

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

AMANDA DIAS FERREIRA

OTIMIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE  
FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS

PONTA GROSSA  
2019

AMANDA DIAS FERREIRA

OTIMIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE  
FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Los Weinert

PONTA GROSSA  
2019

F383            Ferreira, Amanda Dias  
                  Otimização e desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida  
de alta eficiência para determinação de fármacos anti-hipertensivos / Amanda  
Dias Ferreira. Ponta Grossa, 2019.

91 f.

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Los Weinert.

1. Losartana potássica. 2. Hidroclorotiazida. 3. Cromatografia líquida de alta  
eficiência. 4. Planejamento de experimentos. 5. Validação analítica. I. Weinert,  
Patrícia Los. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Química. III.T.

CDD: 543.8

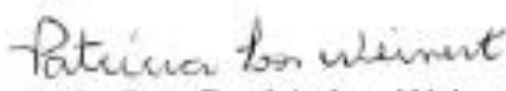
## TERMO DE APROVAÇÃO

AMANDA DIAS FERREIRA


"OTIMIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS"

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

Orientadora :

  
Profa. Dra. Patricia Los Weinert  
UEPG/PR

  
Profa. Dra. Suellen Aparecida Alves  
UEPG/PR

  
Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner  
UNICENTRO/PR

Ponta Grossa, 30 de julho de 2019

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter chegado aqui, pelas batalhas e vitórias que apenas Ele e eu sabemos.

À Profa. Dra. Patrícia Los Weinert a quem tanto admiro por ter oportunizado novos desafios com sua orientação, dando amor, carinho e palavras de incentivo durante todo o desenvolvimento do trabalho.

À Caroline Golembiouski minha amiga querida pelos anos de companheirismo, amizade estando presente durante toda a graduação e mestrado, compartilhando momentos de alegria e tristeza.

Aos meus pais Marcos e Célia que sempre estiveram me incentivando nessa caminhada dando seu amor e estando ao meu lado.

Ao meu irmão Marcos Junior e minha cunhada Maria Carolina que mesmos distantes estiveram dando suporte e incentivo.

Às Profa.(s) Dra.(s) Suellen e Elaine que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e CLABMU pelo apoio e pela infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

*A ciência é muito mais do que  
um corpo de conhecimento. É uma  
maneira de pensar.*

*Carl Sagan*

## RESUMO

O mercado farmacêutico nos últimos anos vem sendo representado como a categoria econômica de maior ascensão, despontando como um dos setores de maior faturamento nacional. Com isso o desenvolvimento de metodologias analíticas para a qualidade dos produtos farmacêuticos é imprescindível, pois assegura o controle, a qualidade e eficácia nos fármacos. Outra ferramenta ainda pouco explorada e utilizada para o desenvolvimento de metodologias é o Planejamento de Experimentos com respostas múltiplas e que possibilita otimizar métodos de forma mais rápida e eficiente. Com isso este trabalho propõem a utilização do Planejamento de Experimentos com aplicação da Função Desejabilidade para determinação de Losartana Potássica (LOS) e Hidroclorotiazida (HCTZ) para determinação em formulações farmacêuticas, urina sintética e água superficial de rio, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção de arranjo de diodos. A partir do planejamento composto central com aplicação da função desejabilidade, a melhor condição obtida foi eluição isocrática; fase móvel ácido fosfórico 0,1%: acetonitrila (60:40, v/v); temperatura 40,0 °C; fluxo 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Para a validação do método, empregou-se o Teste Huber, o qual permitiu definir a faixa linear de trabalho para LOS e HCTZ de 0,2 a 5,0 µg mL<sup>-1</sup> com resíduos abaixo de 5,0% e coeficientes de correlação de 0,9999. Os limites de quantificação obtidos para LOS e HCTZ foram de 0,032 e 0,010 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente. Os limites de detecção foram de 0,010 µg mL<sup>-1</sup> para a LOS e 0,003 µg mL<sup>-1</sup> a HCTZ. O método desenvolvido foi aplicado na análise de amostras comerciais, urina sintética e água superficial de rio obtendo-se recuperações adequadas com boa precisão e exatidão.

**Palavras-chave:** CLAE. Losartana potássica. Hidroclorotiazida. Desenvolvimento analítico. Planejamento de experimentos. Validação analítica.

## ABSTRACT

The pharmaceutical market in recent years is being represented as a growing economic category, emerging as one of highest-grossing national sectors. With this method of analytical quality analysis of pharmaceutical products is essential, as quality control, quality and sales in pharmaceuticals. Another tool still little explored and used in which for the development of methodologies is the Design of Experiments with multiple responses and that allows optimizing methods faster and more efficiently. With that, this study proposes application the experimental design with Derringer's desirability function the determination the Losartan potassium (LOS) and Hydrochlorithiazide (HCTZ) function in the determination tablet dosage form, synthetic urine and river surface water by high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector. By using central composite design with desirability function, the best condition was obtained with isocratic elution; mobile phase of phosphoric acid 0.1%: acetonitrile (60:40, v/v); temperature of 40.0 °C and flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The validated method, used Huber test which enabled set the working range for LOS and HCTZ 0.2-5.0 µg mL<sup>-1</sup> with residues below 5.0% and correlation coefficient 0.9999. The limit quantification for LOS and HCTZ was 0.032 and 0.010 µg mL<sup>-1</sup> respectively, and limit detection was 0.010 µg mL<sup>-1</sup> LOS and 0.003 µg mL<sup>-1</sup> HCTZ. The developed method was applicated in tablet dosage form and synthetic urine and obtaining appropriate recoveries good precision and accuracy.

**Keywords:** HPLC. Losartan potassium. Hydrochlorithiazide. Analytical development. Design experimental. Analytical validation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da Losartana Potássica. ....	19
Figura 2 - Fórmula estrutural da Hidroclorotiazida.....	20
Figura 3 - Espectros de absorção obtidos por espectrofotômetro dos compostos de LOS e HCTZ.....	47
Figura 4 - Efeito do pH no equilíbrio para LOS.....	47
Figura 5 - Efeito do pH no equilíbrio para HCTZ.....	48
Figura 6 - Cromatograma do composto LOS com fase móvel de acetonitrila e ácido fosfórico. ....	49
Figura 7 - Cromatogramas resultantes da variação da fase móvel com acetonitrila e ácido fosfórico 0,1% na proporção (a) 60:40 v/v ; (b) 70:30 v/v e (c) 80:20 v/v. ....	50
Figura 8 - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados: a) Tempo de retenção de HCTZ; b) Tempo de retenção de LOS; c) Área de HCTZ; d) Área de LOS; e) Altura de HCTZ; f) Altura de LOS; g) Resolução de LOS; h) K HCTZ; i) K LOS; j) Fator de encaudamento de HCTZ; k) Fator de encaudamento de LOS.....	53
Figura 9 - Superfície de Resposta obtida pela Função Desejabilidade do modelo quadrático para LOS e HCTZ.....	60
Figura 10 - Superfície de Contorno obtida pela Função Desejabilidade do modelo quadrático para LOS e HCTZ.....	60
Figura 11- Cromatograma da condição otimizada para os compostos LOS e HCTZ. ....	61
Figura 12 - Cromatogramas obtidos para o estudo da especificidade para os compostos a)HCTZ e b)LOS.....	63
Figura 13 - Cromatograma do estudo da seletividade para os compostos de HCTZ e LOS. ....	64
Figura 14 - Teste Huber para o composto LOS.....	65
Figura 15 - Curva analítica para o composto LOS.....	66
Figura 16 - Gráfico dos Resíduos para LOS. ....	67
Figura 17 - Teste Huber para o composto HCTZ.....	68
Figura 18 - Curva analítica para o composto HCTZ.....	68
Figura 19 - Gráfico dos Resíduos para HCTZ.....	70
Figura 20 - Cromatograma de LOS e HCTZ em urina sintética. ....	78

Figura 21- (a) Cromatograma da amostra do branco da água superficial de rio; (b) Cromatograma da fortificação da amostra do rio com adição de LOS e HCTZ. ....	80
Figura 22 - Cromatograma da amostra do branco da água de rio; (b) Cromatograma da fortificação da amostra do rio com LOS=0,032 µg mL <sup>-1</sup> e HCTZ=0,010 µg mL <sup>-1</sup> .....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físicas e químicas da LOS. ....	20
Tabela 2 – Características físicas e químicas da HCTZ. ....	21
Tabela 3 – Ocorrência de fármaco anti-hipertensivos em diversas matrizes. ....	26
Tabela 4 – Amostras dos medicamentos comerciais. ....	39
Tabela 5 – Experimentos realizados para a Exatidão dos compostos de LOS e HCTZ. ....	43
Tabela 6 – Composição da solução experimental. ....	44
Tabela 7 – Estudo da percentagem (%) com a modificação da fase móvel ACN: ácido fosfórico 0,1%, fluxo de 0,8 mL min <sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 µL. ....	50
Tabela 8 – Níveis de estudo da matriz de planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> . ....	51
Tabela 9 – Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com adição de ponto central para LOS. ....	51
Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com adição de ponto central para HCTZ. ....	52
Tabela 11 – Avaliação de R-sqr e F.cal. para as respostas obtidas pelo Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> . ....	56
Tabela 12 – Níveis de estudo da matriz de planejamento composto central. ....	57
Tabela 13 – Matriz do Planejamento Composto Central para o composto LOS. ....	57
Tabela 14 – Matriz do Planejamento Composto Central para o composto HCTZ. ....	58
Tabela 15 – Condições ótimas de Fluxo e Temperatura para cada resposta analisada. ....	59
Tabela 16 – Valores Preditos resultantes da desejabilidade com os valores experimentais obtidos para LOS e HCTZ. ....	61
Tabela 17 – Condições cromatográficas para Nelima et al. (2016) e condição otimizada. ....	62
Tabela 18 – Valores das áreas experimentais e áreas interpoladas para avaliação do resíduo do composto LOS. ....	66
Tabela 19 – ANOVA de regressão linear para a curva analítica de LOS. ....	67
Tabela 20 – Valores das áreas experimentais e áreas interpoladas com a avaliação do resíduo de HCTZ. ....	69
Tabela 21 – Análise da Variância (ANOVA) para a curva analítica de HCTZ. ....	69
Tabela 22 – Comparação da Linearidade e Coeficiente de correlação entre o método de Neelima et al. (2015) e o método otimizado. ....	70
Tabela 23 – Repetibilidade de LOS para o nível de concentração de 0,2; 1,0 e 4,0 µg mL <sup>-1</sup> . ....	71

Tabela 24 – Repetibilidade de HCTZ para o nível de concentração de 0,2; 1,0 e 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .	71
Tabela 25 – Estudo da precisão intermediária entre diferentes dias e analistas para os compostos de LOS e HCTZ.	72
Tabela 26 – Tabela de ANOVA para a concentração de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LOS.	73
Tabela 27 – Tabela de ANOVA para a concentração de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LOS.	73
Tabela 28 – Tabela de ANOVA para a concentração de 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LOS.	73
Tabela 29 – Tabela de ANOVA para a concentração de 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCTZ.	74
Tabela 30 – Tabela de ANOVA para a concentração de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCTZ.	74
Tabela 31 – Tabela de ANOVA para a concentração de 4,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para HCTZ.	74
Tabela 32 – Exatidão para o composto de LOS.	75
Tabela 33 – Exatidão para o composto de HCTZ.	75
Tabela 34 – Limite de Quantificação e Detecção para as amostras de LOS e HCTZ.	76
Tabela 35 – Avaliação quantitativa do princípio ativo em amostras de comprimidos comerciais por CLAE.	77
Tabela 36 – Ensaio dos fármacos de LOS e HCTZ em urina sintética.	79
Tabela 37 – Ensaio de Recuperação e DPR para as amostras de LOS e HCTZ em água de rio.	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
D	Desejabilidade global
$d_i$	Desejabilidade parcial
DAD	Detector arranjo diodos
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Eletroforese capilar
ECC	Eletrocromatografia capilar
ECCM	Eletrocromatografia capilar micelar
HCTZ	Hidroclorotiazida
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and applied chemistry</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental
k	Fator de retenção
LD	Limite de detecção
LOS	Losartana Potássica
log P	Coeficiente de partição
LQ	Limite de quantificação
MET	Metanol
OMS	Organização mundial da saúde
P.A.	Padrão analítico
PFTE	Politetrafluoroetileno
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	constante dissociação ácida
$R_E$	Resolução
SUS	Sistema único de saúde

$t_R$	Tempo de retenção
$t_M$	Tempo de retenção do composto não retido
UV	Ultravioleta
USP	<i>Reference standart</i>
Vis	Visível
W	Largura do pico
$\alpha$	Seletividade

## SUMÁRIO

1	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	16
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	CONTROLE E QUALIDADE DOS FÁRMACOS .....	17
2.2	FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS .....	18
2.3	LOSARTANA POTÁSSICA.....	19
2.4	HIDROCLORITIAZIDA.....	20
2.5	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LOS E HCTZ.....	21
2.5.1	Métodos Espectrofotométricos.....	22
2.5.2	Eletroforese Capilas .....	24
2.5.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	24
2.5.4	Parâmetros Cromatográficos.....	28
2.5.4.1	<i>Tempo de Retenção (<math>T_R</math>)</i> .....	28
2.5.4.2	<i>Fator de Retenção (<math>K</math>)</i> .....	29
2.5.4.3	<i>Seletividade (<math>A</math>)</i> .....	29
2.5.4.4	<i>Resolução (<math>Re</math>)</i> .....	29
2.6	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	30
2.6.1	Função Desejabilidade .....	31
2.7	VALIDAÇÃO .....	32
2.8	ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE.....	33
2.8.1	Linearidade.....	33
2.8.2	Intervalo .....	34
2.8.3	Precisão .....	34
2.8.4	Exatidão .....	34
2.8.5	Limite de Detecção (LD) .....	35
2.8.6	Limite de Quantificação (LQ).....	35
2.8.7	Robustez.....	35
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	38
4.1.1	Reagentes e Solventes .....	38
4.1.2	Equipamentos.....	38
4.1.3	Amostras .....	38

4.2	MÉTODOS .....	39
4.2.1	Preparo das soluções padrão de los.....	39
4.2.2	Preparo da solução padrão de hctz.....	39
4.2.3	Preparo da solução de ácido fosfórico 0,1% .....	40
4.2.4	Procedimento para o preparo das soluções das amostras comerciais .....	40
4.3	ESTUDOS DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	40
4.4	MÉTODO COMPARATIVO PELA TÉCNICA DE ESPECTROFOTÔMETRIA DE UV-VIS.....	41
4.5	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	41
4.6	VALIDAÇÃO .....	41
4.6.1	Seletividade e especificidade .....	41
4.6.2	Linearidade e faixa de trabalho .....	42
4.6.3	Precisão .....	42
4.6.4	Exatidão .....	43
4.6.5	Limite de quantificação (LD).....	43
4.6.6	Limite de detecção (LQ) .....	43
4.7	ANÁLISE DE LOS E HCTZ EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS .....	44
4.8	ANÁLISE DE LOS EM URINA SINTÉTICA .....	44
4.9	ANÁLISE DE LOS E HCTZ EM ÁGUAS SUPERFICIAIS.....	45
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	46
5.1	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS .....	46
5.2	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO EMPREGANDO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS .....	50
5.3	VALIDAÇÃO .....	62
5.3.1	Seletividade e especificidade .....	62
5.3.2	Linearidade e faixa de trabalho .....	64
5.3.3	Precisão .....	71
5.3.3.1	<i>Repetibilidade</i> .....	71
5.3.3.2	<i>Precisão Intermediária</i> .....	71
5.3.4	Exatidão .....	75
5.3.5	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	75
5.3.6	Robustez.....	76
5.4	APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO .....	76
5.4.1	Amostra de fármacos .....	76
5.4.2	Análise do fármaco em urina sintética .....	78
5.4.3	Análise de fármacos em água superficial de rio .....	79
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	82



<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
--------------------------	-----------

## 1 JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial é um dos fatores de risco mais significativos de morbidade e mortalidade no mundo atualmente. Junto com o tabagismo é a principal causa de mortalidade da população mundial. Constitui um fator de risco para doença coronária, junto com o diabetes, tabagismo e acidentes vasculares cerebrais (derrame) (PIERIN, 2004).

Nos últimos quarenta anos pesquisadores têm estudado novos fármacos que possam ser utilizados para o tratamento da hipertensão no qual sejam obtidos menores efeitos colaterais e maiores eficiências. A partir dos anos 80, surgiram os primeiros fármacos anti-hipertensivos que revolucionaram a indústria farmacêutica, sendo eles os mais vendidos em todo o mundo (GUS; KOHLMANN, 2010).

Muitos desses fármacos estão sujeitos a adulteração, devido à grande circulação no mercado, resultando em ineficiência do tratamento, podendo ocasionar sérios problemas aos pacientes. Portanto é fundamental que os desenvolvimentos de métodos analíticos sejam seletivos e eficientes para determinação dos princípios ativos. Na literatura várias técnicas são empregadas para a determinação de fármacos anti-hipertensivos, e a cromatografia é o método mais largamente utilizado, uma vez que é capaz de separar, identificar e quantificar diversos compostos em matrizes simples ou complexas. Dentre os métodos cromatográficos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é amplamente utilizada pois permite a análise de princípios ativos em formulações farmacêuticas, fluidos biológicos e matrizes complexas como águas superficiais.

Neste sentido, o desenvolvimento de metodologias analíticas para quantificação de fármacos anti-hipertensivos como LOS e HCTZ é de grande importância, visto que viabiliza o controle de qualidade dos produtos comercializados com a identificação inequívoca permitindo a análise tanto qualitativa como quantitativa. Uma forma de auxiliar no desenvolvimento dessas metodologias analíticas, sendo uma ferramenta ainda pouco utilizada é a Quimiometria, pois engloba uma série de métodos estatísticos e matemáticos para o tratamento de dados.

Tendo em vista essas informações, o presente trabalho delineou o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de LOS e HCTZ, com auxílio de ferramentas quimiométricas para otimização do sistema cromatográfico. O emprego da ferramenta de planejamento de experimentos e do uso da função desejabilidade que permitiu desenvolver uma metodologia de análise ambientalmente correta (baixo consumo de reagentes, menor geração de resíduos e de menor risco ao operador e ao meio ambiente), simples, rápida e eficiente a qual pode ser adotada como uma alternativa vantajosa em termos de tempo e custo das análises.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CONTROLE E QUALIDADE DOS FÁRMACOS

Nos últimos anos o crescente número de casos relacionados com a falsificação e/ou adulteração de medicamentos, tem sido tratado em muitos países como um problema de saúde pública (MARTINO et al., 2010). Entretanto, este não afeta apenas países emergentes, mas também países desenvolvidos (COCKBURN et al., 2005).

O uso de medicamentos falsificados ou de má qualidade pode resultar na ineficiência do tratamento médico, onde os pacientes podem não receber a quantidade necessária do princípio ativo, provocando sérios danos à saúde, quando os produtos são adulterados ou produzidos deliberadamente com substâncias inadequadas (DRESSMAN; KOCZWARA, 2017; OLIVEIRA, 2011).

Não se tem dados exatos sobre a falsificação e/ou adulteração de fármacos em todo o mundo, já que em muitos países têm sido relutantes em relatar o problema para não alarmar a população ou prejudicar a indústria farmacêutica (COCKBURN et al., 2005). Contudo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 1 a cada 10 produtos farmacêuticos em circulação em países emergentes são falsificados (OMS, 2017c). Segundo OMS, define-se medicamento falsificado como

[...] aqueles deliberada e fraudulentamente rotulados de forma incorreta com relação à identificação e/ou fonte. A falsificação pode se aplicar tanto a produtos de marca quanto a genéricos, sendo que os mesmos podem incluir produtos com princípios corretos ou incorretos, sem princípios ativos, com princípios ativos insuficientes ou com embalagem falsa[...]. (OMS, 1992a, p.1).

A incidência de medicamentos falsificados depende de país para país, e os fatores podem ser: falta de legislação, sanções penais fracas, autoridade regulatórias deficientes ou ausentes, falta de controle de medicamentos para exportação, comércio envolvendo diversos intermediários e zonas livres de comércio, corrupção e conflito de interesses (OMS, 2005b).

No Brasil, na crise ocorrida nos anos de 1998 e 1997, foram recebidas 172 denúncias de medicamentos falsificados (WEINERT et al., 2008). Com essa grande repercussão, algumas medidas importantes foram adotadas como a instituição da Comissão Parlamentar de Inquérito dos Medicamentos, a modificação da lei que tornou a falsificação um crime hediondo e a

aprovação da Política Nacional de Medicamentos. A criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1999 e a sua estruturação e ações no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária também foi fundamental para enfrentar o problema da falsificação e adulteração dos medicamentos vendidos no país. Entretanto, ainda há relatos de casos de adulteração e/ou falsificação de medicamentos no Brasil (HURTADO; LASMAR, 2014).

Dentre os fármacos mais falsificados em todo mundo encontram-se os de uso: anti-infecciosos (21,1%), gínito-urinário (14,5%), cardiovascular (11,6%), sistema nervoso central (11,0%), músculo esquelético (8,1%), metabólico (7,7%) e respiratório (3,8%). Em julho de 2018 nos Estados Unidos, alguns lotes de Valsartan usado no tratamento de hipertensão, foram recolhidos por conter traços de uma impureza, N-nitrosodimetilamina. Essa impureza é classificada como potencial carcinogênico, e foi encontrado na matéria prima de um fornecedor na China (FDA, 2018a). Em novembro de 2018, também ocorreu o recolhimento de lotes de Losartana Potássica e Hidroclorotiazida, usados no tratamento de hipertensão, contendo a mesma impureza (FDA, 2018b). Em janeiro de 2017, testes foram feitos para avaliação da qualidade dos remédios genéricos no Brasil, sendo que Losartana Potássica, não atingiu a quantidade mínima exigida de princípio ativo (FANTÁSTICO, 2017).

