



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO MESTRADO

Cromatografia líquida de alta eficiência e Química verde na
determinação de losartana em associação com hidroclorotiazida
em medicamentos

Diego Coelho Barroso dos Santos

Orientador: Carlos Martin Infante Córdova

Brasília, DF

(2023)

Diego Coelho Barroso dos Santos

Cromatografia líquida de alta eficiência e Química verde na determinação de losartana em associação com hidroclorotiazida em medicamentos

Orientador: Carlos Martin Infante Córdova

Brasília, DF

(2023)

COMUNICADO

Trabalho submetido à avaliação como parte da Defesa de mestrado

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Infante Martin Córdova
Presidente (IQ – UnB)

Prof.^a Dra. Marly Eiko Osugi
Membro Titular (IQ – UnB)

Prof. Dr. Jorge César Masini
Membro Titular (IQ – USP)

Prof. Prof.^a Dra. Mônica Valero da Silva
Membro Suplente (FS – UnB)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe Deuza, minha irmã Thais e ao meu pai Dagoberto por sempre terem me apoiado nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para superar esse desafio.

Ao prof. Dr Carlos Infante Martin Córdova por ter me aceitado como seu aluno e por toda ajuda nesse trajeto.

À Prof^a. Dr. Marly Eiko Osugi por ter emprestado sua coluna cromatográfica que foi uma peça essencial para a execução deste trabalho.

Aos prof. Dr. Fabrício Machado Silva, Prof. Dr. José Joaquin Linares Leon, à Prof^a. Dra. Eloísa Dutra Caldas e à Central Analítica – IQ(UnB), por gentilmente me cederem seu equipamento para fazer as análises

Aos Colegas de trabalho Patrícia Silva Rêgo, Karolyne Vilela de Oliveira, Rosângela Maia Feitosa, Yuri Henrique de Oliveira Falcão e Gabriel Ferreira da Silva Brito pela companhia, conversas e ajuda nessa trajetória.

À minha mãe Deuza e à minha irmã Thais que são as pessoas que mais amo nessa vida e que sempre me apoiaram e deram força par a conclusão do mestrado.

À psicóloga Márcia e ao psiquiatra Danilo por terem me ajudado a cuidar da saúde mental durante essa jornada.

ABREVIATURA

ACN	Acetonitrila
ANGII	Angiotensina II
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CCD	Cromatografia de camada delgada
CFS	Cromatografia de fluido supercrítico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Desv.pad	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EtOH	Etanol
FC	Fator Caudal
FIA	Análise por injeção em fluxo
FP	Farmácia popular
GC	Cromatografia gasosa
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDCL	Hidroclorotiazida
HPLC	High performance liquid chromatography
IND	Indopamida
K	Fator de retenção
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LOR	Lorsatana
MeOH	Metanol
N	Pratos teóricos
NaMB	Fosfato de sódio monobásico
P	Pressão
QV	Química verde
R	Resolução
SUS	Sistema único de saúde
T	Temperatura
TACN	Tampão: acetonitrila
TM	Tempo morto
TR	Tempo de retenção
VAL	Valsartana

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação gráfica dos parâmetros A e B.....	21
Figura 2 - Estrutura da LOR (referencia).....	30
Figura 3 - Estrutura HDCL	32
Figura 4 - Cromatograma de acordo com as condições da USP- Condição 1 (Tabela 2), 1,00 mL.min ⁻¹ e 35°C.	42
Figura 5 - Variação na composição do eluente: (a) 32% TACN/62% ACN (em azul) ;(b) 100% TACN (em vermelho); (c) 92% TACN/8% ACN (em preto), 1 mL.min ⁻¹ e 35°C.....	43
Figura 6 - Influência da vazão no experimento com a condição 1 a 35 °C. (a) 1,00 mLmin ⁻¹ (em verde); (b) 1,50 mLmin ⁻¹ (em azul) e (c) 2,00 mLmin ⁻¹ (em vermelho).	45
Figura 7 - Influência da temperatura na determinação da LOR e HDCL com condição 1(Tabela 2) (a) 35°C (em vermelho), (b) 55°C (em preto).....	46
Figura 8 - Preparo da amostra variando a porcentagem do solvente (a) amostra preparada no diluente. (b) amostra preparada em tampão.	47
Figura 9 - Preparo da amostra com EtOH como solvente orgânico.	48
Figura 10 - Preparo de amostras com ACN.....	49
Figura 11 – Cromatogramas obtidos usando eluentes diferentes (a) ACN (em vermelho), (b) EtOH (em preto). Vazão 1,00 mLmin ⁻¹ , 35°C.....	50
Figura 12 - Condições isocráticas testadas com EtOH.	51
Figura 13 - Cromatograma obtido através da condição descrita na Tabela 11.....	53
Figura 14 - Cromatograma adquirido com a condição 3 (Tabela 3). (a) branco (linha tracejada), (b) amostra (linha contínua).	54
Figura 15 - Cromatograma da (a) amostra (linha contínua) e (b) amostra fortificada (linha tracejado)	55
Figura 16 - Estrutura da Losartana e da Valsartana.....	56

Figura 17 - Cromatograma da VAL.....	57
Figura 18 - Cromatogramas da amostra fortificada com (a) VAL (linha contínua) e (b) da amostra com VAL (linha tracejada).	58
Figura 19 – Curva analítica de HDCL construída com dados da Tabela 14	59
Figura 20 – Curva analítica de LOR construída com dados da Tabela 14	60
Figura 21 - Cromatogramas de ensaio de recuperação.	64
Figura 22 - Cromatogramas obtidos com diferentes colunas cromatográficas. (a) Coluna 1 (linha contínua), (b) Coluna 2 (linha tracejada).	65
Figura 23 - Cromatogramas das corridas em diferentes valores de pH da amostra. (a) 2,25 (linha contínua), (b) 2,50 (linha tracejada), (c) 2,75 (linha pontilhada).	67
Figura 24 - Corrida com fase móvel em diferentes pHs. (a) 6,5 (linha contínua), (b) 7,0 (linha tracejada).....	68
Figura 25 - Cromatogramas obtidos com vazões diferentes. (a) 0,90 mLmin ⁻¹ (linha tracejada), (b) 1,00 mLmin ⁻¹ (linha contínua), (c) 1,10 mLmin ⁻¹ (linha pontilhada).....	69
Figura 26 - Cromatogramas em temperaturas diferentes. (a) 30°C (linha tracejada), (b) 35°C (linha contínua) e (c) 40°C (linha pontilhada).....	71
Figura 27 – Cromatogramas produzidos com os padrões. (a) HDCL 0,50 mgL ⁻¹ e LOR 2,0 mgL ⁻¹ , (b) HDCL 1,25 mgL ⁻¹ e LOR 5,0 mgL ⁻¹ , (c) HDCL 2,50 mgL ⁻¹ e LOR 10,0 mgL ⁻¹ , (d) HDCL 6,25 mgL ⁻¹ e LOR 25,0 mgL ⁻¹ , (e) HDCL 12,50 mgL ⁻¹ e LOR 50,0 mgL ⁻¹ , (f) HDCL 18,75 mgL ⁻¹ e LOR 75,0 mgL ⁻¹ , (g) HDCL 25,0 mgL ⁻¹ e LOR 100,0 mgL ⁻¹ , (h) HDCL 50,0 mgL ⁻¹ e LOR 200,0 mgL ⁻¹	72
Figura 28 - Curva analítica de HDCL construída a partir da Tabela 29.....	73
Figura 29 - Curva analítica de LOR construída com dados da Tabela 28.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condição de gradiente para determinação de LOR	31
Tabela 2 - Condição de referência (farmacopeia USP) para análise de LOR e HDCL, vazão de 1,00 mL.min ⁻¹ e temperatura de 35°C.	36
Tabela 3 - Condição cromatográfica 3.....	37
Tabela 4 - Concentrações utilizadas para determinar a faixa de trabalho e sua linearidade.	38
Tabela 5 - Concentrações utilizadas na construção das curvas analíticas.	41
Tabela 6 - tempos de retenção retirados da Figura 5	44
Tabela 7 - Resultados obtidos a partir da variação da vazão do eluente	45
Tabela 8 - Dados obtidos a partir da Figura 7.....	46
Tabela 9 - Valores de FC obtidos a partir das amostras preparadas com ACN.....	49
Tabela 10 - Dados obtidos a partir da Figura 11.....	51
Tabela 11- Condição cromatográfica 5.....	52
Tabela 12 - Dados obtidos a partir da Figura 13.....	53
Tabela 13 – Dados obtidos a partir do cromatograma da Figura 14.....	55
Tabela 14 - Dados de injeção (em quadruplicata) dos padrões de HDCL e LOR.....	59
Tabela 15 – Áreas obtidas com as concentrações injetadas dos padrões de HDCL e LOR.	61
Tabela 16 - Áreas obtidas com a segunda injeção dos padrões de HDCL e LOR.	61
Tabela 17 – Dados para cálculo de LOD.....	61
Tabela 18 - Dados para cálculo de LOQ.....	62
Tabela 19 - Análise de dados para se determinar a DPR.....	62
Tabela 20 - Quantidade calculada de analitos nos comprimidos.....	63
Tabela 21 - Recuperação da HDCL e LOR.	64
Tabela 22 - Dados obtidos a partir do cromatograma da Figura 24.	65

Tabela 23 - Dados obtidos com a coluna 1 e coluna 2.	66
Tabela 24 - Dados obtidos de corridas com pHs diferentes da amostra.	67
Tabela 25 - Dados obtidos através das corridas mostradas na Figura 22.	68
Tabela 26 - Dados obtidos com a variação da vazão.	69
Tabela 27 - Dados das corridas em temperaturas diferentes.	71
Tabela 28- Áreas dos padrões de HDCL e LOR.	73
Tabela 29 - Quantidade dos analitos nos comprimidos (determinação em triplicata)..	74

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1	k	20
Equação 2	N	21
Equação 3	H	21
Equação 4	FC	22
Equação 5	R	22
Equação 6	LOD	23
Equação 7	LOQ	23
Equação 8	DPR	24
Equação 9	teste-t de Student.....	39
Equação 10	$SHDCL$	60
Equação 11	$SLOR$	60
Equação 12	$SHDCL$	74
Equação 13	$SLOR$	74

RESUMO

Por exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e para salvaguarda da saúde da população, todo medicamento tem que passar por um rigoroso controle de qualidade antes de ser colocado no mercado. A determinação de losartana (LOR) em associação com hidroclorotiazida (HDCL) em comprimidos não está presente na farmacopeia brasileira, mas pode ser feito por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo a Farmacopeia USP. Neste trabalho mostramos que é possível a substituição da acetonitrila (ACN) pelo etanol (EtOH) no doseamento de comprimidos de anti-hipertensivos contendo LOR em associação com HDCL. O desenvolvimento e otimização do método foram feitos variando a composição da fase móvel (Etanol e tampão fosfato) no modo gradiente variando, a porcentagem do etanol (5% a 69%), pH da fase móvel (7,0) pH da amostra (2,5), vazão da corrida cromatográfica (1,0), temperatura (35°C) e coluna cromatográfica (C18). A validação do método proporciona respostas adequadas para limite de detecção (0,89 mgL⁻¹ para a HDCL e 2,21 mgL⁻¹ para a LOR), limite de quantificação (2,69 mgL⁻¹ para a HDCL e 6,71 mgL⁻¹ para a LOR). A quantidade dos resíduos gerados foi menor no método usando etanol, quando em comparação ao método empregando acetonitrila (cerca de 50% a menos), tornando os resíduos, definitivamente, menos tóxicos ao eliminar a utilização de acetonitrila.

Palavras-Chave: Losartana, Hidroclorotiazida, Cromatografia, CLAE, Química verde, Etanol.

ABSTRACT

As required by the national health surveillance agency (ANVISA), and to safeguard the health of the population, every medication must undergo rigorous quality control before being placed on the market. Losartan heroin (LOR) in association with hydrochlorothiazide (HDCL) in tablets is not present in the Brazilian pharmacopoeia, but can be made by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the American pharmacopoeia. In this work, we show that it is possible to replace acetonitrile (ACN) with ethanol (EtOH) in the dosage of antihypertensive pills containing LOR in association with HDCL. The method was developed and optimized by varying the composition of the mobile phase (Ethanol and approved phosphate) in gradient mode, varying the percentage of ethanol (5% to 69%), pH of the mobile phase (7.0) pH of the sample (2.5), chromatographic run flow rate (1.0), temperature (35°C) and chromatographic column (C18). Method validation provides responses met for detection limit (0.89 mgL⁻¹ for HDCL and 2.21 mgL⁻¹ for LOR), quantification limit (2.69 mgL⁻¹ for HDCL and 6.71 mgL⁻¹ for LOR). The amount of waste generated was lower in the method using ethanol, when compared to the method using acetonitrile (about 50% less), becoming definitely less toxic when eliminating the use of acetonitrile.

Keywords: Losartan, Hydrochlorothiazide, Chromatography, HPLC, Green Chemistry, Ethanol.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	OBJETIVOS GERAIS.....	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	20
3.1.1.	SELETIVIDADE.....	22
3.1.2.	LINEARIDADE.....	22
3.1.3.	LIMITE DE DETECÇÃO (LOD).....	23
3.1.4.	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	23
3.1.5.	PRECISÃO	23
3.1.5.1.	REPETIBILIDADE	24
3.1.5.2.	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	24
3.1.5.3.	REPRODUTIBILIDADE	24
3.1.6.	EXATIDÃO	24
3.1.7.	ROBUSTEZ	25
3.1.8.	ESPECIFICIDADE.....	25
3.2.	QUÍMICA VERDE	27
3.3.	MEDICAMENTOS	28
3.3.1.	LOSARTANA POTÁSSICA	30
3.3.2.	HIDROCLOROTIAZIDA.....	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1.	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	34
4.2.	REAGENTES E SOLVENTES.....	34
4.2.1.	PADRÕES.....	34
4.2.2.	AMOSTRA.....	35

4.3.	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS.....	35
4.3.1.	ESTUDOS PRELIMINARES	36
4.3.2.	DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE LOSARTANA POTÁSSICA E HIDROCLOROTIAZIDA COM COLUNA EMPACOTADA CONVENCIONAL E ETANOL COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO	36
4.4.	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS	37
4.4.1.	SELETIVIDADE.....	37
4.4.2.	LINEARIDADE.....	38
4.4.3.	LIMITE DE DETECÇÃO (LOD).....	38
4.4.4.	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	38
4.4.5.	PRECISÃO	38
4.4.5.1.	REPETIBILIDADE	39
4.4.5.2.	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	39
4.4.6.	EXATIDÃO	39
4.4.7.	ROBUSTEZ	39
4.4.7.1.	TESTANDO DUAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS DIFERENTES	40
4.4.7.2.	VARIAÇÃO DO PH DA AMOSTRA	40
4.4.7.3.	VARIAÇÃO DO PH DA FASE MÓVEL	40
4.4.7.4.	VAZÃO DA FASE MÓVEL	40
4.4.7.5.	TEMPERATURA DE ANÁLISE	40
4.4.8.	CURVA ANALÍTICA.....	40
4.4.9.	DETERMINAÇÃO DE HDCL E LOR EM COMPRIMIDOS	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1.	ESTUDOS PRELIMINARES	42
5.1.1.	DAS CONDIÇÕES DE CORRIDA	42
5.1.2.	QUANTIDADE DE SOLVENTE NA PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	46

5.2.	DETERMINAÇÃO CROMATOGRAFICA DE LOSARTANA POTASICA E HIDROCLOROTIAZIDA COM COLUNA EMPACOTADA CONVENCIONAL E ETANOL COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO	50
5.2.1.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	50
5.3.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	55
5.3.1.	SELETIVIDADE.....	55
5.3.2.	LINEARIDADE.....	59
5.3.3.	LIMITE DE DETECÇÃO(LOD).....	60
5.3.4.	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	62
5.3.5.	PRECISÃO	62
5.3.5.1.	REPETIBILIDADE	62
5.3.5.2.	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	63
5.3.6.	EXATIDÃO	63
5.3.7.	ROBUSTEZ	65
5.3.7.1.	TESTANDO DUAS COLUNAS DIFERENTES.....	65
5.3.7.2.	VARIAÇÃO DO PH DA AMOSTRA	66
5.3.7.3.	VARIAÇÃO DO PH DA FASE MÓVEL	68
5.3.7.4.	VAZÃO DA FASE MÓVEL	69
5.3.7.5.	TEMPERATURA DE ANÁLISE	70
5.3.8.	CURVA ANALÍTICA.....	71
5.3.8.1.	DETERMINAÇÃO DE HDCL E LOR EM COMPRIMIDOS	74
6.	CONCLUSÕES	76
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) ou pressão alta é uma doença crônica caracterizada pelo aumento da pressão sanguínea nas artérias. É considerada hipertensa a pessoa que possui valores de pressão arterial diastólica e sistólica respectivamente, iguais ou superiores aos 140/90mmHg (ou, popularmente chamado de 14 por 9). Ela é um dos principais fatores de risco que aumenta a possibilidade de ocorrerem acidente vascular cerebral (AVC), enfarte, aneurisma arterial e insuficiência renal e cardíaca (JARDIM et al., 2020).

Com o intuito de controlar a HAS, diversos medicamentos podem ser utilizados, contendo por exemplo losartana potássica (LOR) (ZHEN LIU, 2021), que pode ser usada sozinha ou associação com outras substâncias, como é o caso da hidroclorotiazida (HDCL), um diurético. Esses medicamentos podem ser de referência, similares ou genéricos.

Entre janeiro de 2000 e agosto de 2016 um total de 4.661 novos medicamentos genéricos foram registrados no Brasil. Dos 6.300 produtos diferentes no mercado de medicamentos, 75,7% são genéricos (dados de 2016) (ANVISA, 2018). Toda empresa que quiser comercializar um fármaco (ou medicamento), no Brasil, deve antes submeter o seu produto à análise da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2019).

A Constituição brasileira garante acesso a medicamentos de forma gratuita - (ANVISA, 2018), porém apenas em 1999, devido ao custo elevado dos medicamentos disponíveis, foi criada a Lei 9.797 para os medicamentos genéricos, com objetivo de proporcionar medicamentos de qualidade e com um preço mais acessível (LEITÃO et al., 2020), chegando a ser até 40% mais barato. (QUENTAL et al., 2008) E então, por meio dessa lei, passou a ser obrigatória a adoção, pelos SUS (Sistema Único de Saúde), da prescrição do medicamento pelo nome do princípio ativo (QUENTAL et al., 2008) .

Em 2018 mais de 2 bilhões de reais foram gastos com tratamento de hipertensão no Brasil. Este valor tende a aumentar, uma vez que é observado o aumento do número de obesos no Brasil e, como se sabe, a obesidade é um dos fatores que aumentam a probabilidade de uma pessoa desenvolver a HAS (NILSON et al., 2020).

Entre 2016 e 2017, foram analisados 240 lotes de medicamentos e, destes, somente 85,9% estavam de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes(JARDIM et al., 2020). Essa discrepância entre o teor informado e o teor real pode ter várias causas, dentre elas:

produção, armazenamento, e embalagem inadequadas, controle de qualidade ineficiente, reagentes de baixa qualidade e fraude. (LEITÃO et al., 2020) .

E, por isso, efeitos colaterais não presentes nos medicamentos de referência, devido a impurezas, podem levar pessoas a abandonarem o tratamento, assim como teores abaixo do informado pelo fabricante, pois pode não haver a resposta esperada. (FERRARI, 2020).

Há um grande investimento de dinheiro público na aquisição de anti-hipertensivos genéricos e por isso é necessário atestar a qualidade dos mesmos. (DUARTE et al., 2022).

