curva de calibração.

4.2.5.6 Robustez

A robustez foi avaliada, em sextuplicata, para o ponto central da curva analítica correspondendo a $22,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de maleato de enalapril e $55,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida.

Foram realizadas pequenas e deliberadas modificações na proporção da fase móvel, fluxo e temperatura da coluna.

A ferramenta estatística teste t foi utilizada para avaliar o comportamento dos dados após as modificações.

TABELA 6: PARÂMETROS MODIFICADOS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO CLAE-UV

| Parâmetro modificado | Varição 1 | Nominal | Varição 2 |
|---|------------------|----------------|------------------|
| Acetonitrila em fase móvel (%) | 37 | 38 | 39 |
| Fluxo da fase móvel (mL.min^{-1}) | 1,7 | 1,8 | 1,9 |
| Temperatura de forno da coluna ($^{\circ}\text{C}$) | 47 | 48 | 49 |

4.2.5.7 Teste de estabilidade

A estabilidade foi avaliada para todos os analitos em sua solução de trabalho.

As soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque, em acetonitrila:solução ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v), até obter as concentrações de $22 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de maleato de enalapril e $55 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. O ensaio de estabilidade foi realizado em sextuplicata comparando-se as áreas obtidas de amostras recém-preparadas com aquelas amostras analisadas após 24 horas de armazenamento no gerenciador de amostras a 20°C .

Foram consideradas estáveis as amostras com desvio padrão relativo $\leq 5\%$.

4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA (PLS)

4.3.1 Planejamento das amostras

O planejamento foi realizado de forma manual a partir de dois fatores, maleato de enalapril e hidroclorotiazida. Foram planejadas a obtenção de 39 amostras, com variações em relação ao ponto central ($5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ME e $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para HCTZ) de ± 5 , 10 e 20%, correspondendo, em relação à quantidade declarada no medicamento (10 mg de ME e 25 mg de HCTZ), de 8 a 12 mg de ME e de 20 a 30 mg de HCTZ. Das 39 amostras planejadas, 29 foram utilizadas como amostras de calibração (Tabela 7) e 10 como amostras de validação (Tabela 8).

A Figura 12 representa a distribuição das amostras com relação as concentrações de maleato de enalapril e hidroclorotiazida utilizadas para construção dos modelos.

TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO

| Amostra | Concentração de ME ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Concentração de HCTZ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) |
|----------------|--|--|
| 1 | 4,00 | 10,00 |
| 2 | 4,00 | 11,25 |
| 3 | 4,00 | 12,50 |
| 4 | 4,00 | 13,75 |
| 5 | 4,00 | 15,00 |
| 6 | 4,50 | 10,00 |
| 7 | 4,50 | 11,25 |
| 8 | 4,50 | 12,50 |
| 10 | 4,50 | 15,00 |
| 11 | 5,50 | 10,00 |
| 12 | 5,50 | 11,25 |
| 13 | 5,50 | 12,50 |
| 14 | 5,50 | 13,75 |
| 15 | 5,50 | 15,00 |
| 16 | 6,00 | 10,00 |
| 17 | 6,00 | 11,25 |
| 19 | 6,00 | 13,75 |
| 20 | 6,00 | 15,00 |
| 21 | 5,00 | 10,00 |
| 24 | 5,00 | 13,75 |
| 26 | 5,00 | 12,50 |
| 27 | 5,00 | 12,50 |
| 29 | 5,25 | 12,50 |
| 31 | 5,00 | 13,13 |
| 32 | 4,50 | 13,13 |
| 33 | 4,50 | 11,88 |
| 34 | 5,50 | 13,13 |
| 36 | 4,75 | 11,25 |
| 37 | 5,25 | 11,25 |

ME: maleato de enalapril; HCTZ: hidroclorotiazida

TABELA 8 - CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO

| AMOSTRA | Concentração de ME ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Concentração de HCTZ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) |
|---------|--|--|
| 9 | 4,50 | 13,75 |
| 18 | 6,00 | 12,50 |
| 22 | 5,00 | 11,25 |
| 23 | 5,00 | 12,50 |
| 25 | 5,00 | 15,00 |
| 28 | 4,75 | 12,50 |
| 30 | 5,00 | 11,88 |
| 35 | 5,50 | 11,88 |
| 38 | 4,75 | 13,75 |
| 39 | 5,25 | 13,75 |

ME: maleato de enalapril; HCTZ: hidroclorotiazida

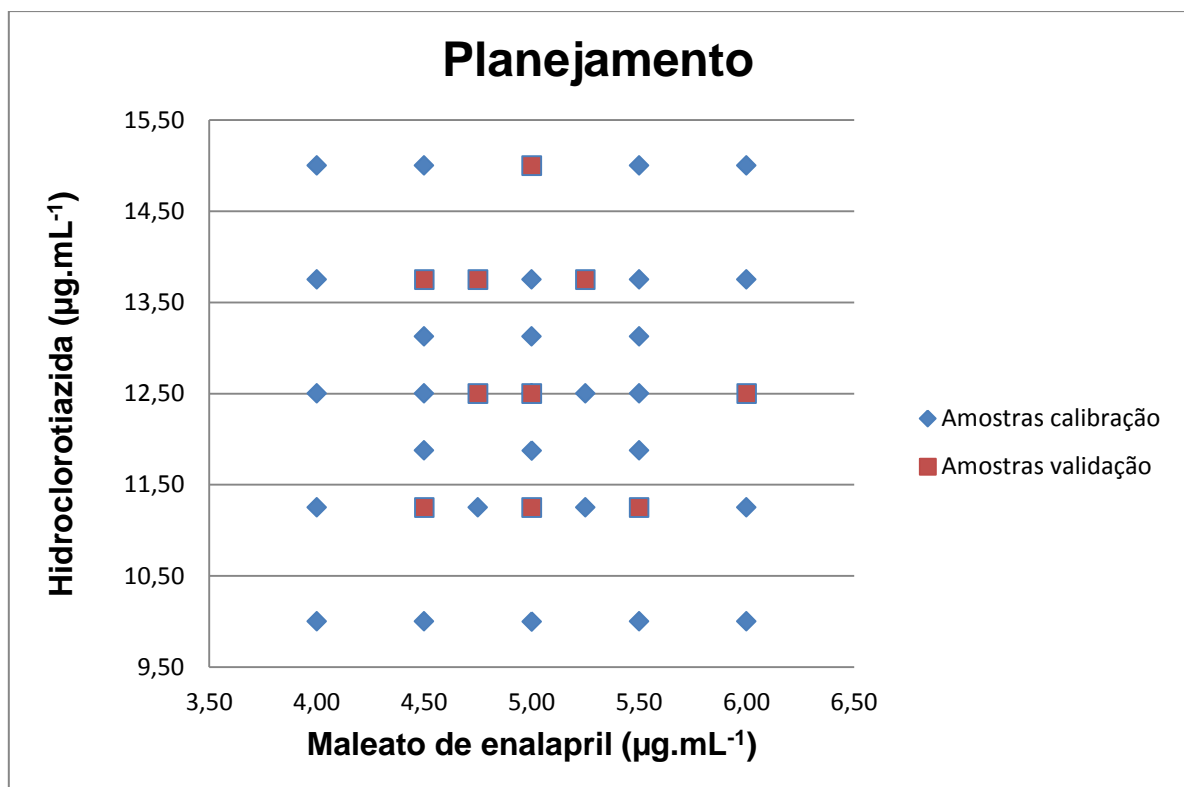


FIGURA 12: PLANEJAMENTO PARA AMOSTRAS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.

4.3.2 Preparo das amostras e aquisição dos espectros no ultravioleta

As amostras dos conjuntos de calibração e validação (Tabelas 7 e 8) foram preparadas a partir de duas soluções mãe, uma contendo $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de maleato de enalapril e outra contendo $625 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, preparadas em metanol:água (50:50 v/v). Alíquotas dessas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e estes completados com água ultrapura, para obtenção das concentrações desejadas de cada amostra dos conjuntos.

Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 200 a 400 nm, com intervalo de leitura de 1 nm e em triplicata.

4.3.3 Construção dos modelos de calibração multivariada

Para a construção dos modelos de calibração multivariada foram considerados dois parâmetros, os pré-processamentos e a seleção de variáveis.

Os pré-processamentos utilizados foram a primeira e segunda derivada e dados centrados na média.

Na seleção de variáveis utilizou-se o espectro por inteiro ou regiões, através do algoritmo iPLS, no qual foram avaliados os intervalos 20, 40, 50 e 100 nm.

A escolha do melhor modelo de calibração multivariada foi feita com base nos valores de RMSEC, RMSEP e erro médio relativo.

4.3.3.1 Detecção de amostras anômalas

Para a determinação de amostras anômalas foi avaliado o gráfico de resíduo de Student por *leverage*. Foi considerada amostra anômala aquela que ultrapassava os limites tanto de resíduo de Student (2,5%) quanto de *leverage*.

4.3.4 Validação do método

O método por espectrofotometria no UV-PLS foi validado para os parâmetros de seletividade, linearidade, sensibilidade, sensibilidade analítica, limite de detecção, limite de quantificação, *bias*, RPD de calibração e validação, precisão e exatidão. Os parâmetros de seletividade, sensibilidade, limite de detecção e quantificação, *bias*, RPD de calibração e validação e exatidão foram obtidos através das fórmulas descritas na revisão bibliográfica (item.3.9.1, pág. 39).

4.3.4.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de correlação (r) do ajuste entre os valores de referência e preditos. A verificação da aleatoriedade dos resíduos também foi realizada.

4.3.4.2 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Para os dois níveis foram analisadas amostras em três níveis de concentração, em triplicata.

Para avaliar a repetitividade, as amostras foram preparadas em triplicata nas concentrações de 4,0, 5,0 e 6,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o maleato de enalapril e 10,0, 12,5 e 15,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para hidrocortiazida, correspondentes a 80, 100 e 120% das concentrações referentes ao planejamento. Os espectros foram adquiridos em um curto período de tempo, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento.

Para avaliar a precisão intermediária, as amostras foram preparadas da mesma maneira que na repetitividade. Os espectros adquiridos em dias e analistas diferentes e no mesmo equipamento.

A precisão foi avaliada em função do desvio padrão relativo.

4.3.4.3 Sensibilidade analítica

Para cálculo da sensibilidade analítica calculou-se a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental (ϵ). O ruído instrumental foi estimado pelo espectro de 15 replicatas do branco.

4.4 DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS EM AMOSTRAS REAIS

Para este ensaio, 10 comprimidos do medicamento referência industrial (10 mg de maleato de enalapril e 25 mg de hidroclorotiazida por comprimido) foram pesados individualmente para o cálculo do peso médio e, em seguida foram pulverizados. Da massa total, foram pesadas 10 alíquotas e diluídas em solução acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5, sonicadas por 30 minutos, colocadas em agitação mecânica por 30 minutos e filtradas. De cada uma das 10 soluções foram retiradas alíquotas e diluídas para as concentrações de trabalho para análise por CLAE-UV e por espectrofotometria no UV-PLS.