## 2.2 FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS

Nos últimos 50 anos, drogas cada vez mais específicas e potentes têm sido propostas para o tratamento da hipertensão. Os tratamentos devem não só reduzir a pressão arterial, mas os eventos cardiovasculares fatais e não fatais (KANNEL, 1996; KOHLMANN; MION, 2006). A eficácia da ação do fármaco no tratamento de hipertensão baseia-se na teoria de que a pressão arterial elevada, por si, produz hiperplasia reativa e alterações fibróticas hialinas nas artérias e arteríolas, bem como a hipertrofia do coração. Recomenda-se o tratamento precoce para que não ocorram alterações anatomopatológicas (SILVA et al., 2006).

Os fármacos anti-hipertensivos são divididos em classes como: diuréticos, betabloqueadores, inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina (BRA II) e antagonistas dos canais de cálcio (ACC) (GUS; KOHLMANN, 2010). A escolha dentre as classes de hipertensivos depende do tratamento e muitas vezes a associação entre ambas as classes traz benefícios aos pacientes. Dentre as classes de IECA e diuréticos, pode-se destacar a Losartana Potássica (LOS) e Hidroclorotiazida (HCTZ) respectivamente, devido ao fato destes princípios ativos terem uma maior eficiência terapêutica e com menores efeitos colaterais. Esses fármacos, especialmente a LOS, encontra-se entre o

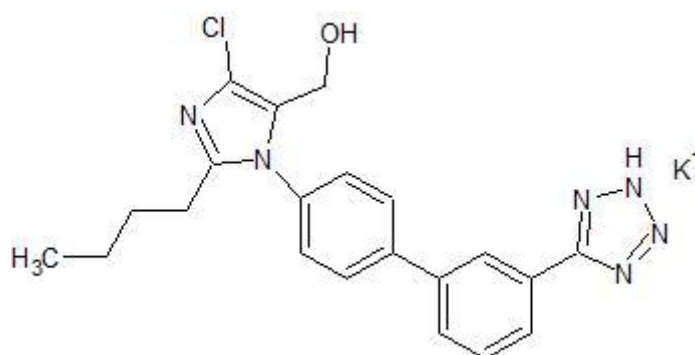
medicamento mais vendido no Brasil (ANVISA, 2016) e dentro do setor dos genéricos a LOS responde sozinha por 5,58% das vendas de genéricos no Brasil, seguido da HCTZ com 2,59% (ANVISA, 2016). A LOS é disponibilizado gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e também pode ser encontrado em associação com HCTZ.

### 2.3 LOSARTANA POTÁSSICA

No ano de 1982, Y. Furakawa e Takeda, da Chemical Industries em Osaka, publicaram que os derivados hipertensivos do ácido imidazole 5-acético, inibiam o efeito da angiotensina II. Com essas descobertas a DuPont Merck Company® em Delaware, iniciaram um projeto de pesquisa que conseguiu otimizar a inibição da antiotensina II, com a DUP 753 ou Losartana. Em 1991 David J. Carini e colaboradores conseguiram sintetizar a Losartana, o qual foi lançado no mercado em 1995 com o nome comercial de Cozzar (LANDAU et al., 1999).

A LOS (Figura 1; Tabela 1) é um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento de pacientes hipertensivos, exerce o bloqueio específico dos receptores da angiotensina II e, portanto, reduz a resistência vascular periférica e volume sanguíneo. Possui atividade metabólica eficiente, seus efeitos colaterais ainda que existentes são considerados mínimos (FARMACOPEIA, 2010).

**Figura 1** - Fórmula estrutural da Losartana Potássica.



Fonte: A autora.

**Tabela 1** – Características físicas e químicas da LOS.

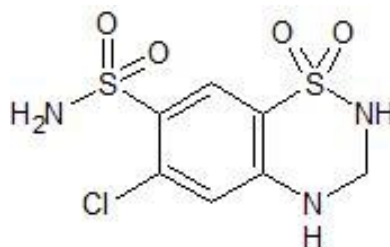
<b>Nome IUPAC</b>	2-butil-4-cloro-1-[[2'-(2H-tetrazol-5-il) [1,1'-bifenil]4-il]metil]-1H-imidazol-4-metanol(1:1)
<b>Fórmula Química</b>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClKN <sub>6</sub> O
<b>Característica Física</b>	Pó branco e cristalino
<b>Solubilidade</b>	solúvel em água, metanol e acetonitrila; insolúvel em acetato de etila, clorofórmio e cloreto de metileno
<b>Massa Molecular</b>	461,0 g mol <sup>-1</sup>
<b>LogP</b>	4,48
<b>Ponto de Fusão</b>	184 °C

Fonte: Farmacopeia, 2010.

## 2.4 HIDROCLORITIAZIDA

A HCTZ (Figura 2; Tabela 2) pertence à classe dos diuréticos tiazídicos que agem preferencialmente inibindo o transporte de sódio e cloro na membrana da parte proximal do tubo contorcido distal, reduzindo o volume sanguíneo plasmático e extracelular (PIMENTA, 2008).

**Figura 2** - Fórmula estrutural da Hidrocloritiazida.



Fonte: A autora.

**Tabela 2** - Características físicas e químicas da HCTZ.

<b>Nome IUPAC</b>	6-Cloro-1,1-dioxo-3,4-diidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida
<b>Fórmula Química</b>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
<b>Característica Física</b>	pó cristalino, branco e inodoro
<b>Solubilidade</b>	solúvel em etanol, acetona, acetonitrila e metanol; insolúvel em água
<b>Massa Molecular</b>	297,74 g mol <sup>-1</sup>
<b>log P</b>	-0,07
<b>Ponto de Fusão</b>	273-275 °C

Fonte: O' Neil, 2001.

Tanto a LOS como HCTZ são comercializados sozinhos ou associados a outros princípios ativos. Em alguns casos, combinações entre princípios ativos torna-se necessária para que o tratamento se torne mais eficiente. A combinação desses agentes faz com que a ação anti-hipertensiva apresente ações complementares, sinérgicas e ocorrência de menos eventos adversos. Algumas associações encontradas podem ser: Losartana Potássica com Besilato de Anlodipina, Hidroclorotiazida e Captopril, ou Losartana Potássica com Hidroclorotiazida. A associação entre LOS e HCTZ apresenta maior eficácia para a redução da pressão sanguínea. Estudos demonstraram que combinações entre LOS e HCTZ proporcionam uma redução da pressão arterial superior ao alcançado por monoterapia, ou seja, com princípios ativos separados ou com outros princípios ativos (LACOURCIÈRE; POIRIER, 2008), e por este motivo neste trabalho estes analitos foram selecionados para estudo.

A hipertensão arterial é considerada um dos grandes problemas da saúde pública na atualidade, e conseqüentemente o consumo desses fármacos nos últimos anos cresce rapidamente. Assim a necessidade do controle de qualidade desses fármacos fica evidente, necessitando o desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de LOS e HCTZ de forma simples, rápido, de fácil execução e que forneçam resultados confiáveis para uma avaliação da qualidade dos produtos comercializados.

## 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE LOS E HCTZ

Para o desenvolvimento de novas metodologias analíticas alguns fatores devem ser considerados como: custo, viabilidade, tempo de análise, facilidade para execução e confiabilidade do método para garantir que os resultados estejam exatos e reprodutíveis em qualquer laboratório. A cada dia milhares de laboratórios efetuam milhões de medições e existe a necessidade de uma grande infraestrutura para que dados analíticos sejam consistentes e que

uma vez efetuada a medição esta seja aceita em qualquer país, logo, requisitos legais, certificação e credenciamento devem ser observados (BARROS et al., 2001).

A literatura descreve métodos analíticos para determinação da LOS em produtos farmacêuticos empregando diferentes técnicas, tais como: a cromatografia líquida de alta eficiência (AMNA; ELSADIG, 2016; BRURETTO et al., 2009; MOHAMMED et al., 2013; PATIL et al., 2009; RAO; SRINIVAS, 2010; SIDDIQUI et al., 2011), cromatografia líquida de alta eficiência em camada delgada (KOLSURE et al., 2014; MEYYANATHAN SELVADURAI, 2011), eletroforese capilar (AKESOLO; GONZÁLES, 2002), eletrocromatografia capilar (QUAGLIA et al., 2002); voltametria de redissolução catódica (HABIB et al., 2008), voltametria cíclica (ALI; HASSAN, 2014) e espectrofotometria (ANSARI et al., 2004; BHATIA; SINGHVI, 2006; GIRIDHAR; PRABHAKAR, 2002; LASTRA et al., 2003; RAHMAN et al., 2006).

Para HCTZ, a literatura descreve as seguintes técnicas para sua determinação: cromatografia líquida de alta eficiência (ALI et al., 2016; HUANG et al., 2006; JOSHI et al., 2010; SHAALAN et al., 2017), voltametria de redissolução adsortiva (HUDARI et al., 2018), voltametria cíclica (MACHINI et al., 2015), voltametria de pulso diferencial (SALAMANCA-NETO et al., 2016), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (GADEPALLI et al., 2014; PATEL et al., 2014b; SHAH et al., 2017), eletroforese capilar (HILLAERT; VAN DE BOSSCHE, 2003; WANG, 2003) e espectrofotometria (ABDELWAHAB, 2016; ERK, 2002; LAKSHMI; LAKSHMI, 2010a).

Para determinação de LOS e HCTZ em associação a literatura descreve as seguintes técnicas: cromatografia líquida de alta eficiência (HOSSEN et al., 2011; OBANDO et al., 2008; SMAJIC et al., 2013), cromatografia líquida de alta eficiência em camada delgada (BARI; SATHE, 2007; LAKSHMI; LAKSHMI, 2012b), eletroforese capilar (BALLESTEROS et al., 2007; QUAGLIA et al., 2002), voltametria de pulso diferencial (SANTOS et al., 2013) e espectrofotometria (MAGGIO et al., 2008).

### 2.5.1 Métodos Espectrofotométricos

Análises espectrofotométricas baseadas em medidas de absorção ultravioleta (UV) e visível (Vis) encontram vasta aplicação para identificação e determinação de uma grande variedade de espécies inorgânicas e orgânicas (SIDDIQUI et al., 2013). Métodos baseados em medidas no UV são relativamente sensíveis, entretanto, existe a dificuldade de se trabalhar



nessa região do espectro, pois os excipientes comumente encontrados nos fármacos podem estar presentes, interferindo nas medidas uma vez que também absorvem radiação nesta região do espectro. Visando eliminar este tipo de interferência, os métodos espectrofotométricos baseados em medidas no ultravioleta utilizam do recurso matemático de derivação dos espectros. Todavia, o inconveniente reside no uso de formas sofisticadas de tratamento matemático das medidas para a quantificação do sinal obtido, pois requer do operador um bom conhecimento matemático para o tratamento correto dos espectros obtidos (SIDDIQUI et al., 2013).

Nagavalli et al. (2010) propuseram o uso da espectrofotometria com medidas de UV, para a quantificação de LOS e HCTZ em formulações farmacêuticas. As medidas de absorvância foram medidas, no intervalo de 230,5 – 350,4 nm na ordem zero do espectro. Uma relação linear foi encontrada para LOS e HCTZ de 8,0 – 40,0 e 3,0 – 15,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. O método proposto foi validado, e nas análises de amostras comerciais obteve-se a recuperação média de  $99,3 \pm 0,3$  a  $101,3 \pm 0,6$  %.

Vetuschi e Giannandrea (2006) propuseram a quantificação da LOS e HCTZ na região do UV. Foram realizadas sucessivas derivadas e avaliaram que a melhor seletividade analítica foi alcançada na quarta derivada, e absorvâncias foram lidas entre 280 – 290 nm. As faixas de linearidades obtidas foram de: 10,0 – 500,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para HCTZ e, 40,0 – 2000,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LOS. Foram verificadas as figuras de méritos da validação, fornecendo recuperações de  $99,4 \pm 1,3$  % para HCTZ e  $100 \pm 1,1$  % para LOS.

Bathia et al. (2013), realizaram o estudo de um método baseado no espectro de primeira derivada para quantificar LOS e HCTZ. Para o método as absorvâncias foram lidas em 257 nm para LOS e 243 nm para HCTZ, e a linearidade ficou entre 10,0 – 90,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LOS, e 2,5 – 22,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para HCTZ. As recuperações obtidas foram de  $100,87 \pm 1,186$  % para LOS e  $99,84 \pm 0,7453$  % para HCTZ.

Patel e Captain (2013a) desenvolveram um método espectrofotométrico baseado na reação de complexação da losartana com solução de ferroína em meio tamponado em pH 7,0 produzindo um complexo, que após extração com clorofórmio apresentou coloração púrpura, com absorvância máxima em 571 nm. As condições experimentais foram determinadas por estudo univariado. O clorofórmio foi selecionado como o melhor solvente quando comparado a diclorometano ou benzeno. A faixa de trabalho foi de 25,0 – 300,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O método foi validado de acordo com as orientações da International Conference on Harmonization (ICH) e mostrou-se preciso e exato. Apesar da boa sensibilidade e ausência de interferência de matriz,

o procedimento é demorado e laborioso. Além disto, o uso de clorofórmio é desfavorável, pois oferece riscos tanto ao operador como ao meio ambiente.

### 2.5.2 Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação, e baseia-se na migração de compostos iônicos ou ionizáveis na presença de um campo elétrico. Esta técnica tem sido amplamente utilizada em diversas áreas como industrial, clínica, biomédica e ambiental. Todavia, a técnica de EC tem baixa sensibilidade resultante das pequenas dimensões do capilar; os analitos que são neutros (não possuem mobilidade eletroforética) não conseguem ser detectados; variações no pH afetam a carga das moléculas e o fluxo do EC. (HARRIS, 2005).

Quaglia et al. (2002) propuseram dois métodos de eletroforese: a eletroforese capilar (EC) e a eletrocromatografia capilar (ECC) para determinação de LOS e HCTZ. Para método de EC a separação foi executada em coluna capilar não empacotada com solução de borato em pH=9,0 contendo trimetil-p-ciclodextrinas. Utilizando a ECC a separação foi executada em coluna empacotada com C18 e fase móvel foi uma mistura de acetato de amônia ( $50,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , pH=7,0) água e acetonitrila (1/1; 5/7; 5, v/v/v). Ambos os métodos foram aplicados na análise de formulações farmacêuticas com resultados precisos e exatos.

Hillaert e Van de Bossche (2003) propuseram o uso da eletroforese capilar (EC) e eletrocromatografia capilar micelar (ECCM) para simultaneamente separar seis antagonistas-receptores da angiotensina II. Os métodos foram aplicados na análise de misturas binárias dos fármacos em formulações farmacêuticas fornecendo boa separação. Ambos os métodos foram validados em termos de sua linearidade da resposta, reprodutibilidade e precisão.

### 2.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE é das técnicas cromatográficas mais usadas em todos os campos da ciência; sua utilização envolve uma alta sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas, separação de espécies termicamente frágeis e uma ampla aplicabilidade. A aplicação vai desde proteínas, aminoácidos, ácido nucleicos, fármacos, pesticidas e muitos outros (COLLINS et al., 2006).

Atualmente a CLAE é usada comumente para determinação de fármacos em várias matrizes, pois possui uma alta reprodutibilidade, exatidão, precisão e robustez. Na literatura há

vários estudos reportados utilizando a técnica para determinação de LOS e HCTZ como é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Ocorrência de fármaco anti-hipertensivos em diversas matrizes.

(continua)

Analito	Matriz	Fase móvel (v/v)	Detector	Faixa de linearidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Referência
LOS e Clortalidona	fármaco	ACN:H <sub>2</sub> O (80:20)	UV-Vis	LOS e Clortalidona (20-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	ANEESH et al., 2015
LOS e Anlodipino	fármaco	ACN: tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,005 M (50:50), pH=3,0	UV-Vis	LOS (1,25-7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Anlodipino (0,12-0,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RAMYA et al., 2012
LOS, HCTZ e Atenolol	fármaco	ACN: tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,050 M (50:50), pH=3,5	UV-Vis	LOS (5,0-60,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); HCTZ (2,5-15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Atenolol (5,0 – 60,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	KAVITHA; MURALIDHARAN, 2010
LOS e metabólito E-3174	urina e plasma	ACN: tampão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25,0 mM (60:40), pH=3,4	Fluorescência	LOS (50,0 – 100,0 ng mL <sup>-1</sup> )	FARTHING et al., 1997
LOS e Perindopril Erbumina	fármaco	ACN: H <sub>2</sub> O acidificada com CH <sub>3</sub> COOH pH=3,0 (50:50)	UV-Vis	LOS/Perindopril (1,0/30,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CHAUDHARY et al., 2010
LOS, Irbesartana, Valsartana, Candesartana e o metabólito Candesartana M1	plasma	ACN: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5,0 mM , pH= 4,0	Fluorescência	LOS (16,0 – 250,0 ng mL <sup>-1</sup> ); Irbesartana e Valsartana (50,0 – 4000,0 ng mL <sup>-1</sup> ); Candesartana e metabólito M1 (3,0 – 250,0 ng mL <sup>-1</sup> )	GONZÁLES et al., 2002
HCTZ, Aspirina, Ramipril, Sinvastatina e Atenolol	fármaco	MET : H <sub>2</sub> O	UV- Vis	HCTZ (5,0 – 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Aspirina (40,0 – 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Ramipril (2,0 – 6,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Sinvastatina (8,0 – 24,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Atenolol (20,0 – 60,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RAO; SAVITH, 2014

Tabela 3 - Ocorrência de fármaco anti-hipertensivos em diversas matrizes.

(continua)

Analito	Matriz	Fase móvel (v/v)	Detector	Faixa de linearidade ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Referência
HCTZ e Atenolol	fármaco	ACN: tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (70:30)	UV – Vis	HCTZ (10,0 – 60,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Atenolol (20,0 – 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	GHOSH; INDRANI, 2014
LOS e HCTZ	fármaco	ACN: tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M; pH= 4,0 (35:65)	UV-Vis	LOS (3,0 – 7,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) HCTZ (0,5 – 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CARLUCCI et al., 2000
LOS e Clortalidona	fármaco	ACN: $\text{H}_2\text{O}$ (50:50)	UV-Vis	LOS (10,0 – 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) Clortalidona (5,0 – 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	HINGE et al., 2016
LOS e HCTZ	fármaco	ACN: tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH=3,1 (35:65)	UV- Vis	LOS e HCTZ (2,0 – 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	OBANDO et al., 2008
LOS, HCTZ e Anlodipino	fármaco	ACN: $\text{H}_2\text{O}$ : tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH=2,7 (45:35:20)	UV-Vis	LOS (50,0 – 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); HCTZ (12,5 – 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Anlodipino (2,5 – 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	TENGLI et al., 2013
LOS e HCTZ	fármaco	METANOL: ACN: tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (45:20:35)	UV-Vis	LOS (0,01 – 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); HCTZ (0,025 – 0,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	SMAJIC et al., 2013
LOS e HCTZ	fármaco	$\text{H}_2\text{O}$ : METANOL: ACN (60:38:30)	UV-Vis	LOS (2,0 – 48,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); HCTZ (0,5 – 12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	SHAKYA, 2015
LOS	fármaco	METANOL:ACN	UV-Vis	LOS (5,0 – 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	JAIN et al., 2018
LOS e HCTZ	fármaco	ACN: $\text{H}_2\text{O}$	UV-Vis	LOS (2,0 – 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) HCTZ (5,0 – 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	NIDHAL et al., 2019

O princípio da CLAE deste método baseia-se onde analitos são aplicados a uma fase móvel no qual são transportados a uma superfície (fase estacionária), e as diferenças nas interações (afinidade) do analito com a superfície faz com que ocorra a separação diferencial dos componentes da mistura, devido a diferentes interações do analito com a fase móvel/estacionária (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

A fase móvel ou eluente, pode ser um gás, um líquido, ou um fluido supercrítico, assim sendo pode-se subdividir em cromatografia líquida (CL) ou cromatografia gasosa (CG). A fase estacionária é fixa e condicionada dentro da coluna (tubo de vidro ou metal), no qual existe uma grande variedade de tipos de colunas específicas para cada tipo de análise. Conforme o analito vai passando pela coluna, o tempo que ela permanecerá, dependerá da interação com a fase móvel ou estacionária, ou seja, se o analito apresentar uma maior interação com a fase estacionária, irá permanecer por menor tempo na fase móvel e se deslocará lentamente através da coluna (COSKUN, 2016).

A CLAE pode ser classificada em quatro técnicas distintas sendo caracterizada pelo modo dominante de interações moleculares empregadas, sendo: *fase normal* (fase móvel apolar e fase estacionária polar); *fase reversa* (fase móvel polar e fase estacionária apolar); *troca iônica* (separação por afinidade entre diferentes analitos iônicos com contra íons na superfície estacionária) e *exclusão por tamanho* (a separação do analito baseia-se nas dimensões físicas) (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007).

Os detectores usados na CLAE, são sensíveis e dependem da amostra a ser analisada. Detectores de fluorescência ( $1,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-6}$  mg), possuem limites de detecção mais sensíveis, porém, são limitado a grupos moleculares específicos, onde estes conseguem florescer. Com detectores de UV ( $1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-3}$  mg), existe maiores possibilidade de análises, sendo o detector mais amplamente utilizado em análises de fármacos (COSKUN, 2016).

## 2.5.4 Parâmetros Cromatográficos

### 2.5.4.1 Tempo de retenção ( $t_R$ )

Cada analito específico em um cromatograma é representado por um pico. O tempo decorrido entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico do soluto no detector da coluna é chamado de tempo de retenção ( $t_R$ ), sendo amplamente usado para descrever o comportamento do analito. No entanto mesmo sendo facilmente mensurável depende de outros fatores como a

vazão e a estabilidade do fluxo que influenciam o sistema e alteram facilmente o  $t_R$  (COLLINS et al., 2006).

#### 2.5.4.2 Fator de retenção ( $k$ )

O fator de retenção ( $k$ ) descreve a velocidade de migração dos solutos na coluna; é um dado cromatográfico muito conveniente, já que é adimensional e independe da vazão da fase móvel e dimensões da coluna. É calculado pelas razões do tempo das moléculas que ficam retidas na fase estacionária com aquelas que percorrem na fase móvel, e pode ser calculada a partir da Equação 1 (COLLINS et al., 2006).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

$t_R$  = tempo de retenção do composto;

$t_M$  = tempo de retenção de um composto não retido.