Não existem metodologias oficiais na farmacopeia brasileira para o controle de qualidade do medicamento constituído por LOR e HDCL (porém as indústrias podem utilizar métodos oficiais de outros órgão regulamentadores, como FDA, Farmacopeia USP, Farmacopeia Europeia) e, portanto, é imperativo o desenvolvimento de novas metodologias que possam proporcionar um controle mais rígido e mais rápido da qualidade desses medicamentos, porém deve se levar em conta que os novos métodos não devem gerar nem muito custo e nem muito resíduo, a exemplo da metodologia oficial para determinação de HDCL e LOR da Farmacopeia USP (CONCIL OF EXPERTS AND ITS EXPERTS COMMITTEES, 2018) e também a metodologia utilizada na farmacopeia brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019), e estar em concordância com os princípios da química verde (GOMES et al., 2018). Pensando em métodos eficientes, e em consonância com a química verde, utilizar a CLAE para efetuar a separação e quantificação dos fármacos nos medicamentos é uma possibilidade, já que os equipamentos CLAE são amplamente utilizados na análise de medicamentos (MONIR et al., 2020), por fornecer separações robustas e quantificação eficiente, mas o uso de solventes tóxicos e o consumo de tempo nas corridas cromatográficas continuam sendo grandes desafios na atualidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral empregar a cromatografia líquida de alta eficiência para desenvolver métodos de determinação de LOR e HDCL em medicamentos, de acordo com os preceitos da química verde.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Mostrar que é possível alterar o solvente de eluição ACN por EtOH no método existente na farmacopeia USP e desenvolver um método viável para o controle de qualidade de medicamentos contendo LOR e HDCL.

Comparar a metodologia já existente na farmacopeia USP com o método desenvolvido para determinação de losartana e hidroclorotiazida em medicamentos.

Realizar a validação do método desenvolvido e verificar a aplicação em amostras reais de medicamentos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação de compostos, através da interação desses entre uma fase móvel e uma fase estacionária. (SMERIKAROVA; BOZHANOV; MASLARSKA, 2018). Por ser tão eficiente, pode ser utilizada como técnica analítica de quantificação. Pode ser aplicada em praticamente qualquer tipo de amostra. (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

O primeiro relato de técnica similar à cromatografia foi descrito primeiramente por Jöhn Jacob Berzelius (1779-1848)(PACHECO et al., 2015), em seu estudo sobre produção de água mineralizada. Já a cromatografia em coluna clássica foi inventada por Mikhail Tsweet em 1903, e baseado em seu trabalho em 1930 A. J. P. Martin desenvolveu a cromatografia de papel que mais tarde daria origem ao que chamamos hoje de cromatográfica de camada delgada (CCD)(PACHECO et al., 2015). Outros tipos de cromatografia são a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia de fluido super crítico (CFS) (PACHECO et al., 2015).

Somente em 1954 o precursor do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) surgiu, e a partir deste, várias melhorias foram sendo feitas ao equipamento, como desenvolvimento de novas colunas, com partículas de recheio cada vez menores, bombas mais potentes que possibilitaram aumento da vazão a elevadas pressões, e a elevação e controle de temperatura, junto com a injeção completamente automatizada (PACHECO et al., 2015).

Para se ter uma separação bem sucedida é necessário compreender como as condições do experimento afetam a separação. Alguns fatores que ajudam a compreender essa influência são o tempo de retenção (TR), o fator de retenção (k), a resolução (R), altura de pratos teóricos (H), o número de pratos teóricos(N) e o fator caudal (FC), os quais serão explicados a seguir.

O TR é o tempo decorrido entre o a injeção de uma amostra e a detecção do topo de um pico em um cromatograma, sendo que o tempo de detecção de uma amostra que não é retida pela coluna cromatográfica, comumente o solvente da amostra, é chamado de tempo ou volume morto (TM).

O k, chamado de fator de retenção, é o quociente entre a quantidade de matéria presente na fase estacionária e quantidade de matéria presente na fase móvel, ela fornece uma noção tempo de retenção do analito pela coluna e é dada por:

$$\text{Equação 1} \quad k = \frac{(TR-TM)}{TM}$$

Onde:

TR é o tempo de retenção do composto

TM é o tempo do volume morto

Número de pratos teóricos (N) é a medida da capacidade de uma coluna fornecer picos estreitos, e pode ser dado por:

$$\text{Equação 2} \quad N = 16 \left(\frac{TR}{W} \right)^2$$

Onde:

W é a largura da interseção das tangentes de cada lado do pico com a linha de base

Altura do prato teórico (H) é a medida da eficiência da coluna por unidade de comprimento da coluna, geralmente aumenta com o tamanho da coluna e pode ser calculada por:

$$\text{Equação 3} \quad H = \frac{L}{N}$$

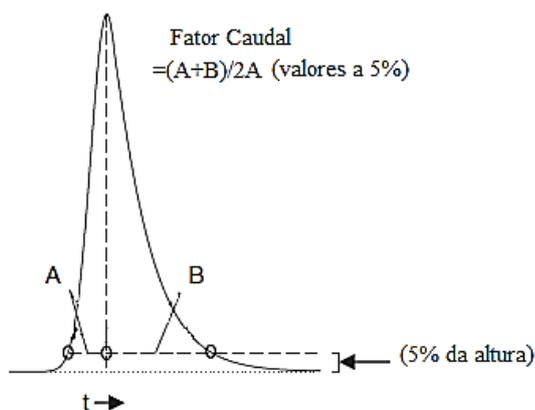
Onde:

L é o comprimento da coluna cromatográfica utilizada

N é o número de pratos teóricos

O fator de calda (FC) é a medida do desvio do formato do pico em relação ao formato gaussiano (Fig. 1). O FC igual a 1 significa que o pico é completamente simétrico, valores diferentes de 1 tanto para cima quanto para baixo, significa a presença de assimetria no pico, isso pode influenciar a eficiência de separação entre picos muito próximos.

Figura 1 - Representação gráfica dos parâmetros A e B.



Fonte: (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010)

O FC é dado por:

$$\text{Equação 4} \quad FC = \frac{A+B}{2A}$$

Onde A e B são valores do intervalo entre um ponto definido por uma linha paralela à linha de base a 5% de altura do pico, interseccionada por uma linha perpendicular à linha de base, passando pelo máximo do pico, e os lados do pico, como mostrado na figura 1.

A medida da eficiência de separação entre dois picos R é dada por:

$$\text{Equação 5} \quad R = \frac{2.(TR2-TR1)}{W2+W1}$$

Com a modificação das condições de eluição e, ao se analisar a alteração desses parâmetros, é possível determinar as melhores condições de corrida.

A cromatografia é um excelente método para quantificação de compostos, mas para que a metodologia desenvolvida seja confiável, é preciso primeiro fazer a validação do método, que é um procedimento para garantir que determinado método atende os critérios necessários para que os resultados obtidos sejam confiáveis (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

As validações são regulamentadas por diversos órgãos tais como a *United States pharmacopeia* (conhecida como Farmacopeia USP ou USP), *US Food and Drug Association* (FDA), *International Conference on Harmonization* (ICH) (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dentre outras.

Uma metodologia desenvolvida para a separação de LOR e HDCL poderia ser adicionada na farmacopeia brasileira e, para isso, alguns parâmetros analíticos precisam ser analisados durante uma validação. Estes são definidos a seguir em concordância com o guia de validação da ANVISA (ANVISA, 2017).

3.1.1. SELETIVIDADE

A seletividade é efetuada através do método de adição de padrão a uma matriz de composição igual à da amostra para ver se acontece alguma alteração no cromatograma.

3.1.2. LINEARIDADE

Linearidade é a capacidade do método detectar de forma proporcional à concentração dos analitos em um determinado intervalo de concentração, produzindo resposta proporcionais entre a concentração e o sinal analítico. Além disso, está relacionado com o intervalo de concentração superior e inferior da concentração de um analito que pode ser determinada com

suficiente precisão, acurácia e linearidade com determinado método (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

3.1.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

Limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito que um método consegue detectar em uma amostra sem necessariamente conseguir quantificá-la. E pode ser calculada pela fórmula a seguir:

$$\text{Equação 6} \quad LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{b}$$

Onde:

σ é desvio-padrão do intercepto da curva de pelo menos 3 curvas construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite (ANVISA, 2017)

b é coeficiente angular da curva analítica

3.1.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração que um método consegue detectar com acurácia e precisão aceitáveis.

$$\text{Equação 7} \quad LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{b}$$

Onde:

σ é desvio-padrão do intercepto da curva de pelo menos 3 curvas construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite (ANVISA, 2017)

b é coeficiente angular da curva analítica

3.1.5. PRECISÃO

Precisão é medida que demonstra o quanto os resultados estão próximos um do outro em uma análise repetida. Ela se divide em três grandezas: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

3.1.5.1. REPETITIBILIDADE

A repetibilidade é a capacidade do método gerar o mesmo resultado em condições analíticas idênticas durante pelo menos 9 análises ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração da amostra individualmente preparadas (ANVISA, 2017).

Ela pode ser calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Equação 8} \quad \text{DPR} = \left(\frac{\text{desv.pad}}{\text{média}} \right) \times 100$$

Onde:

DPR é o desvio padrão relativo

desv.pad é desvio padrão do conjunto de dados

média é a média aritmética do conjunto de dados.

3.1.5.2. PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados obtidos considerando eventos randômicos que podem acontecer em um laboratório e deve obedecer aos seguintes critérios:

I- expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos.

II - contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade (ANVISA, 2017).

3.1.5.3. REPRODUTIBILIDADE

Reprodutibilidade é a concordância entre resultados obtidos, por laboratórios diferentes, para uma mesma análise.

3.1.6. EXATIDÃO

Exatidão de um método analítico indica o quão próximo o valor encontrado está do valor real, aceito como verdadeiro. Além disso, deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove)

determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível, e na indisponibilidade de amostras de todos os componentes do medicamento, pode ser realizada a análise pelo método de adição de padrão de referência, no qual quantidades conhecidas de padrão de referência são acrescentadas à solução do produto terminado. (ANVISA, 2017)

3.1.7. ROBUSTEZ

Robustez é a capacidade de um método resistir a pequenas mudanças nos parâmetros analíticos, tais como diferentes instrumentos, analistas, instrumentos, reagentes, temperatura e dias.

3.1.8. ESPECIFICIDADE

Especificidade é a capacidade de determinar especificamente os analitos para qual aquele método foi feito em amostras que possuam outros componentes.

E após esses testes, há a definição se o método será equivalente ou não à metodologia de referência.

3.2. PESQUISA EM BASE DE DADOS

Além disso, uma pesquisa foi feita para avaliar o quanto de publicações de validação de métodos analíticos em CLAE têm ocorrido nos últimos 5 anos, resultando em 4502 publicações, porém com a simples introdução do termo losartana, o número de artigos publicados cai para 14, indicando que esse assunto foi pouco pesquisado nos últimos 5 anos. Entretanto, afim de verificar se estudos similares aos nossos foram realizados, foram feitas mais algumas pesquisas. O termo “*HPLC determination*” retornou um total de 9563 artigos na base de dados scifinder, que, após serem refinados com o termo “*losartan*”, retornou somente 31 artigos, corroborando com a evidência de pouco estudo de métodos criados para a determinação de *losartan* nos últimos anos. Por último para conferir se haveriam metodologias utilizando EtOH como fase móvel, os termos “*HPLC ethanol losartan*” e “*HPLC ethanol losartan determination*” foram testados e, em ambos os casos, resultaram em um único artigo no qual foi desenvolvido um método para determinar a impureza dietilnitrosamina em medicamentos LOR e VAL (ABD EL-HAY et al., 2022). Nesse artigo os resultados obtidos foram satisfatórios, porém não seria viável para a separação da LOR e da HDCL por iniciar o gradiente (10-60% de EtOH) com uma

quantidade muito alta de EtOH, além não terem sido apresentados os tempos do volume morto e do fator de retenção (k).

De maneira similar foram feitas pesquisas relacionadas termos com “*hydrochlorothazide*”, resultando também somente um artigo no qual havia uma separação de atenolol e HDCL utilizando EtOH como solvente (HEMDAN; AL-TANNAK; MOHAMED, 2022). Nesse artigo não foi apresentado o cromatograma obtido, apenas uma simulação do que seria esperado, além de utilizar modelo multivariável e detector de fluorescência. Provavelmente não seria indicado para a separação de LOR e HDCL pelo fato da corrida em modo isocrático se iniciar com uma concentração muito alta de EtOH (65%), que poderia provocar uma eluição prematura dos compostos em co-eluição.

3.3. QUÍMICA VERDE

A química verde (QV) foi oficialmente introduzida em 1993 pela EPA (*Environmental Protection Agency – US*), (SILVESTRI et al., 2021) ela tem como objetivo uso de matéria e energia de forma a aumentar o seu desempenho e utilidade através do planejamento, comercialização e o uso de processos e produtos de forma a reduzir a poluição, promover a sustentabilidade e minimizar os riscos à saúde humana e ao meio ambiente, sem sacrificar a viabilidade econômica e a eficiência. (EPA, 2022)

A QV possui 12 preceitos(WHITEKER, 2019) listados abaixo:

1. Evitar produção de resíduo ao invés de tratá-lo
2. Economia de átomos – garantir que toda ou, pelo menos, a maior parte dos átomos presentes nos reagentes seja incorporada no produto de uma reação.
3. Utilizar/gerar produtos menos tóxicos/perigosos – sempre dar prioridade a utilizar reagentes que sejam verdes.
4. Projetar produtos seguros – Pensar nos produtos gerados, de forma que estes não causem dano nem à natureza e nem às pessoas.
5. Solventes e auxiliares mais seguros – Dar prioridade ao uso de solventes considerados verdes.
6. Eficiência energética (T e P ambiente) – Fazer análise, reações, experimentos preferencialmente à temperatura ambiente e à pressão ambiente
7. Utilizar matéria prima de fontes renováveis preferencialmente.
8. Sínteses menores evitando derivatização - Fazer reações com o menor número de passos possíveis.
9. Catálise – Sempre dar preferência a uso de catalizadores em reações do que proporção estequiométrica.
10. Formar produtos degradáveis – Ao desenvolver um novo produto, pensar no produto final de forma que este seja biodegradável.
11. Métodos analíticos visando diminuição de poluição – Pensar nas análises, experimentos de demais processos, de forma a reduzir a quantidade de solvente utilizada para o mínimo possível

12. Processos seguros – Desenhar os processos com ausência de riscos – ou, quando não for possível, minimização destes. Por exemplo: explosão, vazamento de gás, condensação de gases como o O₂ (SHELDON, 2012).

Ao se fazer uma busca pelo termo “*green chemistry*”, na base de dados *web of Science*, retornou 39391 publicações nos últimos 5 anos. Refinando a pesquisa com o termo “*methodology*” e “*method*”, houve uma redução para 26156 publicações. A adição do termo “HPLC” devolve um resultado de 1020 e, restringindo mais uma vez com o termo “*Ethanol*”, restaram 137 artigos. Ao adicionar “*drug determination*”, restaram somente 38 artigos que foram analisados. Desses, 36 utilizavam EtOH como fase móvel, um como extrator e um referia-se a um grupamento OH ligado às moléculas componentes de uma fase móvel. Dos 36 citados anteriormente, a maior parte era utilizado em conjunto com tampões, porém em alguns casos havia a combinação do EtOH com outros solventes, 2 utilizaram água, 4 acetona e/ou acetato de etila, 1 amônio e dois ACN.

Esse número demonstra que o EtOH não está sendo tão comumente utilizado associado com a química verde, provavelmente por conta da sua viscosidade, mostrando que ainda há muito espaço para pesquisa com a utilização desse solvente como eluente em CLAE.

3.4. MEDICAMENTOS

A HAS apresenta o maior fator de risco para a mortalidade no mundo com aumento expressivo dessa doença desde 1990 até os dias atuais. Ela assola 38,1 milhões de brasileiros com 18 anos ou mais, equivale a 23,9% da população dessa faixa etária. No Brasil, dados de 2018 apresentam uma percentagem de 24,7% de hipertensos, desses 60,9% possuem idade acima de 65 anos.(JARDIM et al., 2020) A quantidade de pessoas que fazem controle da HAS varia de 10,54 a 35,2% a depender da região,(PRAUXIS, 2020) - um valor muito abaixo do ideal. Há indícios de que crianças e adolescentes obesas podem desenvolver HAS durante a infância e seguir com esse problema na idade adulta. (LEITÃO et al., 2020)

Em 2016, cerca de 273 mil brasileiros morreram em decorrência da hipertensão arterial. Um dos fatores que podem aumentar as chances de se desenvolver essa doença é a idade avançada, por promover modificações fisiológicas no sistema circulatório. Uma vez que a longevidade vem aumentando, é esperado que haja um impacto no número de pessoas que sofrem com HAS. Outros fatores são a obesidade e a falta de atividade física. O Brasil é o quinto país com maior número de pessoas obesas, logo é de se imaginar que haja um grande

número de pessoas acometidas pela HAS. Dentre estas, os homens são o que representam a maior parte dessa população, pois mesmo se considerando as subnotificações, eles tendem a evitar ir em consultas médicas. (MARQUES et al., 2020)

Existe ainda certa relação com o nível social das pessoas e a HAS. Quanto menor o nível social, maior a chance de se encontrar um indivíduo com a doença, uma vez que essas pessoas, muitas vezes, não conseguem ter acesso a uma alimentação mais saudável e adequada. E como se sabe, a alimentação é outro fator influenciador no desenvolvimento da HAS. (MARQUES et al., 2020)

Até o final da década de 1990, o Brasil apresentava somente dois tipos de medicamentos, os lançados pelas grandes empresas da indústria farmacêutica, os quais eram chamados de “inovadores” - e cópias desses medicamentos que eram denominados de “similares”. Eles continham o mesmo princípio ativo, condições e concentrações dos medicamentos inovadores. (QUENTAL et al., 2008)

Segundo a RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014 da Anvisa, “um medicamento de referência é um produto inovador registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária e comercializado no País, cuja eficácia, segurança e qualidade foram comprovadas cientificamente junto ao órgão federal competente...” (BRASIL, 1999); “medicamento genérico é um medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade... (BRASIL, 1999) ; e “medicamento similar é aquele que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, ... devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca (ANVISA, 2001). (ANVISA, 2014).

Em 13 de Abril de 2004, foi criado o programa Farmácia Popular (BRASIL, 2004) com o objetivo de fornecer à população acesso mais barato a medicamentos considerados essenciais. Esse programa é um convênio entre farmácias e drogarias com o governo federal, no qual o governo subsidia os custos dos medicamentos, e estes são repassados à população com descontos que podem chegar a 90%. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007)

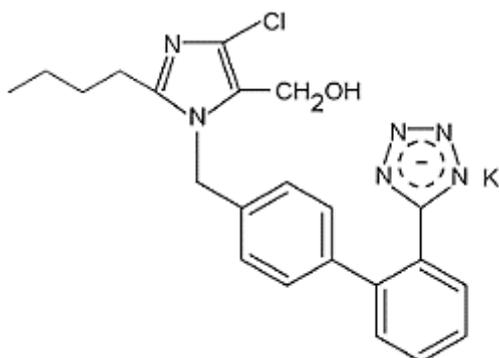
É possível se obter anti-hipertensivos das seguintes formas: pagamento do valor integral do medicamento em farmácias privadas, obtenção do medicamento de forma gratuita em farmácias públicas do sistema único de saúde (SUS) e através da farmácia popular (FP) por um baixo custo em farmácias conveniadas, sendo as vezes possível se obter de forma gratuita. (FERRARI, 2020)

Após diversas reformulações no programa, em 28 de março de 2018, a Portaria 739/2018 (Ministério da Saúde, 2018) estabeleceu um valor de referência a ser pago pelo ministério da saúde por unidade do medicamento.