Os teores obtidos por UV-PLS e CLAE-UV foram comparados estatisticamente pelo teste t (intervalo de confiança de 95%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CLAE-UV

5.1.1 Estudo e solubilidade dos fármacos

Dentre os solventes avaliados, a mistura acetonitrila:solução de ácido fosfórico pH 2,5 (50:50 v/v) foi a que proporcionou a completa solubilização dos padrões analíticos, sendo então esta mistura escolhida para obtenção das soluções estoque para as determinações por CLAE.

5.1.2 Síntese do enalaprilato

Para síntese do enalaprilato, foi realizada uma hidrólise alcalina do maleato de enalapril. No espectro de massas da solução obtida observou-se a presença do íon de massa/carga 348,9, relativo à massa molecular do enalaprilato (Figura 13). Desta maneira foi possível comprovar a presença majoritária no produto de degradação na solução. Esse produto foi adicionado nas soluções padrão contendo maleato de enalapril e hidroclorotiazida para verificar a interferência do mesmo na análise cromatográfica.

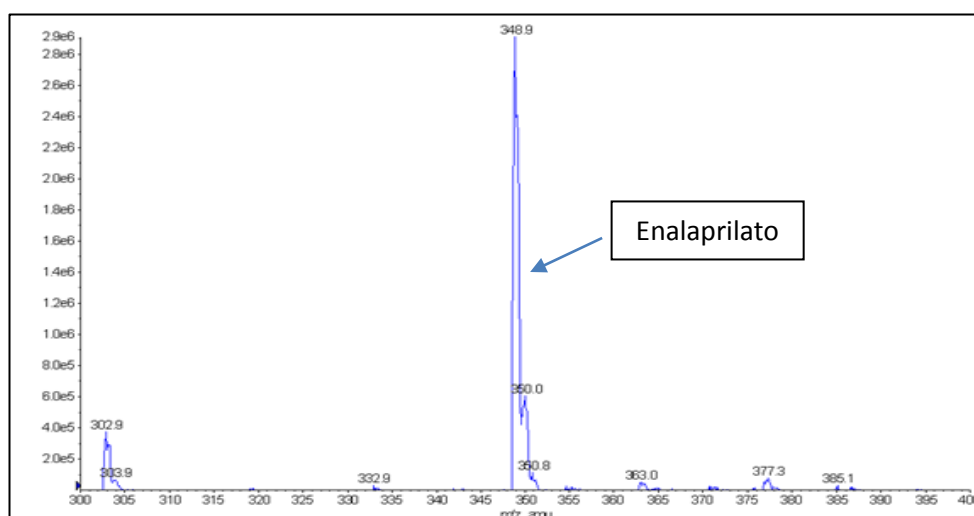


FIGURA 13 – ESPECTRO DE MASSAS DO PRODUTO DA HIDRÓLISE ALCALINA DO MALEATO DE ENALAPRIL.

5.1.3 Desenvolvimento do método CLAE-UV

Para o início do desenvolvimento do método cromatográfico foi realizado um levantamento na literatura das condições cromatográficas mais utilizadas para análise de maleato de enalapril e hidrocloreotiazida, levando em consideração o tipo de coluna, fase móvel, fluxo e temperatura. As colunas do tipo octadecilsilano (C18) e octilsilano (C8) foram empregadas pelos autores e assim, escolhidas para os experimentos iniciais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; WEDIAN, 2013; USLU, 2013; PAWAR *et al*, 2011; REDDY *et al*, 2011).

O maleato de enalapril e o enalaprilato não apresentaram um bom perfil cromatográfico utilizando a coluna octadecilsilano, (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm), pois os picos se apresentaram assimétricos e alargados. Por isso a coluna octilsilano (C8) de mesmo tamanho foi escolhida para dar sequência ao desenvolvimento deste trabalho.

O uso do metanol como fase orgânica não favoreceu a eluição do maleato de enalapril, cujo pico apresentou-se muito alargado. Como o pico alargado foi observado em menores proporções quando se empregou acetonitrila, este foi o solvente orgânico escolhido. Como fase aquosa, foi definida uma solução de ácido fosfórico pH 2,5. O pH dessa fase foi escolhido de acordo com os pKa's dos fármacos em análise (ME pKa: 3 e 5,3; HCTZ pKa:7,9 e 9,2). Com esse pH, procurou-se garantir que os grupamentos ionizáveis estivessem protonados, melhorando a eluição dos fármacos.

O ajuste da temperatura da coluna foi fundamental para uma boa cromatografia do maleato de enalapril. Da temperatura ambiente até 35°C, o pico do ME se apresentou bastante alargado e assimétrico. Por isso utilizou-se temperaturas mais altas para realização do planejamento de otimização do método (40 à 50°C).

Após algumas análises com diferentes condições, foram definidas as variáveis que seriam incluídas como fatores do planejamento experimental, sendo elas a proporção de acetonitrila na fase móvel, a temperatura da coluna e o fluxo. Um dos principais objetivos da otimização foi encontrar a menor temperatura possível para se analisar o maleato de enalapril com uma largura de pico e simetria satisfatórias.

5.1.4 Planejamento experimental fatorial

O planejamento experimental foi conduzido de acordo com a Tabela 3 (pág 51). As respostas analisadas foram: resolução entre os picos, assimetria dos picos (maleato de enalapril e hidroclorotiazida) e largura dos picos.

O planejamento continha um total de 17 experimentos (Tabelas 2 e 3, Materiais e Métodos, pág. 51), sendo três delas replicatas do ponto central para estimativa do erro. As respostas obtidas estão representadas nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9 - RESPOSTAS OBTIDAS NOS CROMATOGRAMAS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

| Corrida cromatográfica | As ME | As HCTZ | Rs EN-HCTZ | Rs HCTZ-ME | w ME | w HCTZ |
|------------------------|-------|---------|------------|------------|--------|--------|
| 1 | 1,13 | 0,89 | 2,66 | 5,66 | 1,16 | 0,0721 |
| 2 | 1,19 | 0,89 | 2,59 | 4,93 | 0,8933 | 0,0586 |
| 3 | 1,02 | 0,86 | 1,98 | 8,72 | 0,71 | 0,0684 |
| 4 | 1,02 | 0,91 | 1,51 | 7,79 | 0,5233 | 0,055 |
| 5 | 0,97 | 0,89 | 4,82 | 1,06 | 0,1485 | 0,055 |
| 6 | 0,94 | 0,91 | 3,11 | 1,02 | 0,1041 | 0,0483 |
| 7 | 0,93 | 0,88 | 4,16 | 1,61 | 0,1163 | 0,0539 |
| 8 | 0,94 | 0,94 | 2,17 | 1,7 | 0,0829 | 0,0475 |
| 9 | 1,04 | 0,89 | 0,095 | 10,06 | 1,8133 | 0,0743 |
| 10 | 0,72 | 0,91 | 1,99 | 1,16 | 0,3133 | 0,0499 |
| 11 | 1,64 | 0,92 | 4,57 | 2,95 | 0,32 | 0,0551 |
| 12 | 0,98 | 0,88 | 3,05 | 4,79 | 0,1967 | 0,0528 |
| 13 | 1,08 | 0,86 | 4,4 | 4,66 | 0,3067 | 0,0642 |
| 14 | 1,1 | 0,93 | 3,14 | 3,51 | 0,2022 | 0,0487 |

NOTA: As: assimetria; Rs: resolução; w: largura do pico; EN: enalaprilato; ME: maleato de enalapril; HCTZ: hidroclorotiazida.

TABELA 10 - RESPOSTAS OBTIDAS NOS CROMATOGRAMAS DAS REPLICATAS DO PONTO CENTRAL

| Corrida cromatográfica | As ME | As HCTZ | Rs EN-HCTZ | Rs HCTZ-ME | w ME | w HCTZ |
|------------------------|-------|---------|------------|------------|--------|--------|
| 1 | 1,04 | 0,90 | 3,79 | 3,41 | 0,2183 | 0,0533 |
| 2 | 1,05 | 0,90 | 3,76 | 3,48 | 0,2183 | 0,0531 |
| 3 | 1,05 | 0,91 | 3,70 | 3,32 | 0,2200 | 0,0533 |

NOTA: As: assimetria; Rs: resolução; w: largura do pico; EN: enalaprilato; EM: maleato de enalapril; HCTZ: hidroclorotiazida.

As variáveis que influenciaram em cada uma das respostas e os coeficientes dos modelos foram obtidos pelo programa *Statistica*. Na Tabela 11, os coeficientes estatisticamente significativos (95% de confiança) estão destacados em vermelho, sendo que b1 está relacionado ao fator proporção de acetonitrila na fase móvel, b2 a temperatura e b3 ao fluxo, os coeficientes b11, b22 e b33 são os coeficientes quadráticos do modelo e os b12, b13 e b23 os coeficientes de interação de segunda ordem.

TABELA 11 - COEFICIENTES DE REGRESSÃO DOS MODELOS OBTIDOS PELO SOFTWARE STATISTICA

| Coeficientes de regressão | As EN | As HCTZ | Rs ENP-HCTZ | Rs HCTZ-EN | w EN | w HCTZ |
|---------------------------|---------|---------|-------------|------------|---------|---------|
| b0 | 1,0517 | 0,9034 | 3,7402 | 3,4354 | 0,2238 | 0,0532 |
| b1 | -0,0818 | 0,0075 | 0,6581 | -2,6710 | -0,3922 | -0,0066 |
| b11 | -0,0763 | -0,0015 | -0,9748 | 0,7003 | 0,2815 | 0,0030 |
| b2 | -0,1047 | -0,0041 | -0,4127 | 0,7847 | -0,0791 | -0,0009 |
| b22 | 0,0756 | -0,0015 | 0,0496 | 0,0144 | -0,0030 | 0,0001 |
| b3 | 0,0053 | 0,0181 | -0,5000 | -0,3357 | -0,0517 | -0,0048 |
| b33 | -0,0021 | -0,0033 | 0,0407 | 0,0728 | -0,0044 | 0,0010 |
| b12 | 0,03 | 0,0037 | 0,0862 | -0,6112 | 0,0958 | 0,0006 |
| b13 | -0,0099 | 0,0037 | -0,4287 | 0,1887 | 0,0469 | 0,0017 |
| b23 | -0,0025 | 0,0112 | -0,1437 | 0,0162 | 0,0113 | 0,0001 |

NOTA: As: assimetria; Rs: resolução; w: largura do pico; ENP: enalaprilato; EN: maleato de enalapril; HCTZ: hidroclorotiazida.

Analisando os coeficientes, pôde-se verificar uma forte influência da quantidade de acetonitrila na fase móvel (b1 e b11) em todas as respostas avaliadas. Como já era esperado, na resolução entre os picos da hidroclorotiazida e do enalapril, a acetonitrila tem efeito negativo (b1 = -2,6710) o que significa que

quanto maior a proporção do solvente orgânico, menor a resolução entre os picos. A temperatura (b2 e b22) e o fluxo (b3 e b33) possuem menor influência, porém se mostraram significativas para alguns parâmetros avaliados. Como foi percebido nos testes anteriores ao planejamento, a temperatura possui efeito negativo na largura do pico do enalapril (b2 = -0,0791), sendo que o aumento da temperatura levou a uma diminuição na largura do pico.

