

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E
BIOANALÍTICOS PARA OS FÁRMACOS ANLODIPINO E
OLMESARTANA MEDOXOMILA, EM DOSE FIXA COMBINADA**

Belo Horizonte – MG

2013

MARIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E
BIOANALÍTICOS PARA OS FÁRMACOS ANLODIPINO E
OLMESARTANA MEDOXOMILA, EM DOSE FIXA COMBINADA**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

Coorientadora: Dra. Isabela da Costa César

Belo Horizonte – MG

2013

A447d Almeida, Mariana de Oliveira.
Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos para os fármacos anlodipino e olmesartana medoxomila, em dose fixa combinada / Mariana de Oliveira Almeida. – 2013.

179 f. : il.

Orientador: Dr. Gerson Antônio Pianetti.

Co-orientadora: Dra. Isabela da Costa César.

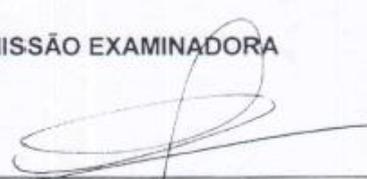
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

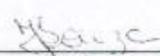
1. Hipertensão - Teses. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. 3. Medicamentos – Teses. 4. Espectrometria de massa – Teses. I. Pianetti, Gerson Antônio. II. César, Isabela da Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

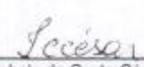
CDD: 615.4

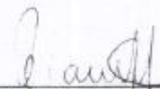
FOLHA DE APROVAÇÃO**MARIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA****"Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalíticos para os fármacos Anlodipino e Olmesartana medoxomila, em dose fixa combinada"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o título de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e dois de fevereiro de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo de Souza Teixeira - ICF - Goiânia

Profa. Dra. Jacqueline de Souza - UFOP

Profa. Dra. Isabela da Costa César - UFMG

Prof. Dr. Gerson Antônio Piahetti - UFMG

Dedico este trabalho ao meu pai, pelo amor incondicional, e ao Franklin, por me ajudar nos momentos mais difíceis e por estar sempre ao meu lado.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por iluminar minha vida e guiar meus passos sempre, dando-me força, coragem, paciência, esperança e perseverança, em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti, pela orientação, confiança, compreensão, disponibilidade e contribuição em minha vida profissional.

À Dra. Isabela da Costa César, pela coorientação e imensurável ajuda na elaboração deste trabalho. Pela atenção dedicada e amizade.

Ao meu amado pai, pelos ensinamentos, por sempre acreditar em mim e me apoiar.

A minha família, pelo amor, incentivo, confiança e por suportar minha ausência durante vários anos de estudo em Belo Horizonte.

Ao Franklin, meu amor, por encher minha vida de alegria. Pela paciência infinita e por me dar força nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e do CEDAFAR, em especial Taízia, Vinicius, Tiago, Laura, Flávia, Ricardo, Fernando, Paula Enéas, Paula Chellini, Geovani, Léo, Luciano, Juliana, Iara, Edna, pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

As minhas amigas Ana Bárbara, Aline Menezes, Aline Fortunato, Carla Amaral e Carla Elvira, por tornar meus dias na Faculdade de Farmácia mais felizes.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia, em especial a Adriana Godin, pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

À aluna de graduação Priscila, pela ajuda em diversas etapas deste trabalho.

Aos Professores da Faculdade de Farmácia, em especial à Prof. Dra. Cristina Duarte e ao Prof. Dr. Christian Fernandes, pelos ensinamentos e disponibilidade

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia, em especial Eduardo, Batista e Adelaide, pelo auxílio prestado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da realização desta importante etapa da minha vida.

*“É preciso ter sonho sempre. Quem traz na pele essa
marca, possui a estranha mania de ter fé na vida”*

Milton Nascimento

*“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho
é no dicionário”*

Albert Einstein

RESUMO

O tratamento da hipertensão com apenas um fármaco é eficiente, somente, para um terço dos pacientes. Para maximizar a eficácia do tratamento, associam-se fármacos que atuam em diferentes mecanismos fisiopatológicos. A associação de olmesartana medoxomila e besilato de anlodipino, um antagonista do receptor AT₁ de angiotensina II e um bloqueador dos canais de cálcio, respectivamente, em comprimidos de dose fixa combinada é efetiva, segura e bem tolerada. Por ser uma associação nova e que ainda está protegida por patente, há na literatura científica poucos artigos que descreveram métodos analíticos e bioanalíticos para quantificação simultânea desses fármacos. Um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em dose fixa combinada. A análise cromatográfica foi realizada em coluna C₁₈, a fase móvel foi composta de acetonitrila:metanol:triethylamina 0,3% (30:30:40) pH 2,75 com fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL, a detecção foi em λ 238 nm e o tempo de corrida foi 5,5 minutos. Na sequência, o método foi transferido para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) com detecção por ultravioleta com auxílio de fórmulas matemáticas para calcular o novo volume de injeção e novo fluxo da fase móvel, que foram 0,7 µL e 0,613 mL/min., respectivamente. Ajustes na proporção dos solventes da fase móvel foram realizados para melhorar a eficiência do método por CLUE. A fase móvel otimizada foi composta por acetonitrila:metanol:triethylamina 0,3% (26:26:48) pH 2,75. Nessa condição o tempo de corrida foi 1,25 minutos, o que proporcionou uma redução de aproximadamente 77% no tempo de análise e de 86% no consumo de solvente. Após a otimização do método por CLUE, o método foi validado. Os métodos por CLAE e CLUE demonstraram ser estatisticamente equivalentes após a análise de três lotes do medicamento BenicarAnlo®. Assim, ambos os métodos podem ser utilizados para proceder ao controle de qualidade de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada. Um método bioanalítico também foi desenvolvido e validado por CLAE com detecção por espectrometria de massas sequencial e ionização por *electrospray* no modo positivo para quantificar anlodipino e olmesartana em plasma humano. Felodipino e valsartana foram empregados como padrões internos de anlodipino e olmesartana, respectivamente. O preparo das amostras foi feito por meio da técnica de extração líquido-líquido. A análise cromatográfica foi realizada em coluna C₁₈, com fase móvel composta de metanol:ácido fórmico 0,05% (75:25) a 1,0 mL/min. As transições empregadas para anlodipino, olmesartana, felodipino e valsartana foram m/z 409,4 → 237,7, m/z 447,6 → 206,8, m/z 384,7 → 338,2, m/z 436,5 → 291,0, respectivamente. O método bioanalítico foi seletivo, preciso, exato e linear na faixa de 1 a 100 ng/mL para anlodipino e de 3 a 1800 ng/mL para olmesartana. Por isso, poderá ser aplicado em estudos futuros de monitorização terapêutica e de bioequivalência.

Palavras-chave: hipertensão, anlodipino, olmesartana medoxomila, olmesartana, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida de ultra eficiência, espectrometria de massas sequencial.

ABSTRACT

The treatment of hypertension with a single drug is efficient for only one-third of the patients. In order to maximize the efficacy of the treatment, drugs that act in different pathophysiological mechanisms are associated. The combination of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate, an angiotensin II type 1 receptor antagonist and calcium channel blocker, respectively, in fixed dose combination tablets is effective, safe and well tolerated. Because it is a new association that is still protected by a patent, there are few articles in the scientific literature that described analytical and bioanalytical methods for the simultaneous quantification of these drugs. An analytical method by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection was developed and validated for simultaneous quantification of amlodipine and olmesartan medoxomil in fixed dose combination. The chromatographic analysis was performed in a C₁₈ column, mobile phase composed of acetonitrile:methanol:0.3% triethylamine (30:30:40) pH 2.75 and a flow rate of 1.0 mL/min. Injection volume was 10 µL, detection was at λ 238 nm and run time was 5.5 minutes. Then, the analytical method was transferred to ultra performance liquid chromatography (UPLC) with ultraviolet detection using mathematical formulas to calculate the new injection volume and new flow rate of mobile phase, which were 0.7 µL and 0.613 mL/min., respectively. Adjustments in the solvent composition of mobile phase were performed to improve the efficiency of the UPLC method. The optimized mobile phase was composed of acetonitrile:methanol:0.3% triethylamine (26:26:52) pH 2.75. At this condition, the run time was 1.25 minutes, which provided a reduction of approximately 77% in the analysis time and 86% in solvent consumption. After the method optimization by UPLC, the method was validated. The HPLC method showed to be statistically equivalent to the UPLC method after analysis of three batches of the product BenicarAnlo®. Thus, both methods may be used to perform quality control of olmesartan medoxomil and amlodipine in fixed dose combination tablets. A bioanalytical method was also developed and validated by HPLC with tandem mass spectrometry detection and electrospray ionization in the positive mode for quantifying amlodipine and olmesartan in human plasma. Felodipine and valsartan were used as internal standards of amlodipine and olmesartan, respectively. The sample preparation was carried out using the technique of liquid-liquid extraction. The chromatographic analysis was performed in a C₁₈ column, mobile phase composed of methanol:0.05% formic acid (75:25) and a flow rate of 1.0 mL/min. The transitions employed for the quantification of amlodipine, olmesartan, felodipine and valsartan were m/z 409.4 → 237.7, m/z 447.6 → 206.8, m/z 384.7 → 338.2, m/z 436.5 → 291.0, respectively. The bioanalytical method showed to be selective, precise, accurate and linear over the range of 1 to 100 ng/mL for amlodipine and 3 to 1800 ng/mL for olmesartan. Therefore, it may be applied in future studies of therapeutic drug monitoring and bioequivalence.

Key words: hypertension, amlodipine, olmesartan medoxomil, olmesartan, high performance liquid chromatography, ultra performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

1.1	Estrutura química do besilato de anlodipino.....	31
1.2	Representação da hidrólise da olmesartana medoxomila.....	32
1.3	Associações de fármacos utilizadas no tratamento da HAS consideradas sinérgicas e não sinérgicas.....	34

CAPÍTULO 2

2.1	Representação da curva de van Deemter para colunas com partículas de 5 e 2 μm	39
2.2	Regra de decisão do teste estatístico de Durbin-Watson.....	54
2.3	Espectro de absorção na região do ultravioleta das soluções de ANLO e OLMD em fase móvel na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$	69
2.4	Cromatograma obtido para a solução da olmesartana a 60 $\mu\text{g/mL}$ em fase móvel composta por ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 (30:30:40;v/v/v).....	69
2.5	Cromatograma obtido para a solução de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho e nas condições analíticas definidas após o desenvolvimento do método por CLAE.....	70
2.6	Cromatograma obtido após a hidrólise ácida de ANLO e OLMD nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.....	73
2.7	Cromatograma obtido após a hidrólise básica de ANLO nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.....	74
2.8	Cromatograma obtido após a hidrólise básica de OLMD nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.....	74
2.9	Cromatograma obtido após a oxidação de ANLO nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.....	75
2.10	Cromatograma obtido após a oxidação de OLMD nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.....	75
2.11	Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de ANLO obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.....	76
2.12	Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de OLMD obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.....	77
2.13	Cromatograma obtido para o LD de ANLO (0,095 $\mu\text{g/mL}$) por CLAE.....	82
2.14	Cromatograma obtido para o LD de OLMD (0,114 $\mu\text{g/mL}$) por CLAE.....	82
2.15	Cromatograma obtido para o LQ de ANLO (0,318 $\mu\text{g/mL}$) por CLAE.....	83
2.16	Cromatograma obtido para o LQ de OLMD (0,485 $\mu\text{g/mL}$) por CLAE.....	83

/continua.

LISTA DE FIGURAS (continuação)

2.17	Variações das áreas dos picos de ANLO obtidas para avaliação da estabilidade por CLAE.....	84
2.18	Variações das áreas dos picos de OLMD obtidas para avaliação da estabilidade por CLAE.....	84
2.19	Cromatograma obtido para a solução de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho por CLUE antes da otimização, com fase móvel composta por ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 (30:30:40;v/v/v).....	91
2.20	Cromatograma obtido para a solução de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho por CLUE após a otimização, com fase móvel composta por ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 (26:26:48;v/v/v).....	91
2.21	Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de ANLO obtidos durante a avaliação da linearidade por CLUE.....	93
2.22	Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de OLMD obtidos durante a avaliação da linearidade por CLUE.....	94
2.23	Cromatograma obtido para o LD de ANLO (0,085 µg/mL) por CLUE.....	99
2.24	Cromatograma obtido para o LD de OLMD (0,065 µg/mL) por CLUE.....	99
2.25	Cromatograma obtido para o LQ de ANLO (0,290 µg/mL) por CLUE.....	100
2.26	Cromatograma obtido para o LQ de OLMD (0,400 µg/mL) por CLUE.....	100
2.27	Variações das áreas dos picos de ANLO obtidas para avaliação da estabilidade por CLUE.....	101
2.28	Variações das áreas dos picos de OLMD obtidas para avaliação da estabilidade por CLUE.....	101

CAPÍTULO 3

3.1	Ilustração de um analisador triplo quadrupolo operando no modo de monitoramento seletivo de reações.....	110
3.2	Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de <i>electrospray</i>	111
3.3	Estruturas químicas de ANLO e FELO.....	134
3.4	Estruturas químicas de OLM e VALS.....	134
3.5	Espectros ESI(+) de anlodipino. (A) espectro e estrutura do íon precursor <i>m/z</i> 409,4; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal <i>m/z</i> 237,7.....	138
3.6	Espectros ESI(+) de olmesartana. (A) espectro e estrutura do íon precursor <i>m/z</i> 447,6; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal <i>m/z</i> 206,8.....	139

/continua.