3.4.1. LOSARTANA POTÁSSICA

A LOR (losartana potássica), (2-butil-4-cloro-1-{[2'-(1H-tetrazol-5-il)bifenil-4-il]metil}-1H-imidazol-5-il)metanol, foi uma importante descoberta na área terapêutica. Começou a ser comercializado no mercado em 1995, na Suécia, fabricada pelo laboratório Du Pont Merck, e tinha como nome fantasia Cozaar® (WANI et al., 2022)

Figura 2 - Estrutura da LOR.



FONTE: (MARQUES et al., 2020)

É um medicamento indicado para pessoas que sofrem de HAS e de espessamento das paredes do ventrículo esquerdo (hipertrofia do ventrículo esquerdo) (EMS/SA, [s.d.]). É um antagonista do receptor de angiotensina II(ANGII) não peptídico. Derivado do angiotensinogênio, funciona como um regulador da pressão sanguínea ao bloquear o seu receptor quando ocorre uma hipovolemia, não há, então, o aumento da taxa de filtragem dos rins e conseqüentemente não há o aumento da pressão arterial.(MARQUES et al., 2020) . Uma característica importante é o valor do pka, que apresenta valores de 4,07 para o grupamento amina, 4,29 para o grupamento tetrazol e 14,27 para o grupamento hidroxila. (PUBCHEM, 2023)

A LOR ajuda a prevenir o acidente vascular cerebral (AVC), infarto do miocárdio e lesões em órgãos internos, como os rins.

A busca pelo termo “Losartan” na base de dados SciFinder retornou 23858 artigos, sendo que desses 2473 foram publicados nos últimos 5 anos. Ao refinar a busca somando o termo HPLC, nos últimos 5 anos, 111 artigos foram encontrados e ao se limitar a pesquisa mais

ainda com o termo, que é o escopo do nosso trabalho, (*ethanol*) foram obtidos somente 3 trabalhos - e nenhum deles utilizava o EtOH como eluente na determinação da LOR.

Ao pesquisar “*Losartan determination ethanol*” somente dois artigos foram encontrados e, em ambos, mais uma vez o EtOH não estava envolvido em determinação cromatográfica da LOR como eluente.

Um termo mais abrangente foi utilizado para que pudessemos obter um número considerável de artigos. Com o termo “*Losartan determination HPLC*”, houve um retorno de 45 artigos. Após ler os títulos, permaneceram somente 17 artigos e, após breve revisão nos resumos, 3 foram eliminados. Os 14 artigos restantes foram analisados em relação à determinação da LOR, tanto sozinha quanto em associação com outros medicamentos. Em nenhum dos artigos foi verificada a utilização de EtOH como um dos solventes eluentes, em todos os casos foi utilizada uma combinação de ACN ou metanol (MeOH) com um tampão fosfato ou acetato, e em um único artigo foi utilizado uma solução de surfactante como alternativa.(IBRAHIM; ELMANSI; BELAL, 2020) A partir destes dados, é possível considerar que o presente trabalho apresenta uma proposta inédita, focada na inovação da substituição de solventes tóxicos (SHAFAQ et al., 2022) por outros mais benignos(RAO; SRINIVAS, 2010).

Na farmacopeia brasileira o procedimento para determinação da LOR é efetuado com a vazão da fase móvel de 1 mL min⁻¹, temperatura ambiente e gradiente conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Condição de gradiente para determinação de LOR

Tempo(min)	H ₃ PO ₄ 0,1%	ACN
0	75	25
25	10	90
35	10	90
45	75	25
50	75	25

Fonte: (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019)

Além da técnica de CLAE, a LOR também pode ser determinada por métodos espectrofotométricos (BINH et al., 2021), Cromatografia de camada delgada (CCD)(JADHAO et al., 2019), voltametria(SILVA et al., 2020b), Cromatografia gasosa (CG)(WICHITNITHAD et al., 2021), análise por injeção em fluxo (FIA)(HAMMOOD; KAREEM, 2022) e titulação potenciométrica. (HASHEM; IBRAHIM; ELHENAWEE, 2016).

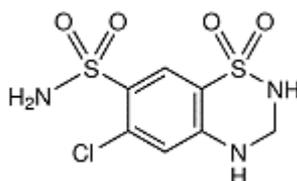
3.4.2. HIDROCLOROTIAZIDA

A HDCL é anti-hipertensivo e diurético da classe das tiazidas, age inibindo a absorção de eletrólitos pelos rins, e assim, aumentando a excreção de sódio e cloreto através da urina.

Descoberta em 1958, foi o primeiro medicamento eficaz no combate da HAS. Apresenta nome químico 6-Cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazina-7-sulfonamida 1,1-dioxido. (BIBLIOMED, [s.d.]), apresenta pkas de 7,9 e 9,2. (PUBCHEM.2023).

Ela pode ser utilizada sozinha ou em combinação com outras medicações para o tratamento de HAS, diabetes, prevenção de pedra nos rins, hipoparatiroidismo e insuficiência cardíaca congestiva. Para o tratamento de hipertensão ela é comumente combinada com a LOR.

Figura 3 - Estrutura HDCL



Ao se fazer uma busca rápida em uma base de dados, o termo “*hydrochlorothiazide*” retornou 7903 artigos, desses 1035 foram publicados nos últimos 5 anos. Ao refinar a busca para “*hydrochlorothiazide determination*” foram obtidos 153 resultados. Com a adição do termo “HPLC”, somente 69 artigos restaram, esses foram analisados principalmente baseados nos seus títulos e foram escolhidos 21 artigos, destes, 2 já haviam sido avaliados no tópico anterior 3.3. Os 19 artigos restantes foram brevemente avaliados em base aos seus resumos, resultando no descarte de 3 artigos.

Ao se analisar os 16, foi verificado que apenas em um dos artigos utilizada EtOH como fase móvel. Em todos os outros era uma combinação ACN, MeOH e alguma solução tampão.

Outra busca foi realizada com o termo “*hydrochlorothiazide ethanol*”, 13 artigos foram encontrados e mais uma vez somente 1 apresentava o EtOH como fase móvel, porém era o mesmo artigo obtido na procura anterior (IBRAHIM; ELMANSI; BELAL, 2020).

Na farmacopeia brasileira existe um procedimento para a determinação da HDCL, uma corrida isocrática com a fase móvel sendo uma mistura de solução de tampão fosfato (pH 3) 0,1M: ACN na proporção 9:1, à temperatura ambiente e fluxo de 2mL min⁻¹.

Além da técnica de CLAE, a HDCL também pode ser determinada por métodos espectrofotométricos (BINH et al., 2021), Cromatografia de camada delgada (CCD)

(AAYUSHI; SHAH, 2023), voltametria (REZAEI, 2019), Cromatografia gasosa (CG)(MONTEIL et al., 2019), análise por injeção em fluxo (FIA) (SILVA et al., 2020a) e titulação potenciométrica (HASHEM; IBRAHIM; ELHENAWEE, 2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Cromatógrafo Shimadzu prominence; como injetor automático SIL 20A HT; Detector de arranjo de diodos SPD – M20A forno para coluna CTO-20A, cromatógrafo líquido LC-20AD; Degasificador DGU-20A5R; Controlador CBM 20

As colunas cromatográficas empregadas foram:

Coluna cromatográfica empacotada 1, phenomenex®, 120A, 5 μ m, 4,6 mm de diâmetro, 150 mm, C18.

Coluna cromatográfica empacotada 2, ACE®, 100A, 5 μ m, 4,6 mm de diâmetro, 150 mm, C18.

Nos ensaios foram utilizadas, pipetas, balões volumétricos, e diversos matérias de vidro, pipetas automáticas, membranas de filtração de teflon, entre outros materiais típicos de um laboratório de química analítica.

4.2. REAGENTES E SOLVENTES

Acetonitrila (T. J. Backer), Metanol (T. J. Backer), Etanol Desnaturalizado (T. J. Backer), Etanol Grau UV/HPLC (Dinâmica) e Etanol Absoluto (Vetec), Fosfato de potássio diácido (dinâmica), Fosfato de potássio ácido (dinâmica), Ácido Fosfórico (vetec), água Milliq®.

O tampão fosfato utilizado no tampão-acetonitrilo (TACN) foi produzindo dissolvendo 1,25 gramas fosfato monobásico e 1,50 g de fosfato de sódio dibásico em 1 litro de água Milliq®. A solução resultante, que foi utilizada como fase móvel, teve seu pH ajustado para 7,01 com o auxílio de hidróxido de sódio.

4.2.1. PADRÕES

Os padrões foram preparados a partir de padrão de referência certificados obtidos na Sigma-Aldrich®. Uma solução estoque de 5000 mgL⁻¹ de LOR e 1250 mgL⁻¹ de HDCL foi preparada em etanol. As soluções padrão foram preparadas coletando alíquotas da solução estoque e transferindo-as para balões de 5 mL ou 10 mL. Aos balões de 5 mL foram adicionados

1 mL de ACN e aos balões de 10 mL foram adicionados 2 mL de ACN. Posteriormente todos os balões foram avolumados com a solução tampão de fosfato de pH 2,5.

4.2.2. AMOSTRA

Os comprimidos de marca Medley®, com dosagem de 50 mg de LOR e 12,5 mg de HDCL, foram obtidos em farmácia, utilizando o critério de menor preço (provavelmente o mais utilizado). E então 5 comprimidos foram pesados e a massa média foi calculada. Posteriormente, esses foram triturados e pesou-se três vezes a massa referente à massa média. A preparação da solução estoque da amostra foi realizada em um béquer de 50 mL se dissolvendo a massa pesada do comprimido em EtOH Absoluto 99,5% e, em seguida, foram deixadas em banho ultrassônico por 30 minutos.

Um volume de 500 mL de uma solução de concentração $2,76 \text{ gL}^{-1}$ de fosfato de sódio monobásico (NaMB) foi preparada e seu pH foi ajustado para 2,5 com auxílio de ácido fosfórico, e, logo após, foi utilizada para avolumar os balões volumétricos.

Uma alíquota dessa solução foi transferida para um balão de 10 mL, ao qual foi adicionado 2 mL de ACN e completado com o tampão fosfato pH 2,5.

Uma alíquota de 250 μL da solução da amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e a ele foram adicionados 2 mL de ACN. Todos os balões foram completados com NaMB e homogeneizados.

4.3. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS

O comprimento de onda utilizado para a detecção dos analitos em todos experimentos foi 280 nm.

Em geral, o volume de injeção foi em 20 μL - em alguns ensaios será especificado outro valor se utilizado.

Solvente A (TACN), tampão fosfato pH = 7,01:ACN (93:7), Solvente B: ACN, Solvente C: EtOH, Solvente D: Tampão fosfato pH=7,01 (Tampão)

4.3.1. ESTUDOS PRELIMINARES

Baseado na condição da Farmacopeia USP (USP), na qual temos o fluxo do eluente 1,00 mL min⁻¹, 35°C e a programação de gradiente apresentado na Tabela 2, foi realizado o experimento para determinação de HDCL e LOR em comprimidos de medicamento. Este método será considerado como referência para os diversos testes, tais como modificação da composição de eluição, variação da vazão e da temperatura para verificar o desempenho do método farmacopeico a ser desenvolvido.

Tabela 2 - Condição de referência (farmacopeia USP) para análise de LOR e HDCL, vazão de 1,00 mLmin⁻¹ e temperatura de 35°C.

Condição 1		
Tempo(min)	%TACN	%ACN
0	100	0
12	92	8
28	38	62
30	100	0
35	100	0

Fonte (CONCIL OF EXPERTS AND ITS EXPERTS COMMITTEES, 2018)

Foi alterada a proporção de solventes para testar o comportamento dos analitos. Foram testadas corridas em condições isocráticas 100% TACN, 92% TACN/8% ACN, ambas com duração de 150 minutos, e 38% TACN/62% ACN.

A vazão do eluente foi variada para 1,50 mLmin⁻¹ e 2,00 mLmin⁻¹ na condição da Tabela 2, enquanto a temperatura foi mantida em 35°C, a fim de verificar a influência da vazão.

Por último foi verificada a influência da temperatura na condição 1(Tabela 2) alterando a temperatura de 35°C para 55°C e mantendo a vazão em 1,00 mLmin⁻¹.

Foram testadas corridas em condições isocráticas com concentração de EtOH de 15%, 30%, 45% e 60%, além da condição 1 apresentada na Tabela 2, porém com a substituição da ACN pelo EtOH.

4.3.2. DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE LOSARTANA POTÁSSICA E HIDROCLOROTIAZIDA COM COLUNA EMPACOTADA CONVENCIONAL E ETANOL COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO

Baseados nas condições da Farmacopeia USP, foram iniciados diversos estudos, com modificação da composição do eluente, variação da vazão e da temperatura, para verificar a possibilidade de substituição de ACN por EtOH, obtendo um método com desempenho similar ao método farmacopeico.

Esses testes foram feitos para tentar comparar o comportamento dos analitos frente aos dois solventes (ACN e EtOH).

Após diversos testes a melhor condição em que se obteve um resultado satisfatório foram as condições apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condição cromatográfica 3.

Condição 3				
Tempo(min)	Tampão	EtOH	Vazão (mLmin ⁻¹)	Temp(°C)
0	95	5	1,00	35
5	95	5		
10	31	69		
12	95	5		
17	95	5		

Fonte: Autoria própria.

4.4. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Para que o método seja considerado confiável, é necessário que seja feita a sua validação, que consiste na avaliação do método de forma sistemática através de experimentos que confirmem aquele procedimento para determinada utilização. No caso do presente estudo, para demonstrar a confiabilidade para a determinação de HDCL e LOR simultaneamente, e a fim de demonstrar a eficiência do método, o fluxo do eluente, o pH do eluente e a temperatura foram variados para determinar as suas influências.

Para o preparo das amostras foram testadas a influência do pH da amostra, a quantidade de ACN utilizada na preparação da amostra, a possibilidade de substituição da ACN pelo EtOH e a quantidade de EtOH.

4.4.1. SELETIVIDADE

A fim de testar a seletividade dessa metodologia, uma quantidade conhecida de padrão foi adicionada à amostra para verificar se há alguma alteração no cromatograma.

4.4.2. LINEARIDADE

Para testar a faixa de linearidade da curva a ser produzida, uma solução estoque de concentração 1250 mgL^{-1} de HDCL e 5000 mgL^{-1} de LOR foi preparada, e a partir desta, padrões foram preparados nas seguintes faixas de concentração. $0,50$ a 250 mgL^{-1} de HDCL e $2,00$ a 1000 mgL^{-1} de LOR. Esses valores foram escolhidos devido ao fato da amostra do medicamento preparada ter $12,5 \text{ mgL}^{-1}$ de HDCL e 50 mgL^{-1} de LOR, ficando assim no meio do intervalo de pontos que foram medidos. Os valores de concentração exatos podem ser observados na tabela abaixo.

Tabela 4 - Concentrações utilizadas para determinar a faixa de trabalho e sua linearidade.

Conc. LOR (mgL^{-1})	Conc.HDCL(mgL^{-1})	Vol.padrão(μL)	Vol.ACN(mL)	Vol. Balão(mL)
branco	branco	0	2	10
2	0,50	2	1	5
5	1,25	5	1	5
10	2,50	10	1	5
25	6,25	25	1	5
50	12,50	50	1	5
75	18,75	75	1	5
100	25,00	100	1	5
200	50,00	200	1	5
400	100,00	800	2	10
600	150,00	1200	2	10
800	200,00	1600	2	10
1000	250,00	2000	2	10

Fonte: Autoria própria.

4.4.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

Feito de acordo com o item 3.1.3.

4.4.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Feito de acordo com o item 3.1.4.

4.4.5. PRECISÃO

Foi testado a proximidade entre os resultados obtidos pela metodologia desenvolvida e os valores informados pelo fabricante, assumidos como valores reais.

4.4.6. REPETITIBILIDADE

Foram analisadas 6 réplicas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista, mesmo método, mesma corrida e mesmo equipamento.

4.4.6.1. PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A partir de três replicatas, cada uma analisada três vezes, obteve-se um primeiro conjunto de dados. O procedimento foi repetido em dia distinto para se obter um segundo conjunto de dados e, a partir dessas informações, a precisão intermediária foi calculada.

4.4.7. EXATIDÃO

É a medida da proximidade entre o valor encontrado através da análise com o valor real teórico. A fim de se determinar a exatidão um teste de adição e recuperação foi efetuado com as seguintes quantidades de analitos adicionadas: 50%, 100% e 150% em relação à concentração da amostra.

4.4.8. ROBUSTEZ

É um teste para se verificar se pequenas variações no sistema causam alguma alteração influenciável na análise. No presente caso foram feitas alterações no pH da amostra, no pH da fase móvel, na temperatura de corrida, na vazão de corrida e também análise em uma coluna de marca diferente, porém com as mesmas características de comprimento, polaridade e tamanho de partícula. Para se definir se o parâmetro é ou não robusto, será feito o teste-t, que é um teste que indica se valores testados podem ser considerados equivalentes.

Equação 9 - teste-t de Student

$$t = \frac{\bar{x}_m - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}} \text{ onde,}$$

\bar{x}_m é a média da amostra

μ é o valor de comparação

σ é o desvio padrão amostral

n é o número de réplicas

4.4.9. TESTANDO DUAS COLUNA CROMATOGRÁFICAS DIFERENTES

A Metodologia foi desenvolvida em uma coluna cromatográfica empacotada, phenomenex®, 120A, 5 μ m, 4,6 mm de diâmetro, 150 mm, C18. A fim de verificar se ocorreria alguma alteração no resultado com a alteração da coluna, essa foi substituída por uma coluna cromatográfica empacotada, ACE® com características iguais, exceto a porosidade que é de 100 Å.

4.4.9.1. VARIAÇÃO DO pH DA AMOSTRA

O pH da amostra foi variado em $\pm 10\%$ do pH em que a análise é feita, testando os pH 2,25 e 2,75, para verificar se haveria alguma influência no resultado da análise.

4.4.9.2. VARIAÇÃO DO pH DA FASE MÓVEL

O pH da fase móvel foi alterado diminuindo-se em 0,5 unidades do valor de pH utilizado na análise (7,0) para verificar se há influência no resultado da análise.

4.4.9.3. VAZÃO DA FASE MÓVEL

A vazão foi variada em $\pm 10\%$ em relação à vazão utilizada na análise, testando as vazões de 0,9 mLmin⁻¹ e 1,10 mLmin⁻¹.

4.4.9.4. TEMPERATURA DE ANÁLISE

A temperatura foi variada em ± 5 °C para verificar se haveria alguma influência no resultado da análise. Análises foram feitas às temperaturas de 30°C e 40°C.

4.4.10. CURVA ANALÍTICA

Após determinar a faixa de linearidade da curva analítica, uma curva foi construída para a HDCL e outra para a LOR a partir das concentrações mostradas abaixo.

Tabela 5 - Concentrações utilizadas na construção das curvas analíticas.

HDCL	LOR
Conc. (mgL ⁻¹)	Conc. (mgL ⁻¹)
0,50	2,00
1,25	5,00
2,50	10,0
6,25	25,0
12,5	50,0
18,8	75,0
25,0	100
50,0	200

Fonte: Autoria própria.

4.4.11. DETERMINAÇÃO DE HDCL E LOR EM COMPRIMIDOS

A partir da curva obtida e dos dados obtidos com a injeção da amostra, a concentração dos analitos foi determinada nos comprimidos analisados.