#### 2.5.4.3 Seletividade ( $\alpha$ )

É a habilidade de um sistema cromatográfico de diferenciar diferentes analitos, sendo dependente da natureza dos analitos e sua interação com a fase estacionária.

A seletividade é determinada como a relação do fator de retenção de dois analitos, ou dos tempos de retenção (COLLINS et al., 2006).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (2)$$

#### 2.5.4.4 Resolução ( $R_E$ )

A  $R_E$  fornece uma medida quantitativa da sua habilidade em separar dois analitos e é calculada a partir da Equação 3.

$$R_E = 2 \frac{t_{RB} - t_{RA}}{w_A + w_b} \quad (3)$$

$w_a$  e  $w_b$  = largura dos picos na base (unidade de tempo).

Quando  $R_E = 1$ , os picos estão razoavelmente separados. Maiores valores de resolução indicam melhor separação,  $R_E = 1,25$  é suficiente para fins quantitativos e  $R_E > 1,5$  indica separação completa dos compostos (COLLINS et al., 2006).

## 2.6 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A utilização de planejamentos de experimentos baseados em princípios estatísticos é, em geral, a maneira mais eficiente para se estimar os efeitos de várias variáveis simultaneamente (AGUIAR; WERKEMA, 1996a; AGUIAR; WERKEMA, 1996b; BARROS et al., 2001). Com esta ferramenta é possível extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis com um número mínimo de ensaios. Na prática isso significa diminuição de horas trabalhadas, de gastos com reagentes e mais agilidade no desenvolvimento de novos produtos, processos ou métodos, além do melhor entendimento do sistema, melhor controle e consequentemente obtenção de resultados mais confiáveis, dentre outras vantagens (BARROS et al., 2001).

O planejamento de experimentos não propõe uma rota única a ser seguida, mas direciona a condução dos experimentos de forma a atingir a meta estabelecida, para tanto deve-se: selecionar as variáveis independentes a serem avaliadas; selecionar os níveis em que cada variável será avaliada e projetar o planejamento do experimento de forma que se possa ser obtida exatamente o tipo de informação desejada (BARROS et al., 2001).

Na cromatografia em grande parte dos casos, os experimentos iniciais, são avaliados para estimar a influência dos fatores em vários níveis no processo cromatográfico, como: temperatura, fase móvel, fluxo, volume de injeção, etc. Com isso, a avaliação dos fatores se faz necessária, para otimizar o processo, obtendo-se o melhor nível dos fatores para a condição cromatográfica.

Em função disso, nos últimos anos, a utilização da cromatografia com planejamento de experimentos, foi relevante para a pesquisa, aumentando significativamente os estudos nessa área, devido a superioridade e precisão com que os resultados são processados; a possibilidade de otimização simultânea de múltiplas respostas, promovendo uma investigação mais ampla entre os fatores (HIBBERT, 2012).



Dentre os estudos já relatados na literatura, Kalariya et al. (2014) propõe um método para determinação de Moxifloxacin, utilizando a otimização multivariada com CLAE. Três fatores foram estudados para serem otimizados: volume de metanol na fase móvel, pH do tampão e o fluxo. O planejamento escolhido foi o planejamento fatorial composto central, para o estudo da metodologia de superfície. O autor conseguiu otimizar o método e validá-lo, e as figuras de mérito ficaram dentro dos padrões estabelecidos.

Kumar et al. (2015) sugeriu a otimização para determinação de Valsartan, utilizando planejamento fatorial  $3^3$  estudando os fatores: acetonitrila na fase móvel, comprimento de onda e pH do tampão. A otimização multivariada obteve ótimos resultados com porcentagem de recuperação de 98,57 – 100,27 %. Pelas respostas estudadas houve boa simetria de pico, fator de encaudamento e número de pratos teóricos adequados.

No mesmo sentido Srinubabu et al. (2007) desenvolveram um método para determinação de Voriconazol em formulações farmacêuticas. Escolheram o planejamento composto central, otimizando: fluxo, volume de acetonitrila e pH. O método proposto foi otimizado e validado, e se mostrou seletivo para as amostras, onde apresentou linearidade excelente e taxas de recuperação entre 99,81 a 0,27 %.

### 2.6.1 Função de Desejabilidade

Visto que a otimização multivariada é de grande relevância na avaliação dos parâmetros cromatográficos, a Função Desejabilidade proposta por Derringer e Suich (1980), utiliza e propõe a metodologia de otimização simultânea de várias respostas. Derringer e Suich estabeleceram que para resposta individual (função de desejabilidade parcial,  $d_i$ ) pode ser calculada uma função de desejabilidade global (D) (BARROS et al., 2001). O procedimento da utilização da função desejabilidade, é primeiramente converter cada resposta individual em  $d_i$ , que varia no intervalo

$$0 \leq d_i \leq 1 \quad (4)$$

Se a resposta está no seu objetivo alvo, então  $d_i = 1$ , e se a resposta está fora de uma região aceitável,  $d_i = 0$ . Então as variáveis do planejamento são escolhidas para maximizar a desejabilidade (MYERS et al., 2009).

A desejabilidade global é dada pela média geométrica das desejabilidade individuais, indicada pela Equação 5:

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (5)$$

onde  $m$  são as respostas.

A partir da fórmula, a otimização simultânea das várias respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global. Vantagens da função de desejabilidade, são eficiência, economia e objetividade na otimização de procedimentos com múltiplas respostas, no qual permite que o analista encontre condições (níveis de fatores) para atingir simultaneamente o valor ótimo para todas as variáveis (MYERS et al., 2009). O processo de otimização simultânea é reduzido ao calcular os níveis das variáveis que maximizem, indicado pela Equação 6 (NOVAES et al., 2017).

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{se } L \leq y \leq T \\ 1 & \text{se } y > T \end{cases} \quad (6)$$

- $L$  é o menor valor aceitável para a resposta;
- $S$  é o peso, quando  $s = 1$ , a função de desejabilidade é linear,  $s > 1$ , uma maior importância é dada aos valores perto do ótimo (NOVAES et al., 2017).

## 2.7 VALIDAÇÃO

Todos os anos são praticadas milhões de medições analíticas. A partir desse processo, uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, desde que requisitos legais, certificação e credenciamento devem ser observadas. As normas internacionais, nacionais e sistemas de qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos. A validação de métodos é essencial para a garantia da qualidade analítica (BARROS et al., 2001).

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendidos são atendidos. A validação do método analítico permite demonstrar que o método é “adequado ao uso” pretendido (BARROS et al., 2001).

As técnicas analíticas usadas no desenvolvimento ou para determinação de suas características relacionadas devem ser validadas. Quando o método é descrito em farmacopeias, não é necessária à validação desde que as análises devam prosseguir com estrita observação no

texto. Quando há modificação na composição de fármacos é necessário reavaliar a técnica analítica (ÉPSHTEIN, 2004).

A validação é um processo contínuo que começa com planejamento de estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Com a regulamentação o registro de novos produtos deve atender aos órgãos regulatórios do Brasil e de outros países, por isso a maioria deles tem estabelecidos documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (RIBANI, 2004).

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO), os quais podem acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios. Um bom método de validação requer validação rápida sem perder a qualidade das estimativas (FERREIRA; RIBEIRO, 2008; RIBANI, 2004). O procedimento para a validação de métodos analíticos na ANVISA RDC N° 166 de 24 de Julho de 2017, e no INMETRO documento DOQ-CGCRE-008 (ANVISA, 2017; FERREIRA; RIBEIRO, 2008; INMETRO, 2003). Os parâmetros definidos segundo a ANVISA, podem ser descritos da seguinte forma (ANVISA, 2017).

## 2.8 ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE

A especificidade ou seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impureza, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise qualitativa é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Para análise quantitativa e análise de impureza, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Nos métodos cromatográficos, deve ser comprovada a pureza cromatográfica do sinal do analito.

### 2.8.1 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5

concentrações diferentes para soluções preparadas em, no mínimo, triplicata. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser acima de 0,990. Nos testes estatísticos, deve ser utilizado um nível de significância de 5%. Os dados devem estar representados graficamente em resposta da função da concentração do analito; gráfico da dispersão dos resíduos e avaliação estatística. Avaliação da regressão da reta de  $y$  em  $x$ , estimada pelo método dos mínimos quadrados.

### 2.8.2 Intervalo

O intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente 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 adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

### 2.8.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

*Repetibilidade*: concordância entre os resultados dentro das mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação em uma única corrida analítica.

*Precisão intermediária*: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em pelo menos dois dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

*Reprodutibilidade*: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medida e mediante testes estatísticos adequados.

### 2.8.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Pode ser verificada a partir de, no mínimo, nove

determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três replicatas em cada nível. A exatidão deve ser representada pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionada à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada a concentração teórica correspondente.

#### 2.8.5 Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção pode ser estabelecido por meio da relação sinal-ruído ou baseado em parâmetros da curva analítica.

#### 2.8.6 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito. O limite de quantificação pode-se estabelecer os mesmos adotados pela LD, método sinal ruído ou parâmetros da curva analítica.

#### 2.8.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez.

Para a CLAE, a ANVISA especifica quais são os fatores que devem ser considerados, e adequadamente controlados no procedimento para determinação da robustez no método analítico, como:

- Variação do pH da fase móvel;
- Variação na composição da fase móvel;
- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas;
- Temperatura;

- Fluxo da fase móvel

No caso de métodos quantitativos, a variação dos resultados obtidos deverá ser avaliada com os mesmos critérios utilizados pela exatidão. No caso de métodos qualitativos, deve ser verificado se as variações propostas interferem na resposta analítica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento, otimização e validação de um método cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos para quantificação de fármacos anti-hipertensivos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os parâmetros experimentais, por meio do planejamento de experimentos com a utilização da Função Desejabilidade para avaliação de mais de uma resposta;
- Validar a metodologia desenvolvida pelas seguintes figuras de mérito: seletividade; faixa de trabalho; linearidade; precisão; exatidão; limite de quantificação; limite de detecção e robustez.
- Determinar por CLAE a concentração de LOS e HCTZ em formulações farmacêuticas; urina sintética e águas superficiais de rios.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

#### 4.1.1 Reagentes e Solventes

Os solventes utilizados foram Acetonitrila e Metanol grau HPLC (MERCK, PA, USA); Ácido fosfórico (Vetec, Brasil) e água ultrapura filtrada pelo processo de osmose reversa (resistividade da água 18,5 M $\Omega$  x cm) (OS10 LZ, Geaka). Os princípios ativos LOS e HCTZ são padrões secundários, validados por padrões USP, com teor declarado de 99,8% de LOS e 99,9% de HCTZ.

#### 4.1.2 Equipamentos

Os equipamentos empregados foram: banho de ultrassom (CLEANER LEO-50); balança analítica (XP 26/AG 204, Mettler Toledo); cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, USA) equipado com unidades de bombeamento de solventes LC-20AT, auto-injetor SIL-20A HT, forno de colunas CTO-20A, detector de rede de fotodiodos SPD-M20A e controlador do sistema CBM-20A e equipado como o software *LC solution* e coluna C18 (Shim-pack VP-ODS 250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m).

#### 4.1.3 Amostras

Foram analisadas amostras de medicamentos comerciais, adquiridas em farmácias locais, e que continham os princípios ativos de LOS e HCTZ, sendo dispostos na Tabela 4.



**Tabela 4** – Amostras dos medicamentos comerciais.

AMOSTRA	LOTE	VALOR NOMINAL <sup>a</sup>	VALIDADE
LOS, Medley®	18020131	100,0 mg	01/2020
LOS, Eurofarma®	549506	50,0 mg	02/2020
DIURIX®, HCTZ, TEUTO®	2244209	50,0 mg	08/2019
HCTZ, CIMED®	1801352	25,0 mg	12/2019
LOS + HCTZ, EMS®	OC2647	100,0 mg+ 25,0 mg	08/2019
LOS + HCTZ, EUROFARMA®	531777	50,0 mg + 12,5 mg	10/2019
LOS + HCTZ, EUROFARMA®	533711	100,0 mg + 25,0 mg	11/2019

<sup>a</sup> Quantidade declarada pelo fabricante

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparo das soluções padrão de LOS

Para a preparação da solução estoque de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , foi pesado 100,0 mg de LOS e diluiu-se com água ultrapura, transferindo para um balão de 100,0 mL, dispondo de uma solução com concentração final de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Filtrou-se a solução com um filtro PTFE de 25 mm de diâmetro com poro de  $0,45 \mu\text{m}$  (Analítica, Brasil), e transferiu-se para um frasco âmbar o qual foi mantido sob refrigeração ( $10^\circ\text{C}$ ).

### 4.2.2 Preparo da solução padrão de HCTZ

Na preparação da solução estoque de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , foi pesado 100,0 mg de HCTZ e diluiu-se com metanol, transferindo para um balão de 100,0 mL, dispondo de uma solução com concentração final de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Filtrou-se a solução com um filtro PTFE de 25 mm de

diâmetro com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e transferiu-se para um frasco âmbar o qual foi mantido sob refrigeração (10 °C).

#### 4.2.3 Preparo da solução de ácido fosfórico 0,1%

Uma alíquota de 0,5 mL de ácido fosfórico foi transferida para um balão volumétrico de 500,0 mL e completou-se o mesmo com água ultrapura. Ajustou-se o pH em torno de 3,0 – 4,0, utilizando uma solução 0,3 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. Sonicou-se a solução em banho de ultrassom por 20 minutos e transferiu-se para um frasco âmbar.

#### 4.2.4 Procedimento para o preparo das soluções das amostras comerciais

Para cada amostra de medicamento, 20 comprimidos de um mesmo lote foram aleatoriamente pesados na balança analítica. Determinou-se o valor da massa média dos comprimidos com variação menor que 5% (FARMACOPEIA, 2010). Maceraram-se os comprimidos em gral de porcelana obtendo-se um pó finamente dividido.

Para cada amostra, foi pesado o equivalente ao valor da massa média determinada, sendo, correspondente ao valor nominal. Diluiu-se com metanol e colocou em banho de ultrassom por 30 minutos. Filtrou-se as soluções com filtros de PTFE de 25 mm de diâmetro com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenou-se em frasco âmbar em refrigeração (10 °C).

### 4.3 ESTUDOS DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para o teste preliminar foi baseado nas condições já relatadas na literatura, utilizando fase móvel ACN: H<sub>2</sub>O (60:40, v/v), fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , temperatura de 40 °C, descrita por Dubey et al. (2011), onde foram testados os princípios ativos de LOS e HCTZ. Posteriormente, a metodologia foi baseada nas condições relatadas por Nelima et al. (2016), no qual os autores determinaram LOS, HCTZ por CLAE de fase reversa, em formulações farmacêuticas. As condições relatadas pelo autor foram testadas para LOS e HCTZ com fase móvel ACN: ácido fosfórico 0,5% (30:70, v/v), fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> e detecção UV em 225 nm.

#### 4.4 MÉTODO COMPARATIVO PELA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS

O método comparativo, se baseou pelo estudo relatado por Wankhede et al. (2010), onde determinou-se LOS e HCTZ individualmente, em formulações farmacêuticas. Os padrões foram preparados com metanol, sendo a curva analítica de LOS 10,0 – 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 5,0 – 25,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  HCTZ. As análises foram realizadas pelo espectrofotômetro de UV-Vis, 225 nm.

#### 4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Realizou-se o estudo de otimização das condições cromatográficas utilizando o Planejamento de Experimentos, no qual é possível estabelecer as condições ótimas para o prosseguimento do desenvolvimento do método. Os parâmetros estudados foram: fluxo da fase móvel ( $\text{mL min}^{-1}$ ) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ). O Planejamento Fatorial  $2^2$  foi selecionado, com adição de ponto central em triplicata, para a estimativa do erro experimental totalizando 7 experimentos, executados em ordem aleatória.

A partir dos efeitos observados no primeiro planejamento foi dado prosseguimento ao processo de otimização, empregando um Planejamento Composto Central com triplicatas no ponto central totalizando 11 experimentos, executados em ordem aleatória. Os dados foram tratados pelo programa *Statistica, versão 13.0* (USA). Para ambos os planejamentos, foram analisadas todas as respostas para os compostos: tempo de retenção, área do pico, altura do pico, fator de retenção (k), fator de encaudamento, resolução e separação. Os modelos foram avaliados por meio da ANOVA ao nível de confiança de 95%, e pela função desejabilidade de Derringer-Suich.

#### 4.6 VALIDAÇÃO

##### 4.6.1 Seletividade e Especificidade

A seletividade foi avaliada a partir da obtenção dos cromatogramas onde continham os dois fármacos analisados simultaneamente para identificação de interferentes nos picos cromatográficos.

A especificidade foi avaliada a partir da análise dos cromatogramas dos fármacos obtidos quando analisados isoladamente, a fim de verificar a capacidade do método em detectar cada um dos fármacos.

#### 4.6.2 Linearidade e Faixa de Trabalho

As curvas analíticas, foram construídas estabelecendo a correlação entre as médias das áreas dos analitos e suas concentrações. A análise foi feita em triplicatas verdadeiras, em quatro dias diferentes. Os níveis de concentração avaliados para LOS e HCTZ foram: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para avaliar a região linear foi utilizado o teste Huber e a linearidade avaliou-se a análise de variância de regressão linear.

#### 4.6.3 Precisão

Repetibilidade: a partir da análise das amostras comerciais, a avaliação foi realizada no mesmo dia, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. Realizaram 9 determinações, em 3 concentrações: baixa, média e alta, com triplicatas em cada nível. A Repetibilidade foi demonstrada calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) e recuperações correspondentes.

Precisão Intermediária: com base nas amostras comerciais, a avaliação foi realizada em 4 dias diferentes não consecutivos ( $n=4$ ), analistas diferentes e a mesma instrumentação. Onde realizaram-se 9 determinações, em 3 concentrações: baixa, média e alta, com triplicatas em cada nível. A Precisão intermediária foi avaliada a análise de variância de fator duplo e os desvios padrões (DP) e desvios padrões relativos (DPR) e recuperações correspondentes. O DP e DPR podem ser expressos pelas equações abaixo (ANVISA, 2017):

$$DP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

$$DPR (\%) = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \quad (7)$$

Onde  $\bar{x}$  é a média aritmética;  $x_i$  é o valor de cada medida e  $n$  é a quantidade de medidas.

#### 4.6.4 Exatidão

Avaliou-se pelo método de adição de padrão, no qual alíquotas variáveis da solução padrão de LOS e HCTZ, são adicionadas a um volume fixo e exatamente conhecido das amostras comerciais de LOS e HCTZ (Tabela 5). As análises foram realizadas em 4 dias diferentes, e calculou-se o desvio padrão relativo (DPR) das médias de recuperações obtidas.

**Tabela 5** – Experimentos realizados para a Exatidão dos compostos de LOS e HCTZ.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*	Volume padrão (mL)	Volume amostra de LOS e HCTZ (mL)
0,0	0,0	1,0
0,2	0,2	1,0
1,0	1,0	1,0
4,0	4,0	1,0

\*n=3

#### 4.6.5 Limite de quantificação (LD)

O estudo estabeleceu-se pela entre a estimativa do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva analítica (S), com a utilização da seguinte fórmula:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (8)$$

#### 4.6.6 Limite de detecção (LQ)

Realizou-se o LD por meio da estimativa do desvio padrão das respostas (s) e a inclinação da curva analítica (S), por meio da fórmula:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (9)$$

#### 4.7 ANÁLISE DE LOS E HCTZ EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

As amostras de formulações farmacêuticas comerciais, foram adquiridas em farmácias locais e estão listadas na Tabela 4. Preparou-se as amostras em metanol, e as diluições preparadas com a fase móvel ácido fosfórico 0,1%: ACN (60:40, v/v) e filtradas em filtro PTFE de 25 mm de diâmetro com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Para análise preparou-se soluções das amostras individuais na concentração final de 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e analisadas por CLAE na metodologia desenvolvida e utilizou-se um método comparativo proposto por Wankhede et al. (2010). Foi realizado para a exatidão e precisão dos métodos o Teste-t pareado e Teste-F de comparação de variâncias.

#### 4.8 ANÁLISE DE LOS EM URINA SINTÉTICA

A urina sintética foi preparada segundo LAUBEL et. al. (2001), onde adicionou-se em um balão volumétrico de 500,0 mL com água ultrapura os seguintes reagentes foram pesados e estão relatados na Tabela 6. A solução foi deixada em banho ultrassom por 30,0 minutos e filtrou-se no filtro PFTE 0,22  $\mu\text{m}$ . Soluções dos analitos de interesse foram preparadas utilizando a solução de urina sintética, obtendo concentrações finais de 0,032; 0,010 e 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LOS, e, 0,010; 0,003 e 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para HCTZ. As soluções foram analisadas de acordo com o método cromatográfico desenvolvido.

**Tabela 6** – Composição da solução experimental.

<b>Reagentes</b>	<b>Massa pesada (g)</b>
Cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,551
Cloreto de cálcio (NaCl)	1,462
Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	1,125
Fosfato de monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,700
Cloreto de potássio (KCl)	0,800
Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	0,500
Uréia	12,50
Creatina	0,550

A solução foi deixada em banho ultrassom por 30,0 minutos e filtrou-se no filtro PFTE 0,22  $\mu\text{m}$ . Soluções dos analitos de interesse foram preparadas utilizando a solução de urina sintética, obtendo concentrações finais de 0,032; 0,010 e 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LOS, e, 0,010; 0,003 e 0,20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para HCTZ. As soluções foram analisadas de acordo com o método cromatográfico desenvolvido.