LISTA DE FIGURAS (conclusão)

3.7	Espectros ESI(+) de felodipino.(A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 384,7; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal m/z 338,2.....	140
3.8	Espectros ESI(+) de valsartana.(A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 436,5; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal m/z 291,0.....	141
3.9	Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM para um CQM extraído e analisado nas condições definidas para o método bioanalítico.....	147
3.10	Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM para amostra de plasma branco normal durante a avaliação da seletividade do método bioanalítico.....	148
3.11	Gráfico de resíduo da regressão e curva analítica obtidos para ANLO na corrida analítica 01, faixa linear 1 a 100 ng/mL.....	152
3.12	Gráfico de resíduo da regressão e curva analítica obtidos para OLM na corrida analítica 01, faixa linear 3 a 1800 ng/mL.....	152
3.13	Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM para um LIQ extraído e analisado nas condições definidas para o método bioanalítico.....	156

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

1.1	Classificação da pressão arterial em adultos.....	29
-----	---	----

CAPÍTULO 2

2.1	Métodos por CLAE-DAD para quantificação simultânea de ANLO e OLMD descritos na literatura e métodos farmacopeicos de quantificação de ANLO e OLMD.....	44
2.2	Preparo das soluções de ANLO e OLMD para avaliação da linearidade do método de quantificação por CLAE	53
2.3	Excipientes, com suas respectivas proporções, utilizados para a elaboração do placebo.....	55
2.4	Preparo das soluções de ANLO e OLMD para construção da curva analítica matrizada do método de quantificação por CLAE.....	56
2.5	Massas pesadas de ANLO, OLMD e placebo para avaliação da exatidão por CLAE.....	57
2.6	Planejamento fatorial de Placket-Burman utilizado na avaliação da robustez por CLAE.....	60
2.7	Fatores e níveis avaliados durante a robustez do método analítico por CLAE.....	61
2.8	Parâmetros analíticos e variações empregadas para avaliação da robustez do método analítico por CLUE.....	65
2.9	Parâmetros cromatográficos para ANLO e OLMD em diferentes proporções da fase móvel.....	68
2.10	Condições analíticas estabelecidas para a determinação de ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE.....	71
2.11	Resultados obtidos após as amostras de ANLO e OLMD serem submetidas a condições de estresse.....	72
2.12	Concentração das soluções de ANLO e OLMD e respectivas áreas utilizadas para obtenção da curva analítica do método por CLAE.....	76
2.13	Parâmetros da regressão obtidos para a quantificação de ANLO e OLMD por CLAE.....	78
2.14	Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em solução durante a avaliação do efeito matriz por CLAE ($\alpha = 0,05$).....	79

/continua.

LISTA DE TABELAS (continuação)

2.15	Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLAE ($\alpha = 0,05$).....	79
2.16	Parâmetros da regressão obtidos para a curva em solução e em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLAE.....	79
2.17	Valores de recuperação aparente obtidos para avaliação da exatidão de ANLO e OLMD por CLAE.....	80
2.18	Valores do teor, DP e DPR obtidos para avaliação da precisão de ANLO e OLMD por CLAE.....	81
2.19	Diferença entre as somas dos resultados do teor do medicamento obtidos nas condições normais e nas condições variadas (nível +1 e -1) para cada fator, desvio padrão das diferenças e critério de aceitação para a robustez por CLAE....	85
2.20	Resultados da influência dos efeitos no teor, fator de retenção, fator de cauda e números de pratos teóricos para o ANLO obtidos durante a avaliação da robustez por CLAE.....	86
2.21	Resultados da influência dos efeitos no teor, fator de retenção, fator de cauda, números de pratos teóricos e resolução entre os picos para a OLMD durante a avaliação da robustez por CLAE.....	87
2.22	Parâmetros cromatográficos para ANLO e OLMD obtidos para o método por CLUE antes e após a otimização da fase móvel.....	90
2.23	Parâmetros cromatográficos para ANLO e OLMD obtidos para o método por CLAE.....	90
2.24	Ângulos de pureza e ângulos limites obtidos para ANLO e OLMD durante a avaliação da seletividade do método analítico por CLUE.....	92
2.25	Concentração das soluções de ANLO e OLMD e respectivas áreas utilizadas para obtenção da curva analítica do método por CLUE	93
2.26	Parâmetros da regressão obtidos para a quantificação de ANLO e OLMD por CLUE	95
2.27	Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em solução durante a avaliação do efeito matriz por CLUE ($\alpha = 0,05$)	96
2.28	Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLUE ($\alpha = 0,05$)	96
2.29	Parâmetros da regressão obtidos para a curva em solução e em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLUE.....	96

/continua.

LISTA DE TABELAS (continuação)

2.30	Valores de recuperação aparente obtidos para avaliação da exatidão de ANLO e OLMD por CLUE.....	97
2.31	Valores do teor, DP e DPR obtidos para avaliação da precisão de ANLO e OLMD por CLUE.....	98
2.32	Resultados da média dos teores, do DPR dos teores e dos parâmetros de conformidade do sistema obtidos em condições nominais e com variações das condições analíticas para avaliação da robustez do método por CLUE para quantificação de ANLO.....	102
2.33	Resultados da média dos teores, do DPR dos teores e dos parâmetros de conformidade do sistema obtidos em condições nominais e com variações das condições analíticas para avaliação da robustez do método por CLUE para quantificação de OLMD.....	102
2.34	Teores de ANLO em comprimidos de dose fixa combinada determinados por CLAE e por CLUE.....	104
2.35	Teores de OLMD em comprimidos de dose fixa combinada determinados por CLAE e por CLUE.....	104

CAPÍTULO 3

3.1	$C_{máx}$ e $T_{máx}$ de estudos farmacocinéticos de dose oral única descritos na literatura para ANLO e OLMD.....	120
3.2	Preparo das soluções de trabalho de ANLO e OLM utilizadas durante o desenvolvimento e validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM e concentrações de trabalho obtidas após a diluição.....	123
3.3	Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para ANLO e OLM durante a avaliação das três curvas calibração.....	149
3.4	Dados obtidos para a construção das 03 curvas de calibração de ANLO durante a análise da linearidade do método bioanalítico.....	150
3.5	Dados obtidos para a construção das 03 curvas de calibração de OLM durante a análise da linearidade do método bioanalítico.....	150
3.6	Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o LIQ de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.....	153
3.7	Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQB de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.....	153
3.8	Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQM de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.....	154

/continua.

LISTA DE TABELAS (conclusão)

3.9	Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQA de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.....	154
3.10	Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQD de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.....	155
3.11	Resultados de recuperação do método bioanalítico para os fármacos ANLO, OLM, FELO e VALS.....	157
3.12	Avaliação do efeito matriz para ANLO por meio da comparação entre as áreas das soluções em plasma e a média das soluções em fase móvel.....	158
3.13	Avaliação do efeito matriz para OLM por meio da comparação entre as áreas das soluções em plasma e a média das soluções em fase móvel.....	158
3.14	Avaliação do efeito matriz para FELO e VALS por meio da comparação entre as áreas das soluções em plasma e a média das soluções em fase móvel.....	159
3.15	Avaliação do efeito matriz para ANLO e OLM por meio do cálculo do FMN.....	159
3.16	Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade de curta duração do método bioanalítico.....	161
3.17	Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade de curta duração do método bioanalítico.....	161
3.18	Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento do método bioanalítico.....	161
3.19	Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento do método bioanalítico.....	162
3.20	Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade de pós-processamento do método bioanalítico.....	162
3.21	Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade de pós-processamento do método bioanalítico.....	163
3.22	Resultados obtidos para FELO e VALS durante a avaliação da estabilidade de pós-processamento do método bioanalítico.....	163
3.23	Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade das soluções de trabalho do método bioanalítico.....	164
3.24	Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade das soluções de trabalho do método bioanalítico.....	164
3.25	Resultados obtidos para FELO e VALS durante a avaliação da estabilidade das soluções de trabalho do método bioanalítico.....	164
3.26	Resultados obtidos para ANLO e OLM durante a avaliação da estabilidade das soluções estoque do método bioanalítico.....	165
3.27	Resultados obtidos para FELO e VALS durante a avaliação da estabilidade das soluções estoque do método bioanalítico.....	165

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a	Coeficiente linear
ACN	Acetonitrila
ANLO	Anlodipino
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	Argônio
b	Coeficiente angular
BP	<i>British Pharmacopoeia</i>
C ₁₈	Octadecilsilano
CA	Critério de aceitação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
C _{máx}	Concentração plasmática máxima
conc.	Concentração
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQB	Controle de qualidade de baixa concentração
CQD	Controle de qualidade de diluição
CQM	Controle de qualidade de média concentração
<i>d</i>	Estatística de Durbin-Watson
<i>d_c</i>	Diâmetro interno da coluna
DAD	Detector de arranjo de diodos
<i>d_L</i>	Limite crítico inferior de Durbin-Watson
<i>d_p</i>	Diâmetro da partícula da fase estacionária
DP	Desvio padrão
DPa	Desvio padrão do intercepto da curva analítica
DPR	Desvio padrão relativo
<i>d_U</i>	Limite crítico superior de Durbin-Watson
DCV	Doença cardiovascular

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECD	Estabilidade de curta duração
ECCD	Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento
EDU	Espectrofotometria derivada na região do UV
EM	Espectrometria de massas
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
EP	<i>European Pharmacopoeia</i>
EPP	Estabilidade de pós-processamento
EPR	Erro padrão relativo
ESI+	<i>Electrospray</i> no modo positivo
eV	Eletrovolt
F	Razão entre as variâncias
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FELO	Felodipino
FM	Fase móvel
FMN	Fator de matriz normalizado pelo padrão interno
g	Aceleração da gravidade
GL	Grau de liberdade
H	Altura do prato teórico
Ha	Hipótese alternativa
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCl	Ácido clorídrico
Ho	Hipótese nula
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hz	Hertz
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

J_{ei}	Resíduo padronizado de Jacknife
k	Fator de retenção
kV	Quilovolts
L	Comprimento da coluna cromatográfica
LD	Limite de detecção
LIQ	Limite inferior de quantificação
Log P	Coefficiente de partição octanol:água
LQ	Limite de quantificação
LSQ	Limite superior de quantificação
M	Mol/L
mAU	Miliabsorbância
mbar	Milibar
MeOH	Metanol
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MM	Massa molecular
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
mmHg	Milímetros de mercúrio
MPa	Mega pascal
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
ms	Milissegundo
MTBE	Éter metil <i>terc</i> -butílico
m/z	Razão massa-carga
N	Número de pratos teóricos
N_2	Gás nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (continuação)

OLMD	Olmesartana medoxomila
OLM	Olmesartana
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Nível de significância
PA	Pressão arterial
PI	Padrão interno
pH	Potencial hidrogeniônico
psi	Libra por polegada ao quadrado
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	Coefficiente de correlação de Ryan-Joiner
R ²	Coefficiente de determinação
R _s	Resolução entre os picos
RE	Resolução
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotação por minuto
s	Segundo
S _D	Desvio padrão das diferenças
SQR	Substância química de referência
SRP	<i>Sequoia Research Products</i>
T	Fator de cauda
<i>t</i>	<i>t de student</i>
<i>t_a</i>	<i>t da interseção da reta para variância homogênea</i>
<i>t_b</i>	<i>t da inclinação da reta para variância homogênea</i>
<i>t_L</i>	<i>T de Levene</i>
t _o	Tempo morto
TEA	Trietilamina
temp.	Temperatura
T _{máx}	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
t _R	Tempo de retenção

/continua.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (conclusão)

u	Velocidade linear da fase móvel
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V	Volts
VALS	Valsartana
V _o	Volume morto da coluna cromatográfica
v/v	Volume por volume
v/v/v	Volume por volume por volume
WHO	<i>World Health Organization</i>
α	Nível de significância
λ	Comprimento de onda
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
σ	Desvio padrão
σ^2	Variância

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1 Hipertensão arterial sistêmica.....	28
2.2 Tratamento da hipertensão arterial sistêmica.....	29
2.3 Besilato de anlodipino.....	30
2.4 Olmesartana medoxomila.....	32
2.5 Associação em dose fixa combinada de anlodipino e olmesartana medoxomila.....	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
CAPÍTULO 2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANLODIPINO E OLMESARTANA MEDOXOMILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA. TRANSFERÊNCIA DO MÉTODO PARA SISTEMA DE CLUE-DAD E VALIDAÇÃO	36
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
1.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	37
1.2 Transferência de métodos no modo de eluição isocrática de CLAE para CLUE.....	40
1.2.1 Efeito da variância extra-coluna na transferência do método.....	41
1.3 Métodos analíticos para quantificação de anlodipino e olmesartana medoxomila.....	43
2 MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 Materiais.....	46
2.1.1 Padrões analíticos e amostras.....	46

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

2.1.2 Solventes e vidrarias.....	46
2.1.3 Equipamentos e materiais.....	47
2.2 Métodos.....	48
2.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada.....	48
2.2.2 Transferência do método analítico de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila por CLAE-DAD para um sistema de CLUE-DAD.....	62
2.2.3 Validação do método analítico por CLUE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada.....	63
2.2.4 Comparação entre os métodos de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila: CLAE e CLUE.....	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada.....	67
3.1.1 Determinação das condições analíticas.....	67
3.1.2 Validação do método analítico.....	71
3.2 Transferência do método analítico de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila por CLAE-DAD para um sistema de CLUE-DAD.....	89
3.3 Validação do método analítico por CLUE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada.....	92
3.3.1 Seletividade.....	92
3.3.2 Linearidade.....	92
3.3.3 Efeito matriz.....	95
3.3.4 Exatidão.....	97

/continua.