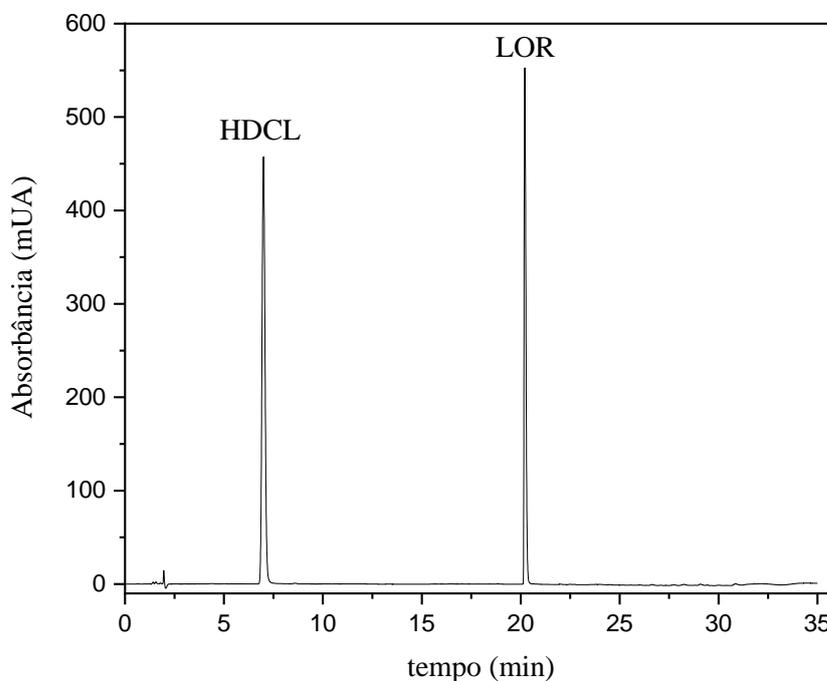
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDOS PRELIMINARES

5.1.1. DAS CONDIÇÕES DE CORRIDA

O estudo foi iniciado com a eluição da amostra utilizando a condição 1 (Tabela 2), que é a condição descrita na farmacopeia USP, obtendo o cromatograma apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Cromatograma de acordo com as condições da USP- Condição 1 (Tabela 2), 1,00 mLmin⁻¹ e 35°C.



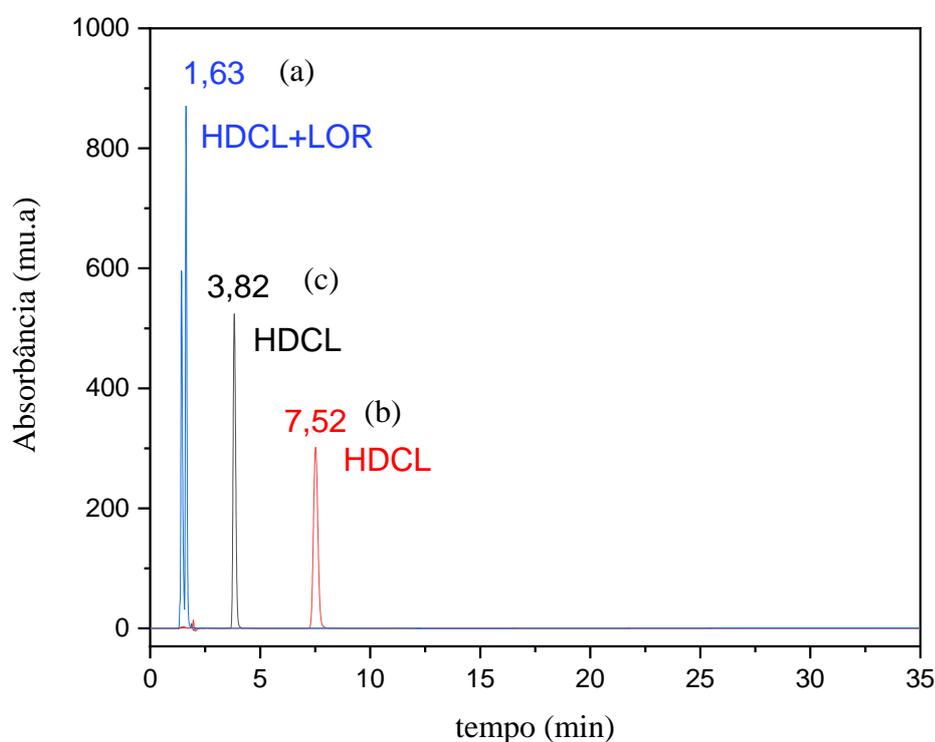
Na Figura 4, é possível observar uma boa separação dos compostos, tendo uma resolução de 57,93. O primeiro analito a eluir foi a HDCL com tempo de retenção de 7,00 minutos, enquanto a LOR teve um elevado tempo de retenção (20,21 min). O fator caudal (FC) foi de 1,10 para a HDCL e de 1,52 para a LOR enquanto o fator de retenção (k) foi de 2,57 para a HDCL e 9,31 para a LOR.

A resolução indicou uma separação eficiente dos compostos e o FC está dentro do permitido, uma vez que a farmacopeia brasileira estabelece que o FC da LOR tem que ser NMT (do inglês *no more than*, não maior que) 2,0 em comprimidos, e a Farmacopeia USP define que deve ser NMT 2,5 quando em comprimido.

Para a hidroclorotiazida não existe um valor de FC estabelecido na farmacopeia brasileira, porém na Farmacopeia USP o valor tolerado é de NMT 1,5.

Modificações foram feitas de modo a observar como o cromatograma seria afetado pela alteração da composição do eluente, especialmente no caso de eluição isocrática com alto conteúdo ou baixo conteúdo de solvente orgânico. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Figura 5 - Variação na composição do eluente: (a) 32%TACN/62%ACN (em azul) ;(b) 100% TACN (em vermelho); (c) 92%TACN/8%ACN (em preto), 1,00 mLmin⁻¹ e 35°C.



No cromatograma (c) da Figura 5 (92%TACN:8%ACN), percebe-se a diminuição do tempo de retenção (TR) da HDCL, quando comparado com o método da farmacopeia. Isso era esperado uma vez que a corrida se inicia com 8% de ACN (TACN com 7% de ACN), enquanto no método farmacopeico foi utilizado um gradiente de 12 minutos para chegar na mesma proporção, todavia não se observou a detecção do pico de LOR. A corrida teve uma duração total de 150 minutos, porém foi mostrado somente até o minuto 35.

Tabela 6 - tempos de retenção retirados da Figura 5

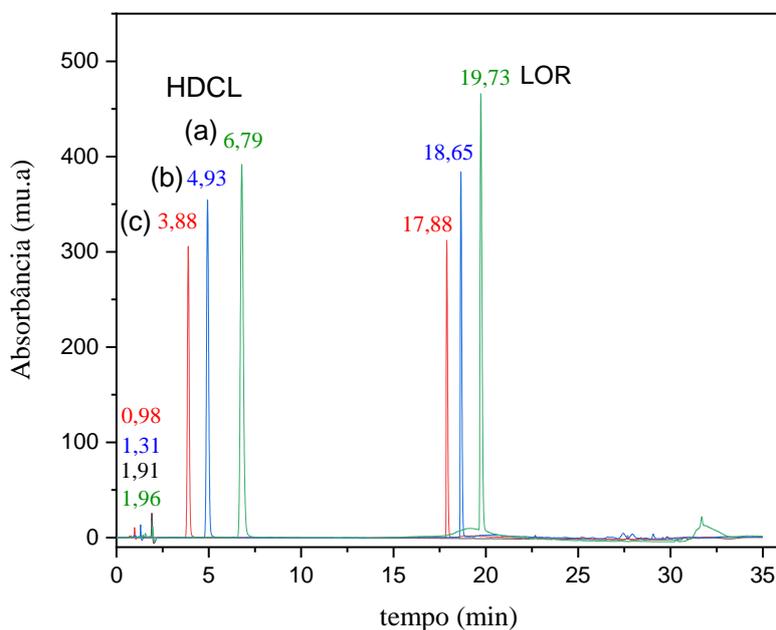
	tempo de retenção (min)	
	HDCL	LOR
A	1,63	1,63
B	7,52	-
C	3,82	-

Em (b) (100% TACN), como esperado, houve um aumento no TR da HDCL, pela baixa concentração de ACN (7% presentes na TACN), novamente não foi observado o pico de LOR. Assim como em (c), a corrida cromatográfica teve duração de 150 min, mas foi apresentado somente 35 minutos.

Em (a) foi testado o comportamento dos analitos em frente uma alta concentração de ACN. Nesse caso, o maior valor de concentração de ACN que o gradiente da Tabela 2 atinge, que é 62% (69% de ACN considerando os 7% de ACN presentes no TACN). O cromatograma (a) mostra que houve uma coeluição dos analitos HDCL e LOR, juntamente com o tempo de retenção do volume morto, em um tempo muito curto, tornando inviável a separação dos compostos nessas condições isocráticas. Quando observamos todas as condições testadas, as respostas obtidas indicam que uma condição isocrática de corrida não é suficiente para obter uma separação eficiente dos analitos, independentemente da quantidade da ACN estar em baixa ou alta concentração, o que reforça a necessidade de um gradiente, como o apresentado na Tabela 2, para que haja uma separação eficiente e para evitar elevado tempo de análise com consequente consumo de fase móvel, energia e desnecessária geração de resíduos.

O comportamento dos analitos também se altera com a modificação fluxo do eluente, pelo que foi pesquisada a variação na faixa de 1,00 a 2,00 mLmin⁻¹, os cromatogramas obtidos são mostrados na Figura 6, obtidos na condição da Tabela 2 a 35°C.

Figura 6 - Influência da vazão no experimento com a condição 1 a 35 °C. (a) 1,00 mL.min⁻¹ (em verde); (b) 1,50 mL.min⁻¹ (em azul) e (c) 2,00 mL.min⁻¹ (em vermelho).



Como pode ser visto na Figura 6, à medida que se aumenta o fluxo do eluente o TR dos analitos diminui, mas também ocorre o aumento da pressão do sistema o que pode diminuir o tempo de vida útil da coluna, além de diminuir o tempo de interação com a coluna e aumentar ligeiramente a dispersão, causando um aumento no FC da LOR como observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados obtidos a partir da variação da vazão do eluente

Condição	Analito	Tempo de retenção (min)	FC	k	Resolução	TR do volume morto
a	LOR	19,73	1,52	9,31	57,93	1,96
	HDCL	6,79	1,10	2,57		
b	HDCL	4,93	1,10	2,76	73,96	1,31
	LOR	18,65	1,57	13,24		
c	HDCL	3,88	1,10	2,96	84,15	0,98
	LOR	17,88	1,60	17,24		

A temperatura foi variada para observar seu efeito durante a determinação de LOR e HDCL, e os resultados são apresentados na Figura 7.

Figura 7 - Influência da temperatura na determinação da LOR e HDCL com condição 1 (Tabela 2) (a) 35°C (em vermelho), (b) 55°C (em preto).

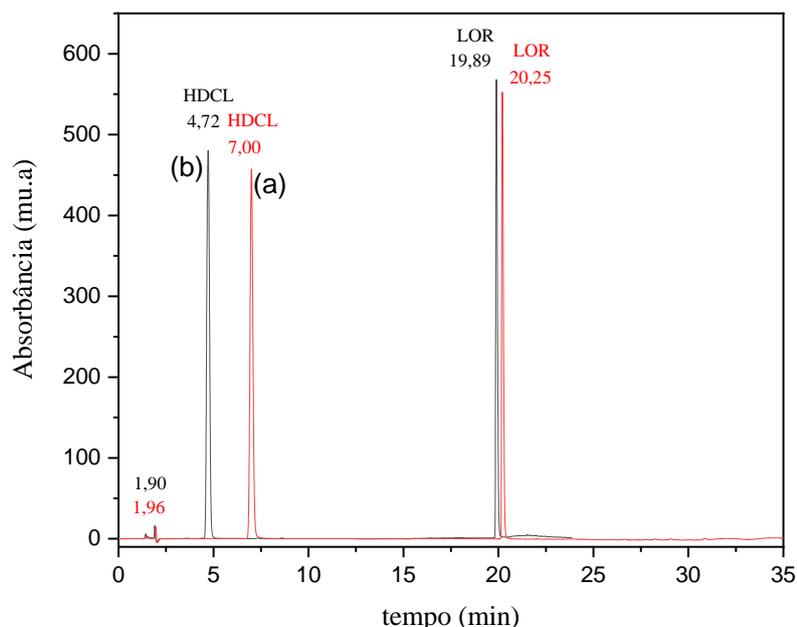


Tabela 8 - Dados obtidos a partir da Figura 7.

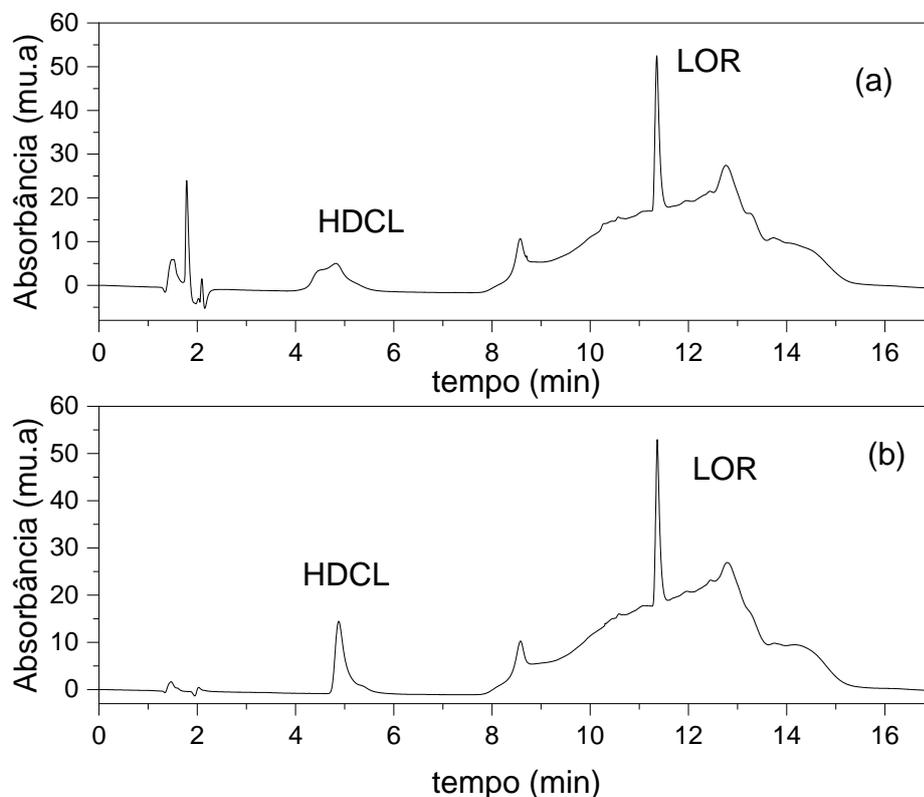
Condição	Analito	Tempo de retenção (min)	FC	k	Resolução	TR do volume morto
a	HDCL	7,00	1,10	2,57	57,93	1,96
	LOR	20,25	1,52	9,31		
b	HDCL	4,72	1,06	1,47	68,68	1,91
	LOR	19,89	1,54	9,41		

Como pode ser observado na Figura 7 e na Tabela 8, a temperatura não apresentou uma influência muito grande no tempo morto, provocou uma pequena mudança no TR da LOR e uma mudança considerável no TR da HDCL (uma variação de 2,38 minutos). Também foi percebido uma pequena mudança no FC da LOR ao se comparar o valor nas duas temperaturas.

5.1.2. QUANTIDADE DE SOLVENTE NA PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Variou-se a quantidade de ACN necessária na preparação da amostra além de substituir o ACN por EtOH. Os cromatogramas são mostrados nas figuras abaixo.

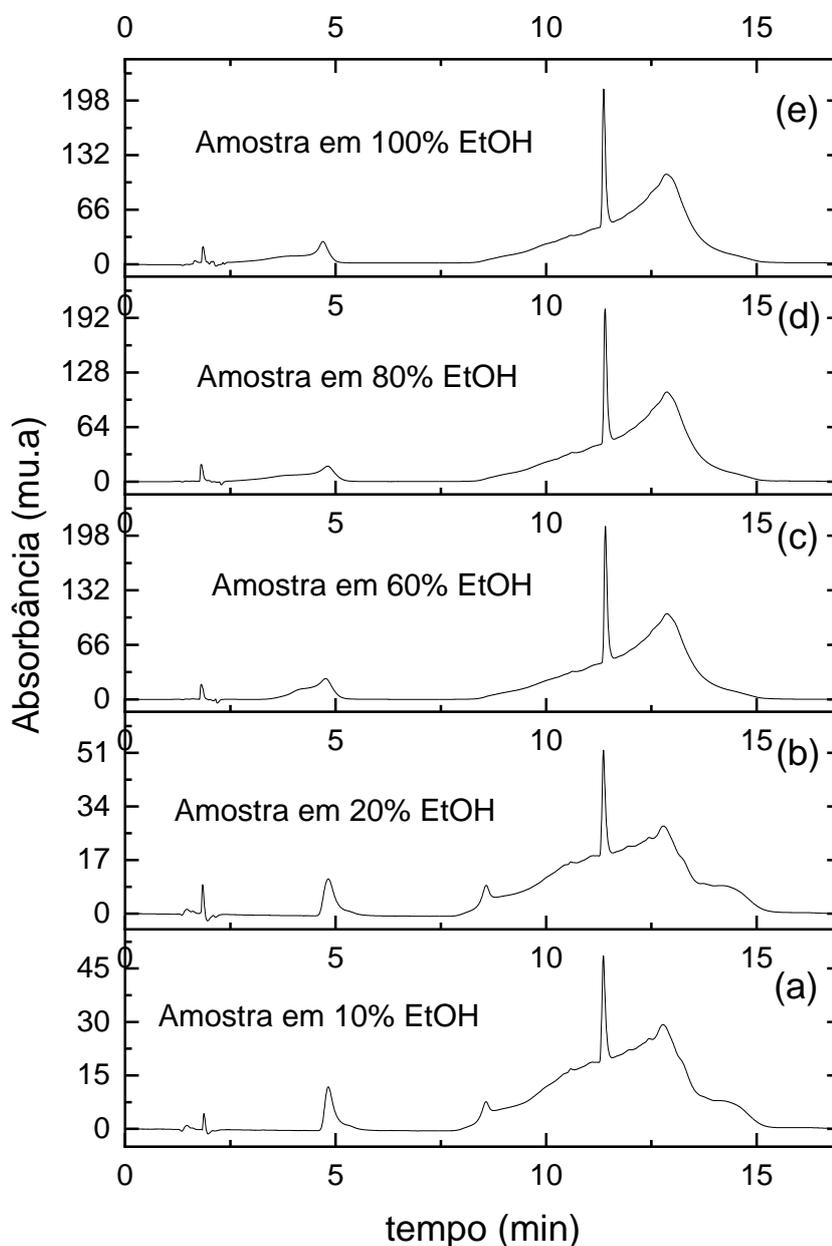
Figura 8 - Preparo da amostra variando a porcentagem do solvente (a) amostra preparada no diluente. (b) amostra preparada em tampão.



É possível perceber que no cromatograma (a) existe um problema de solubilidade com a HDCL. Já no cromatograma (b), o FC da HDCL foi de 2,64, um valor muito alto, bem acima do permitido pela Farmacopeia USP e por isso as condições (a) e (b) foram descartadas.

Como a solução estoque foi preparada em EtOH, esse mesmo solvente foi testado para o preparo da amostra. O resultado é mostrado na figura a seguir.