#### 4.9 ANÁLISE DE LOS E HCTZ EM ÁGUAS SUPERFICIAIS

A amostra de água superficial foi coletada no lago de Olarias, na cidade de Ponta Grossa-Paraná. As amostras foram recolhidas, armazenadas ( $5 \pm 3$  °C) e filtradas. Fortificou-se a amostra do rio com soluções dos fármacos de LOS e HCTZ de modo a obter a concentração final de 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 0,75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Para o desenvolvimento e otimização da metodologia analítica utilizando a técnica de CLAE, inicialmente foi realizada uma revisão da literatura sobre os métodos envolvendo a técnica, como foi apresentado na Tabela 3. De modo geral os estudos reportados empregam a cromatografia em fase reversa usando como fase móvel uma porcentagem de solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) e uma porcentagem aquosa (acidificada ou tamponada na maioria dos métodos), com eluição em gradiente ou isocrática e detecção é em sua maioria realizada por UV.

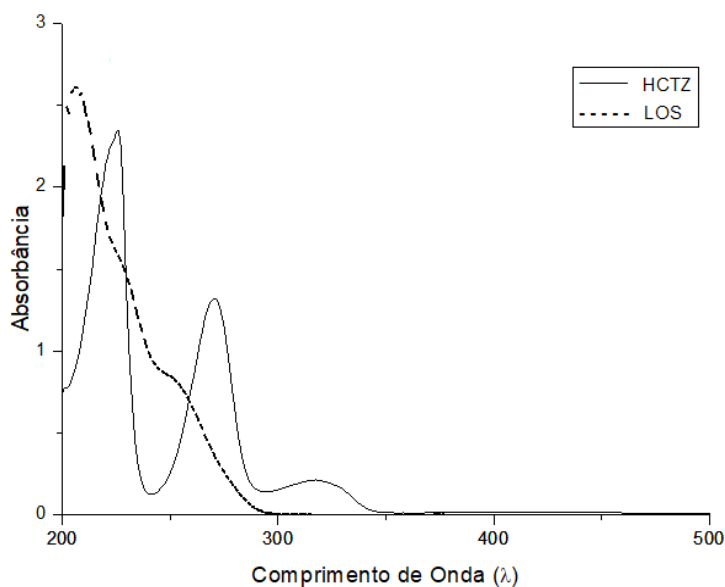
Com base nesses trabalhos relatados na literatura, e de acordo com a disponibilidade de materiais, optou-se inicialmente pela cromatografia líquida de fase reversa. Este modo de eluição apresenta algumas vantagens, dentre elas, o menor encaudamento de picos, pois a fase estacionária tem poucos sítios que podem adsorver fortemente o soluto provocando a cauda (COLLINS et al., 2006).

Inicialmente foram realizados testes, com objetivo de conhecer o sistema cromatográfico e identificar, como os fatores (composição da fase móvel, fluxo e controle de temperatura) poderiam influenciar na separação dos fármacos de interesse neste trabalho.

A corrida cromatográfica foi monitorada com detector de arranjo de diodos. O monitoramento do sinal por UV, permitiu obter o espectro dos compostos de análise, evidenciando que os maiores sinais eram obtidos nos comprimentos de onda de 225 nm, 238 nm e 254 nm. O comprimento de onda de 225 nm foi selecionado, pois o mesmo apresentou a maior intensidade de absorbância, indicando maior sensibilidade (Figura 3).



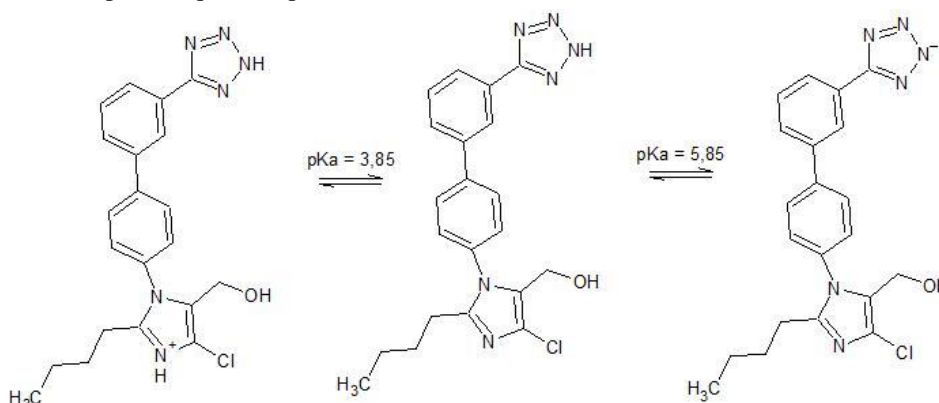
**Figura 3** - Espectros de absorção obtidos por espectrofotômetro dos compostos de LOS e HCTZ.



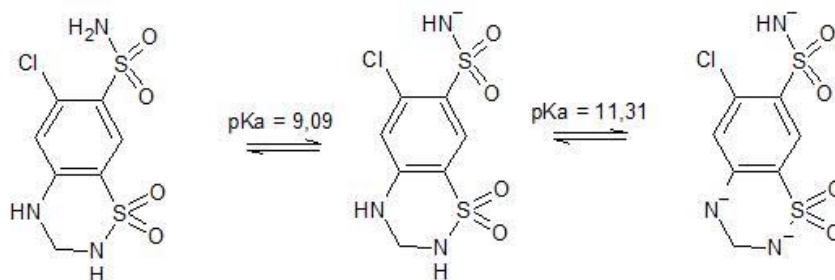
As condições cromatográficas relatadas por Dubey et al. (2011), de eluição isocrática tendo como fase móvel a mistura ACN: H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) foram inicialmente avaliadas. Nessas condições foram constatados picos de LOS e HCTZ. Entretanto, para LOS, houve variações tempo de retenção prejudicando a reprodutibilidade.

Atentando para a estrutura de LOS e HCTZ (Figura 4 e 5), observa-se que há grupos ionizáveis em ambas as moléculas. Para LOS, os grupos funcionais imidazol e tetrazol, são grupos que sofrem alterações químicas, quando o pH da fase móvel é alterado, o mesmo ocorre com os grupos funcionais sulfonamida e amina de HCTZ.

**Figura 4** - Efeito do pH no equilíbrio para LOS.



**Figura 5** - Efeito do pH no equilíbrio para HCTZ.

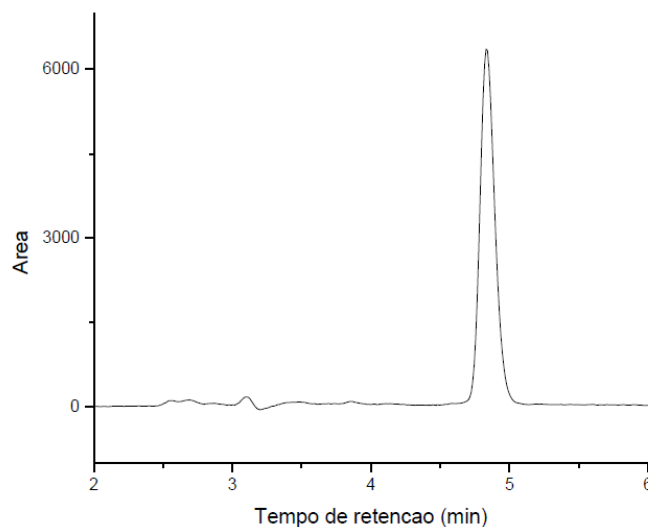


Fonte: A autora.

Constata-se que a alteração do pH influencia na formação de espécies ionizadas e não ionizadas. Utilizando a fase móvel ACN e água, o pH fica em torno de 6, sendo que para a molécula HCTZ essa faixa de pH não altera sua estrutura química, pois a molécula encontra-se neutra (forma não ionizável), com  $\text{pK}_a < 9,09$ . Entretanto, nessa faixa de pH para LOS (composto ácido), a molécula encontra-se na forma ionizável, e devido ao equilíbrio químico entre as espécies neutras e ionizadas ocorre a variação no tempo de retenção, afetando a reprodutibilidade do método e ocasionando perda de resolução cromatográfica.

O equilíbrio entre as formas ionizadas e não ionizadas é estabelecido pelo pH da solução, podendo ser utilizado uma solução tamponada ou um modificador orgânico de modo a garantir que apenas uma das espécies químicas esteja presente, melhorando assim a análise cromatográfica (DOLAN, 2017). Preferiu-se não utilizar uma solução tamponada, em razão de que pode ocorrer a precipitação do sal na presença da fase móvel com alta concentração de solvente orgânico, podendo danificar componentes internos do equipamento de CLAE. Neste sentido optou-se pelo uso de uma solução de ácido fosfórico, e verificou-se que a utilização de uma fase móvel ácida foi adequada para manter a molécula de LOS estável, obtendo tempo de retenção bem definido e reprodutível (Figura 6).

**Figura 6** - Cromatograma do composto LOS com fase móvel de acetonitrila e ácido fosfórico.

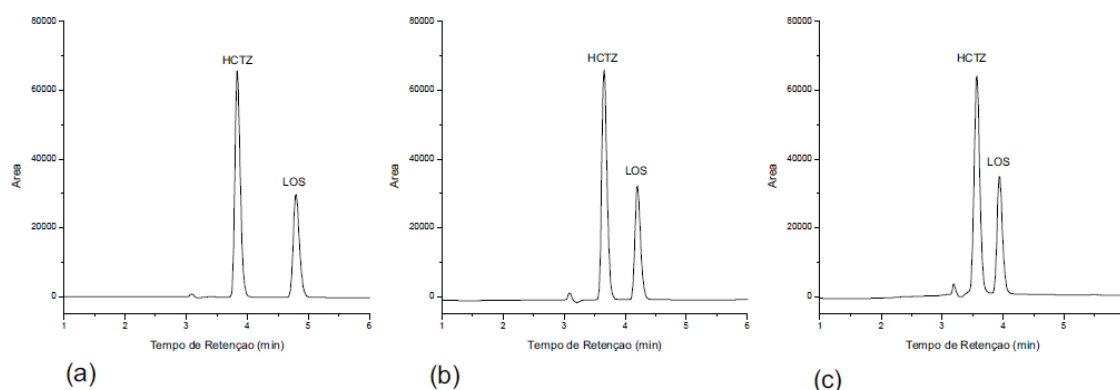


Diante dos resultados, baseou-se no trabalho relatado por Nelima et al. (2016), o qual indica o uso de uma fase móvel constituída por ACN e ácido fosfórico 0,5 % em uma proporção de 30:70. Em um primeiro momento testou-se diminuir a concentração do ácido fosfórico para 0,1%. Os resultados indicaram ser uma alteração viável, obtendo-se picos reproduzíveis em termos de área e de tempo de retenção. Na sequência foram avaliadas algumas proporções diferentes de acetonitrila e ácido fosfórico conforme apresentado na Tabela 7, bem como os resultados obtidos. Como pode ser constatado a condição de fase móvel de ACN: ácido fosfórico 0,1% (80:20, v/v), resulta em tempos de análise menores, entretanto é possível observar que os picos eluem muito próximos comprometendo a resolução e separação (Figura 7). A utilização de uma porcentagem de ACN de 60% ou 70% apresentou pequena variação nos valores de área e no fator de encaudamento. A separação é ligeiramente melhor na condição de 70% de ACN. Entretanto, devido a economia no uso de ACN e considerando que os picos dos analitos ficaram bem definidos e separados optou-se por trabalhar com uma porcentagem de 60% de ACN.

**Tabela 7** – Estudo da percentagem (%) com a modificação da fase móvel ACN: ácido fosfórico 0,1%, fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10 µL.

Fase móvel (ACN: ácido fosfórico 0,1%; v/v)	Tempo de retenção (min)	Área	Separação	Fator de encaudamento
60:40	T <sub>HCTZ</sub> = 3,835	A <sub>HCTZ</sub> = 62758	S <sub>HCTZ</sub> = 0	F <sub>HCTZ</sub> = 1,226
	T <sub>LOS</sub> = 4,798	A <sub>LOS</sub> = 33055	S <sub>LOS</sub> = 2,291	F <sub>LOS</sub> = 1,220
70:30	T <sub>HCTZ</sub> = 3,655	A <sub>HCTZ</sub> = 68413	S <sub>HCTZ</sub> = 2,089	F <sub>HCTZ</sub> = 1,243
	T <sub>LOS</sub> = 4,200	A <sub>LOS</sub> = 35687	S <sub>LOS</sub> = 1,966	F <sub>LOS</sub> = 1,235
80:20	T <sub>HCTZ</sub> = 3,570	A <sub>HCTZ</sub> = 64361	S <sub>HCTZ</sub> = 0	F <sub>HCTZ</sub> = 0,975
	T <sub>LOS</sub> = 3,941	A <sub>LOS</sub> = 35740	S <sub>LOS</sub> = 1,984	F <sub>LOS</sub> = 1,200

**Figura 7** - Cromatogramas resultantes da variação da fase móvel com acetonitrila e ácido fosfórico 0,1% na proporção (a) 60:40 v/v ; (b) 70:30 v/v e (c) 80:20 v/v.



## 5.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO EMPREGANDO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O procedimento tradicional para a otimização de forma univariada, onde cada fator é avaliado separadamente, envolve um grande número de experimentos e não é capaz de estabelecer como cada fator se comporta frente aos demais. Então, para melhor compreensão dos efeitos sobre variáveis simultaneamente com um número mínimo de ensaios, a otimização multivariada é adequada pois se estabelece a avaliação de múltiplas respostas concomitantemente. Inicialmente um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com adição de pontos

centrais (0) foi selecionado pois permite a estimativa do erro experimental bem como o modelo linear primeiramente admitido.

A escolha dos fatores foi baseada em experimentos preliminares e conhecimento prévio da literatura, sendo avaliados: fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ ) e temperatura da coluna ( $^{\circ}\text{C}$ ), em dois níveis, baixo (-1) e alto (+1) (Tabela 8), fixando-se a fase móvel ACN: ácido fosfórico 0,1% (60:40, v/v), volume de injeção 10  $\mu\text{L}$  e coluna cromatográfica C18.

Foram monitorados como respostas vários parâmetros considerados importantes no desenvolvimento do método cromatográfico, como: tempo de retenção, área, altura, fator de encaudamento, fator de retenção, resolução e separação. Nas tabelas 9 e 10, encontram-se os experimentos realizados com as suas respectivas respostas.

**Tabela 8** – Níveis de estudo da matriz de planejamento fatorial  $2^2$ .

Nível de estudo (codificado)	Fluxo ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
-1	0,6	35,0
0	0,8	40,0
+1	1,0	45,0

**Tabela 9** – Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  com adição de ponto central para LOS.

Ensaio	Fluxo	Temp.	Respostas						
	( $\text{mL min}^{-1}$ )	( $^{\circ}\text{C}$ )	$t_r$	Área	Altura	F.E. <sup>b</sup>	K	Res.	Sep.
	-1 0 +1	-1 0 +1	(min)						
1	-1	-1	6,367	116074	12464	1,214	0,559	4,875	2,088
2	+1	-1	3,856	69951	11638	1,227	0,563	4,415	2,097
3	-1	+1	6,323	116602	12862	1,200	0,537	5,558	2,476
4	+1	+1	3,843	69796	11954	1,216	0,547	4,985	2,490
5	0	0	4,786	87454	12285	1,217	0,550	4,954	2,291
6	0	0	4,805	87414	12291	1,221	0,552	4,994	2,291
7	0	0	4,796	87438	12300	1,219	0,553	5,007	2,291

Temp.= temperatura;  $t_r$ = tempo de retenção; F.E.= fator de encaudamento; K= fator de retenção; Res= resolução; Sep.= separação.

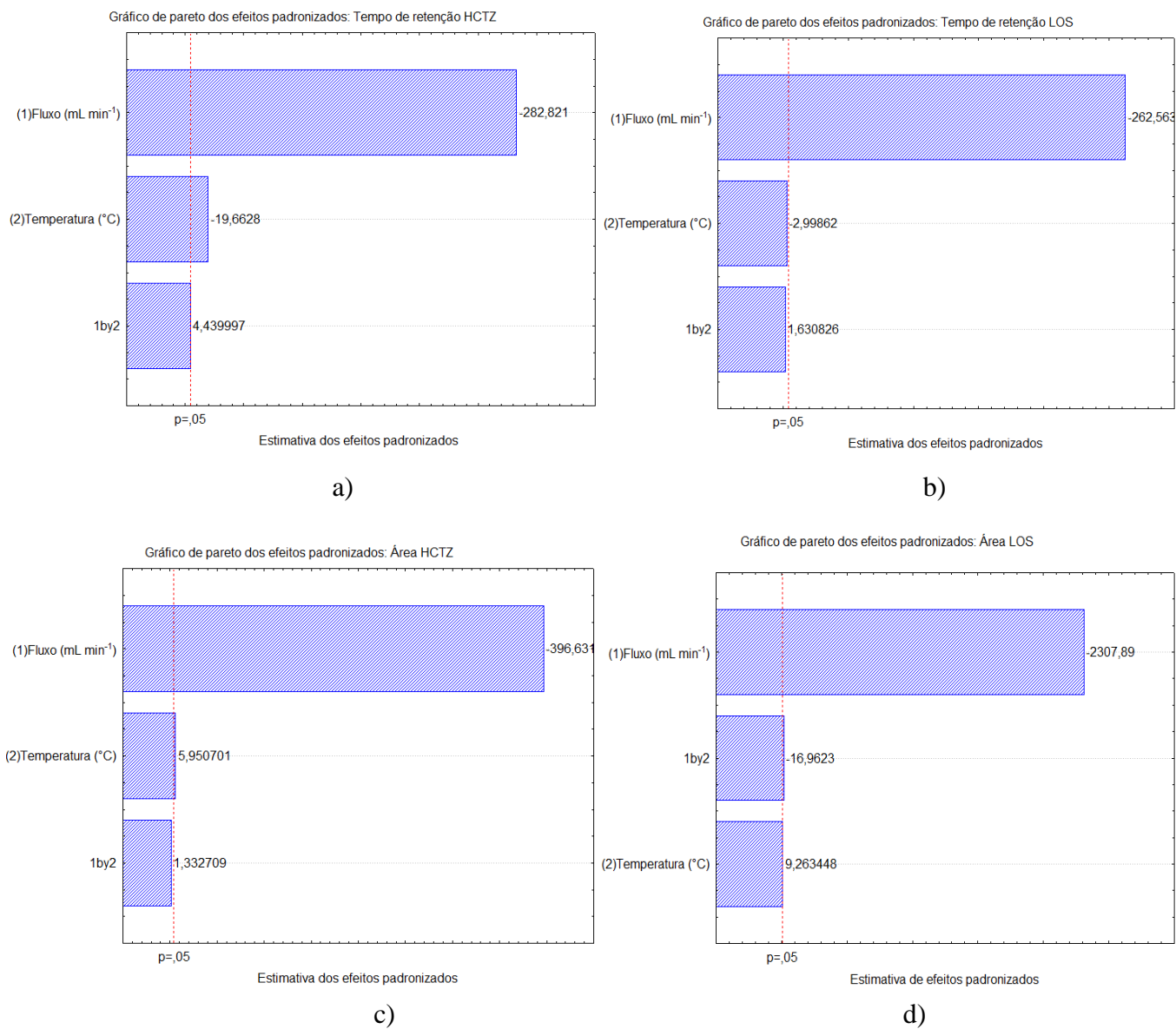
**Tabela 10** – Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com adição de ponto central para HCTZ.

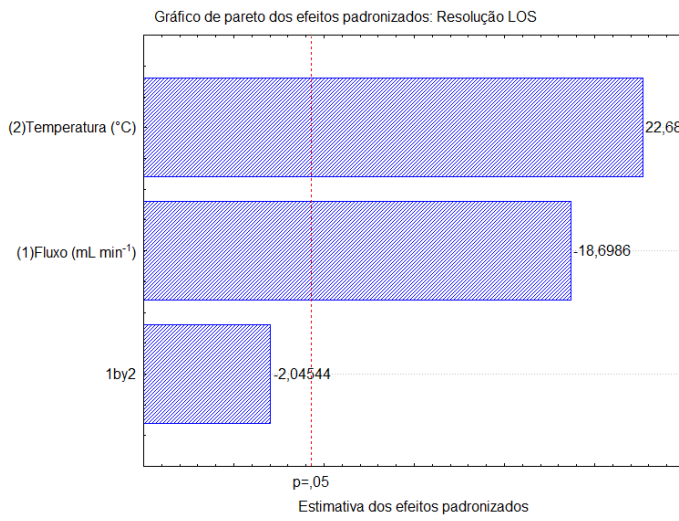
Ensaio	Fluxo	Temp.	Respostas				
	(mL min <sup>-1</sup> )	(°C)	t <sub>r</sub>	Área	Altura	F. E.	K
	-1 0 +1	-1 0 +1	(min)				
<b>1</b>	-1	-1	5,177	96657	11984	1,224	0,268
<b>2</b>	+1	-1	3,139	58136	11277	1,268	0,269
<b>3</b>	-1	+1	5,006	97104	12503	1,220	0,217
<b>4</b>	+1	+1	3,031	58841	11645	1,268	0,219
<b>5</b>	0	0	3,828	72632	11893	1,261	0,240
<b>6</b>	0	0	3,842	72766	11905	1,257	0,241
<b>7</b>	0	0	3,833	72820	11866	1,260	0,242

Temp.= temperatura; t<sub>r</sub>= tempo de retenção; F.E.= fator de encaudamento; K= fator de retenção

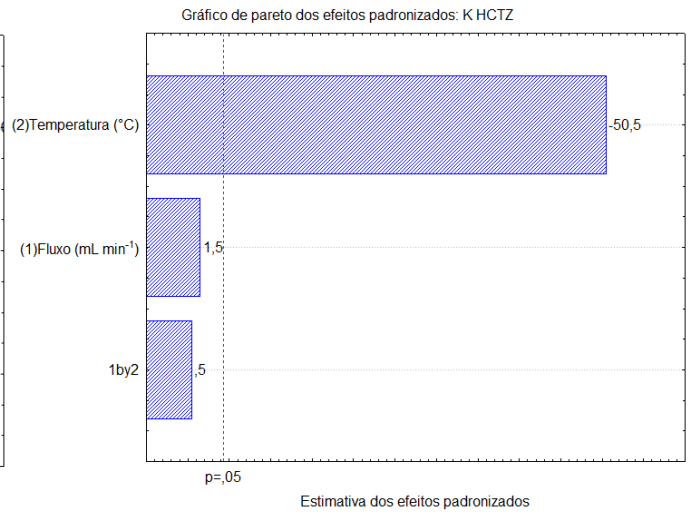
Os dados apresentados nas tabelas 9 e 10 foram tratados utilizando o programa Statistica. Inicialmente considerando cada resposta individualmente por meio do gráfico de pareto dos efeitos padronizados (Figura 8), observou-se que nas respostas de modo geral as variáveis de temperatura e fluxo foram variáveis significativas, indicando que são variáveis importantes para a separação e melhora do sistema cromatográfico.