SUMÁRIO (continuação)

3.3.5 Precisão.....	98
3.3.6 Limites de detecção e quantificação.....	98
3.3.7 Estabilidade das soluções de trabalho.....	100
3.3.8 Robustez.....	102
3.4 Comparação entre os métodos de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila: CLAE e CLUE.....	104
4 CONCLUSÕES.....	107
CAPÍTULO 3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANLODIPINO E OLMESARTANA EM PLASMA HUMANO.....	108
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	109
1.1 Espectrometria de massas.....	109
1.1.1 Ionização por <i>electrospray</i>	110
1.2 Preparo de amostra.....	112
1.3 Métodos bioanalíticos para quantificação de anlodipino e olmesartana.....	114
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	116
2.1 Materiais.....	116
2.1.1 Padrões analíticos.....	116
2.1.2 Solventes e vidrarias.....	116
2.1.3 Equipamentos e materiais.....	116
2.2 Métodos.....	117
2.2.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana em plasma humano.....	117
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
3.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana em plasma humano.....	134

/continua.

SUMÁRIO (conclusão)

3.1.1 Determinação das condições de detecção por espectrometria de massas sequencial.....	135
3.1.2 Determinação das condições cromatográficas.....	142
3.1.3 Determinação do preparo de amostra.....	143
3.1.4 Validação do método bioanalítico.....	147
4 CONCLUSÕES.....	166
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
APÊNDICE A.....	177
APÊNDICE B.....	179

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada a doença cardiovascular (DCV) mais comum e desempenha um papel etiológico importante no desenvolvimento de acidentes vasculares encefálicos, ataques isquêmicos, encefalopatias, infartos agudos do miocárdio, insuficiências cardíacas, aneurismas, insuficiências renais e até mesmo na ocorrência de mortes súbitas. O tratamento correto da HAS foi associado com a redução de 35-40% da incidência de acidente vascular encefálico e de 16% da incidência de infarto do miocárdio. Embora o tratamento farmacológico e o não-farmacológico diminuam, significativamente, as taxas de morbidade e de mortalidade, estima-se que, aproximadamente, 3/4 dos indivíduos hipertensos não controlam de maneira adequada os níveis da pressão arterial (WHO, 2003, 2007).

A mortalidade por DCV aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial de forma linear, contínua e independente. Em 2008, ocorreram no mundo, aproximadamente, 17 milhões de mortes devido às DCV e a projeção da Organização Mundial de Saúde (OMS) é que esse número suba para 25 milhões em 2030. No Brasil, as DCV são as principais causas de morte, somente em 2007 ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório, sendo que 29,4% destes óbitos foram ocasionadas por DCV (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010; WHO, 2012).

A HAS é uma doença crônica considerada um problema grave de saúde pública no Brasil e no mundo. A OMS estima que 13% de todas as mortes do mundo decorrem do aumento da pressão arterial. Considerando o critério atual de diagnóstico ($PA \geq 140/90$ mmHg), a prevalência na população brasileira com idade superior a 24 anos em 2008 foi de 39,4% para mulheres e de 26,6% para homens (WHO, 2012).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hipertensão arterial sistêmica

A HAS pode ser definida como uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. É possível estabelecer uma causa específica para a hipertensão em apenas 10-15% dos portadores, aqueles em que não se pode identificar a causa específica são considerados portadores de hipertensão essencial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

A pressão arterial é o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica. Por isso, em indivíduos normais e hipertensos, a pressão arterial é mantida pela regulação contínua do débito cardíaco e da resistência vascular periférica. Esta regulação ocorre nas arteríolas, vênulas pós-capilares, coração e rins (regula o volume do líquido intravascular). Os barorreceptores, mediados por nervos autônomos, atuam em combinação com mecanismos humorais, incluindo o sistema renina-angiotensina, para coordenar os quatro locais anatômicos de regulação da pressão arterial. Na maioria dos casos, a elevação da pressão está associada a um aumento global da resistência ao fluxo sanguíneo, enquanto o débito cardíaco está habitualmente normal (KATZUNG, 2005).

A classificação da HAS para adultos com mais de 18 anos de acordo com a VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão e com o Ministério da Saúde é apresentada na **Tabela 1.1**. Para avaliar os limites de pressão arterial normal para crianças e adolescentes com até 17 anos, é necessário utilizar tabelas especiais que levam em consideração a idade e a altura. Vale ressaltar que quando as pressões sistólica e diastólica encontram-se em categorias diferentes, a sistólica deve ser utilizada para a classificação da pressão arterial (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

Tabela 1.1 - Classificação da pressão arterial em adultos.

Classificação	Pressão Sistólica (mmHg)	Pressão Diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	<130	<85
Pré-hipertensão	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥180	≥110
Hipertensão sistólica isolada	≥140	<90

Fonte: adaptado da SOCIEDADE BRASILEIRA de CARDIOLOGIA, 2010

2.2 Tratamento da hipertensão arterial sistêmica

O principal objetivo do tratamento da HAS é a redução da morbidade e da mortalidade ocasionadas por doenças cardiovasculares. A decisão do tratamento adequado e eficiente para a HAS deve ser baseada no nível da pressão arterial e, também, no risco cardiovascular, que considera a presença de fatores de risco, lesão em órgãos alvo e a presença de outra doença cardiovascular. Basicamente, há duas abordagens terapêuticas para a HAS: o tratamento não-farmacológico, que é baseado em modificações do estilo de vida, e o tratamento medicamentoso (BRASIL, 2006).

A adoção de hábitos de vida saudáveis é parte fundamental da prevenção e do tratamento de pacientes com HAS, por isso o tratamento não-farmacológico é muito importante. As principais estratégias para esse tratamento são: controle de peso, adoção de hábitos alimentares saudáveis, redução do consumo de sal, redução do consumo de bebidas alcoólicas, abandono do tabagismo, prática de atividade física regular, dentre outras (THE SEVENTH..., 2004).

Os fármacos anti-hipertensivos exercem sua ação terapêutica por meio de mecanismos distintos que interferem na fisiopatologia da HAS. As classes de anti-hipertensivos disponíveis para uso clínico são (BRUNTON *et al.*, 2006):

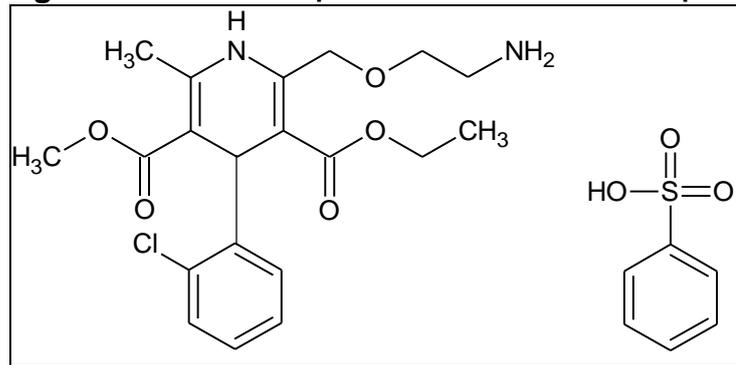
- ✓ diuréticos;
- ✓ inibidores adrenérgicos;

- ✓ vasodilatadores;
- ✓ bloqueadores dos canais de cálcio;
- ✓ inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA);
- ✓ bloqueadores do receptor AT₁ da angiotensina II;
- ✓ inibidor da renina.

Qualquer fármaco dos grupos de anti-hipertensivos pode ser utilizado para o tratamento da hipertensão arterial, desde que resguardadas as indicações e contra-indicações específicas. A monoterapia, geralmente, é a estratégia inicial para pacientes com HAS estágio 1 e com risco cardiovascular baixo a moderado. Dependendo da resposta do paciente à terapêutica, quase sempre é necessária a adoção de terapias combinadas, envolvendo dois ou mais agente anti-hipertensivos com diferentes mecanismos de ação. Estudos recentes mostraram que em cerca de dois terços dos casos, a monoterapia não foi suficiente para reduzir a pressão arterial para valores normais, por isso, a terapia combinada de anti-hipertensivos como primeira medida medicamentosa está sendo adotada, principalmente, para pacientes com hipertensão estágios 2 e 3 e para aqueles com hipertensão arterial estágio 1 que apresentam risco cardiovascular alto. A terapia combinada de anti-hipertensivos pode ser feita por meio de medicamentos separados ou por associações em dose fixa combinada (WHO, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

2.3 Besilato de anlodipino

O besilato de anlodipino é um pó cristalino branco ligeiramente solúvel em água e em 2-propanol e solúvel em metanol e em etanol. Deve ser armazenado protegido da luz, pois é fotossensível. É uma base fraca, apresenta pKa 8,6 e coeficiente de partição octanol:água (log P) igual a 3,0. Sua denominação química de acordo com a IUPAC é: 2-[(2-aminoetoxi)metil]-4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-piridina-ácido dicarboxílico 3-etil 5-metil ester, (±)-, monobenzenosulfonato. A estrutura química desse fármaco está representada na **Figura 1.1** (MOFFAT *et al.*, 2004; THE MERCK INDEX, 2006; SHOHIN *et al.*, 2010).

Figura 1.1 - Estrutura química do besilato de anlodipino.

Fonte: THE MERCK INDEX, 2006

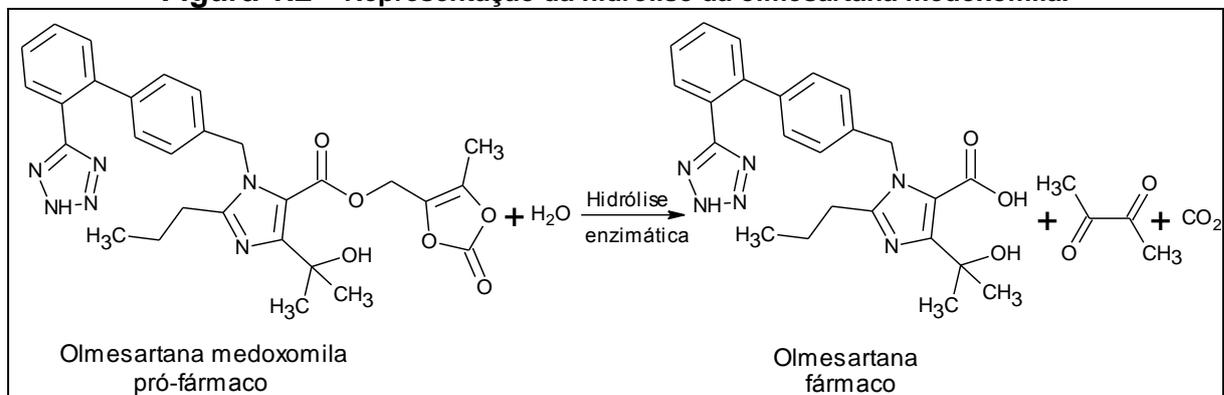
O anlodipino (ANLO), classificado como um derivado da dihidropiridina de terceira geração, é um bloqueador seletivo dos canais lentos de cálcio que age por meio da inibição do fluxo de cálcio extracelular para o meio intracelular dos músculos cardíaco e liso. É indicado para o tratamento da angina de peito, HAS e insuficiência cardíaca congestiva. A dose oral recomendada é de 5 mg a 10 mg, uma vez ao dia. O ANLO está incluído da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais de 2012 do Ministério da Saúde e na lista de medicamentos essenciais da OMS de 2011. Os principais efeitos adversos relacionados ao uso de ANLO são devido à vasodilatação excessiva que pode ocorrer, os sintomas consistem em tonteira, hipotensão, cefaleia, edema periférico e taquicardia (BRUNTON *et al.*, 2006; WHO, 2011; BRASIL, 2012).