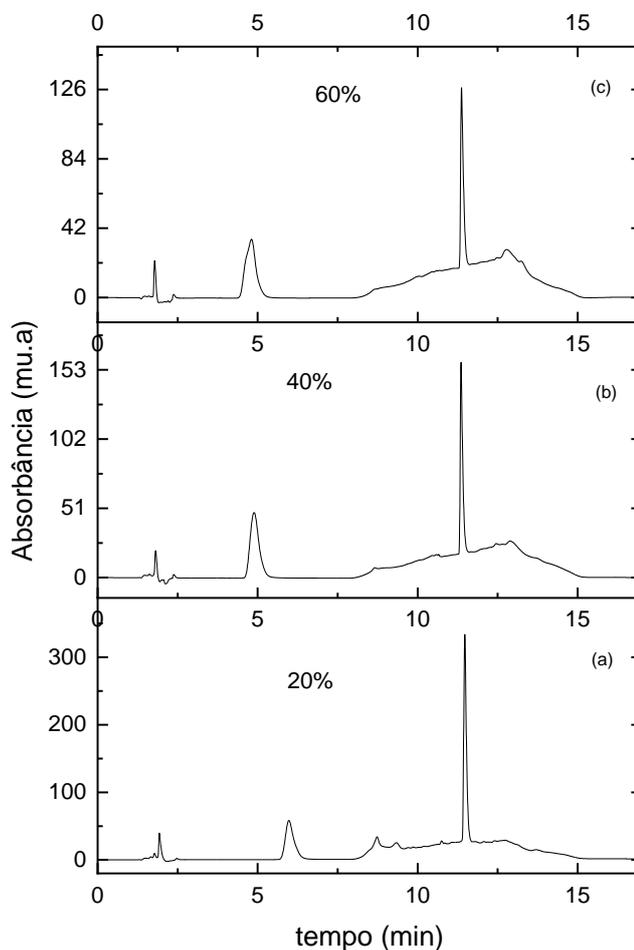
Figura 9 - Preparo da amostra com EtOH como solvente orgânico.



As concentrações de 10% e 20% de EtOH produzem um FC acima de 2,0 para a HDCL, e, à medida que se aumenta a concentração de EtOH na amostra, percebe um alargamento do pico causado provavelmente pela diminuição da porcentagem do tampão na fase móvel, dificultando a solubilidade da HDCL.

Por último se variou a quantidade de ACN no preparo da amostra, os resultados são mostrados na figura abaixo.

Figura 10 - Preparo de amostras com ACN.



Os valores de FC encontrados são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 9 - Valores de FC obtidos a partir das amostras preparadas com ACN.

%ACN	FC	
	HDCL	LOR
20	1,61	1,86
40	1,36	1,86
60	1,09	1,89

A melhor condição encontrada foi a com 40% de ACN no preparo da amostra. 20% de ACN gera valor grande de FC para o HDCL e apesar de com 60% de ACN o FC ser 1,09, há um alargamento do pico provavelmente por problema de solubilidade.

5.2. DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE LOSARTANA POTÁSSICA E HIDROCLOROTIAZIDA COM COLUNA EMPACOTADA CONVENCIONAL E ETANOL COMO SOLVENTE DE ELUIÇÃO

5.2.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Considerando que o objetivo principal desse trabalho é tornar o método de análise proposto pela Farmacopeia USP ecossustentável, foi implementada uma modificação na condição 1 (Tabela 2), substituindo a ACN por EtOH para avaliar a viabilidade da separação utilizando esse solvente como a fase orgânica do eluente e os resultados são apresentados na Figura 11e na Tabela 10.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos usando eluentes diferentes (a) ACN (em vermelho), (b) EtOH (em preto). Vazão 1,00 mLmin⁻¹, 35°C.

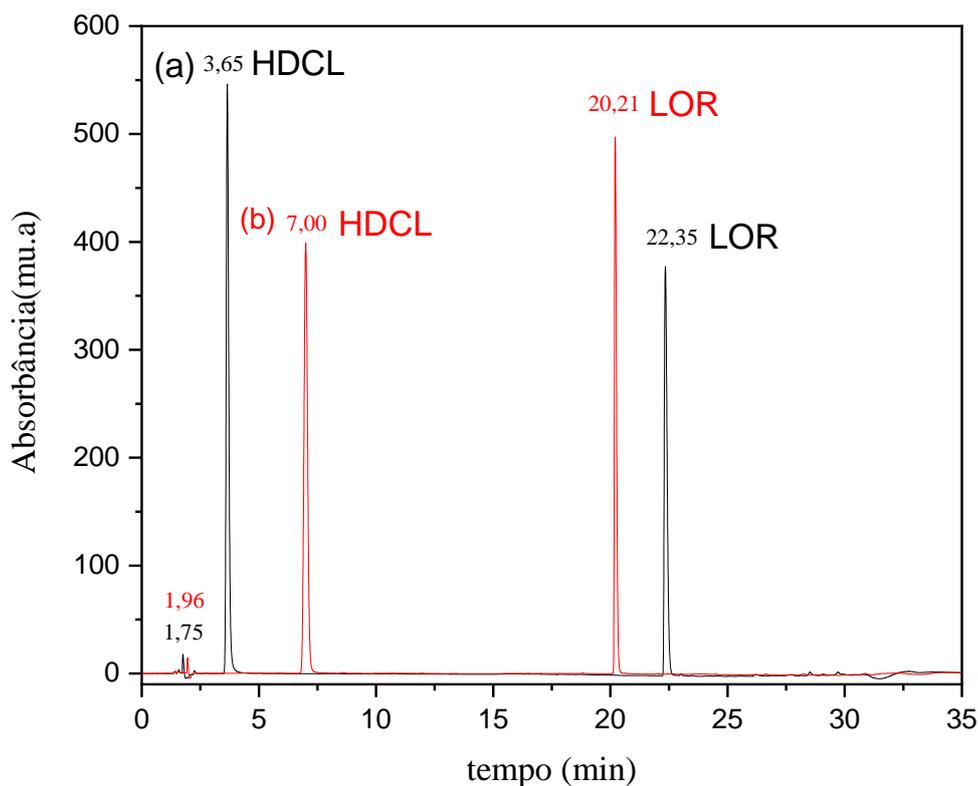
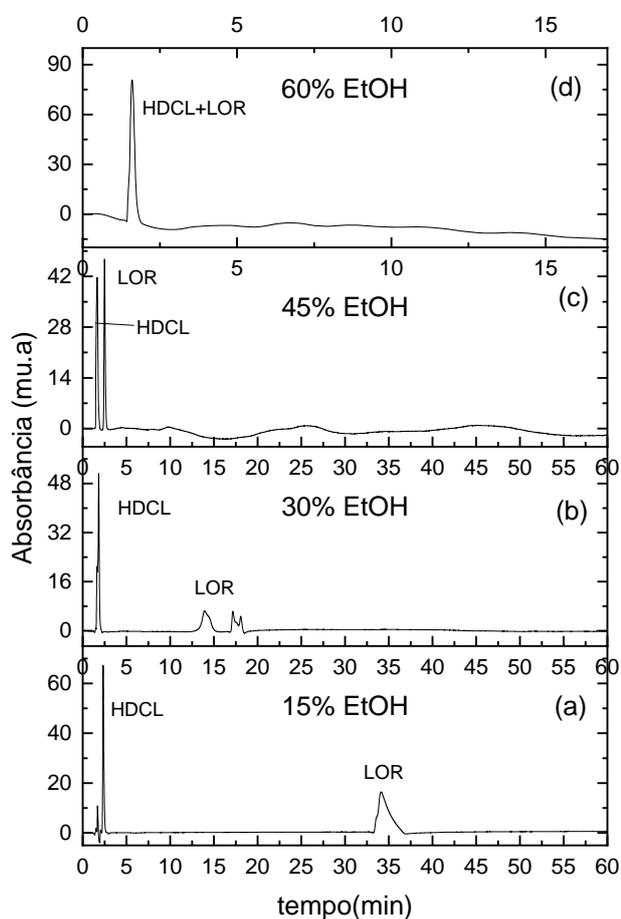


Tabela 10 - Dados obtidos a partir da Figura 11.

solvente	analito	Tempo de retenção (min)	FC	k	Resolução	TR do volume morto
EtOH	HDCL	3,65	1,3	1,09	113,33	1,75
	LOR	22,35	1,58	11,77		
ACN	HDCL	7,00	1,10	2,57	57,93	1,96
	LOR	20,25	1,52	9,31		

Segundo o que foi observado na Tabela 10, a substituição de ACN por EtOH é viável, uma vez que é observada uma separação eficiente quando se utiliza este solvente como a fase orgânica do eluente. Apesar de haver um aumento do FC, que pode ser visto na Tabela 10, para ambos analitos, os valores ainda estão dentro da faixa permitida, tanto pela farmacopeia brasileira, como pela Farmacopeia USP.

Figura 12 - Condições isocráticas testadas com EtOH.



Houve a redução do k da HDCL na eluição com o EtOH, porém o valor permanece maior que um, indicando que o analito está ficando retido por tempo suficiente na coluna, não inviabilizando a utilização do EtOH como solvente. A resolução (R) entre os picos dos compostos foi de 113,33. Ambos valores estão dentro do que se considera adequado para uma metodologia (ANVISA, 2014), entretanto o valor elevado de resolução indica que o método pode ser modificado para diminuir o tempo de corrida, diminuindo o consumo de fase móvel e gerando menor quantidade de resíduos.

Foram testadas algumas condições isocráticas para ver se seria possível obter uma boa separação. As condições foram 15%, 30%, 45%, 60% de EtOH. São apresentadas na Figura 12.

É possível observar que, com 15% e 30% de EtOH, não foi possível obter uma separação satisfatória, pois a polaridade não é suficiente para eluir a LOR de forma satisfatória, causando um grande alargamento do pico. Com 45%, houve uma separação, mas os analitos eluíram junto com o volume morto, inviabilizando a utilização dessa condição e, com 60%, houve co-eluição dos analitos junto com o volume morto. Por isso as tentativas de criar um método de determinação isocrático com EtOH não se mostrou viável.

Foram testadas diversas condições de gradiente para melhorar o a separação dos analitos ao utilizar EtOH. Ao invés de se iniciar as corridas com EtOH com uma concentração de 7% (anteriormente o ACN estava já adicionados no tampão TACN nessa quantidade), essa quantidade foi reduzida para 5% a fim de tentar atrasar a saída da HDCL. Na condição indicada na Tabela 11 a tentativa é aumentar o k da HDCL e diminuir o valor de k da LOR, uma vez que, ao se diminuir a concentração inicial de EtOH, é esperado que haja um aumento no k do HDCL e, ao se iniciar, o gradiente em um tempo menor, nesse caso 5 minutos, deve ocasionar uma diminuição no k da LOR. Os resultados são apresentados na Figura 13 e na Tabela 12.

Tabela 11- Condição cromatográfica 5.

Tempo(min)	Tampão	EtOH	Vazão (mL min ⁻¹)	Temp(°C)
0	95	5	1,00	35
6	95	5		
28	31	69		
30	95	5		
35	95	5		

Figura 13 - Cromatograma obtido através da condição descrita na Tabela 11.

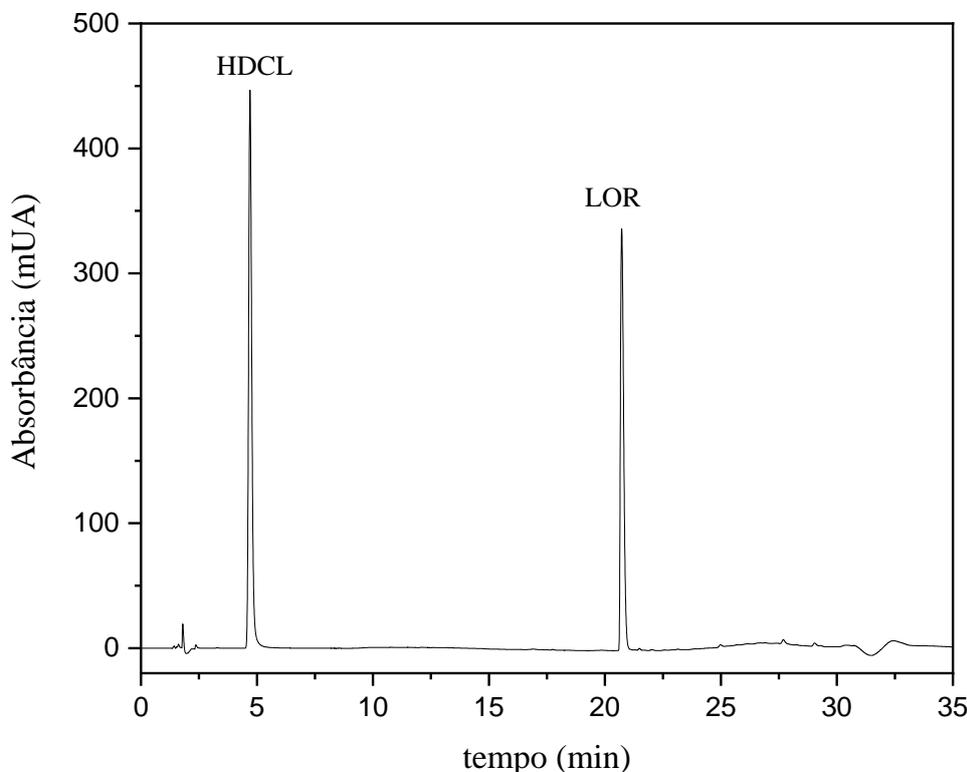


Tabela 12 - Dados obtidos a partir da Figura 13.

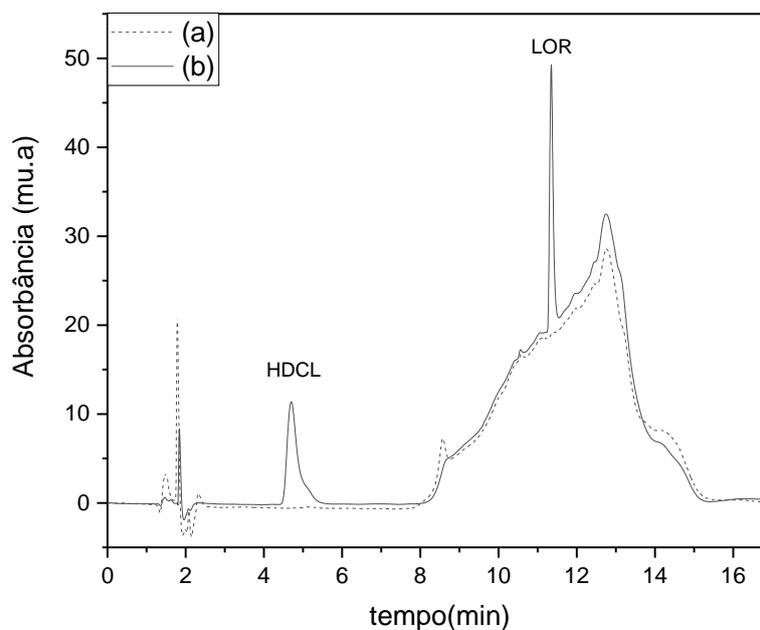
	tempo de retenção (min)	FC	k	Resolução	Volume morto
HDCL	4,69	1,27	1,61	49,32	1,8
LOR	20,72	1,55	10,51		

Nestes resultados mostrados na Tabela 12, em comparação com os dados da Tabela 10, é possível observar o aumento do TR da HDCL de 3,65 minutos para 4,69 minutos, e seu k de 1,08 para 1,61, a diminuição do TR da LOR de 22,35 minutos para 20,72 minutos e de seu k de 11,94 para 10,51, sendo que ambos valores de k estão próximos dos valores que são obtidos na condição encontrada na metodologia da Farmacopeia USP (Tabela 2). Também houve uma pequena redução no valor do FC de ambos analitos vemos que o valor de FC foi 1,27 para HDCL, 1,55 para a LOR e a resolução entre os picos é 49,32 - um valor que se traduz em uma elevada separação entre eles, mas que indica que ainda há a possibilidade de variar as condições para diminuir o tempo de eluição sem prejuízo da resolução na metodologia.

Com a finalidade de diminuir o tempo de corrida e verificar se os parâmetros ainda continuariam dentro do intervalo adequado para considerar a corrida eficiente, houve uma diminuição tanto no início, quanto no intervalo do gradiente gerando a condição 3 (Tabela 3 - Condição cromatográfica 3).

Como o objetivo foi criar uma metodologia de determinação de LOR e HDCL baseada em uma curva analítica, a concentração dos analitos foi diminuída de 400/100 mgL⁻¹ de LOR/HDCL (CONCIL OF EXPERTS AND ITS EXPERTS COMMITTEES, 2018) para 25/6,25 mgL⁻¹ (Figura 14).

Figura 14 - Cromatograma adquirido com a condição 3 (Tabela 3). (a) branco (linha tracejada), (b) amostra (linha contínua).



Ao se diminuir a concentração dos analitos, observa-se também a diminuição da intensidade do sinal (comparando os sinais obtidos nas Figura 13 e Figura 14), confirmando a existência de uma relação entre concentração e intensidade do sinal.

Com a diminuição da concentração dos analitos, foi possível observar que ao se aumentar a proporção de EtOH na fase móvel, mais perceptível se tornou a variação do sinal devido ao gradiente, pelo fato do EtOH apresentar impurezas que absorvem no comprimento de onda utilizado na análise (CARDOSO, 2015), chegando ao seu máximo com a porcentagem de 69% de EtOH, voltando a diminuir à medida que a concentração de EtOH diminui. Foram

testados o EtOH absoluto, desnaturalizado e grau HPLC e todos apresentaram o mesmo comportamento, porém quanto mais puro o EtOH, ligeiramente maior era o sinal atribuído ao gradiente.

O mesmo efeito é visto no cromatograma da amostra e do apresentando na Figura 14.

Tabela 13 – Dados obtidos a partir do cromatograma da Figura 14.

	Tempo de retenção (min)	FC	k	Resolução	Volume morto
HDCL	4,70	1,95	1,55	21,38	1,83
LOR	11,35	1,30	5,17		

Os valores de FC, k e resolução, que foram obtidos através do software do equipamento, estão dentro do intervalo das farmacopeias para que a análise seja válida.

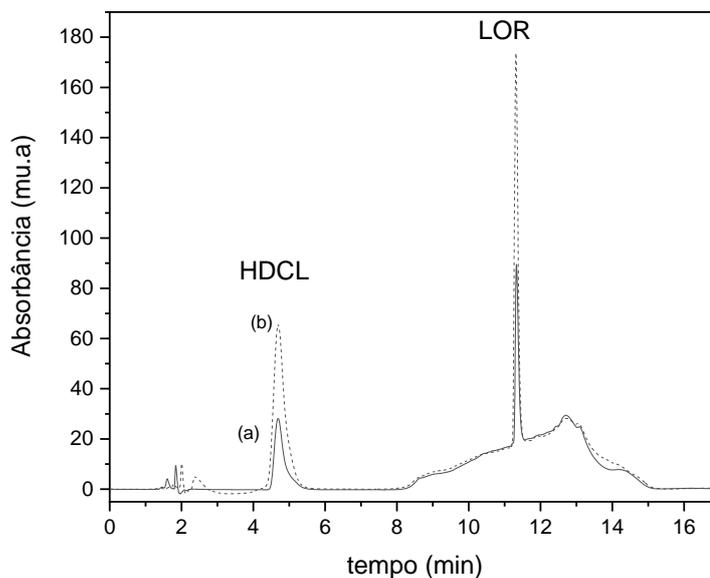
5.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O método foi validado conforme Resolução nº 166 da ANVISA(ANVISA, 2017).