**Figura 8** - Gráficos de Pareto dos efeitos padronizados: a) Tempo de retenção de HCTZ; b) Tempo de retenção de LOS; c) Área de HCTZ; d) Área de LOS; e) Altura de HCTZ; f) Altura de LOS; g) Resolução de LOS; h) K HCTZ; i) K LOS; j) Fator de encaudamento de HCTZ; k) Fator de encaudamento de LOS.

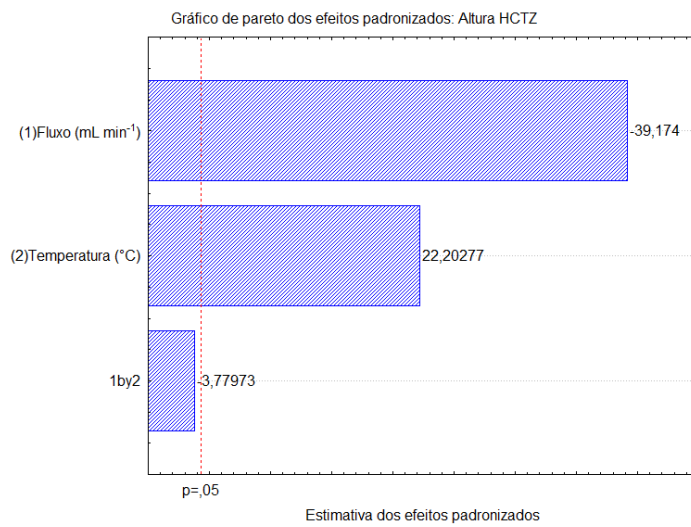




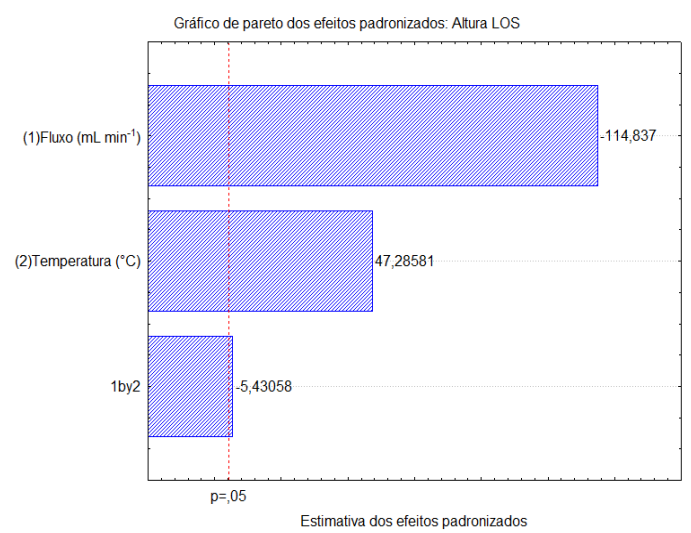
e)



f)

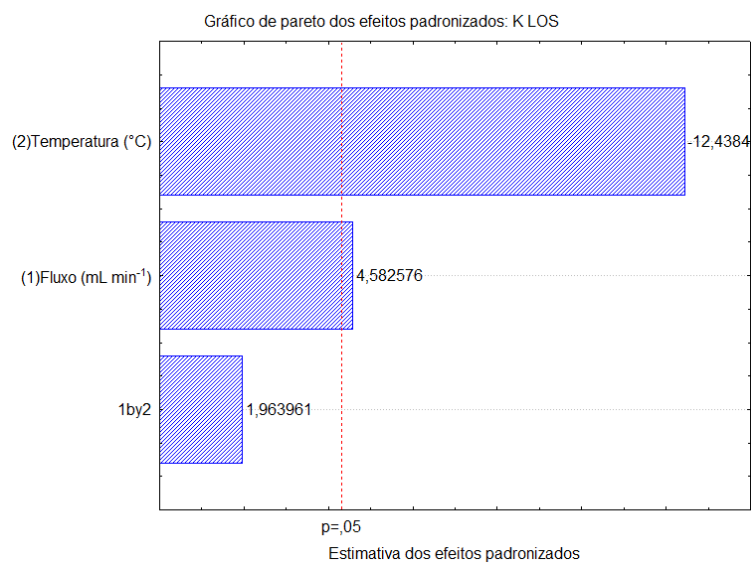


g)

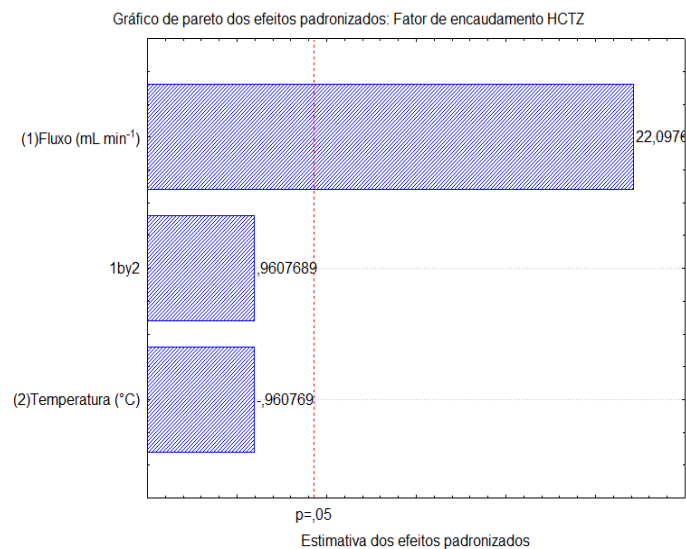


h)

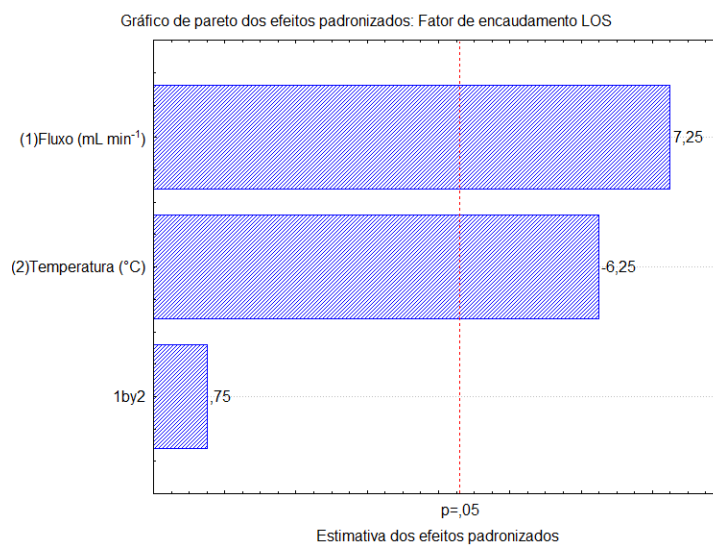




i)



j)



k)

Com o uso dessa ferramenta obteve-se um modelo matemático de primeira ordem o qual foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). A ANOVA permite verificar a adequação do modelo proposto. O teste de falta de ajuste foi usado para comparar os erros residuais e puros na replicata dos pontos centrais, e mensurar o quão bem o modelo se ajusta aos dados. O modelo com valores de  $p < 0,05$  é considerado significativo, portanto, com falta

de ajuste, uma propriedade indesejável, porque indica que o modelo não se encaixa bem nos dados. É desejável que o modelo tenha  $p > 0,05$  para indicar que o modelo é adequado.

Observou-se que o modelo apresentou  $r > 0,9999$  e exibiu falta de ajuste ( $p > 0,05$ ) para algumas respostas, indicando que o modelo linear não consegue explicar o conjunto de dados (Tabela 11).

**Tabela 11** – Avaliação de R-sqr e F.cal. para as respostas obtidas pelo Planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

<b>Respostas</b>	<b>R-sqr</b>	<b>F.calc.</b>
Tempo de Retenção HCTZ	0,97339	2195,9
Tempo de Retenção LOS	0,97555	1726,0
Área HCTZ	0,97234	4474,4
Área LOS	0,97511	135988
Altura HCTZ	0,99634	5,491
Altura LOS	0,99233	117,48
Resolução LOS	0,99586	1,6077
K HCTZ	0,99583	8,679
K LOS	0,98887	0,0204
Fator caudamento HCTZ	0,85478	81,2747
Fator caudamento LOS	0,88764	9,66964
Separação	0,99988	4,89461

R-sqr = Coeficiente de correlação ajustado; F.calc. = comparação de variância

Quando os dados obtidos através de um planejamento resultam em um modelo de primeira ordem que não consegue explicar satisfatoriamente os dados, é preciso ampliar o modelo para uma ordem superior, no caso um modelo de segunda ordem ou quadrático, ou ainda alterar o intervalo de estudo. Para ampliar um modelo é necessário adicionar ao planejamento inicial condições experimentais diferentes, o que pode ser feito por meio de um Planejamento Composto Central, adicionando-se pontos axiais, totalizando 11 experimentos e no ponto central foram realizadas repetições ( $n=3$ ) para a estimativa do erro experimental. As condições experimentais avaliadas e os resultados obtidos para cada uma das respostas encontram-se apresentadas nas Tabelas 12, 13 e 14.

**Tabela 12** – Níveis de estudo da matriz de planejamento composto central.

Nível de estudo (codificado)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temperatura (° C)
-1,41	0,5	33,0
-1	0,6	35,0
0	0,8	40,0
+1	1,0	45,0
+1,41	1,1	47,0

**Tabela 13** – Matriz do Planejamento Composto Central para o composto LOS.

Ensaio	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Temp. (°C)	Respostas						
			t <sub>r</sub> (min)	Área	Altura	F.E.	K	Res.	Sep.
	-1,41	-1,41							
	-1	-1							
	0	0							
	+1	+1							
	+1,41	+1,41							
<b>1</b>	-1	-1	6,367	116074	12464	1,214	0,559	4,875	2,088
<b>2</b>	+1	-1	3,856	69951	11638	1,227	0,563	4,415	2,097
<b>3</b>	-1	+1	6,323	116602	12862	1,200	0,537	5,558	2,476
<b>4</b>	+1	+1	3,843	69796	11954	1,216	0,547	4,985	2,490
<b>5</b>	0	0	4,786	87454	12285	1,217	0,550	4,954	2,291
<b>6</b>	0	0	4,805	87414	12291	1,221	0,552	4,994	2,291
<b>7</b>	0	0	4,796	87438	12300	1,219	0,553	5,007	2,291
<b>8</b>	-1,41	0	7,610	138867	12642	1,198	0,547	5,314	2,268
<b>9</b>	+1,41	0	3,501	63299	11571	1,220	0,550	4,491	2,802
<b>10</b>	0	-1,41	4,773	86977	11841	1,233	0,560	4,326	1,997
<b>11</b>	0	+1,41	4,786	87664	12511	1,203	0,540	5,409	2,564

Temp.= temperatura; t<sub>r</sub>= tempo de retenção; F.E.= fator de encaudamento; K= fator de retenção; Res= resolução; Sep.= separação.

**Tabela 14** – Matriz do Planejamento Composto Central para o composto HCTZ.

Ensaio	Fluxo	Temp.	Respostas				
	(mL min <sup>-1</sup> )	(°C)	t <sub>r</sub>	Área	Altura	F.E.	K
	-1,41	1,41					
	-1	-1	(min)				
	0	0					
	+1	+1					
	+1,41	+1,41					
<b>1</b>	-1	-1	5,177	96657	11984	1,224	0,268
<b>2</b>	+1	-1	3,139	58136	11277	1,268	0,269
<b>3</b>	-1	+1	5,006	97104	12503	1,220	0,217
<b>4</b>	+1	+1	3,031	58841	11645	1,268	0,219
<b>5</b>	0	0	3,828	72632	11893	1,261	0,240
<b>6</b>	0	0	3,842	72766	11905	1,257	0,241
<b>7</b>	0	0	3,833	72820	11866	1,260	0,242
<b>8</b>	-1,41	0	6,102	124156	13040	1,209	0,241
<b>9</b>	+1,41	0	2,804	57005	11954	1,264	0,241
<b>10</b>	0	-1,41	3,917	77607	12226	1,254	0,281
<b>11</b>	0	+1,41	3,762	73485	12177	1,254	0,211

Temp.= temperatura; t<sub>r</sub>= tempo de retenção; F.E.= fator de encaudamento; K= fator de retenção;

Diferentemente do modelo linear, o modelo quadrático apresentou a melhor condição experimental para as respostas, indicando que o modelo quadrático é plausível e capaz de prever satisfatoriamente as melhores condições experimentais com coeficientes de correlação superiores a 0,9.

Partindo para análise das respostas individualmente (Tabela 15), pode-se observar que para cada resposta se tem uma condição ótima diferente. De modo geral, utilizando fluxos menores os tempos de retenção são maiores o que torna as análises mais demoradas. Do mesmo modo para as respostas área e altura do pico, valores maiores são obtidos em fluxos mais baixos, o que indica melhor sensibilidade analítica. Neste contexto, observa-se que deve haver um equilíbrio entre as estimativas de melhor condição experimental ponderando se é primordial obter um método mais sensível, porém mais demorado. Quanto maior o tempo de retenção maior é gasto de solvente o que significa maior custo de análise e ainda geração de maiores volumes de resíduos. Desta forma o uso de uma resposta que pondere várias respostas para a

seleção da melhor condição experimental se faz necessário e o conceito da função desejabilidade ganha destaque.

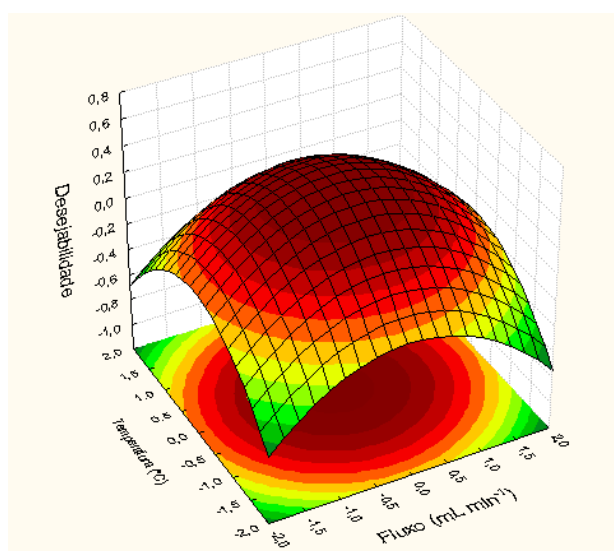
**Tabela 15** – Condições ótimas de Fluxo e Temperatura para cada resposta analisada.

<b>Respostas</b>	<b>Fluxo (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Tempo de retenção HCTZ	0,6	35,0
Tempo de retenção LOS	0,6	35,0
Área HCTZ	0,6	45,0
Área LOS	0,6	45,0
Altura HCTZ	0,6	45,0
Altura LOS	0,6	45,0
Resolução LOS	1,0	35,0
k HCTZ	1,0	45,0
k LOS	0,6	35,0
Fator Encaudamento HCTZ	1,0	35,0
Fator Encaudamento LOS	1,0	45,0

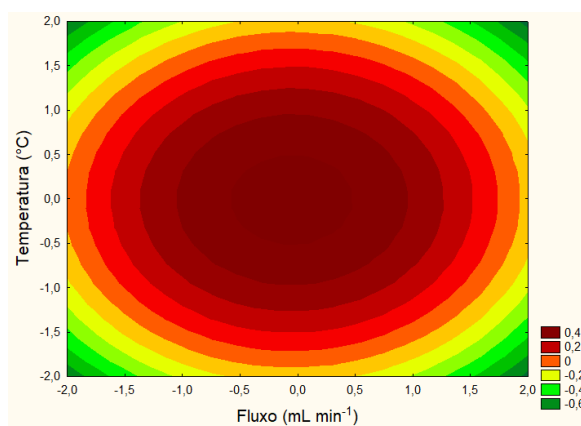
A função desejabilidade proposta por Derringer e Suich (BARROS et al., 2001), permite analisar respostas simultaneamente, maximizando a um único valor (desejabilidade global). A desejabilidade global vai indicar uma única condição ótima, que vai ser capaz de satisfazer cada resposta.

Aplicando a função, os algoritmos previram uma condição analítica que atendeu a desejabilidade, como pode ser observado por meio da superfície de resposta e superfície de contorno (Figura 9 e 10).

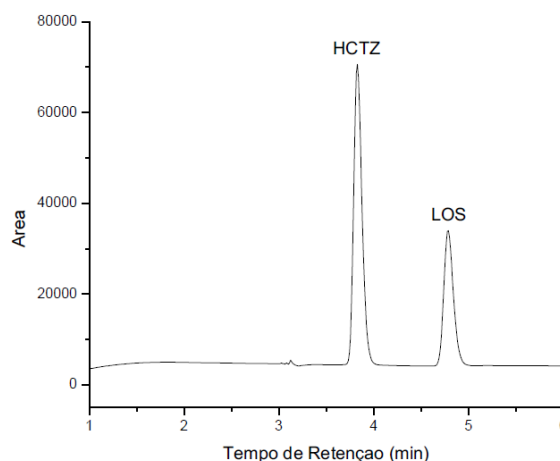
**Figura 9** - Superfície de Resposta obtida pela Função Desejabilidade do modelo quadrático para LOS e HCTZ.



**Figura 10** - Superfície de Contorno obtida pela Função Desejabilidade do modelo quadrático para LOS e HCTZ.



A condição prevista pela função desejabilidade, indicou que o nível do ponto central (0), correspondente a valores de fluxo  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e temperatura  $40,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , é a condição experimental ótima que permite a separação de LOS e HCTZ, obtendo-se picos cromatográficos de boa simetria, resolução e tempo de retenção adequados (Figura 11).

**Figura 11-** Cromatograma da condição otimizada para os compostos LOS e HCTZ.

Foram realizados experimentos com repetição (n=3) nas condições experimentais indicadas pela função desejabilidade, para verificação da concordância entre os resultados obtidos experimentalmente com àquele predito pela equação gerada pelo programa Statistica. Os valores das respostas obtidas experimentalmente ficaram próximas aos valores preditos pela desejabilidade (Tabela 16), indicando que o modelo é adequado, exato e reprodutível.

**Tabela 16** – Valores Preditos resultantes da desejabilidade com os valores experimentais obtidos para LOS e HCTZ.

	Valores Preditos LOS	Média dos valores experimentais LOS*	DPR (%) LOS	Valores Preditos HCTZ	Média dos valores experimentais HCTZ*	DPR (%) HCTZ
Tempo de retenção (min)	4,795	4,785	0,60	3,834	3,838	0,60
Área	87440	86147	0,90	72760	77710	1,00
Altura	12291	12185	1,80	11890	12500	0,95
Resolução	4,984	4,892	0,73	---	---	---
Fator de retenção (k)	0,551	0,547	0,20	0,241	0,240	0,05
Fator de encaudamento	1,220	1,224	0,20	1,260	1,261	0,15
Separação	2,291	2,272	0,15	---	---	---

\*n=4; DPR=desvio padrão relativo

Na Tabela 17, encontram-se as condições cromatográficas otimizadas neste trabalho e as condições relatadas por Nelima et al. (2016). Comparando os valores observa-se que com a utilização da ferramenta estatística de planejamento de experimentos e da função desejabilidade foi possível chegar a uma condição experimental que do ponto de vista econômico é mais vantajosa, uma vez que a análise pode ser realizada em menor tempo, gastando menos solvente e gerando um volume menor de resíduos.

**Tabela 17** – Condições cromatográficas para Nelima et al. (2016) e condição otimizada.

	<b>Condição Nelima et al. (2016)</b>	<b>Condição Otimizada</b>
<b>Fase móvel</b>	ACN: ácido fosfórico 0,5 % (30:70, v/v)	ACN: ácido fosfórico 0,1% (60:40, v/v)
<b>Fluxo (mL min<sup>-1</sup>)</b>	1,00	0,80
<b>Coluna</b>	C18 (25,0 mm x 4,6 mm, 5 µm)	C18 (25,0 mm x 4,6 mm, 5 µm)
<b>Volume de injeção</b>	10,0 µL	10,0 µL
<b>Temperatura da coluna (°C)</b>	---	40,0
<b>Detector</b>	DAD	DAD
<b>Tempo de corrida (min)</b>	7,0	5,0
<b>Tempo de retenção (min)</b>	LOS= 6,70	LOS= 4,80
	HCTZ= 3,96	HCTZ= 3,83

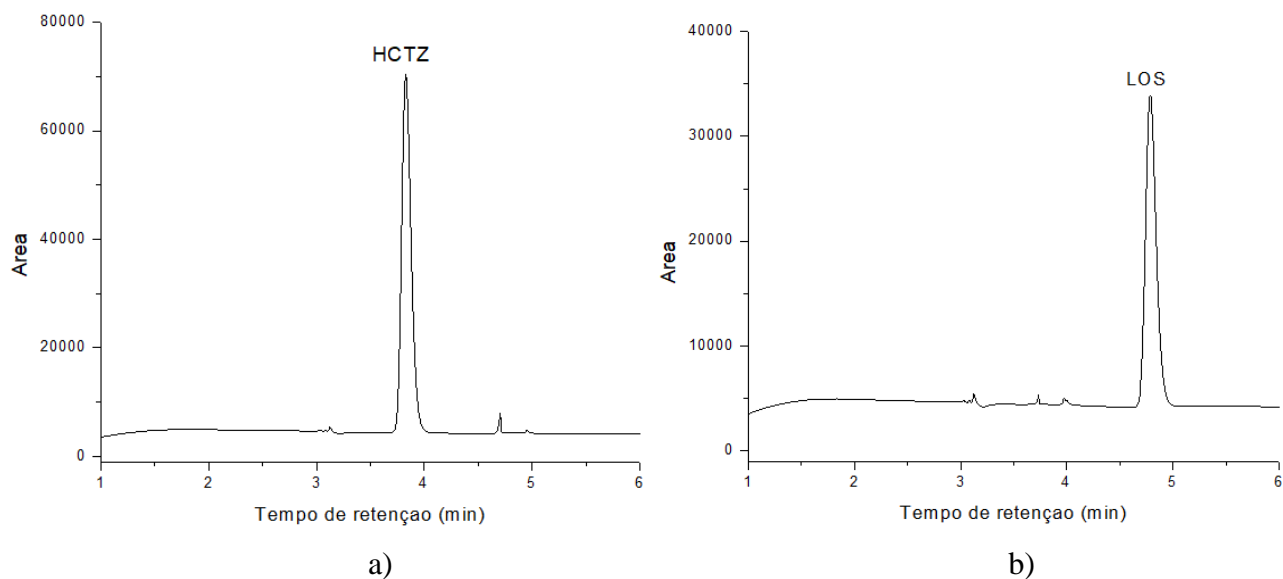
### 5.3 VALIDAÇÃO

#### 5.3.1 Seletividade e Especificidade

A especificidade foi avaliada pelos cromatogramas obtidos individualmente e identificados pela Figura 12. Como pode ser observado a especificidade foi adequada para o método uma vez que foi possível a identificação dos picos referentes a LOS e HCTZ por meio do tempo de retenção e o espectro de absorção característico para cada composto.