Após a administração por via oral, a absorção do ANLO é lenta, apresentando picos máximos de níveis plasmáticos entre 6-12 horas. Sua biodisponibilidade absoluta varia de 64 a 80% e sua absorção não é afetada pela ingestão de alimentos. Aproximadamente, 97,5% unem-se às proteínas plasmáticas. A meia-vida de eliminação é cerca de 40 a 50 horas, o volume de distribuição é de aproximadamente 20 L/kg e o *clearance* é de 7 mL/min./kg. É extensivamente metabolizado pelo fígado e seus metabólitos são excretados pela urina. Não há evidência de interação farmacocinética do ANLO com outras drogas (MEREDITH & ELLIOT, 1992; MOFFAT *et al.*, 2004; SWEETMAN, 2009).

2.4 Olmesartana medoxomila

A olmesartana medoxomila (OLMD) é um pó cristalino branco. É muito pouco solúvel em água, ligeiramente solúvel em metanol, solúvel em soluções ácidas e alcalinas fracas. É uma base fraca, apresenta pKa 4,3. Sua denominação química de acordo com a IUPAC é: 4-(1-hidroxi-1-metiletil)-2-propil-1-[[2` (1H-tetrazol-5-il)[1,1`bifenil]-4-il]metil]-1Himidazol-5-ácido carboxílico (5-metil-2-oxo-1,3-dioxol-4-il) metil éster. A estrutura química desse fármaco está representada na **Figura 1.2** (THE MERCK INDEX, 2006; BAJERSKI *et al.*, 2010).

Figura 1.2 – Representação da hidrólise da olmesartana medoxomila.



Fonte: adaptado de MA *et al.*, 2005

A OLMD, classificada como derivado imidazólico, é um pró-fármaco éster inativo, que, durante sua absorção pelo trato gastrointestinal, é totalmente hidrolisada à forma ativa, a olmesartana (OLM), pelas enzimas esterases, conforme apresentado na **Figura 1.2**. Atua bloqueando seletivamente os receptores AT₁ de angiotensina II. É indicada para o tratamento da HAS, nefropatia diabética, insuficiência cardíaca congestiva e acidente vascular encefálico. A dose oral recomendada é de 20 mg a 40 mg, uma vez ao dia. É o fármaco mais novo de sua classe, foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2002. Em estudos comparativos, mostrou eficácia anti-hipertensiva superior aos outros de sua classe. Os efeitos adversos associados ao uso da OLMD são dor cefaleia, infecção do trato respiratório, edema facial e tonteira (NORWOOD. *et al.*, 2002; BRUNTON *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2008).

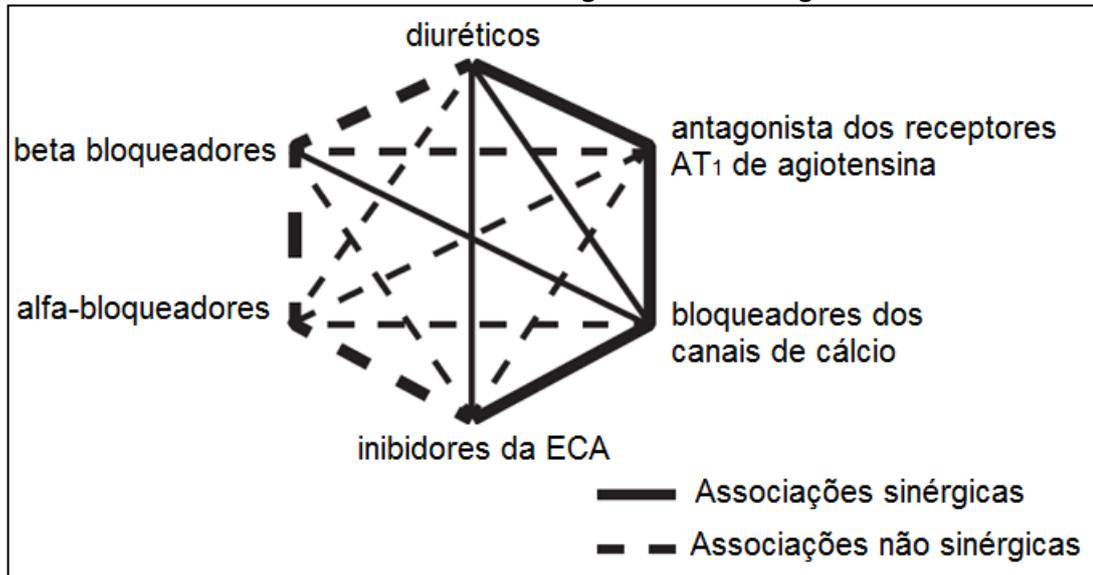
Após a administração por via oral, a OLMD é hidrolisada à OLM que é rapidamente absorvida, apresentando picos máximos de níveis plasmáticos entre 1-2 horas. A biodisponibilidade absoluta da OLM é de, aproximadamente, 26% e não é afetada pela ingestão de alimentos. Aproximadamente, 99% unem-se às proteínas plasmáticas. A meia-vida varia de 10 a 15 horas, o volume de distribuição é de aproximadamente 20 L/kg e o *clearance* é de 22 mL/min./kg. É excretada na forma inalterada sendo que de 30 a 50% é excretada pela urina e o restante pela bile. Não há evidência de interação farmacocinética da OLM com outros fármacos (MOFFAT *et al.*, 2004; KOROLKOVAS & FRANÇA, 2006).

2.5 Associação em dose fixa combinada de anlodipino e olmesartana medoxomila

A monoterapia no tratamento da HAS é eficiente para apenas um terço dos hipertensos. Por isso, a associação de diferentes fármacos é muito importante para o tratamento correto dessa doença. Para a efetividade do tratamento, são associados fármacos de diferentes classes terapêuticas para que ocorra um sinergismo de suas ações farmacológicas, o que ocasiona uma redução maior dos níveis da pressão arterial. Quando é necessário mais de um fármaco para tratar a HAS, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a OMS recomendam o uso de formulações de dose fixa combinada porque diminui os erros de prescrição, simplifica o tratamento e melhora a adesão do paciente (WHO, 2007; BRASIL, 2010).

Em estudos realizados, a combinação de OLMD e ANLO, um antagonista do receptor AT₁ de angiotensina II e um bloqueador dos canais cálcio, respectivamente, mostrou ser efetiva para o tratamento da hipertensão em comparação com a monoterapia, bem tolerada pelos pacientes e com baixa incidência de efeitos adversos. Além disso, a meia vida de ambos os fármacos é longa e, por isso, a posologia é de apenas um comprimido ao dia, o que contribui ainda mais para a adesão ao tratamento. A ANVISA considera a associação de ANLO e OLMD sinérgica para o tratamento da HAS, conforme se pode observar na **Figura 1.3**. (ROHATAGI *et al.*, 2008b; CLEOPHAS & NIEMEIJER, 2009; BASILE, 2010; BRASIL, 2010).

Figura 1.3 – Associações de fármacos utilizadas no tratamento da HAS consideradas sinérgicas e não sinérgicas.



Fonte: BRASIL, 2010

O medicamento referência para a associação em dose fixa combinada de ANLO e OLMD é o BenicarAnlo®, fabricado pela indústria farmacêutica Daiichi Sankyo e que está protegido por patente até 2016. É apresentado em embalagens com 15 ou 30 comprimidos revestidos nas seguintes concentrações de OLMD e ANLO, respectivamente: 20mg/5mg; 40mg/5mg; 40mg/10mg.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos e bioanalítico para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em produto farmacêutico e em plasma humano.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD) para quantificação de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada.
- Transferir o método de quantificação de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE para Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE).
- Validar o método analítico de quantificação de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada por CLUE-DAD.
- Desenvolver e validar um método bioanalítico por CLAE com detecção por espectrometria de massas com fonte de ionização por *electrospray* para quantificação de anlodipino e olmesartana em plasma humano.

CAPÍTULO 2

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD
PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANLODIPINO E OLMESARTANA
MEDOXOMILA EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA.
TRANSFERÊNCIA DO MÉTODO PARA SISTEMA DE CLUE-DAD E VALIDAÇÃO**

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, *High Performace Liquid Chromatography*) é principal técnica analítica utilizada para as análises qualitativas e quantitativas de controle de qualidade na área farmacêutica. A CLAE surgiu no início dos anos 80 com o aprimoramento da cromatografia líquida clássica e desde então pesquisas têm sido feitas para desenvolver novas partículas de fase estacionárias. O que impulsiona esse desenvolvimento é a necessidade de aumentar a eficiência cromatográfica e de reduzir o tempo de análise. Neste contexto, surgiu a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC, *Ultra Performace Liquid Chromatography*) que se baseia nos mesmos princípios da CLAE e utiliza partículas de diâmetro inferiores a 2 μm como fase estacionária (WREN & TCHELITCHEFF, 2006; MALDANER & JARDIM, 2009).

Para tornar possível o uso das partículas inferiores a 2 μm , o sistema cromatográfico deve operar em altas pressões, 100 MPa (15000 psi), uma vez que a pressão do sistema é inversamente proporcional ao quadrado do diâmetro da partícula, conforme demonstrado pela equação 1. Para minimizar o aumento da pressão, colunas de comprimentos menores podem ser usadas (NGUYEN *et al.*, 2006).

$$P = \frac{\Phi \cdot \eta \cdot L \cdot u}{d_p^2} \quad (1)$$

Onde P é a pressão do sistema, Φ é a resistência ao fluxo, η é a viscosidade da fase móvel L é o comprimento da coluna, u é a velocidade linear da fase móvel e d_p é o diâmetro da partícula da fase estacionária.

Um sistema CLAE convencional não consegue operar em altas pressões, trabalhando com pressões de no máximo 40 MPa (6000 psi). Por isso, foi preciso desenvolver um equipamento com bombas, injetor e detector capazes de trabalhar em altas pressões. O primeiro equipamento comercial desenvolvido e adaptado para

operar nas condições necessárias à CLUE foi introduzido em 2004 pela Waters e denominado Acquity UPLC™ (SWARTZ, 2005).

Os equipamentos de CLUE apresentam sistema de bombeamento capaz de impulsionar a fase móvel de forma suave e reprodutível sob altas pressões. O ciclo de injeção da amostra é rápido para assegurar a rapidez da análise. O volume de injeção deve ser pequeno para evitar o alargamento dos picos. Os detectores possuem celas sem dispersão, constantes de tempo baixas (≤ 100 ms) devido às estreitas larguras de base dos picos e altas taxas de aquisição (≥ 20 Hz) para se obter dados suficientes em curto espaço de tempo (MALDANER & JARDIM, 2009).

As colunas utilizadas na CLUE, além de possuírem partículas sub $2 \mu\text{m}$, devem apresentar diâmetro de 1 mm a 2,1 mm para evitar o aquecimento dos solventes da fase móvel por atrito, que pode ocorrer devido à pressão elevada, e reduzir o consumo de solvente. Para garantir os benefícios proporcionados por essas colunas, o volume extra-coluna do equipamento precisa ser pequeno. O volume extra-coluna do sistema Acquity UPLC™ é em torno de 10 a 15 μL (NGUYEN *et al.*, 2006; FEKETE S. & FEKETE J., 2011).

As partículas sub $2 \mu\text{m}$ utilizadas em CLUE proporcionam um aumento da eficiência da coluna e separações cromatográficas mais rápidas. Isso ocorre porque o número de pratos teóricos e a velocidade linear da fase móvel são inversamente proporcionais ao diâmetro da partícula. Assim, o uso dessas partículas juntamente com as altas velocidades lineares da fase móvel permite análises rápidas, consumo menor de solventes, melhor resolução e menor limite de detecção para método. O limite de detecção pode ser reduzido de 2 a 3 vezes, isso vai depender do detector utilizado (SWARTZ, 2005; ORTIZ *et al.*, 2010).

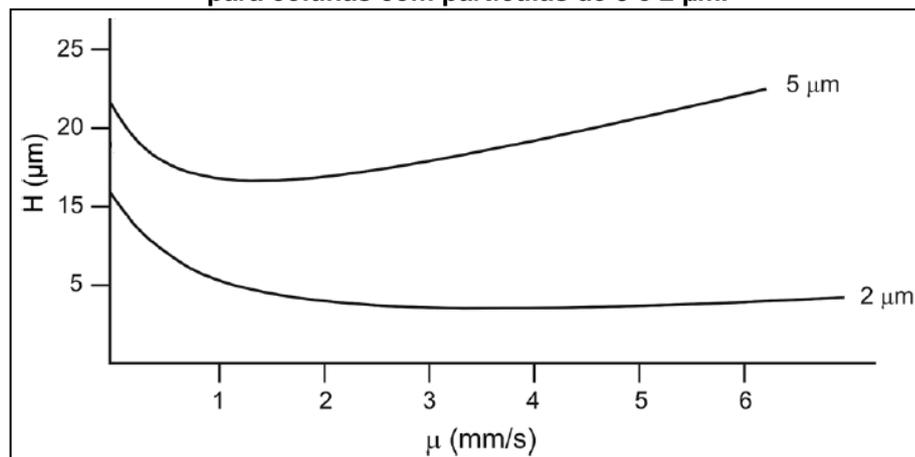
Por meio da equação de van Deemter (2), é possível avaliar como a coluna e a velocidade linear da fase móvel afetam os mecanismos de alargamento da banda cromatográfica e, conseqüentemente, a eficiência da coluna, expressa pela altura do prato teórico (H).

$$H = A + \frac{B}{u} + C.u \quad (2)$$

Onde A, B e C são constantes.