Para todos os modelos construídos a partir do planejamento foi realizada a análise de variância. Três modelos avaliados apresentaram regressões significativas, com valor de F maiores que o tabelado (Tabelas 12, 13 e 14). Os modelos também foram avaliados quanto à falta de ajuste e todos apresentaram valor de F menor do que o valor tabelado. Os testes foram realizados com 95% de confiança. Um modelo com regressão significativa e sem falta de ajuste pode ser utilizado para estimar a resposta em pontos onde não foi realizada uma análise do planejamento, podendo assim ser construído superfícies de resposta

TABELA 12 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PARA ASSIMETRIA DE PICO DA HIDROCLOROTIAZIDA

| | SQ | Graus de liberdade | MQ | F | F_{tab} |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|----------|------------------------|
| Regressão | 0,006754449 | 3 | 0,002251 | 16,113 | 3,411 |
| Resíduos | 0,001816489 | 13 | 0,00014 | | |
| Falta de ajuste | 0,001749823 | 11 | 0,000159 | 4,772 | 19,405 |
| Erro puro | 6,6666x10 ⁻⁵ | 2 | 3,33x10 ⁻⁵ | | |
| | R² | | | 0,7880 | |
| | % de máxima variância | | | 99,22 | |

NOTA: SQ:SOMA QUADRÁTICA; MQ: MÉDIA QUADRÁTICA

TABELA 13 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PARA RESOLUÇÃO ENTRE OS PICOS DO ENALAPRILATO E HIDROCLOROTIAZIDA

| | SQ | Graus de liberdade | MQ | F | F_{tab} |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------|----------|------------------------|
| Regressão | 25,59676 | 5 | 5,119352 | 158,498 | 3,204 |
| Resíduos | 0,355291 | 11 | 0,032299 | | |
| Falta de ajuste | 0,351091 | 9 | 0,03901 | 18,576 | 19,385 |
| Erro puro | 0,0042 | 2 | 0,0021 | | |
| | R² | | | 0,9863 | |
| | % de máxima variância | | | 99,96 | |

NOTA: SQ:SOMA QUADRÁTICA; MQ: MÉDIA QUADRÁTICA

TABELA 14 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO MODELO PARA RESOLUÇÃO ENTRE OS PICOS DA HIDROCLOROTIAZIDA E DO ENALAPRIL

| | SQ | Graus de liberdade | MQ | F | F_{tab} |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------|----------|------------------------|
| Regressão | 116,7708 | 5 | 23,35415 | 289,091 | 3,204 |
| Resíduos | 0,888631 | 11 | 0,080785 | | |
| Falta de ajuste | 0,874031 | 9 | 0,097115 | 13,303 | 19,385 |
| Erro puro | 0,0146 | 2 | 0,0073 | | |
| | R² | | | 0,9877 | |
| | % de máxima variância | | | 99,98 | |

NOTA: SQ:SOMA QUADRÁTICA; MQ: MÉDIA QUADRÁTICA

Analisando as superfícies de resposta e os dados obtidos pelos experimentos do planejamento experimental fatorial na Tabela 9, buscou-se uma condição cromatográfica que permitisse uma análise rápida, com valores satisfatórios de simetria e largura dos picos e com resolução entre os picos superior a 2,0. Observando o resultado da corrida cromatográfica 6 da Tabela 9, notou-se que esta análise obteve uma das menores larguras de pico do enalapril, 0,1041. Ela foi realizada com a menor temperatura do planejamento (40°C) e com os níveis mais altos de concentração de ACN e fluxo (45% de ACN e 1,8 mL/min). O uso dos maiores níveis desses dois últimos fatores permitem diminuir a temperatura utilizada, mantendo uma largura de pico do EN aceitável para a análise cromatográfica. Porém, na corrida 6 a resolução entre os picos da HCTZ e do EN não foi satisfatória (< 2), como pode ser observada na Figura 14. Nessa figura está representado o perfil de superfície da resolução entre HCTZ e EN obtido através do planejamento fatorial de acordo com as variações de fluxo e concentrações de ACN, com a temperatura fixada em 40°C. Observando a Figura 14, confirmamos que é necessário a diminuição de um ou ambos os fatores (Fluxo e % de ACN) para aumentar a resolução entre os picos. Pelos dados originários do planejamento, sabe-se que a diminuição desses, sem alterar a temperatura (40 °C), aumentaria a largura do pico do ME (Exemplo: corridas cromatográficas 1,2 e 5 do planejamento experimental).

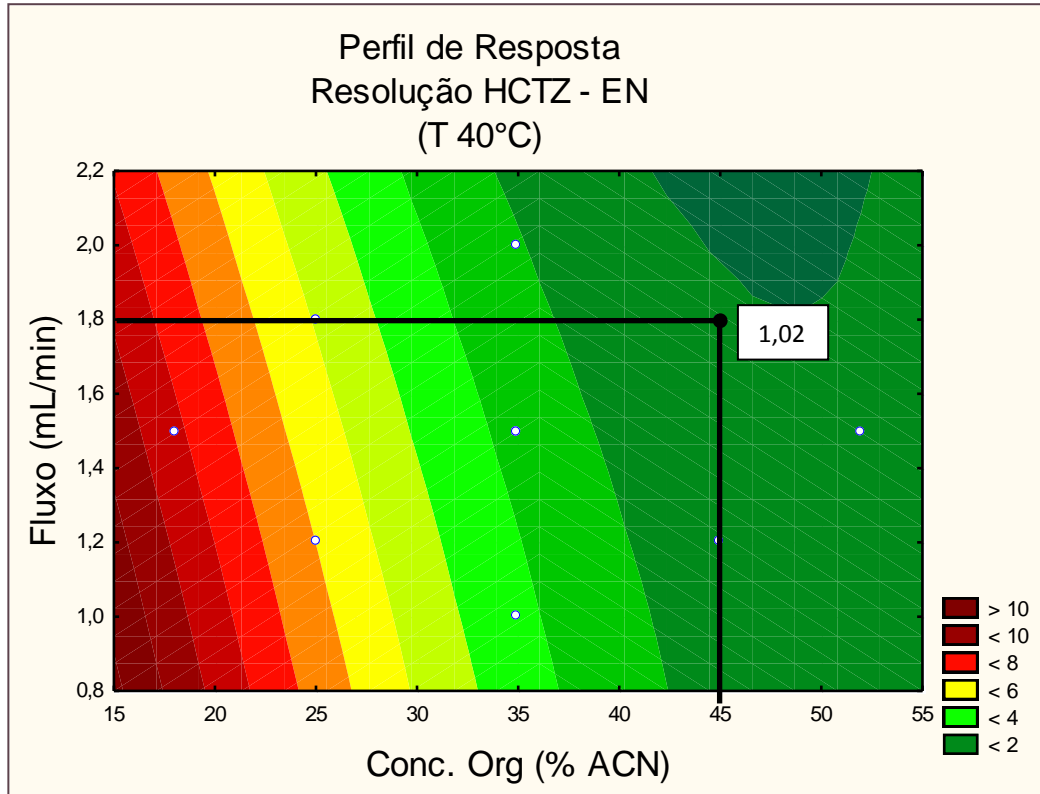


FIGURA 14 – PERFIL DE SUPERFÍCIE: RESOLUÇÃO ENTRE HIDROCLOROTIAZIDA E ENALAPRIL NA TEMPERATURA DE 40°C.

Em resumo, quanto menor a temperatura, maiores as condições de fluxo e concentração de fase orgânica necessária para um valor adequado de largura de pico. Porém, altos valores de fluxo e concentração de fase orgânica podem levar a perda de resolução entre os picos cromatográficos. Para estabelecer um equilíbrio entre as melhores condições para quantificar os anti-hipertensivos, analisou-se os resultados do planejamento (Tabela 9) e as curvas de superfície resposta adquiridas no software *Statistica 10.0*. Observou-se os valores de resolução e largura de pico em várias condições de fluxo, temperatura e concentração de acetonitrila, e determinou-se que a condição cromatográfica que melhor atenderia as condições satisfatórias do método, como menor largura do pico do ME e resoluções entre os picos maior que 2, seria: concentração de acetonitrila de 38%, temperatura da coluna de 48°C e fluxo de 1,8 mL.min⁻¹. Isso pode ser verificado na Figura 15, que representa o perfil de superfície da resolução entre os picos da HCTZ e ME, a 48°C. Essas condições foram testadas no cromatógrafo e os resultados da largura dos picos, assimetria dos picos e resoluções foram satisfatórios.

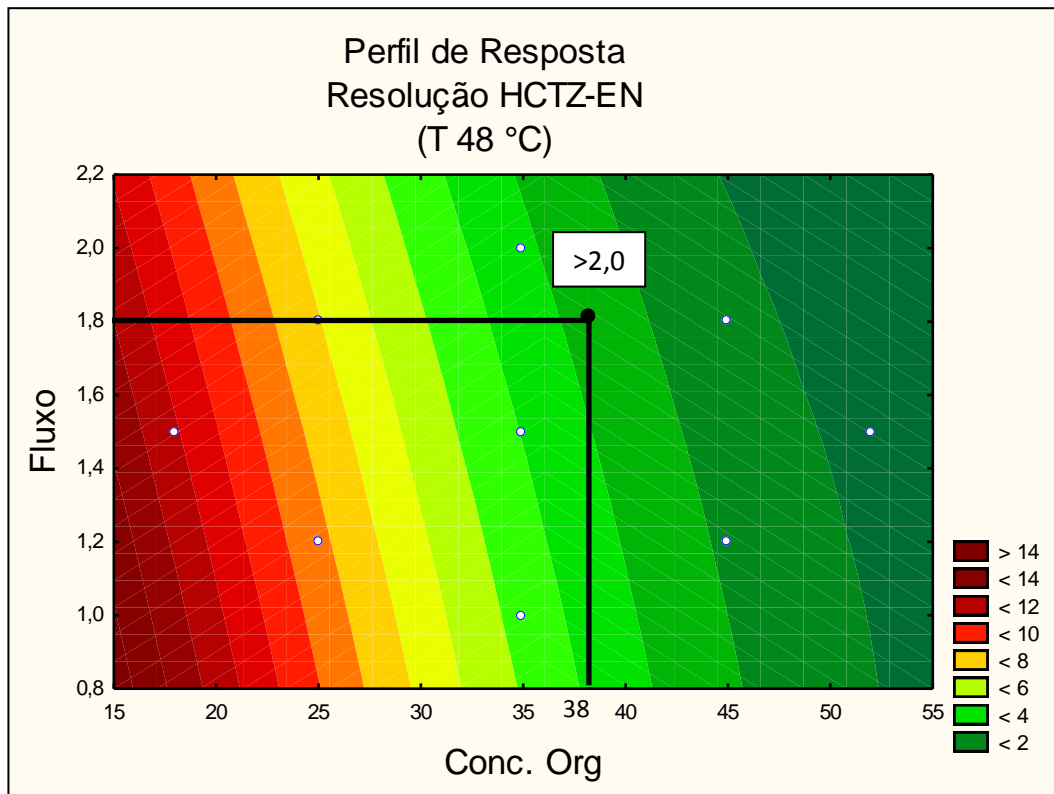


FIGURA 15 – PERFIL DE SUPERFÍCIE: RESOLUÇÃO ENTRE HIDROCLOROTIAZIDA E ENALAPRIL NA TEMPERATURA DE 48°C.