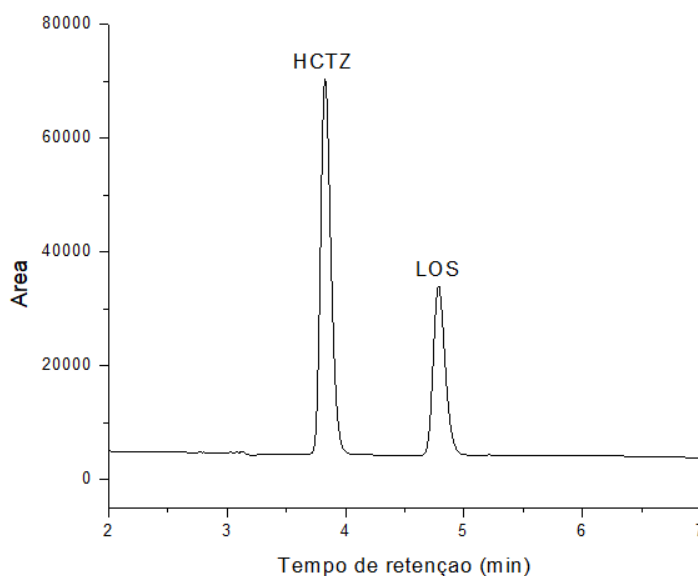


**Figura 12** - Cromatogramas obtidos para o estudo da especificidade para os compostos a)HCTZ e b)LOS.



A seletividade foi confirmada pelo método de adição padrão, onde foi analisado os fármacos em conjunto e o cromatogramas obtido encontra-se na Figura 13. Pelo método de adição de padrão houve excelentes recuperações (>99,0%) em todas as determinações realizadas. Esse resultado corrobora com a seletividade do método no sentido da não co-eluição de excipientes presentes na matriz de fármacos de LOS e HCTZ.

**Figura 13** - Cromatograma do estudo da seletividade para os compostos de HCTZ e LOS.



### 5.3.2 Linearidade e Faixa de Trabalho

A partir da melhor condição cromatográfica obtida pelo planejamento experimental, construiu-se uma curva analítica para LOS e HCTZ, com replicatas em dias diferentes ( $n=4$ ), na faixa de trabalho de 0,2 a 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para LOS e HCTZ.

Com dados experimentais o surgimento de erros pode estar presente, e a presença de valores anômalos é inevitável, e estes devem ser identificados e se possíveis removidos. Os dados anômalos podem ser estatisticamente identificados por procedimentos adequados de tratamento dos dados, e o teste de Huber foi empregado com este intuito.

Para avaliar a região linear foi utilizado o teste de Huber, o qual permite a rejeição de dados anômalos, e foram construídas de acordo com Valente et al. (2003). Primeiramente, calcula-se a razão das médias ( $md$ ) dos valores obtidos da área dos picos cromatográficos pela concentração correspondente ( $A/C$ ). Calculou-se as diferenças absolutas entre  $A/C$  e  $md$  (Equação 7), e ordenou-se em ordem crescente os dados obtidos, sendo obtido a mediana ( $mad$ ).

$$mad = [A/C - md] \quad (7)$$

Para se estabelecer o intervalo de confiança, é obtido o desvio absoluto da mediana. Os limites superior e inferior são calculados pela Fórmula 8:

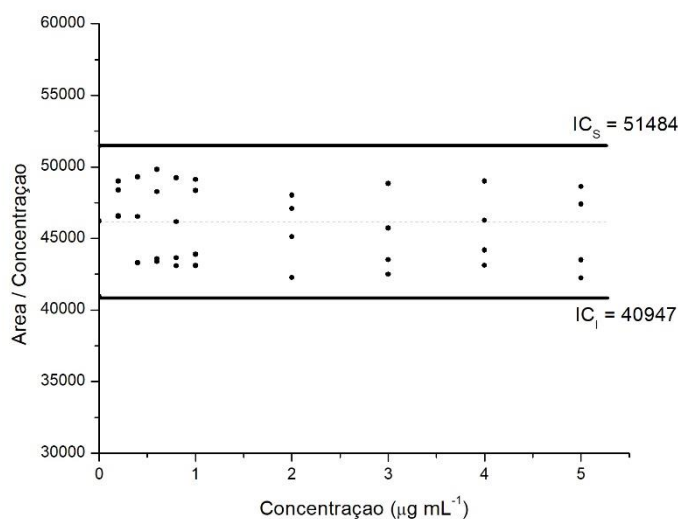
$$IC = md \pm k \cdot mad \quad (8)$$

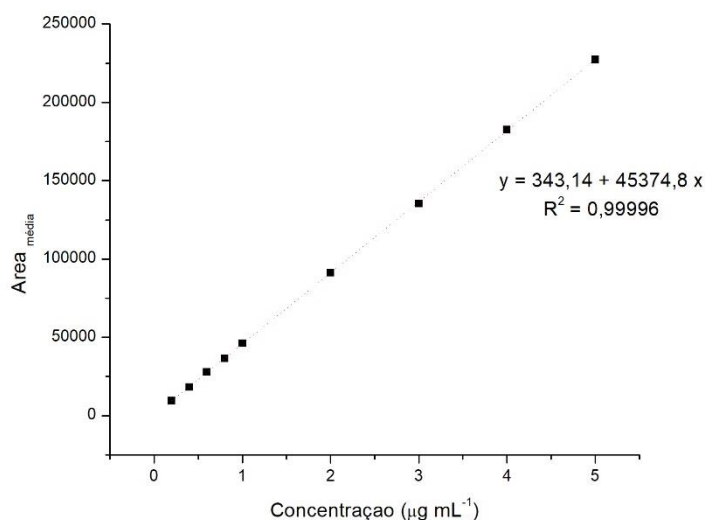
O parâmetro  $k$  varia de 2 a 8,  $IC_S$  é o limite superior e  $IC_I$  é o valor do limite inferior. Escolheu-se  $k=2$  pois o parâmetro  $k$  é arbitrário, de forma que é sugerido que ele seja escolhido após simulações com dados similares aos experimentais.

Com a rejeição dos dados anômalos, aplicou-se a regressão linear com as médias das áreas não rejeitadas e as concentrações para obter a curva analítica. Em seguida, substituiu-se os valores das concentrações na equação da reta, para obter-se as áreas interpoladas (área teórica) e calculou-se os resíduos. A avaliação dos resíduos foi realizada para representar o grau de confiabilidade de interpolação de dados com a curva analítica construída.

Para o teste Huber os pontos situados fora do limite superior ( $IC_S$ ) e inferior ( $IC_I$ ) são rejeitados (anômalos). Para os dados referentes ao LOS não houve a existência de valores anômalos (Figura 14), indicando que todos os valores estão dentro do limite de confiança do teste Huber, portanto, podem ser utilizados para construção da curva analítica. A figura 15 apresenta a curva analítica obtida para LOS, demonstrando que houve uma excelente correlação ( $r^2 = 0,9999$ ).

**Figura 14** – Teste Huber para o composto LOS.



**Figura 15** - Curva analítica para o composto LOS.

A confiabilidade da interpolação dos dados da curva analítica obtida foi avaliada mediante o cálculo dos resíduos do modelo, e dentro do intervalo de concentração avaliado (0,2 - 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) todos os valores ficaram abaixo de 1,36 %. (Tabela 18).

**Tabela 18** – Valores das áreas experimentais e áreas interpoladas para avaliação do resíduo do composto LOS.

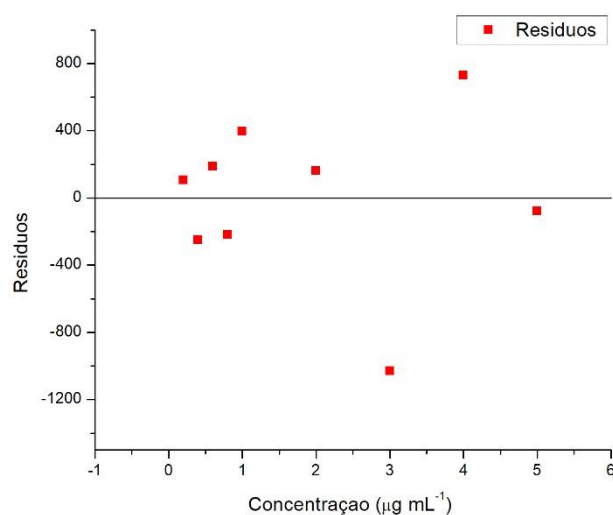
Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área experimental	Área teórica	Resíduo (%)
0,2	9524	9418	+1,13
0,4	18241	18493	-1,36
0,6	27756	27568	+0,68
0,8	36425	36643	-0,59
1,0	46115	45718	+0,87
2,0	91254	91093	+0,18
3,0	135438	136468	-0,76
4,0	182571	181843	+0,40
5,0	227137	227218	-0,04

Realizou-se uma ANOVA da regressão linear para validar o modelo e a significância estatística (Tabela 19). A ANOVA indicou que o modelo linear é adequado, pois valor de p é menor que 0,05 e dentro do grau de confiança de 95,0%. Para o teste de significância avaliou-se a distribuição F e verificou-se que o  $F_{\text{cal.}} > F_{\text{tab.}}$  (5,59) indicando que o modelo linear é significativo e à correlação linear significativa entre x e y. E o gráfico de resíduos (Figura 16) mostrou-se que os resíduos se ajustam aleatoriamente em relação à média.

**Tabela 19** – ANOVA de regressão linear para a curva analítica de LOS.

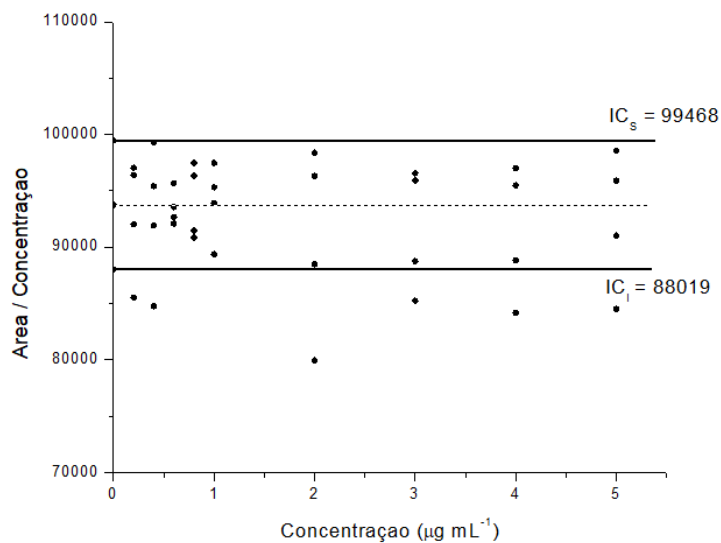
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>Fcal</i>	<i>P-valor</i>
Regressão	1	24,08	24,08	179040,3	$1,08 \times 10^{-16}$
Resíduo	7	0,0009	$1,35 \times 10^{-4}$		
Total	8	24,08			

*gl*=graus de liberdade; *SQ*=soma dos quadrados; *QM*=quadrado médio; *Fcal*.= Teste F de significância

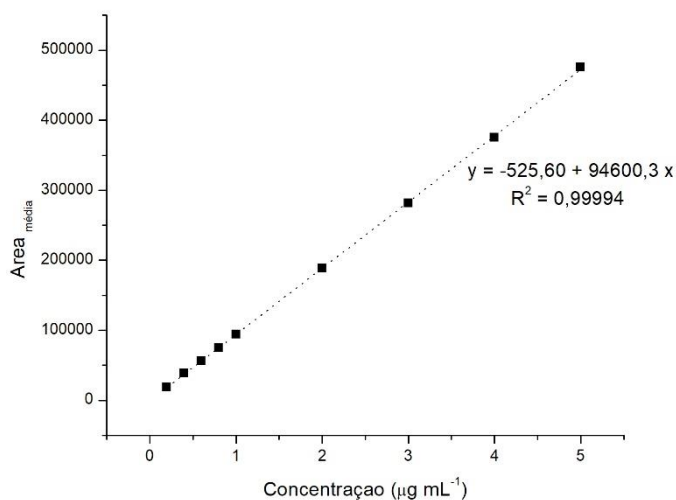
**Figura 16** - Gráfico dos Resíduos para LOS.

O teste de Huber foi aplicado na análise dos dados obtidos, com avaliação da linearidade para o composto HCTZ, e verificou-se a existência de alguns valores anômalos no intervalo de confiança (Figura 17). Excluindo os valores anômalos, construiu-se a curva analítica no intervalo de concentração de 0,2 a 5,0 µg mL<sup>-1</sup>, onde obteve-se uma ótima correlação linear de  $r^2 = 0,9999$  (Figura 18).

**Figura 17** - Teste Huber para o composto HCTZ.



**Figura 18** - Curva analítica para o composto HCTZ



Avaliou-se os resíduos para apresentar o grau de confiabilidade da interpolação dos dados com a curva analítica, e para o intervalo estudado todos os valores ficaram abaixo de 3,46 % (Tabela 20). Tanto para LOS e HCTZ a escolha do  $k=2$  foi adequado como critério para rejeição de valores anômalos, dado que a correlação linear dos compostos foi excelente e a avaliação dos resíduos resultou em valores inferiores à 5%. Do mesmo modo a ANOVA, demonstrou que o modelo linear é adequado para descrever a relação linear entre o sinal analítico e a concentração. Pois o valor de  $p$  é menor que 0,05 indicando que dentro do grau de

confiança de 95,0% (Tabela 21). Para o teste de significância avaliou-se a distribuição F e verificou-se que o  $F_{cal.} > F_{tab.}$  (5,59) indicando que o modelo linear é significativo e à correlação linear significativa entre x e y. E o gráfico de resíduos (Figura 19) mostrou-se que os resíduos se ajustam aleatoriamente em relação à média.

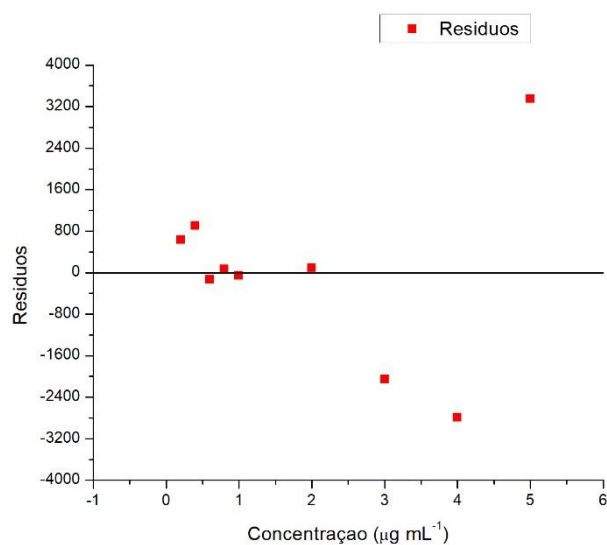
**Tabela 20** – Valores das áreas experimentais e áreas interpoladas com a avaliação do resíduo de HCTZ.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área experimental	Área teórica	Resíduo (%)
0,2	19031	18395	+3,46
0,4	38217	37315	+2,42
0,6	56098	56235	-0,24
0,8	75216	75155	+0,08
1,0	94017	94075	-0,06
2,0	188769	188675	+0,05
3,0	281214	283275	-0,73
4,0	375084	377875	-0,74
5,0	475829	472475	+0,71

**Tabela 21** – Análise da Variância (ANOVA) para a curva analítica de HCTZ.

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>Fcal</i>	<i>P-valor</i>
Regressão	1	$2,16 \times 10^{11}$	$2,16 \times 10^{11}$	61494,0	$4,57 \times 10^{-15}$
Resíduo	7	$2,45 \times 10^7$	35056		
Total	8	$2,16 \times 10^{11}$			

*gl*=graus de liberdade; *SQ*=soma dos quadrados; *QM*=quadrado médio; *Fcal.*= Teste F de significância

**Figura 19** - Gráfico dos Resíduos para HCTZ.

Comparando-se o parâmetro Faixa de Trabalho/ Linearidade com o reportado pela literatura observa-se que os parâmetros obtidos foram superiores aos relatados por Neelima et al. (2015) e observados pela Tabela 22, indicando melhores coeficientes de correlação e faixas de trabalhos mais sensíveis corroborando que a utilização do Teste Huber foi uma ótima ferramenta no auxílio no estudo da melhora da linearidade e faixa de trabalho.

**Tabela 22** – Comparação da Linearidade e Coeficiente de correlação entre o método de Neelima et al. (2015) e o método otimizado.

	Neelima et al. (2015)		Método Otimizado	
	HCTZ	LOS	HCTZ	LOS
Linearidade (µg mL <sup>-1</sup> )	4,0 – 12,0	1,0 – 3,0	0,2 – 5,0	0,2 – 5,0
Coeficiente de correlação (R <sup>2</sup> -ajustado)	0,9979	0,9966	0,99996	0,99994



### 5.3.3 Precisão

#### 5.3.3.1 Repetibilidade

A Repetibilidade foi avaliada em triplicata em três níveis de concentração: 0,2; 1,0 e 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nas Tabela 23 e 24, encontram-se os resultados obtidos para os compostos HCTZ e LOS. Analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar que se obteve excelentes recuperações e DPR inferior ao limite estabelecido pela ANVISA (ANVISA, 2017) de 5,0 %.

**Tabela 23** – Repetibilidade de LOS para o nível de concentração de 0,2; 1,0 e 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração Média experimental (mg)*	Recuperação (%)	DPR (%)
0,2	0,19	98,84	2,84
1,0	0,99	99,42	0,19
4,0	3,98	99,30	0,17

\*n=3; DPR=desvio padrão relativo

**Tabela 24** – Repetibilidade de HCTZ para o nível de concentração de 0,2; 1,0 e 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração Média experimental (mg)*	Recuperação (%)	DPR (%)
0,2	0,20	100,20	0,17
1,0	1,03	103,00	0,86
4,0	4,01	100,25	0,06

\*n=3; DPR=desvio padrão relativo

#### 5.3.3.2 Precisão intermediária

Para avaliação da precisão intermediária foram realizadas análises com repetições (n=4) para soluções de uma mesma amostra contendo concentrações de 0,2; 1,0 e 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de LOS e HCTZ, e para estudo da precisão intermediária foram executadas análises da amostra durante um período de dias diferentes e analistas diferentes. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 25.

Pode-se observar que no estudo da precisão intermediária pelos DP e DPR de ambos os compostos de LOS e HCTZ, os desvios foram inferiores ao limite estabelecido pela ANVISA

(ANVISA, 2017) não excedendo 5,0 %, indicando que independentemente de diferentes analista e dias de análise o método é preciso. Continuando o estudo verificou-se a análise de variância de fator duplo com repetição nas concentrações de 0,2; 1,0 e 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os resultados encontram-se nas Tabelas 26, 27, 28, 29, 30 e 31.