O termo A se refere ao alargamento dos picos devido aos caminhos múltiplos seguido pelo analito na coluna, quanto menor o diâmetro da partícula, menor a contribuição desse termo para o alargamento. O termo B se refere ao alargamento dos picos devido à difusão longitudinal do analito, quanto mais rápida a vazão linear, menor o tempo de permanência do analito na coluna e menor a contribuição desse termo para o alargamento. O termo C se refere ao alargamento dos picos devido à transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, quanto menor a vazão linear e o diâmetro da partícula, menor a contribuição desse termo para o alargamento. A partir da aplicação da equação de van Deemter é possível construir curvas de van Deemter para colunas com diferentes diâmetros de partículas, pela qual se avalia a H (μm) em função de u (mm/s). As curvas obtidas para uma coluna de CLAE convencional com diâmetro de 5 μm e para uma coluna de CLUE com diâmetro de 2 μm estão representadas na **Figura 2.1** (HARRIS, 2005).

Figura 2.1 – Representação da curva de van Deemter para colunas com partículas de 5 e 2 μm .



Fonte: adaptado de MALDANER & JARDIM, 2009

O mínimo da curva demonstra a velocidade ótima para se alcançar a eficiência máxima da coluna. Conforme se pode observar na **Figura 2.1**, colunas com partículas menores reduzem a altura do prato teórico, assegurando a obtenção de colunas com um número maior de pratos. Além disso, as colunas de CLUE permitem

que a eficiência se mantenha próxima da eficiência máxima mesmo quando se trabalha com elevada velocidade linear da fase móvel, possibilitando uma redução ainda maior do tempo de análise (MALDANER & JARDIM, 2009).

1.2 Transferência de métodos no modo de eluição isocrática de CLAE para CLUE

Para realizar a transferência de um método de separação desenvolvido por CLAE para um sistema de CLUE é necessário que a fase estacionária empregada em ambos os métodos sejam similares e que algumas condições analíticas sejam alteradas. Por meio de equações matemáticas é possível calcular as novas condições para CLUE, além disso, pode-se prever o tempo de corrida e a pressão do sistema do novo método. Na transferência de um método de separação no modo de eluição isocrática, o volume de injeção e o fluxo da fase móvel precisam ser modificados (GUILLARME *et al.*, 2007).

O volume de injeção deve ser adaptado de acordo com as novas dimensões da coluna de CLUE para evitar o alargamento do pico. O ideal é que seja de 1 a 5% do volume da coluna. O volume de injeção depende do diâmetro interno da coluna e de seu comprimento e independe do tamanho das partículas. O cálculo do novo volume de injeção deve ser feito de acordo com a equação 3.

$$V_{inj_2} = V_{inj_1} \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (3)$$

Onde V_{inj_2} e V_{inj_1} são os volumes de injeção dos métodos por CLUE e CLAE, respectivamente; d_{c2} e L_2 são o diâmetro interno e o comprimento da coluna de CLUE, respectivamente; d_{c1} e L_1 são o diâmetro interno e o comprimento da coluna de CLAE, respectivamente.

A velocidade linear da fase móvel é diretamente proporcional ao quadrado do diâmetro da coluna e inversamente proporcional ao diâmetro das partículas da fase estacionária. No entanto, independe do comprimento da coluna. Durante a transferência do método, é importante que o resultado obtido ao se multiplicar a velocidade linear da fase móvel pelo diâmetro da partícula seja constante. Para que

essa condição seja obedecida, o fluxo da fase móvel por CLUE é determinado pela equação 4.

$$F_2 = F_1 \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{d_{p1}}{d_{p2}} \quad (4)$$

Onde F_2 e F_1 são os fluxos dos métodos por CLUE e CLAE, respectivamente; d_{p2} e d_{p1} são os diâmetros das partículas da fase estacionária das colunas de CLUE e CLAE, respectivamente.

O tempo de análise esperado para o método por CLUE é diretamente proporcional a alteração que ocorre no volume morto da coluna durante a transferência. Esse pode ser estimado com o auxílio da equação 5.

$$T_{ana,2} = T_{ana,1} \cdot \frac{F_1}{F_2} \cdot \frac{d_{c2}^2}{d_{c1}^2} \cdot \frac{L_2}{L_1} \quad (5)$$

Onde $T_{ana,2}$ e $T_{ana,1}$ são os tempos de análise dos métodos por CLUE e CLAE, respectivamente.

A pressão do sistema esperada para o método por CLUE pode ser calculada com o auxílio da equação 6.

$$P_2 = P_1 \cdot \frac{L_2}{L_1} \cdot \frac{d_{p1}^3}{d_{p2}^3} \quad (6)$$

Onde P_2 e P_1 são as pressões dos sistemas de CLUE e CLAE, respectivamente (GUILLARME *et al.*, 2007).

1.2.1 Efeito da variância extra-coluna na transferência do método

A coluna cromatográfica e os efeitos extra-coluna são os responsáveis pela eficiência total exibida em uma separação cromatográfica. Os fatores que afetam a eficiência intrínseca da coluna estão associados aos termos A, B e C da equação de van Deemter, já os efeitos extra-coluna estão relacionados, principalmente, com o volume extra-coluna. A eficiência total pode ser estabelecida pela variância total do

pico (σ^2_{total}), que representa o alargamento da banda no cromatograma. A σ^2_{total} pode ser calculada de acordo com a equação 7 (HARRIS, 2005; NETO, 2011).

$$\sigma^2_{total} = \sigma^2_{coluna} + \sigma^2_{extra-coluna} \quad (7)$$

Onde a σ^2_{coluna} é a variância atribuída à contribuição intrínseca da coluna e $\sigma^2_{extra-coluna}$ é a variância relativa aos efeitos extra-coluna.

A redução do volume da coluna na CLUE provoca uma diminuição da σ^2_{coluna} , conforme demonstrado pela equação 8 (GUILLARME *et al.*, 2007).

$$\sigma^2_{coluna} = \frac{V_o \cdot (1 + k)}{\sqrt{N_{coluna}}} \quad (8)$$

Onde V_o é volume morto da coluna; k é o fator de retenção; N_{coluna} corresponde à eficiência intrínseca da coluna.

Com a redução da σ^2_{coluna} , o efeito da $\sigma^2_{extra-coluna}$ se torna mais significativo, o que pode provocar uma perda da eficiência durante a transferência do método. Para contornar esse problema, é importante que o sistema cromatográfico seja configurado para que os efeitos extra-coluna sejam os menores possíveis. A relação entre a σ^2_{coluna} e a $\sigma^2_{extra-coluna}$ pode ser melhor visualizada pela equação 9 (FEKETE S. & FEKETE J., 2011).

$$N_{obs.} = N_{coluna} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\sigma^2_{extra-coluna}}{\sigma^2_{coluna} + \sigma^2_{extra-coluna}}} \quad (9)$$

Onde $N_{obs.}$ é o número de pratos teóricos observado no cromatograma.

De acordo com a equação 9, ao se reduzir a σ^2_{coluna} e manter constante a $\sigma^2_{extra-coluna}$, o N observado diminui. Outra forma de evitar a perda da eficiência, durante a transferência de método recomendada pela literatura, é trabalhar com k superior a 3. Isso garante uma redução menor da σ^2_{coluna} e, conseqüentemente, um efeito menor da $\sigma^2_{extra-coluna}$, uma vez que k é proporcional à σ^2_{coluna} , conforme demonstrado pela equação 8 (GUILLARME *et al.*, 2007).

Para se obter uma boa separação cromatográfica é recomendado que a taxa entre a $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$ e a σ^2_{total} seja igual ou inferior a 10% (GUILLARME *et al.*, 2007).

1.3 Métodos analíticos para quantificação de anlodipino e olmesartana medoxomila

O primeiro método para quantificação simultânea de ANLO e OLMD utilizando CLAE-DAD foi publicado por QUTAB *et al.* (2009). Posteriormente, outros seis artigos foram publicados utilizando essa mesma técnica. As condições cromatográficas utilizadas pelos diversos autores estão reunidas na **Tabela 2.1**. Foi observado que, dos sete métodos publicados, seis apresentaram como objetivo o doseamento de ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada e apenas um visou estudar as estabilidades dos fármacos frente a condições de degradação forçada. Todos os métodos empregaram eluição isocrática e, como fase estacionária, utilizaram colunas empacotadas com sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilanos (C_{18}) e com as seguintes dimensões: 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e partículas de 5 μm . A acetonitrila (ACN) foi o solvente orgânico de escolha para todas as análises, o método descrito por CHABUKSWAR *et al.* (2010) também utilizou metanol (MeOH) como modificador orgânico.

Nos artigos publicados por WANKHEDE *et al.* (2009) e KARDILE *et al.* (2010), além dos métodos de quantificação simultânea dos fármacos por CLAE-DAD, foram desenvolvidos e validados também métodos de quantificação simultânea por espectrofotometria derivada na região do UV (EDU). O método por EDU se mostrou mais rápido e menos dispendioso em comparação ao método por CLAE-DAD, uma vez que não necessita da separação prévia dos fármacos, entretanto o método por CLAE-DAD foi mais sensível. Foram encontrados na literatura científica dois artigos que quantificaram ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada utilizando apenas a EDU como técnica (MEHULKUMAR *et al.*, 2009; PATIL *et al.*, 2011b).

Tabela 2.1 – Métodos por CLAE-DAD para quantificação simultânea de ANLO e OLMD descritos na literatura e métodos farmacopeicos de quantificação de ANLO e OLMD.

Referência	Analito	Fase móvel	Coluna	Fluxo (mL/min.)	Deteção (nm)	Aplicação
QUTAB <i>et al.</i> , 2009	ANLO E OLMD	ACN:acetato de amônio 0,05 M pH 6,80 (60:40)	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), 25 °C	1,0	239	Doseamento de comprimido
WANKHEDE <i>et al.</i> , 2009	ANLO E OLMD	ACN:fosfato de potássio dihidrogenado 0,05 M (50:50)	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	1,0	238	Doseamento de comprimido
CHABUKSWAR <i>et al.</i> , 2010	ANLO E OLMD	ACN:MeOH:água (60:28:12); pH 3,20 ajustado com ácido fosfórico	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), 30 °C	0,6	254	Doseamento de comprimido
KAMBLE <i>et al.</i> , 2010	ANLO E OLMD	ACN: acetato de amônio 0,03 M pH 3,00 ajustado ácido acético (55:45)	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	1,0	254	Doseamento de comprimido
KARDILE <i>et al.</i> , 2010	ANLO E OLMD	ACN:fosfato de potássio dihidrogenado 0,05 M pH 6,80 (50:50)	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm)	1,0	238	Doseamento de comprimido
PATIL <i>et al.</i> , 2010	ANLO E OLMD	ACN: acetato de amônio 0,05 M pH 3,20 ajustado com amônia e ácido acético (40:60)	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), 30 °C	1,0	240	Estudo de estabilidade
PATIL <i>et al.</i> , 2011a	ANLO E OLMD	ACN:água (60:40)	C ₁₈ (250 x 4,6 mm; 10 µm)	1,0	248	Doseamento de comprimido
USP 35	ANLO	ACN:MeOH:TEA 0,7% pH 3,00 ajustado com ácido fosfórico (15:30:50)	C ₁₈ (150 x 3,9 mm; 5 µm)	1,0	237	Doseamento de matéria-prima e comprimido
BP 2013 e EP 7.0	ANLO	MeOH: acetato de amônio 2,3 g/L (70:30)	C ₁₈ (250 x 4 mm; 5 µm), 30 °C	1,5	237	Doseamento de matéria-prima
USP 35	OLMD	ACN: fosfato de potássio monobásico 0,015 M, pH 3,40 ajustado com ácido fosfórico (34:66)	C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm), 40 °C	1,0	250	Doseamento de matéria-prima
BP 2013 e EP 7.0	OLMD	ACN:fosfato de potássio dihidrogenado 2,04 g/L pH 3,40 ajustado com ácido fosfórico (35:65)	C ₁₈ (100 x 4,6 mm; 3,5 µm), 40°C	1,0	250	Doseamento de matéria-prima

SAMINATHAN *et al.* (2011) desenvolveram um método por CLAE-DAD para quantificação de ANLO, OLMD e hidroclorotiazida em comprimidos de dose fixa combinada. O medicamento que associa esses três fármacos é o Tribenzor® da indústria farmacêutica Daiichi Sankyo, foi aprovado pelo FDA em 2010 e não é comercializado no Brasil. JAIN *et al.* (2012) também relatou um método para quantificar esses três fármacos simultaneamente e o propósito do artigo foi estudar os produtos de degradação após submeter o medicamento a condições de estresse.