Assim, o método ficou definido com as seguintes condições:

- Coluna cromatográfica: C8 250x4,6 mm, 5 μ m
- Fase móvel: solução de ácido fosfórico pH 2,5:acetonitrila (62:38 v/v)
- Temperatura da coluna: 48°C
- Fluxo: 1,8 mL.min⁻¹
- Volume de injeção: 10 μ L
- Detecção: 215 nm

Os resultados dos parâmetros avaliados e o cromatograma (Figura 16) resultante nessas condições estão descritos na Tabela 15.

TABELA 15 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS ASSIMETRIA DO PICO (A_s), RESOLUÇÃO (R_s) E LARGURA DOS PICOS (w) NAS CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA O MÉTODO

| A_s ME | A_s HCTZ | R_s EN-HCTZ | R_s HCTZ-ME | w ME | w HCTZ |
|----------|------------|------------------|------------------|--------|----------|
| 1,10 | 0,95 | 3,05 | 2,19 | 0,0883 | 0,0473 |

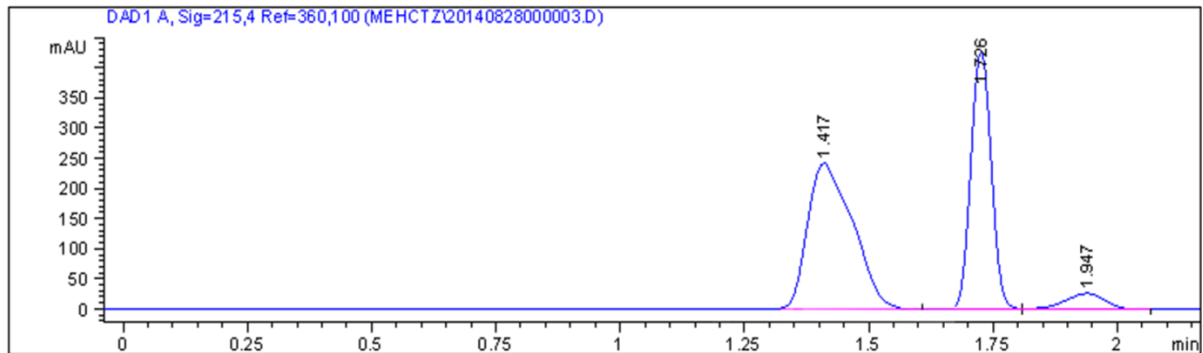


FIGURA 16 - CROMATOGRAMA. TEMPO DE RETENÇÃO 1,417 MIN: MAEATO+ENALAPRILATO; 1,726 MIN: HIDROCLOROTIAZIDA; 1,947 MIN: ENALAPRIL.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CLAE-UV

5.2.1 Seletividade

O ensaio de seletividade foi realizado através da comparação dos coeficientes angulares obtidos das curvas analíticas preparadas em solução padrão e aquelas obtidas da matriz de comprimidos fortificada.

Como pode ser observado na Tabela 16, o método desenvolvido foi seletivo, pois os coeficientes angulares de ambas as curvas analíticas foram estatisticamente iguais (valor de t calculado menor que t tabelado em 95% de confiança).

TABELA 16 – RESULTADO DO TESTE DE SELETIVIDADE PARA O MÉTODO POR CLAE

| Analito | Equações de regressão | | Valor de t calculado | Valor de t tabelado |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| | Solução padrão | Matriz fortificada | | |
| Maleato de enalapril | $y=6,7369x + 1,8245$ | $y = 6,6886x + 6,689$ | 0,28125 | 2,776 |
| | $y=6,5565x + 6,5536$ | $y=6,8527x + 7,6895$ | | |
| | $y=6,7975x + 2,4372$ | $y=6,6666x + 5,5174$ | | |
| Hidroclorotiazida | $y=23,009x + 58,612$ | $y=23,861x + 33,023$ | 1,21 | 2,776 |
| | $y=22,955x + 62,759$ | $y=24,634x + 24,741$ | | |
| | $y=23,111x + 53,516$ | $y=23,338x + 46,087$ | | |

5.2.2 Limite de detecção e limite de quantificação

LD e LQ foram estimados a partir da relação sinal/ruído conforme descrito no item 4.2.5.3.

TABELA 17 – RESULTADOS DOS TESTES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

| | Limite de Detecção ($\mu\text{g. mL}^{-1}$) | Limite de Quantificação ($\mu\text{g. mL}^{-1}$) |
|--------------------------|---|--|
| Enalapril | $2,70 \times 10^{-2}$ | 0,22 |
| Hidroclorotiazida | $6,76 \times 10^{-3}$ | $6,60 \times 10^{-1}$ |

5.2.3 Linearidade e intervalo

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração (ver item 4.2.5.2), variando entre 15,4 a 28,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o maleato de enalapril e 38,5 a 71,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para hidroclorotiazida (Figuras 17 e 18). A linearidade foi obtida através do método dos mínimos quadrados (Tabela 18). A linearidade também foi avaliada por análise de variância (Tabela 19), com a qual foi possível comprovar a linearidade ($F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$) e a ausência de falta de ajuste no modelo ($F_{\text{faj}} < F_{\text{tab}}$).

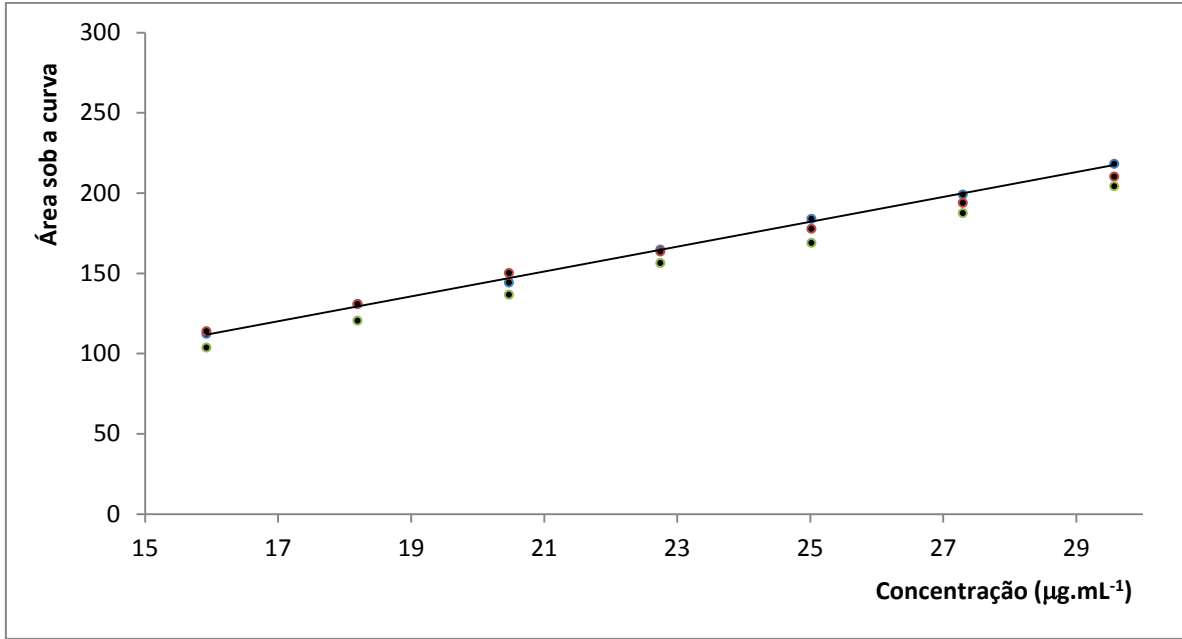


FIGURA 17 - LINEARIDADE DO MALEATO DE ENALAPRIL POR CLAE-UV.

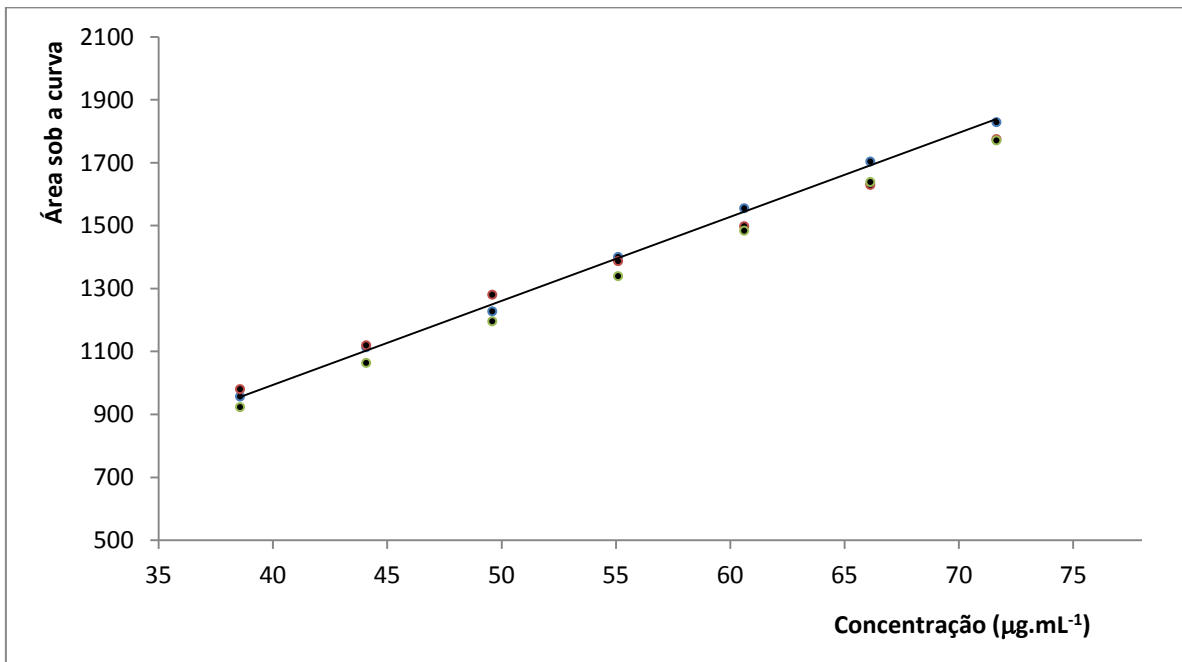


FIGURA 18 - LINEARIDADE DA HIDROCLOROTIAZIDA POR CLAE-UV.