5.3.1. SELETIVIDADE

Os resultados são mostrados a seguir:

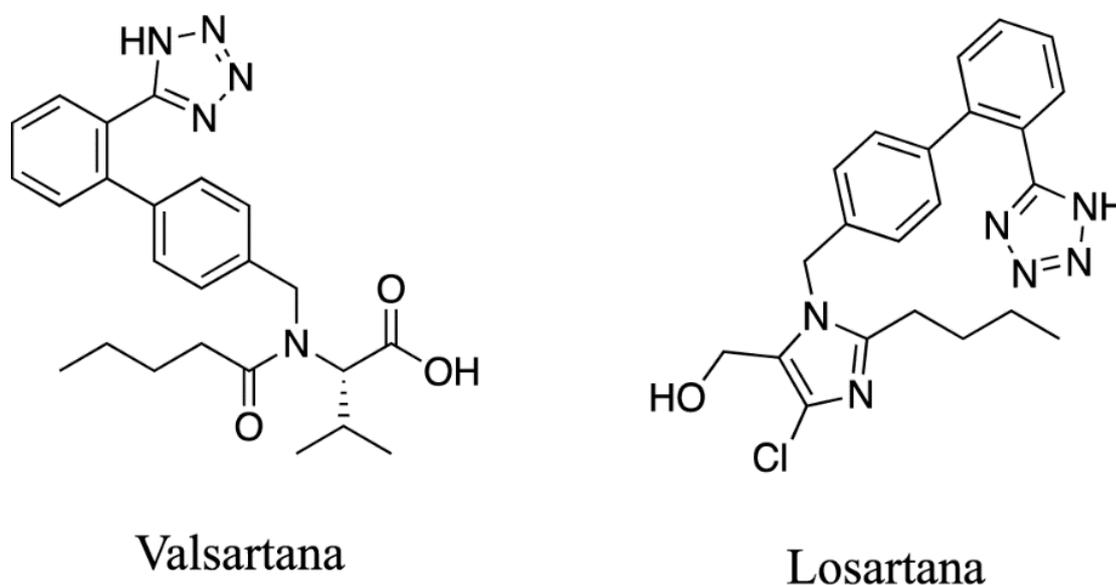
Figura 15 - Cromatograma da (a) amostra do medicamento (linha contínua) e (b) amostra do medicamento fortificada (linha tracejada)



Ao se observar a Figura 15, a alteração no cromatograma com a adição de padrão (25mgL^{-1} de HDCL e 100mgL^{-1} de LOR), foi mínima e em regiões nas quais os picos de LOR e HDCL não aparecem, confirmando a seletividade do método.

Para complementar a avaliação da seletividade do método, mais uma análise foi feita a fim de verificar se medicamentos com compostos com estrutura semelhante provocariam alguma alteração, optou-se por escolher um medicamento da mesma indicação terapêutica para se realizar os testes, nesse caso a valsartana (VAR) da marca TEUTO®.

Figura 16 - Estrutura da Losartana e da Valsartana.

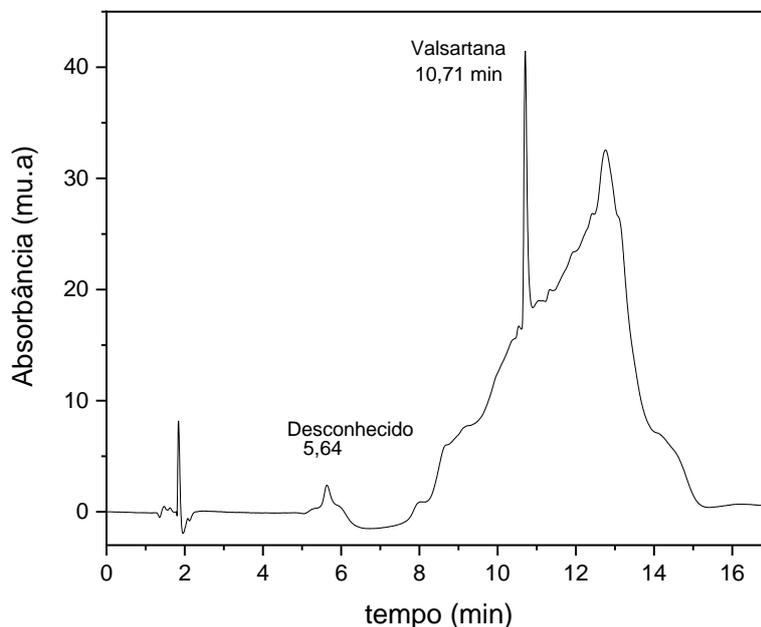


Fonte:(AGLIOA et al., 2022)

Como mostrado na Figura 16, as moléculas de LOR e VAL apresentam estrutura semelhantes, diferenciando-se pelos grupamentos que estão ligados ao nitrogênio, que na representação da Figura 16, esta na parte inferior da imagem. Enquanto na LOR tem-se um ciclo diazo, na VAL se tem uma amida, mas pode ser observado que em ambas existem a presença de grupos polares, enquanto na LOR há a hidroxila e o Cloreto, na VAL há carbonila e carboxila.

Utilizamos comprimidos de VAL obtido em uma farmácia para fazer o teste de seletividade.

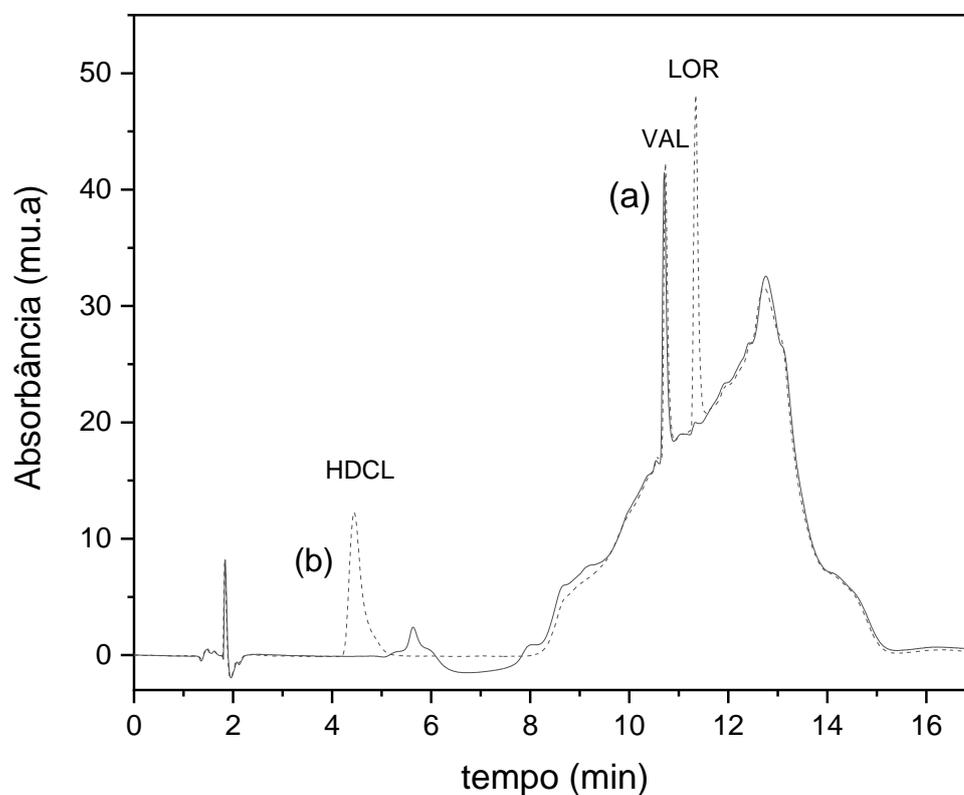
Figura 17 - Cromatograma da VAL.



Através do cromatograma mostrado na Figura 17, pode-se observar que o tempo de retenção da VAL é 10,71 minutos. Há indícios de alguma outra que pode estar eluindo no tempo 5,64 minutos, que provavelmente deve ser algum excipiente.

As soluções de VAL e de amostra (contendo losartana e hidroclorotiazida) foram misturadas, sendo as concentrações estimadas da LOR 25 mgL^{-1} e da VAL e 20 mgL^{-1} , para descobrir se haveria interferência na corrida cromatográfica. O resultado obtido após a injeção da VAL é mostrado na Figura 18.

Figura 18 - Cromatogramas da amostra fortificada com (a) VAL (linha contínua) e (b) da amostra com VAL (linha tracejada).



Através da Figura 18 é possível perceber que existe boa separação entre VAL, LOR e HDCL, com TRs diferentes, e os picos de LOR e HDCL não são afetados pela nova matriz do medicamento contendo VAL, portanto o método, a priori, tem seletividade para a LOR e HDCL.

5.3.2. LINEARIDADE

Os valores de área obtidos pela injeção dos padrões são apresentados nas tabelas abaixo.

Tabela 14 - Dados de injeção (em quadruplicata) dos padrões de HDCL e LOR.

HDCL			LOR		
Conc. (mgL ⁻¹)	média	desvio padrão	Conc. (mgL ⁻¹)	média	desvio padrão
0,50	9638	486	2	11081	1276
1,25	49651	1816	5	37502	416
2,50	101114	965	10	76240	648
6,25	255304	1208	25	192339	179
12,50	522963	63507	50	418703	1741
18,75	877304	1310	75	646733	3306
25,00	1174521	3745	100	863815	1353
50,00	2390355	1928	200	1769864	7634

Figura 19 – Curva analítica de HDCL construída com dados da Tabela 14

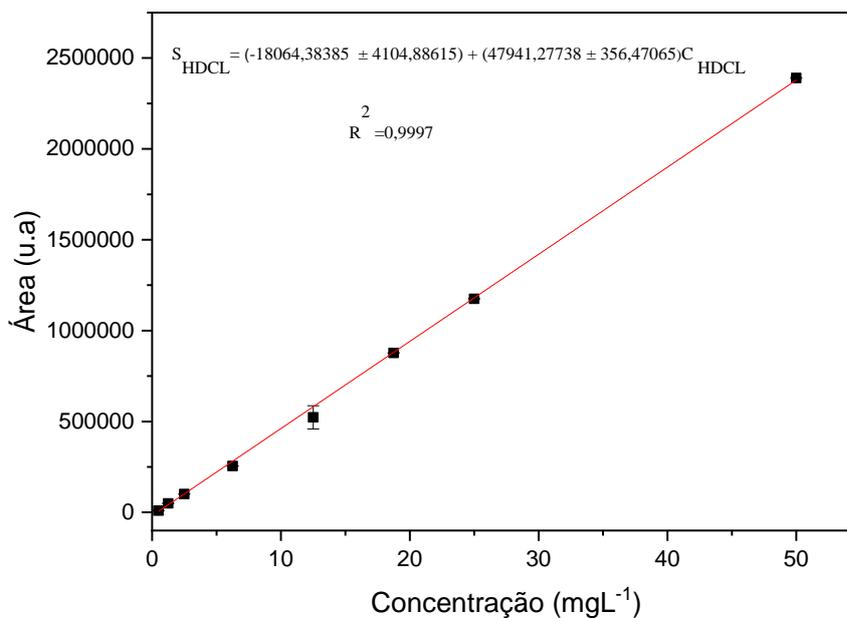
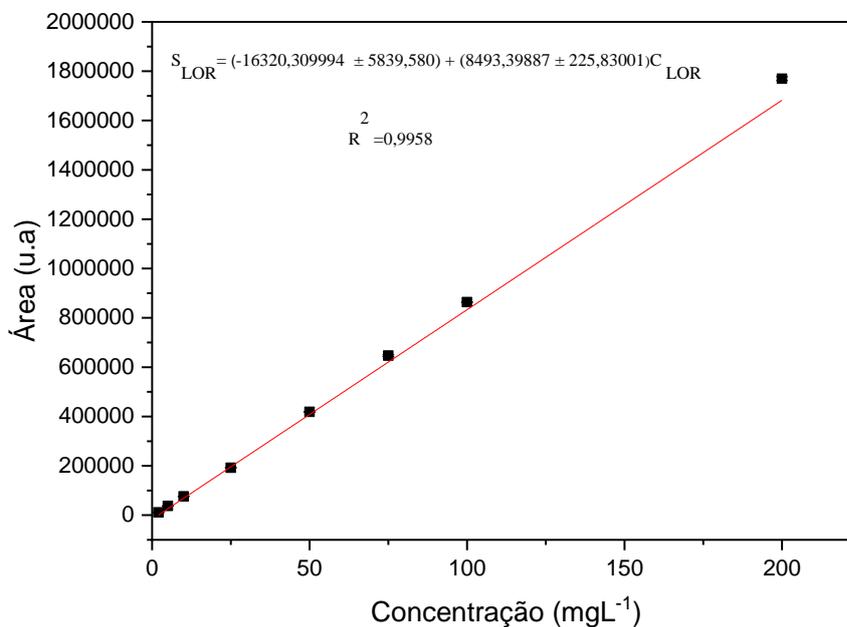


Figura 20 – Curva analítica de LOR construída com dados da Tabela 14 - Dados de injeção (em quadruplicata) dos padrões de HDCL e LOR.



Com os dados das Tabela 14 foram construídas curvas que apresentam as equações seguintes:

$$\text{Equação 10 - } S_{HDCL} = (-1,8 + 4,8) \times 10^4 C_{HDCL}$$

$$R^2 = 0,9997$$

e para a LOR,

$$\text{Equação 11 - } S_{LOR} = (-1,6 + 0,85) \times 10^4 C_{LOR}$$

$$R^2 = 0,9958$$

Em ambas o r^2 é maior que 0,99, indicando uma boa linearidade na faixa estudada, 0,50 mgL⁻¹ a 50 mg L⁻¹ para a HDCL e 2,0 mg L⁻¹ a 200 mg L⁻¹ para a LOR.

5.3.3. LIMITE DE DETECÇÃO(LOD)

Como já se dispunha de 1 curva obtida por injeções em quadruplicata, a fim de conseguir calcular o LOD, 2 novas curvas foram construídas com injeções em quadruplicata nas mesmas

faixas de concentração das anteriores, e os resultados podem ser vistos nas tabelas 15, 16, 17, 18.

Tabela 15 – Áreas obtidas com as concentrações injetadas dos padrões de HDCL e LOR.

Conc.(ppm)	HDCL		Conc. (ppm)	LOR	
	média	desv.pad		média	desv.pad
0,50	9564	663	2	11412	1204
1,25	49651	1816	5	37502	416
2,50	117263	1772	10	81862	424
6,25	321598	1387	25	241776	1302
12,25	604553	2478	50	450925	565
18,75	877304	1310	75	646733	3306
25,00	1,17E+06	3745	100	863815	1353
50,00	2,39E+06	5704	200	1,77E+06	4674

Tabela 16 - Áreas obtidas com a segunda injeção dos padrões de HDCL e LOR.

Conc. (mgL ⁻¹)	HDCL		Conc. (mgL ⁻¹)	LOR	
	Média	desv. Pad		Média	desv. Pad
0,50	19030	1782	2	10515	1168
1,25	51194	873	5	33972	975
2,50	106148	2174	10	74276	310
6,25	317704	1705	25	236754	1260
12,50	592354	3515	50	441493	1232
18,75	871802	9510	75	649186	5193
25,00	1250000	51883	100	923407	26647
50,00	2290000	11655	200	1,69E+06	8734

Tabela 17 – Dados para cálculo de LOD.

		1	2	3	Média (mgL ⁻¹)	desv.pad
		HDCL	Inclinação	47005,72	47941,28	47795,92
Intercepto	7559,62		-18064,38	-4576,24	-	12817,95
LOD	0,90		0,88	0,88	0,89	
LOR	Inclinação	8936,01	8493,40	9024,03	-	
	Intercepto	-13688,02	-16320,31	-5018,10	-	5913,77
	LOD	2,18	2,30	2,16	2,21	

Para a HDCL o LOD encontrado foi de 0,89 mgL⁻¹ e para a LOR foi de 2,21 mgL⁻¹.

5.3.4. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Com base nas 3 curvas obtidas anteriormente (feitas com quadruplicatas), os dados utilizados no cálculo são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados para cálculo de LOQ.

		1	2	3	média(mgL ⁻¹)	desv.pad
HDCL	Inclinação	47005,72	47941,28	47795,92	-	
	Intercepto	7559,62	-18064,38	-4576,24	-	12817,95
	LOQ	2,73	2,67	2,68	2,69	
LOR	Inclinação	8936,01	8493,40	9024,03	-	
	Intercepto	-13688,02	-16320,31	-5018,10	-	5913,77
	LOQ	6,62	6,96	6,55	6,71	

O valor calculado o LOQ foi de 2,69 mgL⁻¹ para HDCL e de 6,71 mgL⁻¹ para a LOR.

5.3.5. PRECISÃO

5.3.5.1. REPETIBILIDADE

Os resultados obtidos são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 19 - Análise de dados para se determinar a DPR.

	HDCL		LOR	
	Área (u.a)	qtd. Comp (mg)	Área (u.a)	qtd. Comp (mg)
	268278	11,95	210751	53,47
	260169	11,61	198965	50,69
	273016	12,14	188632	48,26
	295365	13,08	189453	48,45
	285119	12,65	185449	47,51
	286782	12,72	184333	47,25
média	278121,50	12,36	192930,50	49,27
desv. Pad	13164,80	0,55	10143,43	2,39
teste-t	-	0,59	-	0,68
DPR	-	4,44	-	4,85

Como pode ser visto na Tabela 19, os valores encontrados estão adequados uma vez que os DPR estão abaixo de 5% e o teste-t calculado foi igual a 0,59 para o HDCL e 0,68 para a LOR, indicando que não existe evidência de discrepância entre o valor encontrado e o valor apresentado no rótulo do medicamento.

5.3.5.2. PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Os resultados são apresentados abaixo.

Tabela 20 - Quantidade calculada de analitos nos comprimidos.

	HDCL			LOR		
	qtd. Comp (mg)			qtd. Comp (mg)		
	dia 1	dia 2	dia 3	dia 1	dia 2	dia 3
	11,95	10,70	11,94	53,47	48,26	53,48
	11,61	12,14	10,80	50,69	45,94	48,46
	12,14	10,76	9,82	48,26	47,52	44,64
	13,08	13,08	10,58	48,45	46,56	46,86
	12,65	10,78	9,54	47,51	47,22	43,20
	12,72	10,44	11,60	47,25	46,60	50,70
	-	9,96	10,44	-	41,76	46,08
	-	8,92	10,70	-	38,94	45,20
	-	10,78	12,72	-	47,24	56,76
média	12,36	10,84	10,90	49,27	45,56	48,38
desv. Pad	0,55	1,19	1,02	2,39	3,11	4,47
teste-t	-	3,60	4,04	-	3,38	0,57
DPR	4,44	10,99	9,32	4,85	6,82	9,25

Os valores da precisão intermediária tanto para a HDCL quanto para a LOR apresentam valores muito acima do limite aceitável (5%), mostrando assim que a análise deve ser feita em um único dia, não sendo possível armazenar para posterior análise. Provavelmente deve acontecer a degradação dos compostos durante a armazenagem em solução, explicando assim a grande variação observada.

5.3.6. EXATIDÃO

Os resultados são mostrados na Figura 21 e na Tabela 21 abaixo.