Até o final do presente trabalho, foi encontrado somente um artigo publicado para a determinação simultânea de ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada por meio da técnica CLUE-DAD. O artigo foi publicado por KUMAR *et al.* (2012) e teve por finalidade quantificar ANLO, OLMD e hidroclorotiazida em dose fixa combinada e estudar os produtos de degradação dos fármacos frente a condições de degradação forçada. Esse método apresentou certa complexidade para execução, pois envolveu o gradiente de duas fases móveis (A e B), a fase A foi composta de ACN:perclorato de sódio 0,053 M pH 3,20 ajustado com ácido fosfórico (10:90;v/v) e a fase B foi composta pelos mesmos solventes mas na proporção de (90:10;v/v). Além disso, foi utilizado um comprimento de onda para identificar cada fármaco, o que também dificulta a análise. O tempo de corrida foi de 6,0 minutos, que é considerado longo quando se refere a análises por CLUE.

Não foi encontrada monografia oficial em Farmacopeias reconhecidas pela ANVISA para proceder ao controle de qualidade de ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada. Os métodos de doseamento descritos para ANLO ou OLMD nas farmacopeias Americana (USP 35), Britânica (BP 2013) e Europeia (EP 7.0) estão relatados na **Tabela 2.1**. Para a OLMD, não há monografia para o produto acabado, as monografias da matéria-prima foram publicadas pela primeira vez no 2º suplemento da USP 35 (2012) e no suplemento 7.4 da EP 7.0 (2012). Isso é justificado por a OLMD ser um fármaco relativamente novo, pois foi aprovado pelo FDA em 2002.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Padrões analíticos e amostras

Os seguintes padrões analíticos e amostras foram utilizados para a execução desse trabalho:

- besilato de anlodipino proveniente da USP, lote H01102, teor: 99,8%, válido por todo o período de estudo;
- olmesartana medoxomila proveniente da *Sequoia Research Products* (SRP), lote 0410011205o, teor: 99,3%, válido por todo o período de estudo;
- olmesartana proveniente da SRP, lote 0706011204o, teor: 99,3%, válido por todo o período de estudo;
- besilato de anlodipino matéria-prima proveniente da *Arch Pharmalabs Limited*, lote ABAMBO7038, teor: 99,52%, validade 11/2012;
- olmesartana medoxomila matéria-prima proveniente da *Iffect Chemphar Co.*, lote IF-OL-110502, teor: 99,48%, validade 05/2014;
- BenicarAnlo® comprimidos revestidos – 40 mg de olmesartana medoxomila e 10 mg de anlodipino- proveniente da indústria farmacêutica Daiichi Sankyo, lotes 10406, 10907,11073 e 20168, validades 05/2013, 10/2013, 11/2013 e 11/2013, respectivamente;
- excipientes: álcool polivinílico, amido pré-gelatinizado, celulose microcristalina silicificada, croscarmelose sódica, dióxido de titânio, estearato de magnésio, macrogol, óxido férrico amarelo, óxido férrico vermelho e talco.

2.1.2 Solventes e vidrarias

Os seguintes solventes e vidrarias foram utilizados para a execução desse trabalho:

- água destilada e ultra purificada em sistema Milli-Q;
- balões volumétricos, buretas e pipetas volumétricas calibrados;
- béqueres, erlenmeyers e kit de filtração;

- solventes e reagentes grau analítico: acetato de amônio, ácido acético, ácido clorídrico (HCl), ácido fórmico, ácido fosfórico, hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% v/v e trietilamina (TEA);
- solventes grau cromatográfico: acetonitrila e metanol.

2.1.3 Equipamentos e materiais

Os seguintes equipamentos e materiais foram utilizados para a execução desse trabalho:

- aparelho de banho-maria FANEM;
- aparelho de ultrassom UNIQUE, modelo USC-1400;
- balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg, modelo BP210D;
- balança analítica SHIMADZU com precisão de 0,01 mg, modelo AUW-220D;
- bomba de vácuo MILLIPORE, modelo WP6111560;
- coluna cromatográfica SHIMADZU para CLAE C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm);
- coluna cromatográfica WATERS para CLUE BEH C₁₈ (50 x 2,1 mm; 1,7 µm);
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência AGILENT, com forno, injeção automática e DAD, modelo 1200, software ChemStation B.02.01-SR1;
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência AGILENT, com forno, injeção automática e DAD, modelo HP 1100, software ChemStation B.02.01-SR1;
- cromatógrafo a líquido de ultra eficiência WATERS Acquity, com forno, injeção automática e DAD, software Empower 2;
- espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) SHIMADZU, modelo 1800, software UV probe 2.33;
- estufa a seco FANEM;
- lâmpada de ultravioleta (UV) SPECTROLINE, modelo CM-10;
- membrana filtrante de celulose SARTORIUS com poros de 0,45 µm;
- papel de filtro quantitativo UNIFIL, faixa preta;
- pipetas BRAND, volume ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL;
- potenciômetro METROHM, modelo 827 pH lab;
- ponteiras plásticas AXYGEN de 200 µL e 1000 µL;
- sistema de purificação de água MILLIPORE, modelo DIRECT-Q 3;

- unidade filtrante Millex HV com membrana de durapore PVDF com poros de 0,45 μm , MILLIPORE;
- *vials* de vidro âmbar AGILENT de 2 mL com tampa e septos de teflon.

2.2 Métodos

2.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada

2.2.1.1 Determinação das condições analíticas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Agilent HP 1100 com detector DAD. A seleção das condições cromatográficas para a separação e quantificação de ANLO e OLMD foi realizada com base em revisão bibliográfica e nos seguintes parâmetros de conformidade do sistema: pureza de pico, fator de retenção (k), fator de cauda (T), resolução entre os picos (R_s) e número de pratos teóricos (N). Para calcular o k , o tempo morto (t_0) foi determinado injetando-se no cromatógrafo solução de NaNO_3 0,01% (p/v) em fase móvel.

Para determinar o comprimento de onda (λ) de detecção, os espectros de absorção na região do ultravioleta de ANLO e OLMD foram obtidos na faixa λ 200 nm a 400 nm.

Após a escolha das condições cromatográficas, a estabilidade dos fármacos foi avaliada em diferentes diluentes por um período de 8 horas, com o objetivo de se determinar a solução diluente adequada para o método.

2.2.1.2 Preparo das soluções padrão e amostra e da solução trabalho de anlodipino e olmesartana medoxomila

Solução padrão estoque de anlodipino e olmesartana medoxomila: cerca de 10 mg de ANLO substância química de referência (SQR) e 40 mg de OLMD SQR foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio

de 70 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com o mesmo solvente, obtendo-se solução a 0,1 mg/mL de ANLO e a 0,4 mg/mL de OLMD.

Solução amostra de anlodipino e olmesartana medoxomila: 20 comprimidos de BenicarAnlo® foram pesados e o peso médio foi determinado. Os comprimidos foram pulverizados até a obtenção de pó fino e homogêneo. Quantidade do pó dos comprimidos equivalente a um peso médio (40 mg de OLMD e 10 mg de ANLO) foi, exatamente, pesada e transferida para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 70 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com o mesmo solvente. A solução foi filtrada com papel de filtro quantitativo, obtendo-se solução a 0,1 mg/mL de ANLO e a 0,4 mg/mL de OLMD.

Solução trabalho de anlodipino e olmesartana medoxomila: 5 mL da solução padrão ou amostra foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v), obtendo-se solução a 20 µg/mL de ANLO e a 80 µg/mL de OLMD. A solução foi filtrada para *vial*.

2.2.1.3 Validação do método analítico

O método analítico desenvolvido para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE foi validado de acordo com as recomendações da Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA e procedimento de validação intralaboratorial definido por SOUZA (2007). Os parâmetros de desempenho avaliados foram: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, estabilidade das soluções de trabalho e robustez.

Todos os cálculos foram feitos com auxílio do *software Microsoft Excel 2007*®. As amostras foram injetadas no cromatógrafo em ordem aleatória durante as análises de linearidade, efeito matriz, precisão e exatidão para evitar que variações temporais das condições cromatográficas interferissem no resultado e garantir a independência

dos resultados. A aleatorização foi feita com auxílio do *software* IBM SPSS *Statistic* 19[®].

2.2.1.3.1 Seletividade

Para a determinação da seletividade do método, foram injetadas solução diluente, fase móvel e uma solução contendo os componentes da formulação (preparada conforme descrito no item 2.2.1.3.3) e foi realizada a análise da pureza dos picos dos fármacos obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra nas concentrações de trabalho, com auxílio do DAD. Essa análise é feita por meio da sobreposição dos espectros na região do ultravioleta obtidos em diferentes pontos do pico cromatográfico. A finalidade dos testes referidos é verificar se há possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção do ANLO e da OLMD. Além disso, a seletividade foi demonstrada frente aos produtos de degradação quando os fármacos foram submetidos a condições de estresse por hidrólise ácida e básica, calor seco, exposição à luz UV e por oxidação.

O procedimento para a realização do teste das amostras sob condições de estresse não é claramente definido pelo guia Q1A(R2) do *International Conference on Harmonisation* (ICH), assim como por outros órgãos regulatórios. Devido à falta de informações detalhadas para a condução desse teste, foi decidido seguir as condições empregadas por PATIL *et al.* (2010). As condições utilizadas estão descritas a seguir.

Hidrólise ácida de ANLO e OLMD: cerca de 10 mg de ANLO e 40 mg de OLMD foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio 40 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com HCl 1 M. A solução foi deixada em banho-maria de 60 °C por 2 horas. Ao final, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e 3 mL de NaOH 1 M foram adicionados para neutralizar a solução. O volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v).

Hidrólise básica de ANLO: cerca de 10 mg de ANLO foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio 40 mL de ACN. A solução

foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com NaOH 1 M. A solução foi deixada à temperatura ambiente por 60 min. Ao final, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e 3 mL de HCl 1 M foram adicionados para neutralizar a solução. O volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v).

Hidrólise básica de OLMD: cerca de 40 mg de OLMD foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio 40 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com NaOH 0,01 M. A solução foi deixada à temperatura ambiente por 5 min. Ao final, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e 3 mL de HCl 0,01 M foram adicionados para neutralizar a solução. O volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v).

Oxidação de ANLO: cerca de 10 mg de ANLO foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio 40 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com H₂O₂ 3%. A solução foi deixada à temperatura ambiente por 10 min. Ao final, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v).

Oxidação de OLMD: cerca de 40 mg de OLMD foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio 40 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com H₂O₂ 30%. A solução foi deixada em banho-maria de 60 °C por 2 horas. Ao final, 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v).

Exposição ao calor seco de ANLO e OLMD: cerca de 10 mg de ANLO e 40 mg de OLMD foram, exatamente, transferidos para vidro relógio. A amostra foi colocada em estufa a 80 °C por 48 horas. Ao final, a amostra foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL com auxílio 70 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com o mesmo solvente. 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v).

Exposição à radiação UV de ANLO e OLMD: cerca de 10 mg de ANLO e 40 mg de OLMD foram, exatamente, transferidos para vidro relógio. A amostra foi exposta à radiação de UV em λ 254 nm por 48 horas. Ao final, a amostra foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL com auxílio 70 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume foi completado com o mesmo solvente. 5 mL foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com ACN:MeOH (50:50;v/v). O mesmo procedimento foi feito com exposição da amostra à radiação de UV em λ 365 nm por 48 horas.

Para todas as condições de estresse testadas, foram utilizadas matérias-primas padronizadas dos fármacos. Foi avaliado se o método analítico foi capaz de separar os picos de interesse dos possíveis produtos de degradação. Além disso, as purezas dos picos de ANLO e OLMD foram verificadas. Nos dias da execução do teste, foram preparadas e injetadas no cromatógrafo curvas analíticas de ANLO e OLMD para quantificação das amostras submetidas às condições de estresse.

2.2.1.3.2 Linearidade

Foi preparada uma solução padrão estoque de ANLO e OLMD. A partir dessa solução, foram preparadas aleatoriamente três soluções de cada nível da curva de calibração, que foi composta por 6 pontos igualmente espaçados. As concentrações de trabalho (100%) otimizadas para as análises foram 20 $\mu\text{g/mL}$ de ANLO e 80 $\mu\text{g/mL}$ de OLMD e o intervalo estabelecido para avaliação da linearidade foi de 40 a 140%, conforme apresentado na **Tabela 2.2**.