TABELA 18 – RESULTADOS DO TESTE DE LINEARIDADE PARA O MÉTODO POR CLAE

| Analito | Equações de regressão | Valor de r^2 |
|----------------------|------------------------|----------------|
| Maleato de enalapril | $y = 7,588x - 11,606$ | $r^2 = 0,9984$ |
| | $y = 6,7695x + 4,6859$ | $r^2 = 0,9978$ |
| | $y = 7,7091x - 13,386$ | $r^2 = 0,9988$ |
| Hidroclorotiazida | $y = 26,703x - 75,85$ | $r^2 = 0,9984$ |
| | $y = 22,783x + 87,779$ | $r^2 = 0,9971$ |
| | $y = 26,612x - 76,414$ | $r^2 = 0,9996$ |

NOTA: r^2 : COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO

TABELA 19: ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA LINEARIDADE DO MÉTODO POR CLAE-UV

| | Maleato de Enalapril | Hidroclorotiazida |
|------------------------|----------------------|-------------------|
| $F_{\text{tab } 1,20}$ | | 4,35 |
| F_{cal} | 242,03 | 544,57 |
| $F_{\text{tab } 5,14}$ | | 2,96 |
| $F_{\text{cal faj}}$ | 0,51 | 0,42 |

NOTA: F_{faj} : F CALCULADO PARA FALTA DE AJUSTE

5.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada em dois níveis, repetitividade e precisão intermediária, nas concentrações de 17,6, 22,0 e 26,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o enalapril e 44,0, 55,0 e 66,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a hidroclorotiazida, conforme item 4.3.4.

Os resultados de precisão encontram-se dispostos nas TABELAS 18 e 19. Como pode ser observado, para ambos analitos os valores de DPR da repetitividade e da precisão intermediária foram menores que 5% indicando que o método é preciso, de acordo com a regulação vigente (BRASIL, 2003).

TABELA 20 - RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO (REPETITIVIDADE)

| Analito | Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Determinação 1 (área) | Determinação 2 (área) | Determinação 3 (área) | DPR (%) |
|--------------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Enalapril | 17,6 | 127,3458 | 130,7483 | 130,5628 | 1,47 |
| | 22,0 | 164,5766 | 162,5155 | 164,6087 | 0,73 |
| | 26,4 | 202,2065 | 200,6594 | 198,8168 | 0,84 |
| Hidrocloro-tiazida | 44,0 | 1090,979 | 1115,06 | 1113,404 | 1,21 |
| | 55,0 | 1399,86 | 1373,882 | 1397,192 | 1,02 |
| | 66,0 | 1703,338 | 1694,237 | 1684,268 | 0,56 |

TABELA 21 - RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

| Analito | Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Determinação 1 (área) | Determinação 2 (área) | Determinação 3 (área) | DPR (%) |
|------------------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Enalapril | 17,6 | 121,1909 | 119,2934 | 123,0494 | 1,54 |
| | 22,0 | 156,9496 | 156,6671 | 157,5388 | 0,28 |
| | 26,4 | 190,3981 | 203,3968 | 198,022 | 3,31 |
| Hidrocloro- tiazida | 44,0 | 1042,752 | 1016,788 | 1047,915 | 1,61 |
| | 55,0 | 1316,600 | 1321,038 | 1325,039 | 0,32 |
| | 66,0 | 1591,198 | 1677,133 | 1646,109 | 2,65 |

5.2.5 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado pelo método de adição do padrão. A exatidão foi expressa como a porcentagem recuperada de fármaco da matriz de comprimidos fortificada. As médias foram comparadas por teste t no nível de confiança de 95% e todas apresentaram valor de $p > 0,05$. De acordo com os resultados obtidos, o método pode ser considerado exato.

TABELA 22 - RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO PARA O MÉTODO POR CLAE

| Nível (%) | Enalapril | | | | Hidroclorotiazida | | | |
|-----------|------------------|---------------------|---------|------|-------------------|---------------------|---------|------|
| | Conc. real (n=3) | Conc. predita (n=3) | Rec (%) | p | Conc. real (n=3) | Conc. predita (n=3) | Rec (%) | p |
| 80 | 18,21 \pm 0,21 | 18,20 \pm 0,25 | 99,96 | 0,97 | 43,98 \pm 0,69 | 42,54 \pm 0,84 | 96,72 | 0,08 |
| 100 | 23,26 \pm 0,37 | 23,13 \pm 0,30 | 99,45 | 0,66 | 56,12 \pm 0,65 | 54,81 \pm 0,56 | 97,67 | 0,06 |
| 120 | 26,82 \pm 0,51 | 26,43 \pm 0,46 | 98,57 | 0,39 | 65,85 \pm 1,10 | 64,16 \pm 0,66 | 97,45 | 0,08 |

5.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada em sextuplicata a partir de pequenas modificações do método. Como pode ser observado na Tabela 23, pequenas modificações nas variáveis escolhidas não provocaram alteração na exatidão dos resultados ($p > 0,05$).

TABELA 23: RESULTADOS DA ROBUSTEZ DO MÉTODO POR CLAE

| Parâmetros cromatográficos | Enalapril | | Hidroclorotiazida | |
|--------------------------------|---------------|------|-------------------|------|
| | Área ± DP | p | Área ± DP | p |
| Fase móvel¹: | | | | |
| 37% de ACN | 158,87 ± 3,39 | 0,30 | 1363,62 ± 42,75 | 0,14 |
| 38% de ACN | 161,26 ± 4,24 | - | 1393,27 ± 15,13 | - |
| 39% de ACN | 162,40 ± 2,58 | 0,58 | 1355,60 ± 39,17 | 0,05 |
| Fluxo: | | | | |
| 1,7 mL.min ⁻¹ | 159,65 ± 3,99 | 0,51 | 1365,68 ± 30,39 | 0,07 |
| 1,8 mL.min ⁻¹ | 161,26 ± 4,24 | - | 1393,27 ± 15,13 | - |
| 1,9 mL.min ⁻¹ | 161,08 ± 4,99 | 0,94 | 1384,90 ± 26,67 | 0,51 |
| Temperatura da coluna: | | | | |
| 47 °C | 160,47 ± 3,83 | 0,74 | 1378,28 ± 28,85 | 0,28 |
| 48 °C | 161,26 ± 4,24 | - | 1393,27 ± 15,13 | - |
| 49 °C | 158,34 ± 2,79 | 0,19 | 1364,40 ± 38,24 | 0,11 |

1. Mistura solução de ácido fosfórico pH 2,5:acetonitrila (ACN); DP: DESVIO PADRÃO

5.2.7 Estabilidade da solução de trabalho

Para a solução de trabalho, os compostos EN e HCTZ se mostraram estáveis após 24 h armazenados no gerenciador de amostras a uma temperatura de aproximadamente 20°C, pois as áreas dos picos não variaram significativamente. (Tabela 24).

TABELA 24 - RESULTADOS DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO.

| | Enalapril (Área ± DP) | Hidroclorotiazida (Área ± DP) |
|-------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Solução recém-preparada | 162,04 ± 2,12 | 1375,55 ± 17,72 |
| Solução após 24h | 158,14 ± 1,04 (p=0,14) | 1351,13 ± 12,39(p=0,25) |

5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV COM CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Para o desenvolvimento do método por ultravioleta foram considerados vários parâmetros, como a escolha do solvente, a definição da concentração de trabalho mais adequada para cada fármaco e a investigação das bandas de absorção. A solução diluente escolhida para solubilização dos ativos na solução estoque foi metanol:água (50:50 v/v). Para se preparar as soluções de trabalho (para leitura no espectrofotômetro), utilizou-se como diluente apenas água ultrapura.

5.3.1 Análises dos espectros de absorção eletrônica

Os espectros de absorção dos padrões isolados em água ultrapura, nos comprimentos de onda de 200 a 400 nm estão representados na Figura 19, nas concentrações de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o maleato de enalapril e $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para hidroclorotiazida.

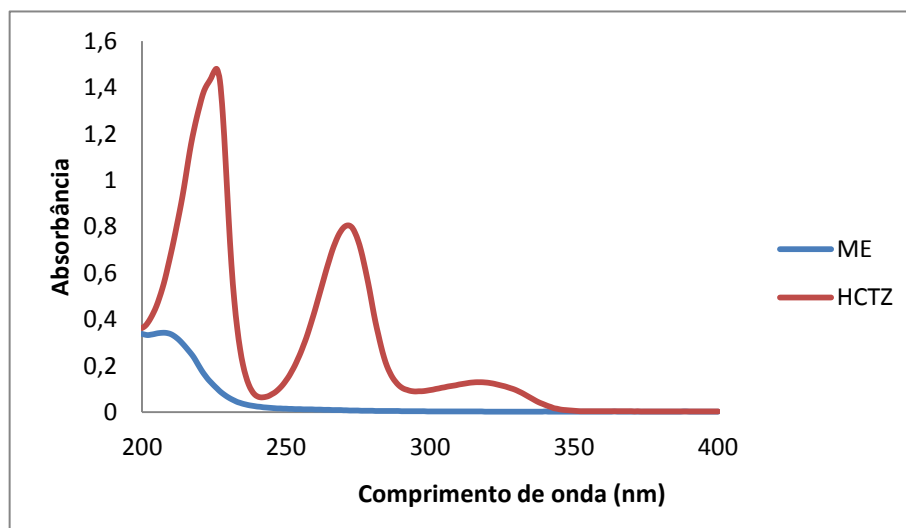


FIGURA 19 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA DO MALEATO DE ENALAPRIL ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) E HIDROCLOROTIAZIDA ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) EM ÁGUA ULTRAPURA.

Foi possível observar a sobreposição das bandas de absorção dos dois fármacos na região de 200 a 250 nm. O maleato de enalapril possui máxima absorção em 210 nm, e a hidroclorotiazida em 225; 272 e 320 nm. Como há a sobreposição completa do espectro do maleato de enalapril pelo espectro da

hidroclorotiazida, ficaria prejudicada a quantificação deste na mistura dos dois fármacos, de maneira simultânea e direta, por espectroscopia no UV com modo univariado. Para resolução desse problema, a melhor alternativa é a utilização da calibração multivariada, por meio do método de regressão PLS. O espectro de absorbância da mistura dos ativos pode ser visto na Figura 20.

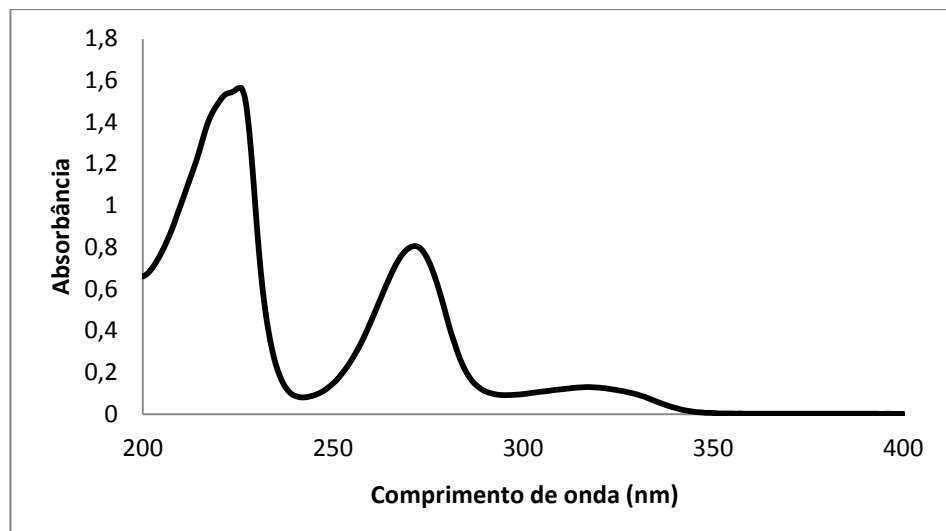


FIGURA 20 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DA MISTURA MALEATO DE ENALAPRIL ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) E HIDROCLOROTIAZIDA ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) EM ÁGUA ULTRAPURA.