**Tabela 25** – Estudo da precisão intermediária entre diferentes dias e analistas para os compostos de LOS e HCTZ.

Analito	Concentração Teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração Experimental ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DP	DPR (%)	Recuperação (%)
LOS	0,2	D <sub>1</sub> = 0,198	$1,88 \times 10^{-3}$	0,95	98,83
		D <sub>2</sub> = 0,202	$3,67 \times 10^{-3}$	1,81	100,91
		A <sub>1</sub> = 0,200	$4,84 \times 10^{-3}$	2,42	100,08
		A <sub>2</sub> = 0,199	$1,37 \times 10^{-3}$	0,69	99,66
	1,0	D <sub>1</sub> = 0,998	$6,69 \times 10^{-3}$	0,67	99,77
		D <sub>2</sub> = 1,030	$6,02 \times 10^{-3}$	0,58	103,00
		A <sub>1</sub> = 1,017	$1,60 \times 10^{-2}$	1,58	101,66
		A <sub>2</sub> = 1,011	$1,80 \times 10^{-2}$	1,78	101,11
	4,0	D <sub>1</sub> = 4,006	$2,85 \times 10^{-2}$	0,71	100,15
		D <sub>2</sub> = 4,037	$2,95 \times 10^{-2}$	0,73	100,91
		A <sub>1</sub> = 4,038	$2,53 \times 10^{-2}$	0,62	100,94
		A <sub>2</sub> = 4,005	$3,10 \times 10^{-2}$	0,77	100,15
HCTZ	0,2	A <sub>1</sub> = 0,202	$3,90 \times 10^{-3}$	1,94	100,75
		A <sub>2</sub> = 0,206	$3,54 \times 10^{-3}$	1,72	102,75
		D <sub>1</sub> = 0,204	$4,58 \times 10^{-3}$	2,24	102,00
		D <sub>2</sub> = 0,203	$3,78 \times 10^{-3}$	1,86	101,50
	1,0	D <sub>1</sub> = 1,004	$3,43 \times 10^{-3}$	0,34	100,38
		D <sub>2</sub> = 1,016	$8,99 \times 10^{-3}$	0,88	101,63
		A <sub>1</sub> = 1,009	$8,75 \times 10^{-3}$	0,86	100,93
		A <sub>2</sub> = 1,011	$9,65 \times 10^{-3}$	0,95	101,08
	4,0	D <sub>1</sub> = 4,007	$3,61 \times 10^{-3}$	0,90	100,17
		D <sub>2</sub> = 4,042	$1,91 \times 10^{-3}$	0,47	101,05
		A <sub>1</sub> = 4,025	$4,71 \times 10^{-3}$	1,89	100,63
		A <sub>2</sub> = 4,023	$4,75 \times 10^{-2}$	1,18	100,59

DP=desvio padrão; DPR=desvio padrão relativo

**Tabela 26** – Tabela de ANOVA para a concentração de 0,2 µg mL<sup>-1</sup> para LOS.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Dia	5,21 x 10 <sup>-5</sup>	1	5,21 x 10 <sup>-5</sup>	4,84	0,058	5,31
Analista	2,08 x 10 <sup>-6</sup>	1	2,08 x 10 <sup>-6</sup>	0,19	0,671	5,31
Dia x Analista	1,41 x 10 <sup>-5</sup>	1	1,4 x 10 <sup>-5</sup>	1,31	0,285	5,31
Dentro	8,6 x 10 <sup>-5</sup>	8	1,08 x 10 <sup>-5</sup>			
Total	1,54 x 10 <sup>-5</sup>	11				

SQ= soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F=teste F; p=probabilidade de significância 95%

**Tabela 27** – Tabela de ANOVA para a concentração de 1,0 µg mL<sup>-1</sup> para LOS.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Dia	3,11 x 10 <sup>-3</sup>	1	3,11 x 10 <sup>-3</sup>	3,69	4,2 x 10 <sup>-5</sup>	5,31
Analista	8,86 x 10 <sup>-5</sup>	1	8,86 x 10 <sup>-5</sup>	1,83	0,212	5,31
Dia x Analista	1,32 x 10 <sup>-5</sup>	1	1,32 x 10 <sup>-5</sup>	0,27	0,614	5,31
Dentro	3,85 x 10 <sup>-5</sup>	8	4,82 x 10 <sup>-5</sup>			
Total	3,60 x 10 <sup>-4</sup>	11				

SQ= soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F=teste F; p=probabilidade de significância 95%

**Tabela 28** – Tabela de ANOVA para a concentração de 4,0 µg mL<sup>-1</sup> para LOS.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Dia	2,73 x 10 <sup>-3</sup>	1	2,73 x 10 <sup>-4</sup>	3,16	0,113	5,31
Analista	3,23 x 10 <sup>-4</sup>	1	3,23 x 10 <sup>-4</sup>	3,75	0,088	5,31
Dia x Analista	2,08 x 10 <sup>-6</sup>	1	2,08 x 10 <sup>-6</sup>	0,002	0,961	5,31
Dentro	6,89 x 10 <sup>-4</sup>	8	8,62 x 10 <sup>-5</sup>			
Total	1,28 x 10 <sup>-3</sup>	11				

SQ= soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F=teste F; p=probabilidade de significância 95%

**Tabela 29** – Tabela de ANOVA para a concentração de 0,2 µg mL<sup>-1</sup> para HCTZ.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Dia	3 x 10 <sup>-6</sup>	1	3,0 x 10 <sup>-6</sup>	0,24	0,635	5,31
Analista	4,8 x 10 <sup>-5</sup>	1	4,8 x 10 <sup>-5</sup>	3,89	0,083	5,31
Dia x Analista	6,53 x 10 <sup>-5</sup>	1	6,53 x 10 <sup>-5</sup>	5,29	0,050	5,31
Dentro	9,86 x 10 <sup>-5</sup>	8	1,23 x 10 <sup>-5</sup>			
Total	2,15 x 10 <sup>-5</sup>	11				

SQ= soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F=teste F; p=probabilidade de significância 95%

**Tabela 30** – Tabela de ANOVA para a concentração de 1,0 µg mL<sup>-1</sup> para HCTZ.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Dia	4,68 x 10 <sup>-5</sup>	1	4,68 x 10 <sup>-5</sup>	4,85	0,03	5,31
Analista	6,75 x 10 <sup>-6</sup>	1	6,75 x 10 <sup>-6</sup>	0,098	0,76	5,31
Dia x Analista	2,08 x 10 <sup>-6</sup>	1	2,08 x 10 <sup>-6</sup>	0,03	0,86	5,31
Dentro	5,47 x 10 <sup>-5</sup>	8	6,84 x 10 <sup>-5</sup>			
Total	1,02 x 10 <sup>-4</sup>	11				

SQ= soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F=teste F; p=probabilidade de significância 95%

**Tabela 31** – Tabela de ANOVA para a concentração de 4,0 µg mL<sup>-1</sup> para HCTZ.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Dia	3,67 x 10 <sup>-4</sup>	1	3,67 x 10 <sup>-4</sup>	5,09	0,053	5,31
Analista	8,33 x 10 <sup>-6</sup>	1	8,33 x 10 <sup>-6</sup>	0,01	0,917	5,31
Dia x Analista	4,25 x 10 <sup>-4</sup>	1	4,25 x 10 <sup>-4</sup>	5,90	0,041	5,31
Dentro	5,76 x 10 <sup>-4</sup>	8	7,20 x 10 <sup>-5</sup>			
Total	1,37 x 10 <sup>-3</sup>	11				

SQ= soma quadrática; gl=graus de liberdade; MQ=média quadrática; F=teste F; p=probabilidade de significância 95%

Averiguando os resultados obtidos das tabelas de análise de variância de fator duplo de repetição pode-se concluir que a fonte de variação Dia, Analista e interação Dia x Analista não foi significativa ao nível de significância de 5% ( $F < F_{\text{crítico}}$ ) para ambas as concentrações de LOS e HCTZ e indicando desta forma a precisão e a exatidão do método desenvolvido, com um nível de confiança de 95%.

### 5.3.4 Exatidão

Para a determinação da exatidão, realizou-se as análises com repetições (n=4), e as amostras de fármacos fortificadas com os padrões de LOS e HCTZ, com concentração de 0,20; 1,00 e 4,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , durante 4 dias consecutivos os resultados encontram-se nas Tabelas 32 e 33.

**Tabela 32** – Exatidão para o composto de LOS.

<b>Concentração Teórica (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração Média Experimental (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>) *</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
0,20	0,20	1,91	102,5
1,00	1,00	1,72	100,5
4,00	3,98	1,52	99,60

\*n=4; DPR=desvio padrão relativo

**Tabela 33** – Exatidão para o composto de HCTZ.

<b>Concentração Teórica (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentração Média Experimental (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>) *</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
0,20	0,19	3,30	95,0
1,00	1,01	2,87	100,1
4,00	4,00	1,38	100,0

\*n=4; DPR=desvio padrão relativo

Observa-se que nas Tabelas 32 e 33, os valores de DPR para diferentes concentrações dos fármacos de LOS e HCTZ apresentam valores inferiores a 5,0%, o que é aceitável para validação de métodos analíticos, segundo a ANVISA. As recuperações encontradas para cada concentração também se encontram dentro dos limites aceitáveis 95,0-105,0%.

### 5.3.5 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

As estimativas dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos por meio dos parâmetros da curva analítica, indicado pelo método analítico (Equação 8 e 9). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as

recomendações da IUPAC, indicando uma boa sensibilidade analítica do método desenvolvido, como apresentado na Tabela 34.

**Tabela 34** – Limite de Quantificação e Detecção para as amostras de LOS e HCTZ.

	<b>L.Q.</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>L.D.</b> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<b>L.Q.</b> <b>NEELIMA</b> <b>et al. (2016)</b>	<b>L.D.</b> <b>NEELIMA</b> <b>et al. (2016)</b>
LOS	0,032	0,010	0,120	0,040
HCTZ	0,010	0,003	0,150	0,050

LQ=limite de quantificação; LD= limite de detecção

Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os apresentados no artigo de referência, observa-se que o método proposto é mais sensível as condições estudadas.

### 5.3.6 Robustez

A robustez foi realizada durante o processo de otimização através da realização planejamento de experimentos, uma vez que a superfície de resposta indica uma região ótima, isto é, quaisquer valores dentro desta região fornecerão respostas muito semelhantes, o que indica que o método proposto é robusto, pois pequenas flutuações do fluxo da fase móvel (0,5 – 1,1 mL min<sup>-1</sup>) ou da temperatura da coluna (33,0 – 47,0 °C) não irão causar distorção dos resultados significativos.

## 5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

### 5.4.1 Amostra de fármacos

Com o método desenvolvido e otimizado, avaliou-se a concentração de LOS e HCTZ em várias formulações farmacêuticas adquiridas em farmácias locais. Na Tabela 35, encontram-se os resultados obtidos.

**Tabela 35** – Avaliação quantitativa do princípio ativo em amostras de comprimidos comerciais por CLAE.

Amostras	Método proposto			Método comparativo			t (4,3)	F (19,0)
	Média*	DPR (%)	Rec. (%)	Média*	DPR (%)	Rec. (%)		
Eurof.	LOS	48,66	0,61	97,32	---	---	---	---
	HCTZ	12,95	0,78	103,60	---	---	---	---
Eurof.	LOS	97,15	1,35	97,15	---	---	---	---
	HCTZ	25,91	1,22	103,65	---	---	---	---
EMS	LOS	98,44	1,24	98,44	---	---	---	---
	HCTZ	25,02	1,95	100,10	---	---	---	---
Eurof.	LOS	48,02	3,40	96,04	48,04	0,52	96,08	2,48
Medley	LOS	100,45	1,06	100,45	99,16	1,32	99,16	3,91
Cimed	HCTZ	26,07	0,31	104,30	23,86	1,28	95,44	4,20
Teuto	HCTZ	50,13	1,22	100,26	49,51	0,44	99,02	3,24

\*n=3; DPR= desvio padrão relativo; Rec.= Recuperação; F=teste F; t=teste t pareado; p=probabilidade de significância 95%

Mediante a tabela a cima, pode-se verificar que foi possível quantificar LOS e HCTZ em formulações farmacêuticas, sendo a massa quantificada próxima aos valores definidos pelos fornecedores, com ótimos valores de DPR e recuperação. Não houve a interferência de excipiente indicando que o método é seletivo para avaliação dos compostos de análise.

A precisão e exatidão do método proposto foram avaliadas por meio da aplicação dos Teste-t pareado e Teste-F de comparação de variâncias. Para tanto os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados pela aplicação do método comparativo (método espectrofotométrico). Diferentemente da CLAE, para o método de UV-Vis as amostras que contém os dois fármacos conjunto, não é possível realizar a quantificação dos analitos com confiabilidade, pois LOS e HCTZ possuem comprimentos de ondas específicos próximos,  $\lambda_{LOS} = 225 \text{ nm}$  e  $\lambda_{HCTZ} = 226 \text{ nm}$ , conseqüentemente a resposta analítica medida não distingue o que seria proveniente do teor de LOS ou de HCTZ. Essa proximidade de comprimentos de ondas, estabelece que o método de UV é limitado a análises individuais de compostos, não sendo possível quantificar corretamente os teores de dois ou mais analitos que apresentam absorção em comprimentos de onda muito próximos. Portanto, o método de UV-Vis foi utilizado somente para amostras comerciais com princípios ativos distintos, e os resultados encontra-se na Tabela 35.

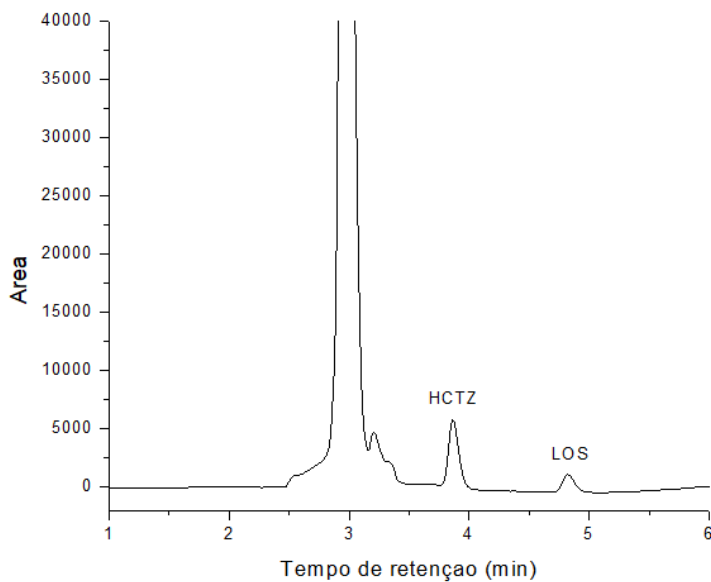
Em todos os casos, os valores obtidos pelo método proposto mostraram-se em boa concordância com os obtidos pelo método comparativo. A aplicação dos Teste-t pareado o valor *t crítico* é  $t_{(0,05;2)} = 4,3$  sendo este maior que os valores de *t calculados* e pode-se afirmar que os

método não produzem resultados significativamente diferentes para a concentração de LOS e HCTZ. A aplicação do Teste-F de comparação de variâncias o valor  $F_{crítico} t_{(0,05;2,2)} = 19,0 > F_{calculados}$  e pode-se concluir que não existem diferenças significativas entre os desvios-padrão dos métodos de CLAE e UV-Vis.

#### 5.4.2 Análise do fármaco em urina sintética

Na literatura há estudos com a análise de fármacos em matrizes mais complexas, tais como na urina. A urina é uma das matrizes na qual se tem detectado os fármacos anti-hipertensivos, devido ao fato que uma vez ingerido uma parte é absorvida pelo corpo, e outra excretada. Uma parte da excreção da molécula pode ser na sua forma inalterada, ou alteradas metabolicamente. Escolheu-se a urina sintética, para avaliar o comportamento do fármaco nesse meio, e as possíveis interferências na quantificação dos fármacos em estudo.

**Figura 20** - Cromatograma de LOS e HCTZ em urina sintética.





Com base no cromatograma (Figura 20), foi possível a identificação de picos referentes a LOS e HCTZ na urina sintética, não tendo a interferência de algum excipiente, ou, compostos presentes na urina durante a eluição de LOS e HCTZ. Na Tabela 36, observa-se que houve excelentes resultados de recuperação para ambos os compostos, entretanto na concentração para o LD de LOS e HCTZ, não foi possível a identificação devido à baixa concentração.

**Tabela 36** – Ensaio dos fármacos de LOS e HCTZ em urina sintética.

	<b>LQ</b> <b>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>	<b>Recuperação</b> <b>(%)</b>	<b>Acima</b> <b>(<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</b>	<b>DPR</b> <b>(%)</b>	<b>Recuperação</b> <b>(%)</b>
LOS	0,032	0,85	100,64	0,20	1,28	100,42
HCTZ	0,010	4,93	105,00	0,20	0,80	98,14

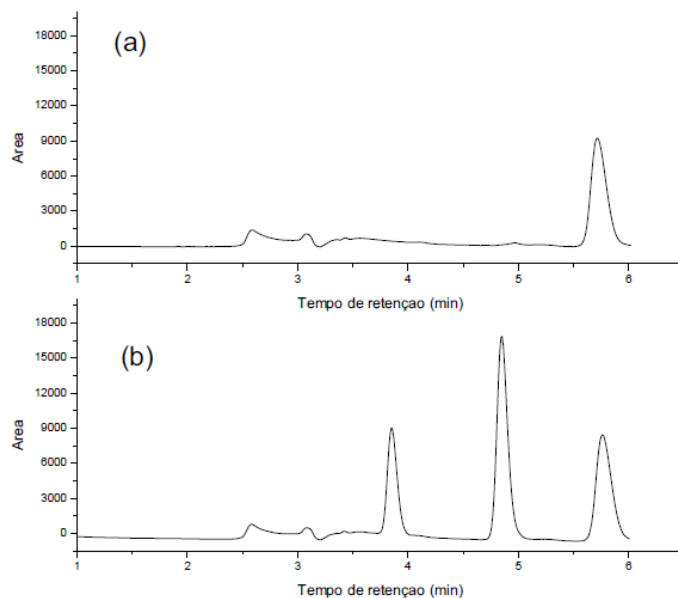
LQ=limite de quantificação; DPR=desvio padrão relativo;

#### 5.4.3 Análise de fármacos em água superficial de rio

Os estudos nos últimos anos, tem-se intensificado no estudo de fármacos em diversos ambientes aquáticos, sendo detectados em vários países. Dentre as classes de fármacos, os anti-hipertensivos tem sido identificado nesses meios, devido a relação direta com o número de pessoas com problemas relacionados com hipertensão e, conseqüentemente um grande consumo desta classe de medicamento.

Neste trabalho foi realizada a fortificação de uma amostra de água coletada no lago de Olarias, na cidade de Ponta Grossa com intuito de apenas avaliar o comportamento da amostra fortificada na amostra de rio com os fármacos de LOS e HCTZ. Para fortificação foram adicionadas alíquotas das soluções dos fármacos de modo a obter uma concentração final de  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  para LOS e HCTZ. A Figura 21 apresenta o cromatograma obtido para estas análises e a Tabela 37 as porcentagens de recuperação encontradas.

**Figura 21** - (a) Cromatograma da amostra do branco da água superficial de rio; (b) Cromatograma da fortificação da amostra do rio com adição de LOS e HCTZ.



**Tabela 37** – Ensaio de Recuperação e DPR para as amostras de LOS e HCTZ em água de rio

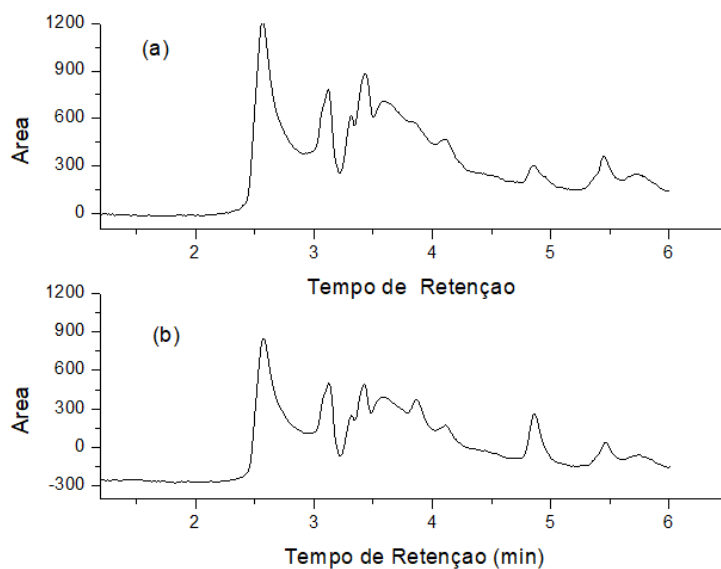
	<b>Recuperação (%)*</b>	<b>DPR (%)</b>
LOS	97,22	0,71
HCTZ	95,55	0,80

\*n=3; DPR=desvio padrão relativo

Constatou-se que nas concentrações estudadas foi possível a quantificação de LOS e HCTZ em amostras de água de rio, não havendo a interferência de algum efeito da matriz. Os ensaios de recuperação foram excelentes, assim como o DPR.

Estudou-se também, as concentrações nos limites de quantificação e detecção dos compostos, devido a possibilidade de se encontrar esses compostos em águas em seus limites inferiores. Na Figura 22 encontra-se o cromatograma desse estudo.

**Figura 22** - Cromatograma da amostra do branco da água de rio; (b) Cromatograma da fortificação da amostra do rio com LOS=0,032  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e HCTZ=0,010  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



Diferentemente, em concentrações mais baixas não foi possível a identificação dos compostos em análise devido a interferentes na matriz de água. Esse interferentes devem estar presentes também nas análises na concentração mais alta (Figura 21) porém como está em concentração mais alta, os interferentes acabam sendo “inibidos”. Essas interferências da matriz poderiam ser amenizadas com pré-tratamento e/ou pré-concentração da amostra.

O método otimizado e validado para determinação de LOS e HCTZ com aplicação em diferentes matrizes permitiu que o método cromatográfico não difere na especificidade e seletividade para quantificação dos compostos.

## 6 CONCLUSÃO

O método cromatográfico otimizado proposto neste trabalho, permitiu a identificação e quantificação de LOS e HCTZ em amostras comerciais de medicamentos, em curto tempo, com boa precisão e exatidão.

A utilização do planejamento de experimentos, foi uma excepcional ferramenta para analisar variáveis que são importantes para o sistema cromatográfico. A utilização da função desejabilidade proposta por Derringer e Suich apresentou diversas vantagens, pois possibilitou a avaliação de múltiplas respostas simultâneas, proporcionando economia de tempo assim como a obtenção da melhor condição cromatográfica.

Na validação do método analítico foram obtidos resultados satisfatórios. A utilização do Teste Huber foi um ótimo procedimento para avaliar a linearidade permitindo obter curvas analíticas com  $r^2$  superiores a 0,9999. Os parâmetros de validação ficaram dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA. O método apresentou-se seletivo, pois não houve a interferência de excipientes na quantificação de LOS e HCTZ.

Da mesma forma, fortificou-se amostras dos compostos com urina sintética e conseguiu-se quantificar nas concentrações de LQ e acima, porém não foi possível quantificar na faixa de concentração de LD, para ambos os compostos. Fortificou-se também em amostras de água de rio, e conseguiu quantificar em concentrações superiores, contudo, na faixa de concentração de LQ e LD não foi capaz a quantificação pois houve a interferência da matriz, sendo que para trabalhos futuros o estudo de pré-concentração ou pré-tratamento da amostra devem ser considerados.