Figura 21 - Cromatogramas de ensaio de recuperação. (a)50%(preto), (b)100% (vermelho) e (c)150% (azul)

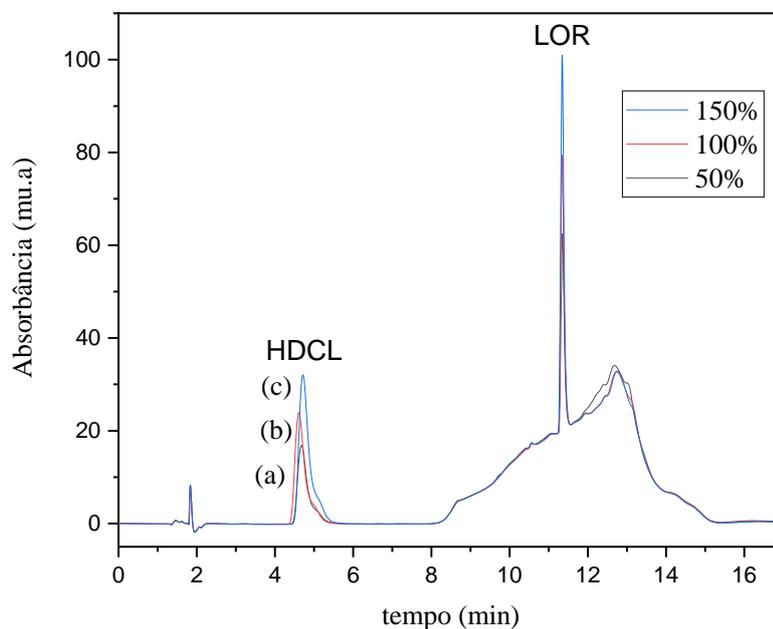


Tabela 21 - Recuperação da HDCL e LOR.

Adição	HDCL			LOR		
	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade encontrada (mg)	Recuperação (%)	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade encontrada (mg)	Recuperação (%)
50%	3,13	3,19	102,36	12,50	13,25	106,04
100%	6,25	6,46	103,43	25,00	26,16	104,67
150%	9,38	9,39	100,15	37,50	38,02	101,40
Média	-	-	101,98	-	-	104,04
Desv.pad	-	-	1,67	-	-	2,38
DPR	-	-	1,64	-	-	2,29

Os valores de recuperação variaram de 100,15% a 103,43%, com um valor médio de $(101,98 \pm 1,64)$ %, para a HDCL e de 101,40% a 106,04%, com um valor médio de $(104,04 \pm 2,29)$ %, para a LOR. Os valores estão adequados, portanto indicam uma boa exatidão do método.

5.3.7. ROBUSTEZ

Os resultados são apresentados abaixo.

5.3.7.1. TESTANDO DUAS COLUNAS DIFERENTES

As análises foram feitas em duas colunas distintas com características similares, sendo diferenciadas apenas pela porosidade, sendo elas: uma Coluna cromatográfica empacotada, phenomenex®, 120A, 5m μ , 4,6 mm de diâmetro, 150 mm, C18 e uma Coluna cromatográfica empacotada, ACE®, 100A, 5m μ , 4,6 mm de diâmetro, 150 mm, C18, nas condições apresentadas na Tabela 3 (condição otimizada), e os resultados são apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Cromatogramas obtidos com diferentes colunas cromatográficas. (a) Coluna 1 (linha contínua), (b) Coluna 2 (linha tracejada).

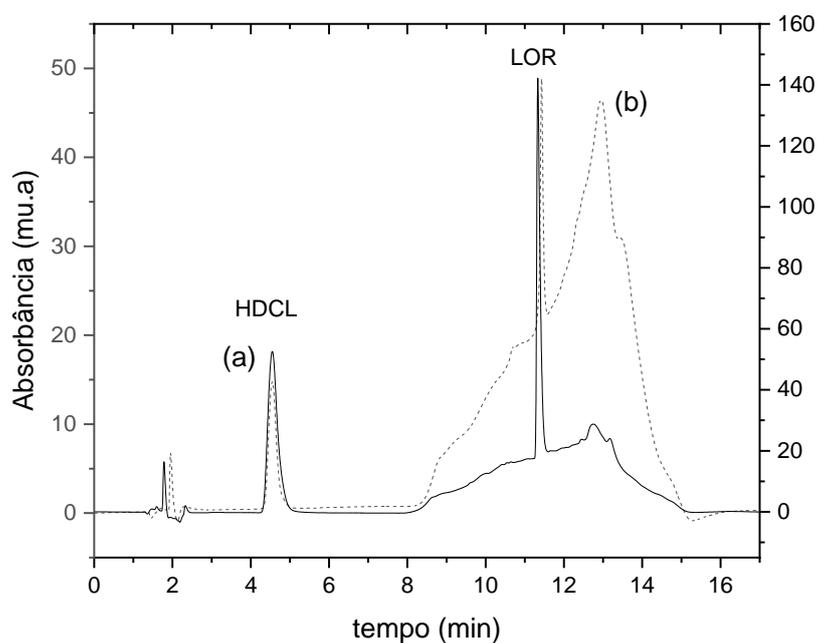


Tabela 22 - Dados obtidos a partir do cromatograma da Figura 22.

		Área média	TR	FC	k	R	Vm
Coluna 2	HDCL	231001	4,58	1,35	1,342	26,176	1,96
	LOR	179237,3	11,43	0,93	4,845		

Ao se comparar os dados mostrados na Tabela 13 (coluna 1) e na Tabela 22 (coluna 2), pode se perceber que houve uma melhora no FC do HDCL e uma diminuição no valor do FC da LOR, passando de um *tailing* para um *fronting*. Entretanto, as áreas dos picos relacionadas a cada composto apresentam valores parecidos, e, para se decidir se o método é robusto ou não, é necessário saber se há variações significantes do ponto de vista estatístico e, nesse intuito, através do teste-t de student, é possível obter essa resposta, mas é necessário primeiramente escolher um parâmetro para ser testado.

Um bom parâmetro de comparação é a área do pico, pois está relacionada diretamente com a concentração do analito e por isso foi escolhida. Com a Equação 9, o teste-t foi calculado com os valores dados na Tabela 23

Tabela 23 - Dados obtidos com a coluna 1 e coluna 2.

	Coluna 1		Coluna 2	
	HDCL	LOR	HDCL	LOR
Área média	224498,3	178661,3	231001	179237,3
desv.pad	1402,49	11123,91	19959,71	29938,91
teste-t	0,46		0,03	

Nesse caso a média das áreas obtidas com a coluna 1 serão o valor de referência e a médias das áreas da coluna 2 serão as testadas. Como se pode observar na Tabela 23, os valores de t-calculado tanto para a HDCL, quanto para a LOR são menores que o t-tabelado de 4,303, indicando assim que os valores são equivalentes. A partir disso se conclui que o método é robusto quanto a utilização de colunas diferentes com características similares.

5.3.7.2. VARIAÇÃO DO pH DA AMOSTRA

O pH da amostra foi variado em $\pm 10\%$ em comparação ao pH que a análise é feita, portanto as análises foram feitas em pH 2,25, pH 2,50 e pH 2,75. Os resultados são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Cromatogramas das corridas em diferentes valores de pH da amostra. (a) 2,25 (em preto), (b) 2,50 (em vermelho), (c) 2,75 (em azul).

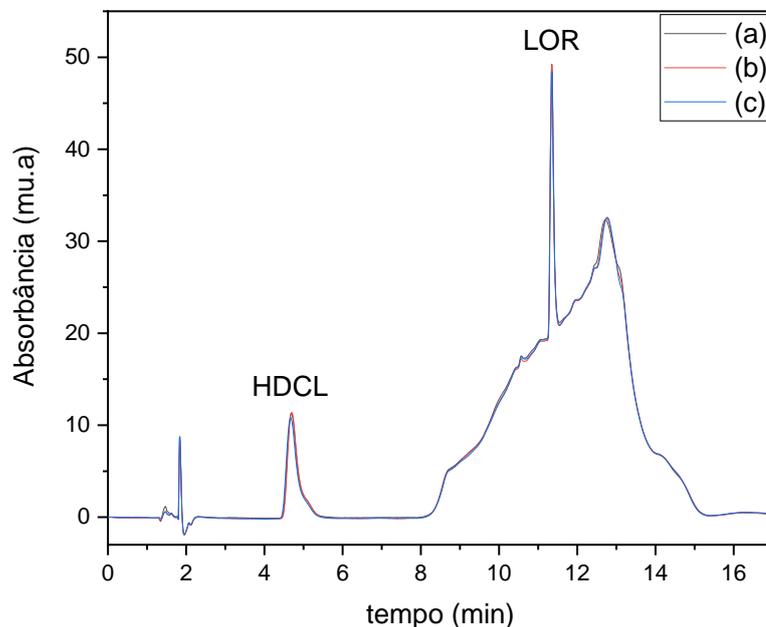


Tabela 24 - Dados obtidos de corridas com pHs diferentes da amostra.

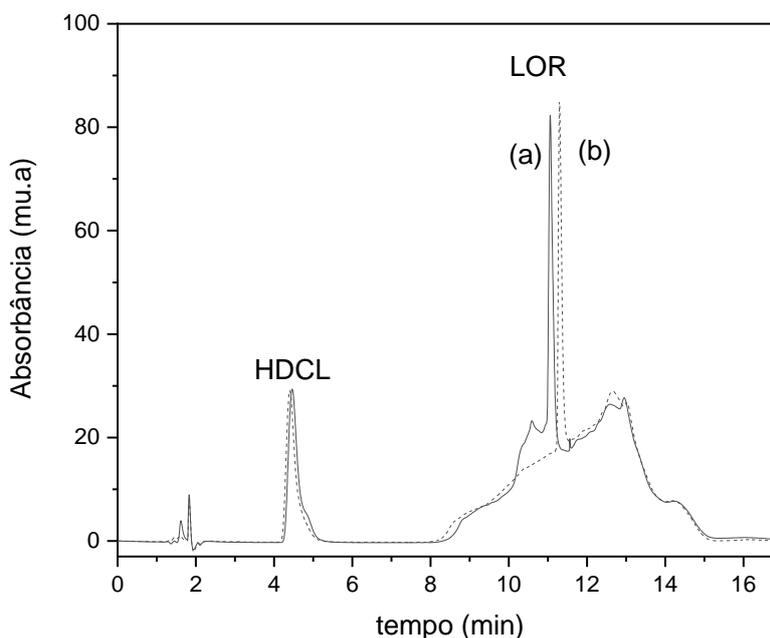
	pH	média	desv.pad	Tempo de retenção (min)	k	FC	Resolução	Vm	test-t
HDCL	2,25	228445	1303	4,69	1,55	1,90	21,14	1,84	1,81
LOR		173007	1396	11,35	5,18	1,30			3,28
HDCL	2,50	226778	23512	4,70	1,55	1,89	21,23	1,84	-
LOR		176246	5164	11,35	5,16	1,35			-
HDCL	2,75	224498	1402	4,67	1,55	1,89	21,13	1,84	2,30
LOR		178661	11123	11,35	5,19	1,31			0,31

Como pode ser observado na Figura 25, apesar de apresentar uma pequena variação na área do pico, o TR, o k, o FC e a resolução permaneceram praticamente inalterados. E a partir do valor t-calculado, que é menor que 4,303 para todos os casos testados (considerando 2,5 o pH otimizado), o método se mostrou robusto à variação do pH da amostra.

5.3.7.3. VARIAÇÃO DO pH DA FASE MÓVEL

Preparou-se a fase móvel com tampão pH = 6,5 ligeiramente menor em comparação com pH = 7,0, que é o valor utilizado no desenvolvimento do método para verificar se haveria alguma alteração no método. Os resultados são mostrados na Figura 24.

Figura 24 - Corrida com fase móvel em diferentes pHs. (a) 6,5 (linha contínua), (b) 7,0 (linha tracejada).



Os parâmetros cromatográficos calculados a partir das corridas com pHs diferentes são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25 - Dados obtidos através das corridas mostradas na Figura 24 - Corrida com fase móvel em diferentes pHs. (a) 6,5 (linha contínua), (b) 7,0 (linha tracejada)

	pH	Média	desv.pad	Tempo de retenção (min)	k	FC	Resolução	Vm	test-t
HDCL	6,5	589011	67017	4,52	1,55	1,90	23,14	1,83	0,99
LOR		423110	31444	11,10	5,18	1,30			0,19
HDCL	7,00	542324	26994	4,71	1,55	1,89	21,23	1,84	-
LOR		418804	19432	11,32	5,16	1,35			-

Houve uma pequena variação no tempo de retenção dos analitos, porém o t-calculado para as áreas mostra que o método é robusto em relação à variação do pH, uma vez que t-calculado é menor do 4,303 e não existe evidencia de diferença significativa ao 95% de confiança.

5.3.7.4. VAZÃO DA FASE MÓVEL

A vazão foi variada em $\pm 10\%$ em relação à vazão utilizada no método, testando as vazões de 0,90 e 1,10 mLmin⁻¹ e os resultados são mostrados na Figura 25.

Figura 25 - Cromatogramas obtidos com vazões diferentes. (a) 0,90 mLmin⁻¹ (linha preta), (b) 1,00 mLmin⁻¹ (linha vermelha), (c) 1,10 mLmin⁻¹ (linha azul).

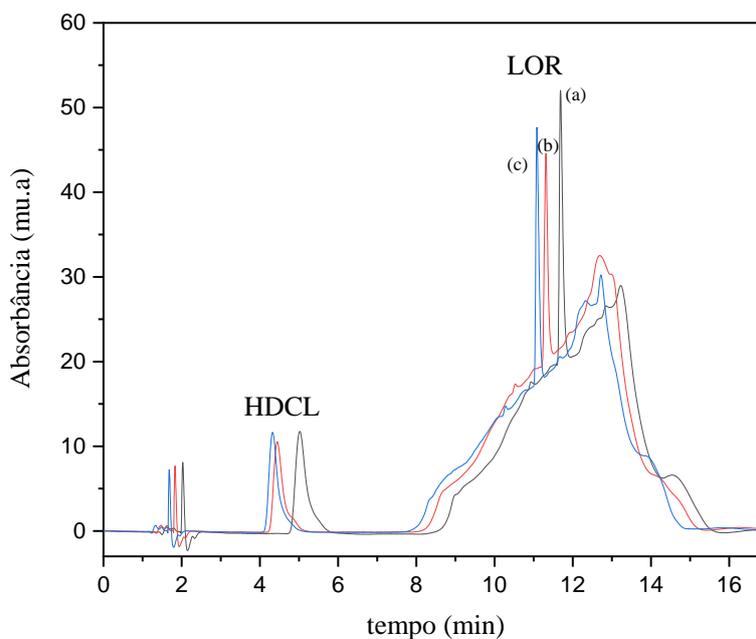


Tabela 26 - Dados obtidos com a variação da vazão.

Vazão (mLmin ⁻¹)	média	desv.pad	Tempo de retenção (min)	k	FC	Resolução	Vm	teste-t
HDCL	0,90	255569	5,02	1,55	1,93	20,31	2,03	2,62
LOR		195107	11,69	4,76	1,76			1,49
HDCL	1,00	226778	4,70	1,55	1,89	21,23	1,84	-
LOR		176246	11,35	5,16	1,35			-
HDCL	1,10	209081	4,28	1,55	1,95	23,91	1,68	2,80
LOR		163953	11,09	5,60	1,60			1,54

A partir da Tabela 26 - Dados obtidos com a variação da vazão., pode ser visto que houve uma variação pequena em alguns dos parâmetros analisados, algo esperado pois, quanto maior a vazão, mais rápido o analito irá eluir, como verificado através da diminuição do TR, sendo o contrário também verdadeiro. Esse efeito também é observado no V_m .

O parâmetro de k para o HDCL permaneceu inalterado devido à variação simultânea do TR e V_m . Já para o LOR a variação foi mais significativa, no caso da vazão $0,90 \text{ mLmin}^{-1}$, provocou uma diminuição do k , provavelmente pelo atraso sofrido no V_m , enquanto na vazão de $1,10 \text{ mLmin}^{-1}$ houve um aumento do k , nesse caso provavelmente devido a antecipação do V_m .

De forma similar é possível fazer relação entre a resolução considerando o TR do HDCL e o TR da LOR. O aumento da TR da HDCL diminui a resolução e o a diminuição do TR desse mesmo analito causa o aumento resolução.

Ao se analisar o FC, nota-se que para o HDCL houve uma pequena variação, já em relação à LOR, na menor vazão há um aumento desse parâmetro, que já era esperado uma vez que a diminuição da vazão acaba aumentando o tempo de interação entre o analito e a coluna fazendo com que haja uma maior dispersão do analito durante a sua eluição. No caso da vazão maior, era esperado que houvesse uma diminuição ou um valor próximo ao encontrado quando se utiliza a vazão de referência ($1,00 \text{ mLmin}^{-1}$), porém foi observado novamente um aumento do FC, em menor grau que o encontrado na vazão menor. Provavelmente o fato de se aumentar a vazão em si deve estar aumentando a dispersão do analito.

Apesar de haver alteração da área dos picos cromatográficos, a partir do valor t -calculado (2,62 e 2,8 para o HDCL e 1,49 e 1,54 para LOR), que é menor que 4,303 para todos os casos testados, o método se mostrou robusto à variação da vazão da corrida cromatográfica.

5.3.7.5. TEMPERATURA DE ANÁLISE

A temperatura do forno da CLAE foi variada em $\pm 5^\circ \text{ C}$ em relação à temperatura otimizada de 35° C (30° C e 40° C), para verificar se o método é robusto em relação a esse parâmetro. Os resultados são apresentados na Figura 26.

Figura 26 - Cromatogramas em temperaturas diferentes. (a) 30°C (linha preta), (b) 35°C (linha vermelha) e (c) 40°C (linha azul).

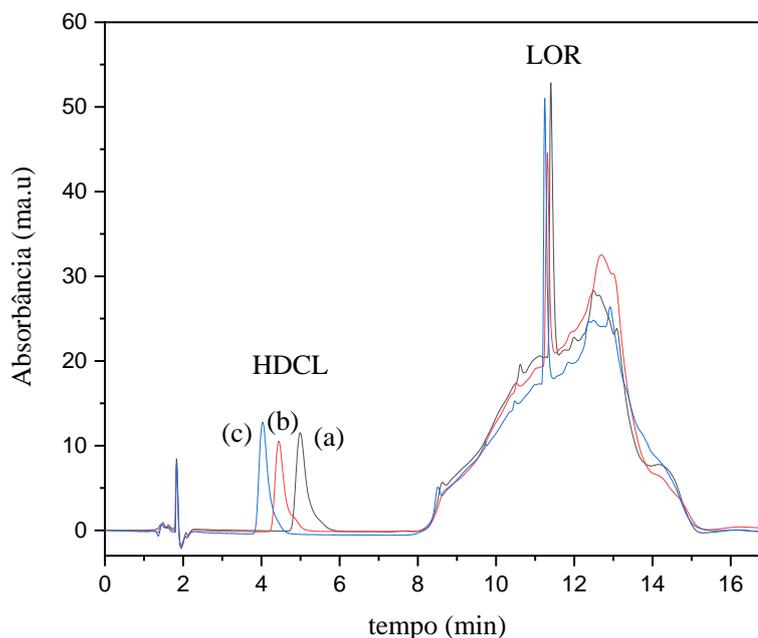


Tabela 27 - Dados das corridas em temperaturas diferentes.