Após a análise dos espectros individuais e da mistura, partiu-se para o planejamento experimental. Este foi realizado de acordo com o descrito no Material e Métodos (item 4.3.1). Os espectros das 39 amostras do planejamento foram obtidos no mesmo dia e pelo mesmo operador. Após a obtenção, as amostras foram separadas em amostras de calibração e validação. A seleção das amostras de calibração foi feita preferencialmente com as amostras mais externas e as de validação mais internas do planejamento (Figura 12, p. 48).

A construção dos modelos levou em consideração os pré-processamentos, a seleção de variáveis, avaliação do erro percentual médio de previsão, RMSEC, RMSECV e RMSEP. O RMSEC (Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Calibração), está relacionado ao erro médio obtido com as amostras utilizadas na calibração do modelo, RMSECV ao erro encontrado na validação cruzada e RMSEP ao erro das amostras de validação.

5.3.2 Avaliação dos modelos multivariados

Inicialmente, foram construídos modelos utilizando toda a faixa espectral e com dois tipos de pré-processamentos, centrado na média e centrado na média com primeira derivada. Para seleção de variáveis foi utilizada a técnica de iPLS. Os parâmetros foram definidos com o número de intervalos automático, número de variáveis latentes máximo igual a 3 e o tamanho dos intervalos em 100, 50, 40 e 20 nm para cada pré-processamento.

Após a construção dos modelos, avaliou-se o número adequado de variáveis latentes para cada modelo. Para isso foi avaliado a gráfico de RMSECV x VL, através do qual se observa o número de VL que produz o menor erro de previsão sem perder significativamente a variância dos dados. Para o melhor modelo, o número de variáveis latentes ideal a ser considerado foi de 2 VL (Figura 21), o que era esperado, uma vez que foram utilizados dois fármacos no planejamento. O uso de um número maior de VL não se justificaria, pois não verificou-se diminuição no erro de RMSECV com o aumento do número de variáveis latentes.

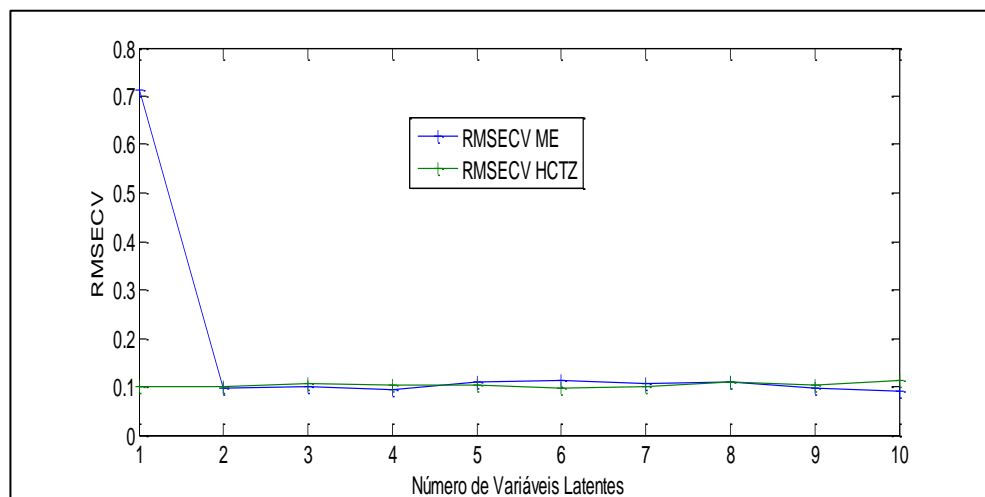


FIGURA 21 – GRÁFICO RMSECV PARA MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA POR NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES.

A detecção de amostras anômalas também é muito importante na avaliação de um modelo, uma vez que essas amostras podem afetar negativamente a capacidade preditiva do modelo. Os *outliers* foram avaliados pelo gráfico de resíduo de Student x *leverage*, com os limites de $\pm 2,5$ e $3(VL)/n$, respectivamente, considerando um limite de confiança de 95%. Para os modelos avaliados, o valor

limítrofe de *leverage* seria 0,25. Não foram identificadas amostras anômalas no modelo construído (Figura 22), pois nenhuma amostra apresentou, simultaneamente, valores maiores que os limites determinados para resíduo de Student e *leverage*.

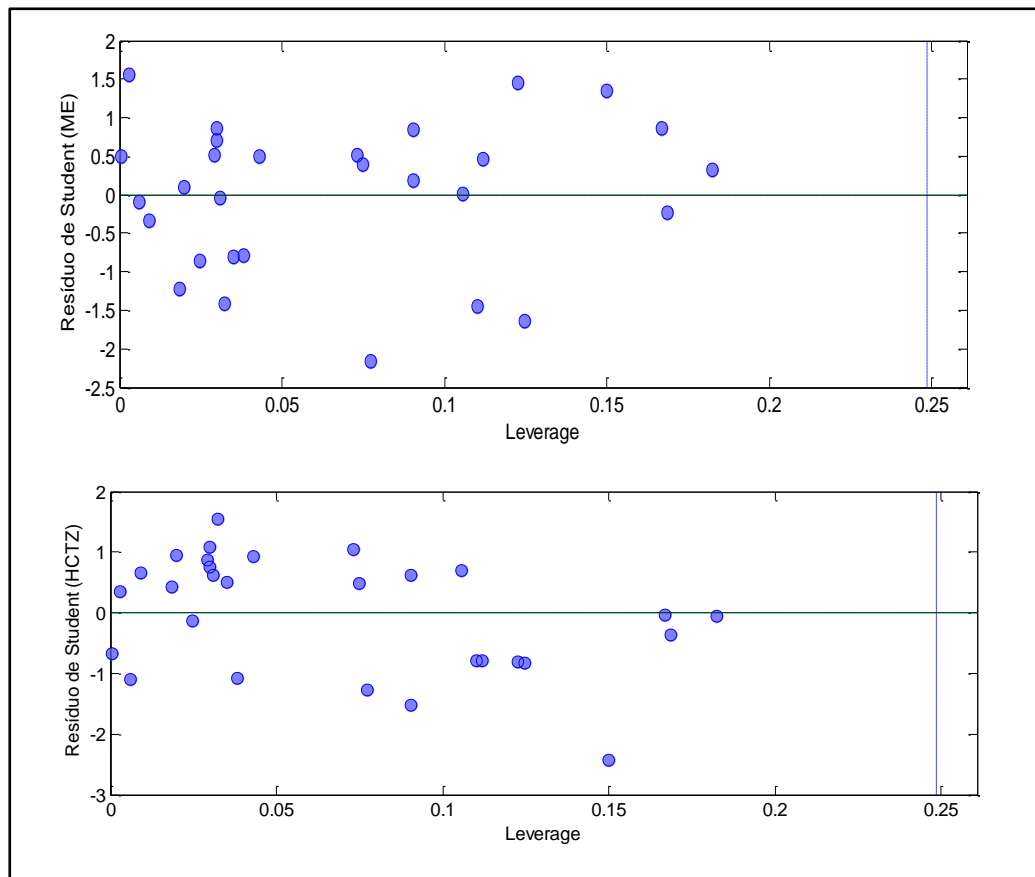


FIGURA 22 – AVALIAÇÃO DE *OUTLIERS* NO MODELO POR UV ATRAVÉS DOS RESÍDUOS DE STUDENT X *LEVERAGE*.

Todos os modelos foram construídos usando PLS2, que quantifica em apenas um modelo dois ou mais fármacos, e o número de variáveis latentes foram escolhidos de acordo com o menor valor de RMSECV (2 VL). Para validação cruzada foi utilizado o método *leave-one-out*.

O melhor modelo utilizou toda a faixa espectral (200-400 nm), duas variáveis latentes, dados centrados na média com primeira derivada. O resumo do melhor modelo com o número de variáveis latentes, faixa, tipo de pré-processamento, coeficiente de correlação, RMSEC, RMSECV e RMSEP está descrito na Tabela 25.

Para o modelo, os coeficientes de determinação (r^2) foram superiores a 0,96, os valores obtidos para RMSEC, RMSECV e RMSEP foram baixos e satisfatórios. A variância explicada nos blocos X e Y e erros de predição também foram determinados (Tabela 26), sendo a variância explicada para os blocos X e Y superior a 99% e o erro médio de predição inferior a 1,5%. Estes resultados sugerem fortemente que o modelo desenvolvido no UV foi adequado a sua finalidade.

TABELA 25 – RESUMO DOS PARÂMETROS ANALISADOS PARA O MELHOR MODELO PARA O MÉTODO POR UV

| Faixa (nm) | VL | Pré-processamento | r^2 | | RMSEC | | RMSECV | | RMSEP | |
|------------|----|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | | | ME | HCTZ | ME | HCTZ | ME | HCTZ | ME | HCTZ |
| 200-400 | 2 | Bloco X: CM + 1ª D Bloco Y: CM | 0,968 | 0,998 | 0,086 | 0,090 | 0,098 | 0,101 | 0,081 | 0,074 |

NOTA: VL: VARIÁVEIS LATENTES; CM: CENTRADO NA MÉDIA; D: DERIVADA; ME: MALEATO DE ENALAPRIL; HCTZ: HIDROCLOROTIAZIDA

TABELA 26 – PORCENTAGENS DE VARIÂNCIA NOS BLOCOS X E Y E ERROS RELATIVOS PARA O MODELO DESENVOLVIDO

| Fator avaliado | Variância Explicada (%) | Erro relativo do modelo (%) |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Bloco X | 99,75 | |
| Bloco Y | 99,46 | |
| Maleato de enalapril | | 1,30 |
| Hidroclorotiazida | | 0,48 |

5.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR UV

A validação analítica é essencial para se garantir a qualidade de qualquer método analítico.

Para se expressar as figuras de mérito para métodos de calibração multivariada, a parte do sinal que está relacionada exclusivamente com o analito de interesse é de grande importância. Este sinal, denominado sinal analítico líquido (NAS), é definido como parte do sinal analítico ortogonal em relação ao sinal dos interferentes presentes na amostra. Com o NAS é possível a estimativa de algumas figuras de mérito, como sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, limites de detecção e limites de quantificação. Para o modelo desenvolvido, estas figuras de

mérito foram determinadas juntamente com *Bias* e RPD e estão relatadas na Tabela 27.