A linearidade foi avaliada por meio da estimativa dos parâmetros coeficiente de determinação (R^2), coeficiente angular (b), coeficiente linear (a) e resíduos da regressão pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), também conhecido como regressão linear simples. Após os cálculos desses parâmetros foi construído o gráfico dos resíduos da regressão *versus* a concentração do analito para inspeção visual dos dados.

Os valores dispersos (*outliers*) foram identificados pelo teste de resíduo padronizado de Jackknife ($\alpha=0,05$). A estatística do teste é o resíduo padronizado de Jackknife (J_{ei}) e segue a distribuição *t* de Student (*t*). Os valores de J_{ei} foram calculados para todos os pontos da curva e aqueles maiores que o *t* crítico foram excluídos do cálculo da regressão e considerados valores dispersos. O critério de aceitação utilizado foi que no máximo 22% dos dados originais da curva de calibração podem ser excluídos, além disso, se o ponto for a terceira e última replicata do nível de concentração, não pode ser excluído. Após a exclusão dos *outliers*, os parâmetros da regressão foram calculados.

Tabela 2.2 – Preparo das soluções de ANLO e OLMD para avaliação da linearidade do método de quantificação por CLAE.

Nível (%)	Volume da solução estoque (mL)	Solução diluente q.s.p (mL)	Concentração ANLO ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração OLMD ($\mu\text{g/mL}$)
40	2	25	8	32
60	3	25	12	48
80	4	25	16	64
100	5	25	20	80
120	6	25	24	96
140	7	25	28	112

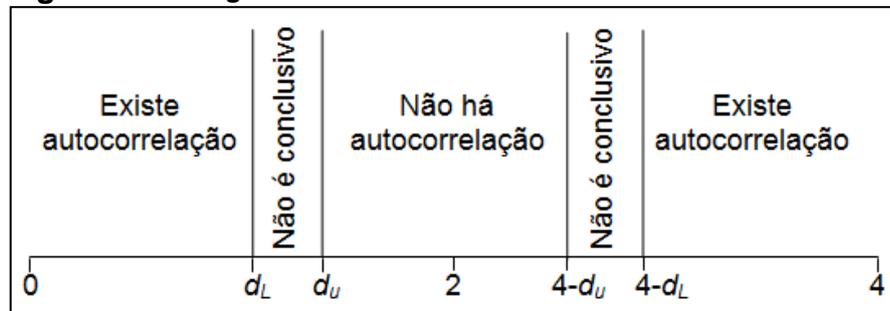
O MMQO parte das premissas que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, possuem variância constante ao longo do eixo x e são independentes. Tais premissas relacionadas à análise de regressão foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de Ryan-Joiner, homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe e independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin-Watson.

O teste de Ryan-Joiner, aplicado para avaliação da normalidade dos resíduos de regressão, testa a hipótese nula (H_0) de que os resíduos seguem a distribuição normal e a hipótese alternativa (H_a) de que os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade. A estatística do teste é o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (R). Para a H_0 não ser rejeitada, R calculado deve ser maior que o R crítico para $\alpha=0,05$.

O teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, aplicado para avaliação da homoscedasticidade dos resíduos de regressão, testa a H_0 de que as variâncias dos resíduos não são diferentes (há homoscedasticidade) e a H_a de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heteroscedasticidade). A estatística do teste é o t de Levene (t_L) e segue a distribuição t de Student. Para a H_0 não ser rejeitada, t_L calculado deve ser menor que o t_L crítico para $\alpha=0,05$.

O teste de Durbin-Watson, aplicado para avaliação da independência entre os resíduos de regressão, testa a H_0 de que não há autocorrelação entre os resíduos (há independência) e a H_a de que há autocorrelação entre os resíduos (não há independência). A estatística do teste é a estatística de Durbin-Watson (d). Para a H_0 não ser rejeitada, d calculado deve estar compreendido entre o limite crítico superior (d_U) e $4-d_U$ para $\alpha=0,05$. Caso o d calculado esteja entre o limite crítico inferior (d_L) e d_U ou entre $4-d_U$ e $4-d_L$, o teste é considerado inconclusivo, conforme mostrado na **Figura 2.2**.

Figura 2.2 – Regra de decisão do teste estatístico de Durbin-Watson.



Fonte: adaptado de SOUZA & JUNQUEIRA, 2005

Após averiguar as premissas dos resíduos da regressão, foi verificada a adequação dos dados ao modelo linear. Como não é possível testar a linearidade, o que se faz é demonstrar que a regressão é significativa e que o desvio da linearidade não é significativo utilizando a análise de variância (ANOVA). A estatística da ANOVA é a razão entre as variâncias (F). Para avaliar a significância da regressão, testa a H_0 de que a regressão não é significativa e a H_a de que a regressão é significativa. Para a H_0 ser rejeitada, F calculado deve ser maior que F crítico para $\alpha=0,05$. Para avaliar o desvio da linearidade, testa a H_0 de que não há desvio da linearidade e a

Ha de que há desvio da linearidade. Para a H_0 não ser rejeitada, F calculado deve ser menor que F crítico para $\alpha=0,05$.

2.2.1.3.3 Efeito matriz

O objetivo do teste de efeito matriz é avaliar se os componentes da matriz, que são os excipientes utilizados na fabricação do medicamento, interferem ou não na quantificação dos analitos de interesse pelo método analítico. Para a avaliação do teste, foi preparada uma curva analítica em solução diluente, conforme descrito no teste de linearidade, e uma curva analítica em matriz.

Para a elaboração da curva analítica matrizada, primeiramente foi preparado um placebo a partir da mistura homogênea dos excipientes indicados na bula do medicamento BenicarAnlo® (**Tabela 2.3**). As quantidades dos excipientes presentes no placebo foram definidas com base nas especificações percentuais descritas por KIBBE (2000).

Tabela 2.3 – Excipientes, com suas respectivas proporções, utilizados para a elaboração do placebo.

Excipiente	Concentração na formulação (%)
Amido pré-gelatinizado	59,80
Celulose microcristalina silicificada	15
Croscarmelose sódica	5
Estearato de magnésio	5
Álcool polivinílico	3
Dióxido de titânico	1
Macrogol	1
Talco	10
Óxido férrico vermelho	0,1
Óxido férrico amarelo	0,1

Após a mistura dos excipientes, foi preparada uma solução placebo pela transferência de 160,14 mg do placebo para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 70 mL de ACN. A solução foi submetida ao ultrassom por 15 min. e o volume completado com o mesmo solvente. Ao final, a solução foi filtrada com papel

de filtro quantitativo. A massa de placebo transferida corresponde à massa de um peso médio dos comprimidos do medicamento BenicarAnlo® subtraída da massa dos princípios ativos.

A curva matrizada foi composta dos mesmos níveis da curva em solução diluente. As três soluções de cada nível de concentração foram preparadas pela adição do volume adequado da solução estoque dos fármacos e pela adição de 5 mL da solução placebo, conforme estabelecido na **Tabela 2.4**. O volume de cada solução foi completado com solução diluente.

Tabela 2.4 – Preparo das soluções de ANLO e OLMD para construção da curva analítica matrizada do método de quantificação por CLAE.

Nível (%)	Volume da solução estoque (mL)	Volume da solução placebo (mL)	Solução diluente q.s.p (mL)	Conc. ANLO (µg/mL)	Conc. OLMD (µg/mL)
40	2	5	25	8	32
60	3	5	25	12	48
80	4	5	25	16	64
100	5	5	25	20	80
120	6	5	25	24	96
140	7	5	25	28	112

Foi verificado se os dados experimentais obtidos para a curva em solução diluente e para a curva matrizada são lineares pela aplicação do MMQO, após a comprovação das premissas e da adequação dos dados ao modelo linear, conforme descrito no teste de linearidade. Uma vez confirmada a linearidade da curva em solução e da curva matrizada, as inclinações e interseções das duas curvas foram comparadas. Entretanto, antes de fazer essa comparação foi preciso avaliar, pelo teste *F* bilateral, se há homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão das curvas. Esse teste confronta a *H*₀ de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (há homoscedasticidade) com a *H*_a de que as variâncias dos resíduos diferem entre si (há heteroscedasticidade). Para a *H*₀ não ser rejeitada, *F* calculado deve ser menor que o *F* crítico para $\alpha=0,05$.

Se as variâncias forem homogêneas, as inclinações e interseções são comparadas pelo teste *t* com variâncias combinadas. Esse teste avalia a *H*₀ de que as inclinações e interseções não diferem entre si e a *H*_a de que as inclinações e

interseções diferem entre si. Para a H_0 não ser rejeitada, t da inclinação da reta para variância homogênea (t_b) e o t da interseção da reta para variância homogênea (t_a) devem ser menor que o t crítico para $\alpha=0,05$. Se as variâncias forem heterogêneas, as inclinações e interseções são comparadas pelo teste t com variâncias distintas. Esse teste avalia a H_0 de que as inclinações e interseções não diferem entre si e a H_a de que as inclinações e interseções diferem entre si. Para a H_0 não ser rejeitada, t da inclinação da reta para variância heterogênea (t_b') e o t da interseção da reta para variância heterogênea (t_a') devem ser menor que o t crítico para $\alpha=0,05$.

Para comprovar a ausência do efeito matriz, as interseções e inclinações das duas retas não podem apresentar diferenças estatisticamente significativas.

2.2.1.3.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método do placebo contaminado em três níveis de concentração dos fármacos (80%, 100% e 120% da concentração de trabalho). A composição do placebo utilizado está descrita no item 2.2.1.3.3.

Para cada nível de concentração, foram preparadas três soluções estoque. Em cada solução foi adicionado a massa de ANLO e OLMD correspondente à concentração e, aproximadamente, 160,14 mg do placebo, conforme especificado na **Tabela 2.5**. A massa de placebo adicionada corresponde à massa de um peso médio dos comprimidos do medicamento BenicarAnlo® subtraída da massa dos princípios ativos.

Tabela 2.5 – Massas pesadas de ANLO, OLMD e placebo para avaliação da exatidão por CLAE.

Nível (%)	Massa do placebo (mg)	Massa do ANLO (mg)	Massa da OLMD (mg)	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)
80	160,14	8	32	16 ANLO + 64 OLMD
100	160,14	10	40	20 ANLO + 80 OLMD
120	160,14	12	48	24 ANLO + 96 OLMD

As massas especificadas na **Tabela 2.5** foram exatamente pesadas e transferidas para balão volumétrico de 100 mL com o auxílio de 70 mL de ACN. As soluções

foram submetidas ao ultrassom por 15 min. e os volumes completados com o mesmo solvente. Em seguida, foram filtradas e 5 mL dos filtrados foram transferidos para balão volumétrico de 25 mL, o volume foi completado com solução diluente.

As amostras foram quantificadas e a recuperação aparente e o desvio padrão relativo (DPR) foram calculados. O teste *t* de *student* foi aplicado para verificar se a recuperação média aparente difere ou não estatisticamente do valor teórico de 100% para $\alpha=0,05\%$. Esse teste confronta a H_0 de que a recuperação média aparente não difere do valor teórico com a H_a de que a recuperação média aparente difere do valor teórico. Para a H_0 não ser rejeitada, *t* calculado deve ser menor que o *t* crítico (ROZET *et al.*, 2007).

A RE 899 (2003) da ANVISA não apresenta critérios de aceitabilidade para as porcentagens individuais de recuperação aparente, por isso foi utilizado o critério de que as porcentagens devem estar compreendidas na faixa de 98-102% (GREEN, 1996).

2.2.1.3.5 Precisão

A repetitividade (precisão intracorrída) foi avaliada por meio de seis determinações do teor do medicamento BenicarAnlo®. Essa análise foi repetida durante três dias consecutivos ($n=18$) para a determinação da reprodutibilidade parcial (precisão intermediária ou precisão intercorrída).

Os teores do medicamento foram calculados e o desvio padrão (DP) para a repetitividade e reprodutibilidade parcial foi estimado por ANOVA ($\alpha=0,05$). Na sequência o DPR foi determinado. Para a utilização da ANOVA foi verificado as seguintes premissas relativas aos resíduos dos teores do medicamento: normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner e homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe.

A RE 899 (2003) da ANVISA determina que o valor máximo aceitável do DPR deve ser definido de acordo com a metodologia empregada e não pode ser superior a 5%.

Para esse trabalho foi estipulado como critério de aceitação o valor de 2% (RIBANI *et al.*, 2004).

2.2.1.3.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram inicialmente estimados baseados na média das inclinações e no desvio padrão do intercepto de três curvas analíticas de cada fármaco, de acordo com as equações 10 e 11, respectivamente. Os dados utilizados no cálculo foram obtidos das curvas analíticas empregadas nos ensaios de linearidade, efeito matriz e exatidão.

$$LD = \frac{DPa \cdot 3}{b} \quad (10)$$

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{b} \quad (11)$$

Onde DPa é o desvio padrão do intercepto e b é a média das inclinações da curva analítica.