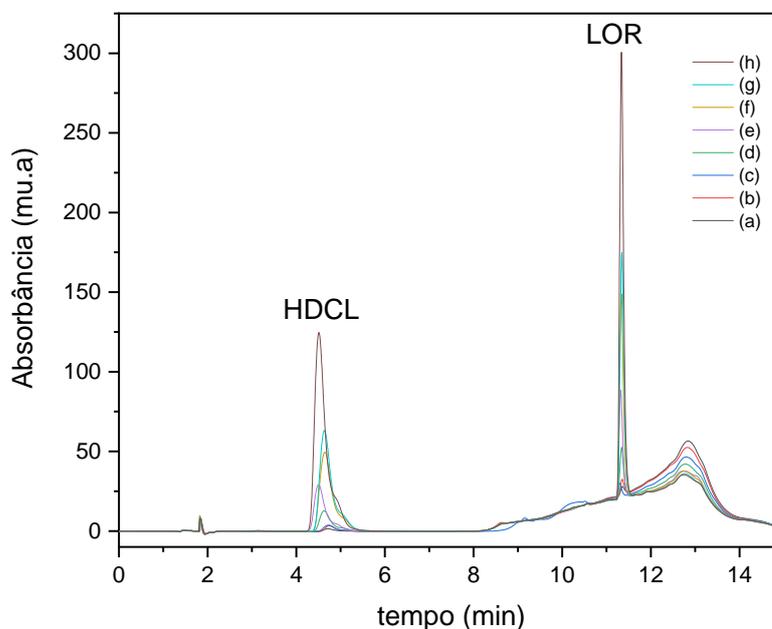
Temperatura (°C)	Média	desv.pad	Tempo de retenção (min)	k	FC	Resolução	Vm	teste-t
HDCL	231661	9568	5,22	1,82	1,62	19,55	1,85	0,72
LOR	177431	14551	11,41	5,18	1,68			0,12
HDCL	226778	23512	4,70	1,55	1,89	21,23	1,84	-
LOR	176246	5164	11,35	5,16	1,35			-
HDCL	227038	15924	4,03	1,20	1,85	25,71	1,84	0,02
LOR	177073	16375	11,25	5,13	1,66			0,07

De forma geral o parâmetro que mais foi afetado pela temperatura foi o TR do HDCL, o que acabou influenciando em seu k e na resolução do método. Porém ambos valores ainda estão satisfatórios. E a partir do valor t-calculado para as áreas, que é menor que 4,303 para todos os casos testados, o método se mostrou robusto à variação da temperatura da coluna cromatográfica.

5.3.8. CURVA ANALÍTICA

Os cromatogramas produzidos pelas concentrações estão mostrados na Figura 27.

Figura 27 – Cromatogramas produzidos com os padrões. (a) HDCL 0,50 mgL⁻¹ e LOR 2,0 mgL⁻¹, (b) HDCL 1,25 mgL⁻¹ e LOR 5,0 mgL⁻¹, (c) HDCL 2,50 mgL⁻¹ e LOR 10,0 mgL⁻¹, (d) HDCL 6,25 mgL⁻¹ e LOR 25,0 mgL⁻¹, (e) HDCL 12,50 mgL⁻¹ e LOR 50,0 mgL⁻¹, (f) HDCL 18,75 mgL⁻¹ e LOR 75,0 mgL⁻¹, (g) HDCL 25,0 mgL⁻¹ e LOR 100,0 mgL⁻¹, (h) HDCL 50,0 mgL⁻¹ e LOR 200,0 mgL⁻¹.



A curva analítica, sinal analítico contra concentração, é apresentada na Figura 27. Foi observado que a partir de da concentração 200 mgL⁻¹ para a HDCL e 600 mgL⁻¹ para a LOR, a curva começava a se afastar da linearidade, a curva analítica de HDCL com todos os pontos apresenta um $R^2 = 0,9975$ e a curva analítica da LOR com todos os pontos apresenta $R^2 = 0,9898$. Para a construção das curvas foram utilizadas as concentrações de 0,5 a 50 mgL⁻¹ de HDCL e de 2 a 200 mgL⁻¹ para a LOR, pois é interessante usar uma faixa de concentração compatível com a esperada da amostra. Cada padrão foi injetado 4 vezes.

Tabela 28- Áreas dos padrões de HDCL e LOR.

HDCL			LOR		
Conc. (mgL ⁻¹)	Média	desv. Pad	Conc. (mgL ⁻¹)	Média	desv. Pad
0,50	19030	1782	2,00	10515	1169
1,25	51194	873	5,00	33972	976
2,50	106148	2174	10,00	74276	311
6,25	317704	1705	25,0	236755	1260
12,5	592354	3515	50,0	441494	1233
18,8	871802	9510	75,0	649187	5193
25,0	1250000	51883	100	923408	26648
50,0	2290000	11656	200	1690000	8734

Figura 28 - Curva analítica de HDCL construída a partir da Tabela 28.

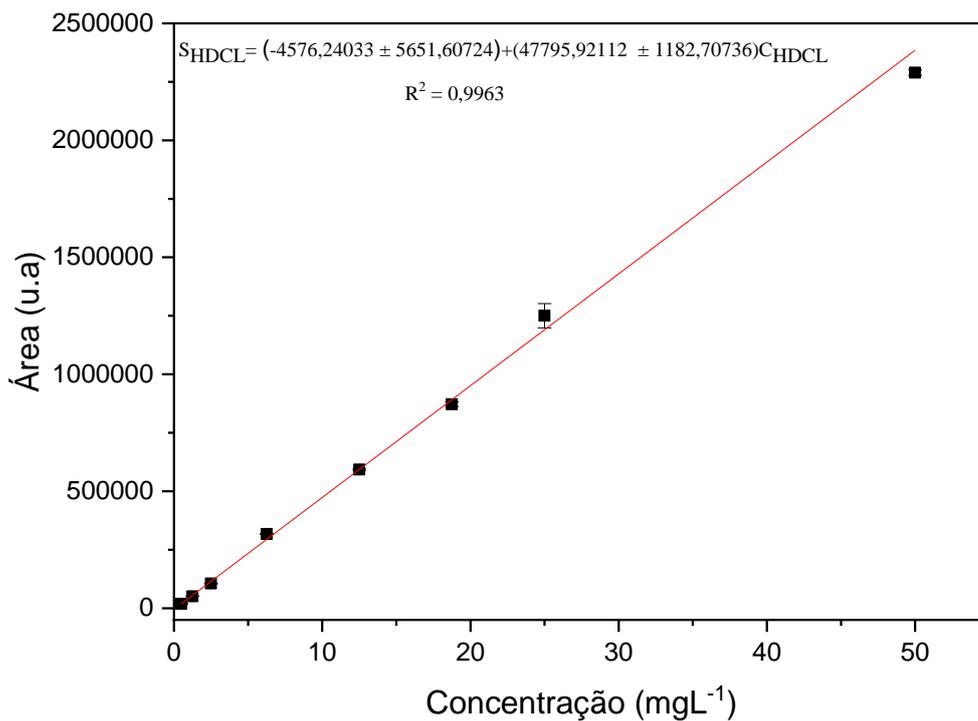
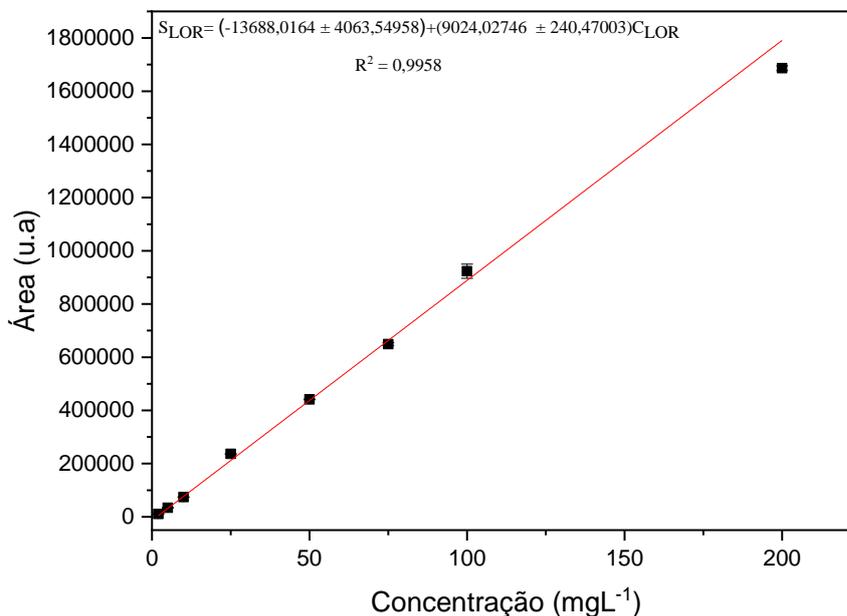


Figura 29 - Curva analítica de LOR construída com dados da Tabela 28



Através da curva analítica, produzidas a partir dos dados da Tabela 28, foram encontradas as seguintes equações de reta:

Para o HDCL,

$$\text{Equação 12 - } S_{HDCL} = (-0,46 + 4,8) \times 10^4 C_{HDCL}; R^2 = 0,9963$$

e para a LOR,

$$\text{Equação 13 - } S_{LOR} = (-1,4 + 0,90) \times 10^4 C_{LOR}; R^2 = 0,9958$$

5.3.8.1.DETERMINAÇÃO DE HDCL E LOR EM COMPRIMIDOS

Após fazer o cálculo para descobrir a quantidade dos analitos presentes nos comprimidos, foi obtido os resultados mostrados na Tabela 29:

Tabela 29 - Quantidade dos analitos nos comprimidos (determinação em triplicata).

	Média (mg)	Desv.Pad
HDCL	12,71	2,14
LOR	51,84	3,67

Usando os valores de referência como 12,5 mg para o HDCL e 50 mg para a LOR foram obtidos:

$$t_{\text{HDCL}} = 0,07 \text{ e } t_{\text{LOR}} = 0,34$$

Logo é possível concluir que os valores calculados não apresentam discrepância em relação ao valor esperado, uma vez que em ambos os casos os valores de t são menores do que 4,303.

6. CONCLUSÕES

Ficou demonstrado que é possível fazer a substituição do solvente ACN pelo EtOH na determinação simultânea de HDCL e LOR na coluna empacotada.

No desenvolvimento e otimização do método foi constatado que há um pequeno aumento no valor do FC dos analitos, mas os valores obtidos são aceitáveis segundo a farmacopeia brasileira e a Farmacopeia USP.

A validação do método foi realizada obtendo valores aceitáveis para os diversos parâmetros testados e o método se mostrou preciso, exato e robusto em relação ao pH da amostra, à temperatura da coluna, à vazão, à coluna, e com pequena variação no tempo de retenção dos analitos quando a vazão do solvente e a temperatura são alterados.

Na determinação de HDCL e LOR nos comprimidos não foi encontrada diferença significativa entre as dosagens dos analitos nas amostras dos fármacos e os declarados pelo fabricante.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma vez que não existe na farmacopeia brasileira uma metodologia oficial que faça a determinação simultânea de LOR em associação com a HDCL em medicamentos, o presente método se apresenta como uma alternativa viável para a determinação desses compostos em comprimidos.

Realizar a difusão do trabalho desenvolvido em eventos nacionais e internacionais.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AAYUSHI, P.; SHAH, K. Development and validation of stability indicating thin-layer chromatography methods for simultaneous estimation of Bisoprolol Fumarate and Hydrochlorothiazide. **SEPARATION SCIENCE PLUS**, v. 6, n. 3, p. 2200122, 28 mar. 2023.

ABD EL-HAY, S. S. et al. Cost-effective, green HPLC determination of losartan, valsartan and their nitrosodiethylamine impurity: Application to pharmaceutical dosage forms. **Royal Society Open Science**, v. 9, n. 6, 2022.

AGLIOA, T. C. et al. N-NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS: UM PROBLEMA ATUAL, UMA REALIDADE ANTIGA. **Química Nova**, v. 45, n. 8, p. 959–976, 12 abr. 2022.

ANVISA. **Medida Provisória nº 2190-34**. Brasil, 23 ago. 2001.

ANVISA. **RDC Nº 60**. AnvisaBrasília, 10 out. 2014.

ANVISA. **RDC Nº 166**. ANVISABrasília, 2017. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/>

ANVISA. **Registro de medicamentos genéricos faz 18 anos**. Ascon/Anvisa, , 2018.

ANVISA. **RDC Nº 301**. Anvisa, , 2019.

BIBLIOMED. **Losartan chemical name**. Disponível em: <[BINH, T. T. et al. Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Losartan Potassium in Pharmaceutical Product by UV-Vis Spectrophotometric Method with Kalman Filter Algorithm. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2021, 2021.](https://www.bibliomed.com.br/lib/showdoc.cfm?LibDocID=16358&titulo=hidroclorotiazida.html#:~:text=Caracter%C3%ADsticas%20do%20medicamento%20e%20apresenta%C3%A7%C3%B5es,molecular%20%C3%A9%3A%20C7H8CIN3O4S2%20%3D297.7.>>. Acesso em: 18 mar. 2023.</p></div><div data-bbox=)

BRASIL. **Lei nº 9.787**. , 10 fev. 1999.

BRASIL. **Decreto n 5.090**. , 20 maio 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Portaria nº 739/2018**, de 28 de março de 2018. Diário oficial da União, Poder Executivo, Brasília. Acessado em:<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2018/prt0739_28_03_2018.html> em 19/05/2023 às 08:32.

CARDOSO, V. M. **Estudo da absorção do vapor de etanol, carregado por gás carbônico, em diferentes solventes**. São Carlos, SP: UFSCar, 2015.

CONCIL OF EXPERTS AND ITS EXPERTS COMMITTEES. **The United States Pharmacopeia**. Baltimore: United Book press, 2018. v. 1

DUARTE, M. et al. No governo Bolsonaro, verba do farmácia popular cai a um terço. **O Globo**, 16 set. 2022.

EMS/SA. **Losartana Potássica**. bulaEMS S/A, , [s.d.].

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>.

FERRARI, F. COVID-19: Updated data and its relation to the cardiovascular system. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 5, p. 823–826, 1 maio 2020.

GOMES, R. N. et al. Desenvolvimento da química verde no cenário industrial brasileiro. **Revista Fitos**, v. 12, n. E, p. 80, 20 set. 2018.

HAMMOOD, M. K.; KAREEM, F. T. Chemical Methodologies Determination of the Quantity of Losartan Active Ingredient in the Medication Formulations via Turbidimetric-Flow Injection Technique. / **Chem. Methodol**, v. 2022, n. 1, p. 41–51, 2022.

HASHEM, H.; IBRAHIM, A. E.; ELHENAWEE, M. Simultaneous determination of the antihypertensives hydrochlorothiazide, losartan potassium, irbesartan and valsartan in bulk powders and pharmaceutical preparations by high performance liquid chromatography. **Main Group Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 335–346, 26 nov. 2016.

HEMDAN, A.; AL-TANNAK, N. F.; MOHAMED, E. H. Development of a multivariate model with desirability-based optimization for determination of atenolol and hydrochlorothiazide by eco-friendly HPLC method with fluorescence detection. **Journal of Separation Science**, v. 45, n. 4, p. 824–831, 1 fev. 2022.

IBRAHIM, A. E.; ELMANSI, H.; BELAL, F. Solvent-free mixed micellar mobile phases: An advanced green chemistry approach for reversed-phase HPLC determination of some antihypertensive drugs. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 16, p. 3224–3232, 23 ago. 2020.

JADHAO, S. et al. Herb-Drug Interaction of Quercetin on the Pharmacokinetics of Losartan in Rats: A High-Performance Thin-Layer Chromatography Study. **JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC**, v. 32, n. 5, p. 401–409, out. 2019.

JARDIM, T. V. et al. Blood pressure reference values for Brazilian adolescents: data from the Study of Cardiovascular Risk in Adolescents (ERICA Study). **Jornal de Pediatria**, v. 96, n. 2, p. 168–176, 1 mar. 2020.

LEITÃO, V. B. G. et al. Prevalence of use and sources of antihypertensive medicine in brazil: An analysis of the VIGITEL telephone survey. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, 2020.

MARQUES, A. P. et al. **Factors associated with arterial hypertension: A systematic review.** *Ciencia e Saude Coletiva* Associação Brasileira de Pós - Graduação em Saúde Coletiva, , 1 jun. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Farmácia Popular do Brasil : Manual de Informações às Unidades Credenciadas : Sistema de Co-Pagamento.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/bvs>>.

MONIR, H. H. et al. Chromatographic Methods for Determination of Finasteride and Tamsulosin Hydrochloride and in Presence of Finasteride Degradation Product. *Acta Chromatographica*, v. 32, n. 2, p. 95–101, 1 jun. 2020.

MONTEIL, H. et al. Efficient removal of diuretic hydrochlorothiazide from water by electro-Fenton process using BDD anode: a kinetic and degradation pathway study. *Environmental Chemistry*, v. 16, n. 8, p. 613, 2019.

NILSON, E. A. F. et al. **Costs attributable to obesity, hypertension, and diabetes in the Unified Health System, Brazil, 2018.** *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health* Pan American Health Organization, , 2020.

PACHECO, S. et al. History of Liquid Chromatography. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 4, p. 1225–1271, 2015.

PRAUXIS, B. **Cresce o número de brasileiros com hipertensão e diabetes, revela IBGE.** BrasíliaCorreio Brasileiro, 18 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.correiobraziliense.com.br/brasil/2020/11/4889720-cresce-o-numero-de-brasileiros-com-hipertensao-e-diabetes-revela-ibge.html>>. Acesso em: 15 mar. 2022

PUBCHEM, 2023, Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Losartan#section=Dissociation-Constants>> A acesso em 20/06/2023.

PUBCHEM, 2023. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Losartan#section=Dissociation-Constants>> acesso em 20/06/2023.

QUENTAL, C. et al. **Medicamentos genéricos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional** *Generic drugs in Brazil: impacts of public policies upon the national industry.* [s.l: s.n.].

RAO, S.; SRINIVAS, K. RP-HPLC method for the determination of losartan potassium and ramipril in combined dosage form. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 72, n. 1, p. 108, 2010.

REZAEI, R. Synthesis of Lanthanum-doped ZnO Nanoflowers: Supported on Graphite Screen Printed Electrode for Selective and Sensitive Detection of Hydrochlorothiazide. **International Journal of Electrochemical Science**, p. 2038–2048, fev. 2019.

SAUDE.GOV. **Sobre o programa farmácia popular.**

SHAFQAQ, S. et al. Quantitative analysis of solid dosage forms of Losartan potassium by Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 272, p. 120996, maio 2022.

SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: Efficiency in reaction design. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 4, p. 1437–1451, 30 jan. 2012.

SILVA, E. F. et al. Batch injection analysis with electrochemical detection for the simultaneous determination of the diuretics furosemide and hydrochlorothiazide in synthetic urine and pharmaceutical samples. **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105027, set. 2020a.

SILVA, L. P. et al. Carbon black-chitosan film-based electrochemical sensor for losartan. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1827–1834, 1 ago. 2020b.

SILVESTRI, C. et al. Green chemistry contribution towards more equitable global sustainability and greater circular economy: A systematic literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 294, 20 abr. 2021.

SMERIKAROVA, M.; BOZHANOV, S.; MASLARSKA, V. Analytical Methods for the Determination of Sartans in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluids: A Review. **Current Analytical Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 208–222, 14 nov. 2018.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY Third Edition.** [s.l: s.n.].

WANI, T. U. et al. Formulation and Pharmacokinetic Evaluation of Ethyl Cellulose/HPMC-Based Oral Expandable Sustained Release Dosage of Losartan Potassium. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 5, 1 jul. 2022.

WHITEKER, G. T. **Applications of the 12 Principles of Green Chemistry in the Crop Protection Industry. Organic Process Research and Development**American Chemical Society, 18 out. 2019.

WICHITNITHAD, W. et al. Development of a Sensitive Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Nitrosamines in Losartan Active Pharmaceutical Ingredients. **ACS Omega**, v. 6, n. 16, p. 11048–11058, 27 abr. 2021.

ZHEN LIU, M. H. C. H. X. protective effect of losartan on acute myocardial infarction in rats and its mechanism. **Jounal of Jilin University(medicine edition)**, v. 43, n. 2, p. 78–84, 2021.

DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE
DOUTORADO

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifique e cite devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, (dia) de (mês) de (ano).

07 de junho de 2023

Assinatura do/a discente: Diego Coelho B. dos Santos

Programa: Programa de Pós-graduação em Química - PPGQ

Nome completo: Diego Coelho Barroso dos Santos

Título do Trabalho: Cromatografia líquida de alta eficiência e Química Verde na determinação de Losartana em associação com Hidroclorotiazida em medicamentos.

Nível: Mestrado Doutorado

Orientador/a: 