A seletividade representa a porcentagem do sinal analítico que foi utilizada para explicar a variação de cada fármaco. Como o sinal analítico da HCTZ é mais intenso, uma maior porcentagem de sinal pôde ser utilizada para construção do modelo. A porcentagem do sinal utilizada para prever o ME foi menor (22,35%) por só possuir absorção entre 200 e 250. O inverso da sensibilidade analítica ($1/SA$), que representa a quantidade mínima de fármaco que o método consegue diferenciar, é menor para a HCTZ mostrando que o método é mais sensível para esse fármaco do que para o ME. Esses valores de inverso da sensibilidade analítica já eram esperados devido aos valores de seletividade.

TABELA 27 – FIGURAS DE MÉRITO MULTIVARIADAS PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO

| Figura de mérito | Maleato de enalapril | Hidroclorotiazida |
|--|-----------------------------|--------------------------|
| Seletividade (%) | 22,35 | 91,51 |
| Sensibilidade Abs/($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 0,041 | 0,32 |
| Sensibilidade Analítica (SA) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 162,97 | $1,26 \times 10^3$ |
| $1/SA$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | $6,13 \times 10^{-3}$ | $7,93 \times 10^{-4}$ |
| LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 0,0202 | 0,0026 |
| LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 0,0614 | 0,0079 |
| RPD CAL | 6,8 | 15,7 |
| RPD VAL | 4,2 | 15,4 |
| <i>Bias</i> | 0,001 | 0,050 |

A linearidade do método foi avaliada através dos gráficos de valores de referência *versus* valores preditos das amostras de calibração. Os coeficientes de correlação, determinação, intercepto e inclinação estão descritos na Tabela 28. A linearidade também foi avaliada por meio da verificação da aleatoriedade dos resíduos para cada um dos analito (Figura 23 e 24).

TABELA 28 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE NO MÉTODO POR UV

| Parâmetro | Maleato de Enalapril | Hidroclorotiazida |
|---------------------------------|----------------------|-------------------|
| Faixa ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | 4-6 | 10-15 |
| Inclinação | 0,9757 | 0,9969 |
| Intercepto | 0,1209 | 0,03514 |
| r | 0,988 | 0,998 |
| r ² | 0,977 | 0,996 |

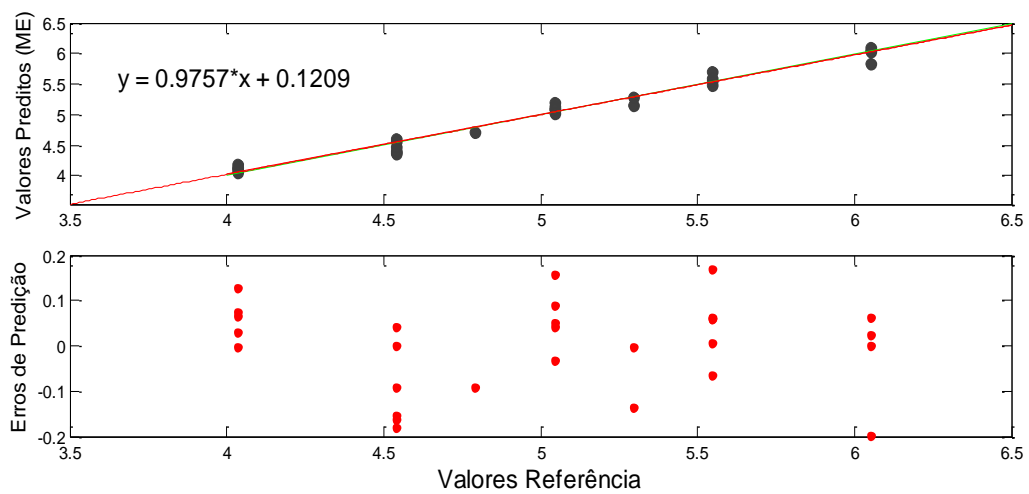


FIGURA 23 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PARA O MALEATO DE ENALAPRIL PELA RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE REFERÊNCIA VS. VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS.

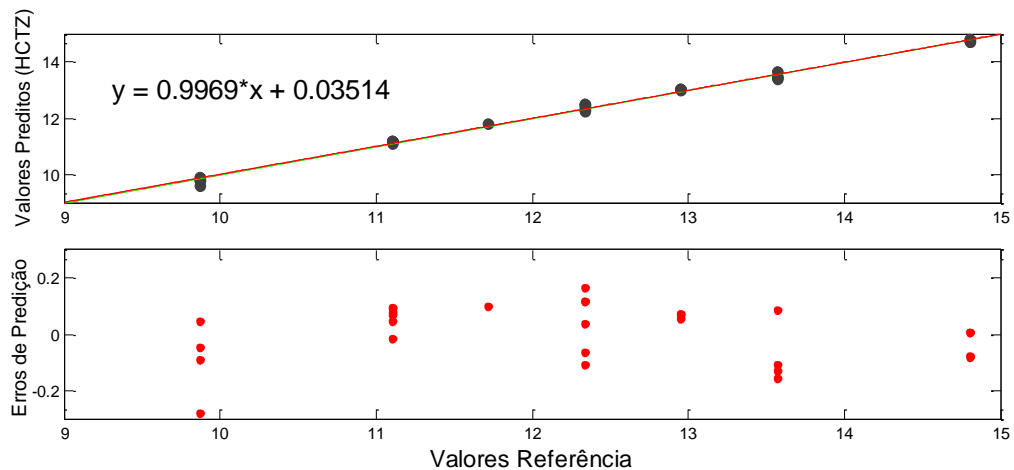


FIGURA 24 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PARA A HIDROCLOROTIAZIDA PELA RELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE REFERÊNCIA VS. VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS.

A precisão no nível repetitividade (intracorrída) e a precisão intermediária, foram avaliadas e os resultados encontram-se nas Tabelas 29 e 30. Cada valor para cada concentração foi realizado em triplicata, e em todas as concentrações o valor de DPR foi menor do que os 5% preconizados pela ANVISA, indicando que o método é preciso.

TABELA 29 – RESULTADOS DA PRECISÃO INTRACORRIDA (REPETITIVIDADE) PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO

| Maleato de enalapril | | | Hidroclorotiazida | | |
|--------------------------------------|---|------|--------------------------------------|---|------|
| Conc. real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Conc. predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | DPR | Conc. real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Conc. predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | DPR |
| 4,012 | 3,99 \pm 0,05 | 1,25 | 10,06 | 10,14 \pm 0,03 | 0,35 |
| 5,04 | 4,97 \pm 0,01 | 0,28 | 12,57 | 12,34 \pm 0,03 | 0,27 |
| 6,27 | 6,10 \pm 0,02 | 0,45 | 15,27 | 15,09 \pm 0,03 | 0,20 |

TABELA 30 – RESULTADOS DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO

| Maleato de enalapril | | | Hidroclorotiazida | | |
|--------------------------------------|---|------|--------------------------------------|---|------|
| Conc. real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Conc. predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | DPR | Conc. real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | Conc. predita ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | DPR |
| 4,02 | 3,97 \pm 0,03 | 0,85 | 9,85 | 9,73 \pm 0,04 | 0,49 |
| 5,02 | 4,97 \pm 0,01 | 0,32 | 12,31 | 12,33 \pm 0,08 | 0,63 |
| 6,03 | 5,83 \pm 0,01 | 0,10 | 14,77 | 14,51 \pm 0,09 | 0,64 |

A robustez foi avaliada através de variações na temperatura das soluções. Foram avaliadas, além da temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), uma temperatura mais baixa ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) e uma temperatura mais elevada ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) no momento da obtenção dos espectros. Os resultados obtidos estão na Tabela 31. Foi realizado um teste t com 95% de confiança, comparando as médias das concentrações obtidas das soluções em temperatura ambiente com as médias das concentrações das soluções a 35°C , a mesma comparação foi feita com as amostras a 18°C , e os resultados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

TABELA 31 – RESULTADOS DA ROBUSTEZ RELACIONADA À TEMPERATURA NO MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO

| Temperatura avaliada | Maleato de enalapril ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | Hidroclorotiazida ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
|----------------------|--|---|
| 23°C | 4,78 \pm 0,07 | 12,08 \pm 0,09 |
| 35°C | 4,69 \pm 0,09 (p=0,15) | 11,98 \pm 0,09 (p=0,14) |
| 18°C | 4,83 \pm 0,05 (p=0,23) | 12,16 \pm 0,11 (p=0,26) |

A estabilidade das soluções foi avaliada comparando os resultados obtidos de amostras recém-preparadas e após 24 horas sob a bancada de trabalho, por teste t com 95% de confiança. Os resultados deste teste estão representados abaixo não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

TABELA 32 – RESULTADOS DA ESTABILIDADE DOS FÁRMACOS PARA O MÉTODO POR UV DESENVOLVIDO

| | Maleato de enalapril ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | Hidroclorotiazida ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
|------------------------------|--|---|
| Solução recém-preparada | 4,77 \pm 0,07 | 12,08 \pm 0,09 |
| Solução após 24h sob bancada | 4,79 \pm 0,06 (p=0,61) | 12,15 \pm 0,08 (p=0,21) |

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS CLAE-UV E UV-PLS

A comparação dos métodos desenvolvidos e validados (CLAE e UV-PLS) foi feita analisando uma amostra comercial (industrial), contendo 10 mg de maleato de enalapril e 25 mg de hidroclorotiazida por comprimido. Os resultados obtidos foram comparados por teste t. Não foi encontrada diferença significativa entre os resultados dos métodos ($p > 0,05$). Assim, os métodos foram considerados adequados para aplicação no controle de qualidade destes fármacos associados em comprimidos.

TABELA 33 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE MALEATO DE ENALAPRIL E HIDROCLOROTIAZIDA EM AMOSTRA COMERCIAL* PELOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS

| Fármaco | Concentração média (mg) \pm DP | |
|----------------------|----------------------------------|-----------------|
| | CLAE | UV-PLS |
| Maleato de enalapril | 10,19 \pm 0,24 | 9,88 \pm 0,16 |

| | | |
|-------------------|------------------|------------------|
| Hidroclorotiazida | $24,95 \pm 0,33$ | $24,81 \pm 0,35$ |
|-------------------|------------------|------------------|

*Valor declarado na amostra comercial: 10 mg de maleato de enalapril e 25 mg de hidroclorotiazida por comprimido.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho dois métodos diferentes foram desenvolvidos e validados para a associação farmacêutica maleato de enalapril e hidroclorotiazida em comprimidos.

O método por CLAE-UV desenvolvido mostrou-se adequado para a quantificação simultânea dos fármacos, na presença do enalaprilato. O método apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis conforme a legislação nacional vigente. As soluções de trabalho se apresentaram estáveis no gerenciador de amostras por 24 h. Na determinação de amostras reais pelo método encontrou-se teores entre 98-100% dos fármacos analisados.