Este trabalho propôs uma metodologia analítica viável e eficaz para a quantificação de LOS e HCTZ em várias matrizes além de contribuir como uma nova metodologia passível de ser utilizada em laboratórios de controle de qualidade.

## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, N. Spectrophotometric methods for simultaneous determination of Carvedilol and Hydrochlorothiazide in combined dosage form. **Arabian Journal of Chemistry**, v.9, p. 355-360, 2016.
- AGUIAR, S.; WERKEMA, M. C. C. **Planejamento e análise de experimentos: como identificar e avaliar as principais variáveis influentes em um processo**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, p. 294, 1996a.
- AGUIAR, S.; WERKEMA, M. C. C. **Otimização estatística de processos: como determinar a condição de operação de um processo que leva ao alcance de uma meta de melhoria**. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, p.330,1996b.
- AKESOLO, U.; GONZÁLES, L. Application of capillary zone electrophoresis to the screening of some angiotensin II receptor antagonists. **Electrophoresis**, v. 23, n. 2, p. 223-229, 2002.
- ALI, T.A.; MOHAMED, G.G.; AGLAN, A.A.; HEAKAL, F.E. RP-HPLC Stability-indicating method for estimation of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in bulk and pharmaceutical dosage form. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v.44, n.1, p.1601-1608, 2016.
- ALI, S.A.; HASSAN, A. Cyclic voltammetric study of Losartan Potassium. *International Research of Pure and Applied Chemistry*, v.4, n.1, p. 128-136, 2014.
- AMNA, B.W.E.M.; ELSADIG, H.R. RP-HPLC method Development and validation of satability indicating method a for estimation of losartan potassium uder stress condition and tablete dosage form. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.7, n.6, p.2343-2351, 2016.
- ANSARI, M. A comparative study of first-derivative spectrophotometry and high-performance liquid chromatography applied to the determination of losartan potassium in tablets. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 10, p. 1166- 1170, 2004.
- ANEESH, T.P.; RENJU, R.; ARAVIND, P.M.; ANAJU, S.; MANISHA, C. RP-HPLC Method for simultaneous determination of losartan and chlorthalidone in pharmaceutical dosage form. **International Research Journal of Pharmacy**, v.6, n.7, p.453-457, 2015.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anuário estatístico do mercado farmacêutico 2016**. Brasília, 2016.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 166, de 24 de Julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos**. Acessado em 05 de Novembro de 2018.
- BALLESTEROS, M. R.; FARIA, A.F.; OLIVEIRA, A.L. Determination of Losartan potassium associated with Chlortalidone or Hydrochlorothiazide in capsules by capillary zone electrophoresis. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.18, n.3, 2007.

BARI, S.B.; SATHE, S.R. Simultaneous analysis of losartan potassium, atenolol, and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption densitometry. **Acta Chromatographica**, n.19, p.270-278, 2007.

BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 401, 2001.

BATHIA, N.M.; DESAI, R.B.; JADHAV, S.D. Simultaneous estimation of Losartan potassium and hydrochlorothiazide from tablets by first order derivative spectroscopy. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n.1, p. 464-466, 2013.

BHATIA, M.S.; SINGHVI, I. Colorimetric methods for estimation of losartan potassium from tablete formulation. **Asian Journal of Chemistry**, v.18, n.2, p.1537-1539, 2006.

BRURETTO, M.R.; CONTERAS, Y.; CLAVIJO S. Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection, **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 50, p.194-199, 2009.

CARLUCCI, G.; PALUMBO, G.; MAZZEO, P.; QUAGLIA, M.G. Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid chromatography. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.23, p.185-189, 2000.

CHAUDHARY, A.B.; PATEL, R.K.; CHAUDHARY, S.A. Determination of Losartan potassium and perindopril erbumine in tablet formulations by reversed-phase HPLC. **Internation Journal of ChemTech Research**, v.2,n.2, p.1141-1146, 2010.

COCKBURN, R.; NEWTON, P. N.; AGYARKO, E. K.; AKUNYILI, D.; WHITE, N. J. The global threat of counterfeit drugs: Why Industry and Governants Must Communicate the Dangers. **Plos Medicine**, v.2, n.4, p.302-308, 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **North Clin Istanbul**, v.3, n.2, p.156-160, 2016.

DOLAN, J.W. Back to basics: The role of pH in Retention and Selectivity. **LCGC Europe**, v.30, n.1, p. 30-33, 2017.

DRESSMAN, J.; KOCZWARA, A. Poor-Quality Poor-Quality and counterfeit drugs: A systematic assessment of prevalence and risks based on data published from 2007 to 2016. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-9, 2017

DUBEY,R.; BHUSARI,V.K.; DHANESHWAR,S.R. Validated RP-HPLC Method for simultadeous quantitation of losartan potassium and metalazone in bulk drug and formulation. **Scientia Pharmaceutica**, v.79, n.545-554, 2011.

ÉPSHTEIN, N.A. Validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis. **Pharm. Chem. J.**, v. 83, n. 4, p. 40-56, 2004.

ERK, N. Simultaneous determination of fosinopril and hydrochlorithiazide in pharmaceutical formulation by spectrophotometric methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.27, p. 901-912, 2002.

FANTÁSTICO. **Entenda como foi feito o teste dos remédios genéricos do Fantástico**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/fantastico/noticia/2017/01/entenda-como-foi-feito-o-teste-dos-remedios-genericos-do-fantastico.html>>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

FARTHING, D.; SICA, D.; FAKHRY,I.; PEDRO, A.; GEHR, T.W.B. Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate. **Journal Chromatography B**, v. 704, p.374-378, 1997.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5º ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FDA. **“FDA announces voluntary recall of several medicines containing valsartan following detection of an impurity”**. Disponível em: <<https://www.pharmacist.com/article/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection/>>. Acessado em 10 de novembro de 2018, 2018a.

FDA. **“Sandoz Inc. Issues Voluntary Nationwide Recall of One Lot of Losartan Potassium and Hydrochlorothiazide Due to the Detection of Trace Amounts of NDEA (N-Nitrosodiethylamine) Impurity Found in the Active Pharmaceutical Ingredient(API)”**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Safety/Recalls/ucm625492/>>. Acessado em 10 de novembro de 2018, 2018b.

FERREIRA, M.M.C.; RIBEIRO, F.A. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, vol. 21, n.1, p. 164-171, 2008.

GADEPALLI, S.G.; DEME, P.; KUNCHA, M.; SISTLA, R. Simultaneous determination of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide by LC-ESI-MS/MS and its application to pharmacokinetics in rats. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n.6, p.399-406, 2014.

GHOSH, S.K.; INDRANI, B. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for the determination of atenolol and hydrochlorothiazide in combined solid dosage form. **Internation Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v.7, n.2, 2015.

GIRIDHAR, R.; PRABHAKAR, A. H. A rapid colorimetric method for the determination of losartan A rapid colorimetric method for the determination of losartan potassium in bulk and in synthetic mixture for solid dosage form. **Journal of Pharm. and Bio. Anal.**, v. 27, n. 6, p. 861-866, 2002.

GONZÁLES, L.; AKESOLO, U. Application of capillary zone electrophoresis to the screening of some angiotensin II receptor antagonists. **Electrophoresis**, v. 23, n. 2, p. 223-229, 2002.

GONZÁLES, L.; LÓPES, R.M.; JIMÉNEZ,R.M. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonist in human plasma by HPLC with fluorimetric detection. **Journal Chromatography A**, v.949, p.49-60, 2002.

GUS, M.; KOHLMANN, O. Tratamento medicamentoso. **Brazilian Journal of Nephrology**, v.32, p. 29 – 43, 2010.

HABIB, I.H.I.; WESHAHY, S.; TOUBAR S. Cathodic stripping voltammetric determination of losartan in bulk and pharmaceutical products. **Port. Electrochim.**, v. 24, p. 315-342, 2008.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 6<sup>o</sup> Edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2005.

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

HILLAERT, S.; VAN DE BOSSCHE. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and several angiotensin II receptor antagonists by capillary electrophoresis. **Journal of Pharm. and Bio. Anal.**, v. 31, p.329-339, 2003.

HINGE, M.A.; BHANUSALI,V.M.; MAHIDA,R.J. Spectrophotometric and HPLC determination of Chlorthalidone and Losartan potassium in combined dosage form. **Taylor e Francis**, v.6, n.4, p.408-420, 2016.

HOSSEN, A.; HAQUE A., DEWAN, I; KABIR,H.; HOSSAIN, K.; ISLAM, A. Development and validation of RP-HPLC method for the simultaneous estimation of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablete dosage form. **Journal Pharmaceutical Science**, v.10, n.1, p.35-42, 2011.

HUANG, T.; HE, Z.; YANG, B.; SHAO, L.; ZHENG, X.; DUAN, G. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide in human plasma by reverse-phase HPLC from linear gradient elution. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.3, p.644-648, 2006.

HUDARI, F.F.; SOUZA, J.C.; ZANONI, M.V.B. Adsorptive stripping voltammetry for simultaneous determination of hydrochlorothiazide and triamterene in hemodialysis samples using a multi-walled carbon nanotube-modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v.179, n.1, p.652-657, 2018.

HURTADO, R. L.; LASMAR, M. C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 30, n.4, p. 891-895, 2014.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação de validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 01 -MARÇO/2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>>. Acessado dia 28 de novembro de 2018.

JAIN, A.K.; DUBEY, B.K.; JOSHI, A.; KHARE, S.; BHARDWAJ, R., JAIN, P. Validated RP-HPLC Method Development for the estimation of Losartan Potassium in marketed formulation. **Asin Journal Pharmaceutical Education and Research**, v.7, n.4, p.23-29, 2018.

JOSHI, S.J.; KARBHARI, P.A.; BHOIR, S.I.; BINDU, K.S.; DAS, C. RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, n.3, p.362-371, 2010.



KALARIYA, P.D.; NAMDEV, D.; SRINIVAS, R.; GANANADHAMU, S. Application of experimental design and response surface technique for selecting the optimum RP-HPLC conditions for the determination of moxifloxacin HCl and ketorolac tromethamine in eye drops. **Journal of Saudi Chemical Society**, p. 1-10, 2014.

KANNEL, W. B. Blood pressure as a Cardiovascular risk factor: prevention and treatment. **Jama**, v. 275, n. 20, p. 1571-1576, 1996.

KAVITHA, J.; MURALIDHARAN, S. Development and Validation of new method for atenolol, hydrochlorothiazide and losartan potassium by RP-HPLC: It's application to routine quality control analysis. **Internation Journal of ChemTech Research**, v.2, n.2, p.880-884, 2010.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. 1ª Edição, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

KOCZWARA, A.; DRESSMAN, J. Poor-Quality Poor-Quality and counterfeit drugs: A systematic assessment of prevalence and risks based on data published from 2007 to 2016. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 1-9, 2017.

KOHLMANN, O.; MION, D. V Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 89, n. 3, p. 24-79, 2006.

KOLSURE, A.K.; CHAVAN, B.B.; CHABUKSWAR, A.R.; KUCHEKAR, B.S. Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of atorvastatin calcium and losartan potassium in combined dosage form. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.32, p.57-61, 2014.

KUMAR, L.; REDDY, M.S.; MANAGULI, R.S.; GIRISH, P.K. Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, p.1-7, 2015.

LACOURCIÈRE, Y.; POIRIER, L. Antihypertensive effects of two fixed-dose combinations of Losartan and Hydrochlorothiazide versus Hydrochlorothiazide monotherapy in subjects with ambulatory systolic hypertension. **American Journal of Hypertension**, v.16, n.12, p.1036-1042, 2008.

LAKSHMI, K.S.; LAKSHMI, S. Design and optimization of a chemometric-assisted spectrophotometric determination of telmisartan and hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage Form. **Journal of Young Pharmacists**, v.2, p. 85-89, 2010a.

LAKSHMI, K.S.; LAKSHMI, S. Simultaneous Analysis of losartan potassium, amlodipine besylate, and hydrochlorothiazide in bulk and in tablets by high-performance thin layer chromatography with uv-absorption densitometry. **Journal of analytical methods in chemistry**, 2012b.

LANDAU, R.; ACHILLADELIS, B.; SCRIBINE, A. **Pharmaceutical Innovation: revolutionizing human health**. 1ª Edição. Philadelphia: Editore Chemical Heritage Foundation, 1999.

LASTRA, O.C.; LEMUS, I.G.; SÁNCHEZ, H.J.; PÉREZ, R.F. Development and validation of a UV derivative spectrophotometric determination of Losartan potassium in tablets. **Journal of Pharm. and Bio. Anal.**, v.33, n.2, p.175-180, 2003.

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

MACHINI, W.B.S.; DAVID-PARRA, D.N.; TEIXEIRA, M.F.S. Electrochemical investigation of the voltammetric determination of hydrochlorothiazide using a nickel hydroxide modified nickel electrode. **Material Science and Engineering C**, p. 344-348, 2015.

MAGGIO, R.M.; CASTELLANO, P.M.; KAUFMAN, T.S. A multivariate approach for the simultaneous determination of losartan potassium and hydrochlorothiazide in a combined pharmaceutical tablet formulation. **Anal Bioanal Chem.**, v.391, n.8, p.2949-2955, 2008.

MARTINO, R.; MALET-MARTINO, M.; GILARD, V.; BALAYSSAC, S. Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification. **Anal Bioanal Chemical**, v.398, n.1, p.77-92, 2010.

MEYYANATHAN, S.N.; SELVADURAIA, M. Sensitive and accurate estimation of losartan potassium formulation by high-performance thin-layer chromatography. **Pharmaceutical Methods**, v. 2, n.2, p.95-98, 2011.

MOHAMMED I.; WALASH, N.M.; EL-ENANY, M.I.; EID, M.E.F. Simultaneous determination of metolozone and losartan potassium in their binary mixtures using high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection: application to combined tablets and spiked human plasma. **Luminescence**, 2013.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C.; ANDERSON-COOK, C.M. **Response surface methodology: Process and Product optimization using designed experiments**. 3ª Edição. New Jersey: Editora John Wiley e Sons, 2009.

NAGAVALLI, D.; VAIDHYLINGAM, V.; SANTHA, A.; SANKAR, A.S.K.; DIVYA, O. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. **Acta Pharm.**, n.60, p. 141-152, 2010.

NELIMA, M.S.; GANDHI, B.M.; RAJU, V.B.; SUMANTH, K.S.; SRINIVAS, K.; MOUNIKA, P.; LAKSHMI, P.J.N. Development and validation of stability indicating reverse phase HPLC method for simultaneous estimation of atenolol, hydrochlorothiazide and losartan in bulk and pharmaceutical dosage form. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.9, n.2, p.118-124, 2016.

NIDHAL, M.S.M.; HASAN, R.A.; HASSAN, M.H. Method Development and validation of simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan in tablet dosage form by RP-HPLC. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.10, n.1, 227-231, 2019.

NOVAES, C.G.; YAMAKI, R.T.; NASCIMENTO JÚNIOR, B.B.; BARRETO, J.A.; VALASQUES, G.S.; BEZERRA, M.A. Otimização de métodos analíticos usando Metodologia

de Superfície de Resposta – Parte I: Variáveis de processo. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.3, p.1-42, 2017.

OBANDO, M.A.; ESTELA, J.M.; CERDÀ V. Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in tablets by high-performance low-pressure chromatography using a multi-syringe burette coupled to a monolithic column. **Anal Bioanal Chem.**, v.391, p.2349-2356, 2008.

OLIVEIRA, G. C. R. **Falsificação de medicamentos no Brasil**, monografia apresentada como requisito para conclusão do curso de bacharelado em Direito do Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2011.

O'NEIL, M.J. **An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. The Merck Index: Whitehouse Station (NJ), 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Counterfeit drugs report of a joint. WHO/DMP/CFD**. Geneva, 1992a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Medicamentos Falsificados. Diretrizes para o desenvolvimento de medidas de combate a medicamentos falsificados. **Organização Mundial da Saúde: Organização Pan-Americana de Saúde**, Brasília, 2005b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **1 in 10 medical products in developing countries is substandard or falsified**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/detail/28-11-2017-1-in-10-medical-products-in-developing-countries-is-substandard-or-falsified/>>. Acessado em 17 de dezembro de 2018, 2017c.

PATEL, N.D.; CAPTAIN, A.D. Extractive Spectrophotometric Method for Simultaneous Determination of Losartan Potassium and Atenolol in Bulk and In Pharmaceutical Dosage Form. **Internat. Journal of PharmTech Research**, v. 5, n. 2, p. 629-640, 2013a.

PATEL, J.R.; PETHANI, T.M.; VACHHANI, A.N.; SHETH, N.R.; DUDHREJIYA, A.V. Development and validation of bioanalytical method for simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.970, p. 53-59, 2014b.

PATIL, P.R.; RAKESH, S.U.; DHABALE, P.N.; BURADE, K.B. RP-HPLC method for simultaneous estimation of losartan potassium and amlodipine bisylate in Tablet formulation. **International Journal of ChemTech Research**, v.1, n.3, p.464-469, 2009.

PIERIN, A. **Hipertensão Arterial: uma proposta para o cuidar**. São Paulo: Editora Manoela, cap. 2, p.11-12, 2004.

PIMENTA, E. Hidroclorotiazida x clortalidona: os diuréticos tiazídicos são todos iguais ?. **Rev. Bras. Hiper.**, n.3, v.15, 2008.

QUAGLIA, M.G.; DONATI, E.; CARLUCCI, G. Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC. **Journal of Pharm. and Bio. Anal.**, v.29, p.981-987, 2002.

RAHMAN, N.; SIDDIQUI, M.R.; AZMI, S.N.H. Development and validation of kinetic spectrophotometric method for the determination of losartan potassium in pure and commercial tablets. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.53, n.3, p.735-743, 2006.

RAMYA, G.; PURANIK, S.B.; KUMAR, G.V.S.; SRIDHAR, K.A. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine and losartan in bulk drug and tablete dosage formulation. **International Research Journal of Pharmacy**, v.3, n.11, p.92-95, 2012.

RAO, J.R.; SAVITH, S.Y. RP-HPLC Method for simultaneous estimation of aspirin, ramipril, hydrochlorothiazide, simvastatin and atenolol from pharmaceutical dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.9, p. 443-448, 2014.

RAO, K.S.; SRINIVAS, K. RP-HPLC method for the determination of losartan potassium and ramipril in combined dosage form. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p.108-111, 2010.

RIBANI, M. validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

SALAMANCA-NETO, C.A.R.; EISELE, A.P.P.; RESTA, V.G.; SCREMIN, J.; SARTORI. Differential pulse voltammetric method for the individual and simultaneous determination of antihypertensive drug metoprolol and its association with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms. **Sensor and Actuators B.**, v. 230, p. 630-638, 2016.

SANTOS, M.C.G.; TARLEY, C.R.T.; DALL'ANTONIA, L.H.; SARTORI, E.R. Evaluation of boron-doped diamond electrode for simultaneous voltammetric determination of hydrochlorothiazide and losartan in pharmaceutical formulations. **Sensor and Actuators B.**, p. 263-270, 2013.

SHAH, J.V.; SHAH, P.A.; SHAH, P.V.; SANYAL, M.; SHRIVASTAV. Fast and sensitive LC-MS-MS method for the simultaneous determination of lisinopril and hydrochlorothiazide in human plasma. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.7, n.3, p. 163-169, 2017.

SHAALAN, R.A.; BELAL, T.S.; YAZBI, F.A.; ELONSY, S.M. Validated stability-indicating HPLC-DAD method of analysis for the antihypertensive triple mixture of amlodipine besylate, valsartan and hydrochlorothiazide in their tablets. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, p.1381-1394, 2017.

SHAKYA, A.K. HPLC-PDA Determination of Losartan potassium and Hydrochlorothiazide using design of experiments. **Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.3, p.153-71, 2015.

SIDDIQUI, M.M.; QASIM, S.S.; ABUEIDA, E.Y. Isocratic RP-HPLC method validation and verification os losartan potassium in pharmaceutical formulation with stress test stability for drug substance. **Scholars Reserach Library**, v.3, n.5, p.160-167, 2011.

SIDDIQUI, M.R.; ALOTHAMAN, Z.A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A Review. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, p.1411-1422, 2013.

- SILVA, P. **Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.67, p. 692-700, 2006.
- SMAJIC, M.; VUJIC, Z.; MULAVDIC, N. Na improved HPLC method for simultaneous analysis of losartan potassium and hydrochlorothiazide with the aid of a chemometric protocol. **Chromatographia**, v.76, n.419-425, 2013.
- SRINUBABU, G.; CHA, R.; SARATH, N.; KUMAR, P.K.; RAO, J.V. Development and validation of a HPLC method for the determination of voriconazole in pharmaceutical formulation using na experimental design. **Talanta**, v.71, n.3, p. 1424-1429, 2007.
- TENGLI, A.R.; GURUPADAYYA,B.M.; SONI, N. Simultaneous estimation of Hydrochlorothiazide, amlodipine and losartan in tablete dosage form by RP-HPLC. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v.4, p.33-38, 2013.
- VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C.R.F. 2003. “**Análise Quantitativa por Cromatografia**”. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/10/17/analise-quantitativa-por-cromatografia/>>. Acessado em 24 de novembro de 2018.
- VETUSCHI, C.; GIANNANDREA, A. Anti-beer Evaluation of Hydrochlorothiazide and Losartan by UV Derivative Spectrophometry. **Analytical Letters**, v.36, n. 5, p. 1051-1064, 2006.
- WANG, Q.; DING, F.; LI, H.; HE, P; FANG, Y. Determination of hydrochlorothiazide and rutin in Chinese herb medicines and human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 5, p. 1507-1514, 2003.
- WANKHEDE, S.B.; RAKA, K.C.; WADKAR, S.B.; CHITLANGE, S.S. Spectrophotometric and HPLC Methods for simultaneous estimation of amlodipine besilate, losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.72, n.1, p.136-140, 2010.
- WEINERT, P.L.; PEZZA, L., PEZZA, H.R. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v.31, n.5, 2008.