O planejamento fatorial se mostrou uma ferramenta útil para a otimização do método cromatográfico, de maneira mais rápida que a convencional. As principais vantagens do método desenvolvido, quando comparado com os métodos existentes, são a rapidez na análise (tempo total de eluição: 3 minutos), quantificação do enalapril ao invés do maleato, como ocorre nos outros métodos cromatográficos da literatura, e menor temperatura de coluna, preservando o equipamento.

O método por UV-PLS desenvolvido foi considerado satisfatório para determinação de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em amostras comerciais da associação. Foi utilizado PLS-2, no qual o mesmo modelo é utilizado para quantificar os dois fármacos. O melhor pré-processamento para o modelo foi com os dados centrados na média e 1° derivada, com duas variáveis latentes. Foi utilizado todo o espectro (200 - 400 nm) para construção do modelo.

Não foram encontradas amostras anômalas no conjunto de calibração nem no de validação. Os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, seletividade, sensibilidade, sensibilidade analítica (SA) e $1/SA$ foram considerados satisfatórios.

Na determinação dos fármacos em amostras reais por UV-PLS foram obtidos teores entre 97-101% para os fármacos.

Os resultados obtidos pelos métodos CLAE-UV e UV-PLS não apresentaram diferença significativa. Portanto, o método por UV pode ser utilizado como alternativa ao método cromatográfico para determinação de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em comprimidos. As principais vantagens da técnica por UV-PLS

são baixo custo e maior rapidez, sendo uma técnica possível de ser utilizada em farmácias de manipulação onde o controle de qualidade por CLAE-UV é inviável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ARFAJ, N. A. *et al.* Determination of enalapril maleate and atenolol in their pharmaceutical products and in biological fluids by flow-injection chemiluminescence. **Luminescence**, v.24, n. 6, p. 422-428, 2009.

ALZAGA, R. *et al.* A generic approach for the determination of residues of alkylating agents in active pharmaceutical ingredients by in situ derivatization-headspace-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 3, p. 472-479, 2007.

ASTM. **E1655-05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**. ed. West Conshohocken, 2012.

AZZAM, K. M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Simultaneous determination of atenolol and amiloride by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (C4D). **Methods in Molecular Biology**, v. 919, p. 67-78, 2013

BAING, M. M. *et al.* Simultaneous RP-LC determination of losartan potassium, ramipril, and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations. **Chromatographia**, v. 64, n. 5-6, p. 293-296, Sep 2006.

BARAKA, M. M. *et al.* Spectrophotometric and atomic absorption determination of ramipril, enalapril maleate and fosinopril through ternary complex formation with molybdenum (V)-thiocyanate (Mo(V)-SCN). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 56, n. 11, p. 1521-1527, 2008.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003.

BEEBE, K. R.; KOWALSKI, B. R. An introduction to multivariate calibration and analysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 1007-1017, 1987.

BHARDWAJ, S. P.; SINGH, S. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 113-120, 2008.

BHUSHAN, R.; GUPTA, D.; SINGH, S. K. Liquid chromatographic separation and UV determination of certain antihypertensive agents. **Biomed Chromatography**, v. 20, n. 2, p. 217-24, 2006.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1004-1011, 2004.

BRASIL. Hipertensão atinge 24,3% da população adulta. Portal Brasil, 2013. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/hipertensao-atinge-24-3-da-populacao-adulta>> Acesso em 04/02/2014.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde, ANVISA. Resolução RDC Nº 17, DE 16 DE ABRIL DE 2010. “Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.” Diário Oficial da União, Brasília, 16 de abril de 2010. Disponível em: < http://bvsms.saude.gov.br/bvs/as_udelegis/anvisa/2010/res_0017_16_04_2010.html>. Acesso em 13/05/2013

BARTHUS R.C.; MAZO, L.H.; POPPI R.J. UV spectrophotometry and chemometrics methods for simultaneous determinations of riboflavin (VB2), thiamine (VB1), pyridoxine (VB6) and nicotinamide (VPP), **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1638–1643, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e 138 Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em 27/03/2013.

BOZAL, B. *et al.* Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrometric analytical methods. **Journal of AOAC International**, v. 96, n.1, p. 42-51, 2013.

BRO, R. Multivariate calibration: what is in chemometrics for the analytical chemist? **Analytica Chimica Acta**, v. 500, n. 1-2, p.185-194, 2003.

BUTTON, S. T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados. 2005. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/apostila.pdf>>. Acessado em 03/05/2014.

CARLUCCI, G.; DI GIUSEPPE, E.; MAZZEO, P. Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 93, p. 245-248, 1993.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

CUNICO, M. W. M., *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v.9, n.1, p. 23-32, 2008.

EL WALILY, A. F. *et al.* Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by first-derivative ultraviolet spectrophotometric and high-

performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, n. 7, p. 851-856, 1995.

FELIX, F. S.; FERREIRA, L. M. C. Quantification of terbinafine in pharmaceutical tablets using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection and batch injection analysis with amperometric detection. **Talanta**. v. 101, n. 15, p. 220–225, 2012.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p.724-731, 1999.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, 2012.

FUNG, V. *et al.* Hypertension treatment in a medicare population: adherence and systolic blood pressure control. **Clinical Therapeutics**, v. 29, p. 972-984, 2007.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de Processos. In: GIL, E. S. (Ed.). **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2. ed. São Paulo:Pharmabooks, 2007. p. 47-52.

GRADMAN *et al.* Combination therapy in hypertentional. **Journal of American Society of Hypertention**, v. 4, n. 1, p. 42-50, 2010.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. McGraw Hill, 11^a ed. 2006.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, 6^a Ed., Rio de Janeiro,Ed. LTC, 2005

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**. v. 910, p. 2-13, 2012.

HILLAERT, S.; DE GRAUWE, K.; VAN DEN BOSSCHE, W. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several inhibitors of angiotensin-converting enzyme by capillary electrophoresis. **Journal Chromatography A**, v. 924, n. 1, p. 439-449, 2001.

ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2 (R1). Disponível em:<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em 20/05/2010.

JARDIM, P.C.V. *et al.* Hipertensão arterial e alguns fatores de risco em uma capital brasileira. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, v.88, n.4, p. 452–457, 2007.

KANNEL, W.B. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. **JAMA**, v. 273, p.1571–1576, 1996.

LEWINGTON S, *et al.* Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v.360, p.1903–1913, 2002.

LOUHAICHI, M. R. *et al.* Simultaneous determination of pseudoephedrine, pheniramine, guaifenesin, pyrilamine, chlorpheniramine and dextromethorphan in cough and cold medicines by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 78, n. 3, p. 991-997, 2009.

MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH, S. Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, p. 345-353, 2005.

MALTA, D.C. *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis: mortalidade e fatores de risco no Brasil, 1990 a 2006, Saúde Brasil 2008. **Ministério da Saúde**; Brasília. 2009, p. 37-362

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**, Wiley, New York, 1989.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**, 4 ed, Ed. JOHN WILEY & SONS, 2004.

ODOVIC, J. V. *et al.* Correlation between ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and reversed-phase thin-layer chromatography hydrophobicity data for evaluation of angiotensin-converting enzyme inhibitors absorption. **Journal Chromatography A**, v. 1258, p. 94-100, 2012.

OMAR, M.A. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of certain diuretics through ternary complex formation with eosin and lead (II). **Journal of Fluorescence**, v. 20, n. 1, p. 275-281, 2010.

PADWAL, R; STRAUS, S. E.; McALISTER, F. A. Cardiovascular risk factors and their impact on decision to treat hypertension: an evidence-based review. **British Medical Journal**, v. 322, p. 977-980, 2001.

PAWAR, P. Y. *et al.* Development and Validation of a Reversed Phase HPLC Method for Simultaneous Estimation of Enalapril maleate, Hydrochlorothiazide and Paracetamol in Pure and its Pharmaceutical Dosage Form. **Der Pharmacia Sinica**, v. 2 (5), p. 121-127, 2011.

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

PIERIN, A. M. G., MION JR. D., FUKUSHIMA, J.; PINTO, A. R.; KAMINAGA, M. O perfil de um grupo de pessoas hipertensas de acordo com conhecimento e gravidade da doença. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 35, p. 11-18, 2001.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PRASAD, C. V. N.; SANTHOSH, C. K; SREE, J. R. Simultaneous determination of telmisartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in a combined poly pill dosage form by stability-indicating high performance liquid chromatography. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**; v. 1, n. 3, p. 352-359, 2011.

RAINFORTH, M. V. *et al.* Stress reduction programs in patients with elevated blood pressure: a systematic review and meta-analysis. **Current Hypertension Reports**, v. 9, p. 520-528, 2007.

REDDY, L. B. *et al.* Single RP-HPLC method for the estimation of losartan potassium, enalapril maleate and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations. **International Journal of Science Innovations and Discoveries**, v. 1, n. 1, p. 33-40, 2011.

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

RINNAN, A. S.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

ROSÁRIO, T. M. *et al.* Prevalência, controle e tratamento da hipertensão arterial sistêmica em Nobres, MT. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 93(6), p. 672-678, 2009.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry. **Química Nova** v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.

SENA, M. M. *et al.* Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 75-79, 2007.

SIMONA, M. *et al.* Spectrophotometric determination of enalapril through ternary complex formation. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi**, v. 116, n. 3, p. 914-919, 2012.

SKOOG, D.A; WEST, D.M; HOLLER, F.J. & STANLEY, R.C. Fundamentos da Química Analítica, Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed.Thomson, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1 supl.1, p. 1-51, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. A campanha 2014. Disponível em <<http://www.sbh.org.br/geral/acampanha.asp>>. Acesso em 29/08/2014.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

USLU, B.; ÖZDEN, T. HPLC and UPLC Methods for the Simultaneous Determination of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Dosage Forms. **Chromatographia**, v. 76, p.1487-1494, 2013.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Variable Selection, Outlier Detection, and Figures of Merit Estimation in a Partial Least-Squares Regression Multivariate Calibration Model. A Case Study for the Determination of Quality Parameters in the Alcohol Industry by Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8331-8338, 2007.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1278-1287, 2009.

VENKATACHALAM, A.; CHATTERJEE, V. S. Stability-indicating high performance thin layer chromatography determination of Paroxetine hydrochloride in bulk drug and pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, n. 2, p. 312-317, 2007.

VENKATARAMANA J. *et al.* A rapid stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous estimation of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in solid dosage forms. **International Journal of Chemical and Life sciences**, v. 2, n. 1, p. 1060-1063, 2013.

VIDYADHARA, S. *et al.* Analytical method development and validation for simultaneous estimation of enalapril maleate and hydrochlorothiazide by RP-HPLC. **Der Pharma Chemica**, v. 6, n. 1, p. 217-223, 2014.

WALD, D. S. *et al.* Combination therapy versus monotherapy in reducing blood pressure: meta-analysis on 11,000 participants from 42 Trials. **American Journal of Medicine**, v. 122, p. 290-300, 2009.

WYSZOMIRSKA, E. *et al.* Identification and determination of antihypertensives from the group of angiotensin-converting enzyme inhibitors by densitometric method in comparison with HPLC method. **Acta Polonicae Pharmaceutica**, v. 67, n. 2, p. 137- 143, 2010.