A partir dos valores calculados pela equação, foram preparadas soluções em concentrações decrescentes de ANLO e OLMD até a obtenção de uma relação sinal/ruído próxima de 3 para o LD e próxima de 10 para o LQ. Além disso, para a determinação do LQ foi avaliado o DPR das áreas de três soluções diferentes. O DPR deve ser inferior a 2 % para garantir uma precisão adequada ao LQ.

2.2.1.3.7 Estabilidade das soluções de trabalho

Foram avaliadas as estabilidades de soluções amostra e padrão nas concentrações de trabalho a cada hora e durante 8 horas. Para a análise da solução padrão foram preparadas três soluções, a primeira contendo OLMD e ANLO, a segunda contendo ANLO e a terceira contendo OLMD. O objetivo foi verificar se a presença de um fármaco influencia a estabilidade do outro. Em todos os cromatogramas obtidos durante a verificação da estabilidade, foi realizada a análise da pureza dos picos dos fármacos com auxílio do DAD. Como critério de aceitação, foi adotado que as

variações das áreas não devem ser superiores a 2% em relação à área inicial (GREEN, 1996).

2.2.1.3.8 Robustez

A robustez mede a sensibilidade que um método apresenta face às pequenas variações. Um método é considerado robusto se ele não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. A robustez foi determinada por meio do planejamento fatorial de Plackett-Burman que avalia 7 fatores em 15 experimentos ordenados de maneira aleatória. Esse planejamento está demonstrado na **Tabela 2.6**. Cada fator foi estudado em dois níveis, nível superior e inferior. O valor nominal, o nível superior e o nível inferior de cada fator foram representados pelos números 0, +1 e -1, respectivamente (BERZAS *et al.*, 2004).

Tabela 2.6 – Planejamento fatorial de Plackett-Burman utilizado na avaliação da robustez por CLAE.

Fator	Experimento														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0	0
B	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1	0
C	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	-1	-1	-1	0	-1
D	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1	0
E	0	1	0	0	1	1	1	0	0	-1	0	0	-1	-1	-1
F	1	0	1	0	0	1	1	0	-1	0	-1	0	0	-1	-1
G	1	1	0	1	0	0	1	0	-1	-1	0	-1	0	0	-1
Resultado	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	l	m	n	o	p

Os fatores e níveis estudados no teste estão representados na **Tabela 2.7**. Os fatores coluna cromatográfica e cromatógrafo foram avaliados somente no nível +1, foram utilizadas as condições nominais para as análises do nível -1.

Em cada experimento, foram realizadas três injeções da solução amostra do medicamento BenicarAnlo® e três da solução padrão de ANLO e OLMD, nas concentrações de trabalho. Os experimentos foram programados para que todos pudessem ser realizados no mesmo dia. Após trocar a coluna cromatográfica ou

alterar os solventes da fase móvel, foram aguardados 30 minutos para estabilização do sistema.

Tabela 2.7 – Fatores e níveis avaliados durante a robustez do método analítico por CLAE.

Fator	Variação	Nível -1	Nível +1	Nominal (0)
A: fluxo (mL/min.)	±0,2	0,80	1,20	1,0
B: temperatura da coluna (°C)	± 3	27	33	30
C: proporção de orgânico na fase móvel (v/v)	± 2	28:32 (MeOH:ACN)	32:28 (MeOH:ACN)	30:30 (MeOH:ACN)
D: pH da solução de TEA	± 0,25	2,50	3,00	2,75
E: volume de injeção (µL)	± 2	8	12	10
F: coluna	-	-	Shimadzu B*	Shimadzu A
G: cromatógrafo	-	-	Agilent 1200	Agilent HP1100

*Coluna Shimadzu B: apresenta lote diferente da coluna utilizada na validação.

Foram avaliados os efeitos de cada fator no teor do medicamento e nos seguintes parâmetros de conformidade do sistema: fator de retenção, fator de cauda, resolução entre os picos e número de pratos teóricos. Esses efeitos foram calculados conforme preconizado pelo teste de Youden. Para determinação do efeito de cada fator, a média de quatro experimentos com valores nominais (0) foi comparada com a média de quatro experimentos correspondentes ao nível +1 e com a média de quatro experimentos correspondentes ao nível -1. Nas equações 12 e 13, foram exemplificadas as fórmulas utilizadas para o cálculo do efeito do fator A (fluxo da fase móvel) no método.

$$Ea_+ = \frac{\sum(d + f + g + h)}{4} - \frac{\sum(a + b + c + e)}{4} \quad (12)$$

$$Ea_- = \frac{\sum(h + m + o + p)}{4} - \frac{\sum(i + j + l + n)}{4} \quad (13)$$

Onde Ea_+ é a diferença obtida entre a média dos resultados dos experimentos com valores nominais e dos experimentos com valores do nível +1 e Ea_- é a diferença obtida entre a média dos resultados dos experimentos com valores nominais e dos experimentos com valores do nível -1.

Para avaliar se os resultados da robustez atenderam ao critério de aceitação, foi calculada, para cada fator, a diferença entre a soma dos quatro resultados do teor do medicamento correspondentes aos experimentos em condições nominais e a soma dos quatro resultados correspondentes aos experimentos em condições variadas (nível +1 e -1). Nas equações 14 e 15, foram exemplificadas as fórmulas utilizadas para o cálculo da diferença para o fator A (fluxo da fase móvel).

$$Da_+ = \sum(d + f + g + h) - \sum(a + b + c + e) \quad (14)$$

$$Da_- = \sum(h + m + o + p) - \sum(i + j + l + n) \quad (15)$$

Onde Da_+ é a diferença do teor do medicamento obtida entre os resultados dos experimentos com valores nominais e dos experimentos com valores do nível +1 e Da_- é a diferença do teor do medicamento obtida entre os resultados dos experimentos com valores nominais e dos experimentos com valores do nível -1.

O critério de aceitação para o teste foi de que todas as diferenças das somas, obtidas durante a avaliação de cada fator para o teor do medicamento, devem ser inferiores a raiz quadrada de 2 multiplicada pelo desvio padrão das diferenças, conforme critério especificado na equação 16 para o nível +1 do fator A. O desvio padrão das diferenças foi calculado conforme a equação 17 (BERZAS *et al.*, 2004; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

$$\sqrt{2} \cdot S_D > |Da_{(+)}| \quad (16)$$

$$S_D = \sqrt{2 \cdot \frac{\sum Da_+^2 + Da_-^2 + Db_+^2 + Db_-^2 + Dc_+^2 + Dc_-^2 + Dd_+^2 + Dd_-^2 + De_+^2 + De_-^2 + Df_+^2 + Dg_+^2}{7}} \quad (17)$$

Onde S_D é o desvio padrão das diferenças.

2.2.2 Transferência do método analítico de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila por CLAE-DAD para um sistema de CLUE-DAD

As análises cromatográficas por CLUE foram realizadas em cromatógrafo WATERS Acquity com detector DAD.

Para realizar a transferência de CLAE para CLUE do método analítico de quantificação simultânea de ANLO e OLMD com eluição isocrática, as condições analíticas que devem ser modificadas são o volume de injeção e o fluxo da fase móvel. Com auxílio das equações 3 e 4 descritas no item 1.3 desse capítulo, o novo volume de injeção e fluxo da fase móvel foram calculados, respectivamente. Na sequência, a proporção do componente aquoso da fase móvel foi aumentada até que a taxa entre a $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$ e a σ^2_{total} fosse igual a 10%. Essa taxa também foi calculada para o método por CLAE com a finalidade de comparar os dois métodos.

A $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$ foi estimada por meio dos picos de ANLO e OLMD obtidos no sistema cromatográfico sem a coluna. No lugar da coluna foi utilizado um conector com volume morto desprezível. A taxa de aquisição do detector foi ajustada para o maior valor possível e a constante de tempo para o menor valor possível. O desvio padrão (σ) foi calculado pela divisão da largura dos picos a meia altura fornecida pelo cromatograma por 2,355. Esse valor de σ , calculado em minutos, foi multiplicado pelo fluxo da fase móvel em $\mu\text{L}/\text{min.}$, para se obter o $\sigma_{\text{extra-coluna}}$ em μL . O $\sigma_{\text{extra-coluna}}$ foi elevado ao quadrado e a variância foi obtida em μL^2 . Esse mesmo procedimento foi realizado no sistema cromatográfico com a coluna para se estimar a σ^2_{total} (TECHNICAL...,2012; NETO, 2011).

2.2.3 Validação do método analítico por CLUE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada

O método analítico para quantificação simultânea de ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada por CLUE foi validado de acordo com as mesmas recomendações seguidas durante a validação do método por CLAE.

2.2.3.1 Seletividade

Para a determinação da seletividade do método, foram injetadas solução diluente, fase móvel e uma solução contendo os componentes da formulação (preparada conforme descrito no item 2.2.1.3.3). Foi injetada, também, uma solução de olmesartana a 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para avaliar se seu tempo de retenção se difere dos tempos

de ANLO e OLMD, uma vez que a olmesartana é o principal produto de degradação da OLMD.

A análise da pureza dos picos dos fármacos obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra nas concentrações de trabalho foram realizadas com auxílio do DAD. Para o pico ser considerado puro, de acordo com as especificações do equipamento, o ângulo de pureza deve ser inferior ao ângulo limite, ambos determinados pelo software Empower 2. O ângulo de pureza é uma medida da heterogeneidade espectral baseada na comparação de espectros obtidos em vários pontos do pico.

2.2.3.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.1.3.2.

2.2.3.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.1.3.3.

2.2.3.4 Exatidão

A exatidão foi determinada de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.1.3.4.

2.2.3.5 Precisão

A precisão foi determinada de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.1.3.5.

2.2.3.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estimados conforme procedimento especificado no item 2.2.1.3.6.

2.2.3.7 Estabilidade das soluções de trabalho

A estabilidade das soluções de trabalho foi avaliada de acordo com o procedimento descrito no item 2.2.1.3.7.

2.2.3.8 Robustez

A robustez foi avaliada por meio de seis determinações do teor do medicamento BenicarAnlo® nas condições nominais do método e em condições nas quais foram variados os seguintes parâmetros analíticos: fluxo da fase móvel, temperatura da coluna cromatográfica, proporção de solventes orgânico e aquoso da fase móvel e pH da solução de TEA. As variações estabelecidas para cada parâmetro estão demonstradas na **Tabela 2.8**.

Tabela 2.8 – Parâmetros analíticos e variações empregadas para avaliação da robustez do método analítico por CLUE.

Parâmetro	Variação	Valor nominal	Valor inferior	Valor superior
Fluxo da fase móvel (mL/min.)	±0,1	0,613	0,513	0,713
Temperatura da coluna (°C)	± 3	30	27	33
Proporção de solventes orgânico e aquoso na fase móvel (v/v)	± 2	52:48	50:50	54:46
pH da solução de TEA	± 0,1	2,75	2,85	2,65

Em cada condição, foram determinados os seguintes parâmetros de conformidade do sistema: fator de retenção, fator de cauda, resolução entre os picos e número de pratos teóricos. Os teores de ANLO e OLMD obtidos nas condições nominais e nas condições variadas foram estatisticamente comparados por ANOVA ($\alpha=0,05$). Para a utilização da ANOVA foi verificado as seguintes premissas relativas aos resíduos dos teores do medicamento: normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner e homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe (SOUZA; 2007).

2.2.4 Comparação entre os métodos de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila: CLAE e CLUE

O método de quantificação simultânea de ANLO e OLMD por CLAE foi comparado ao método de quantificação por CLUE. Para isso, três lotes do medicamento BenicarAnlo® foram analisados, em sextuplica, por CLAE e por CLUE. Os lotes do medicamento utilizados nas análises foram 10406, 11073 e 20168, com validades 05/2013, 11/2013 e 11/2013, respectivamente. As médias dos teores de cada lote estimadas por CLAE e CLUE foram comparadas por meio do teste *t* de *student* bilateral ($\alpha=0,05$). Para a utilização do teste *t* de *student* foi verificado as seguintes premissas relativas aos resíduos dos teores do medicamento: normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner e homoscedasticidade dos resíduos pelo teste *F* bilateral.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento e validação do método analítico por CLAE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada

3.1.1 Determinação das condições analíticas

Inicialmente, testou-se, como componente aquoso da fase móvel, acetato de amônio 0,05 M (pH=6,80 ajustado com ácido acético), ácido fosfórico 0,05% e 0,1% e ácido fórmico 0,05% e 0,1%. Como componente orgânico foi testado ACN e MeOH em diferentes proporções. Para todas as condições testadas, o pico do ANLO apresentou fator de cauda superior a 2,0. Isso aconteceu porque o ANLO, que é uma base orgânica, interagiu com os grupos de silanóis residuais da fase estacionária. A coluna C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm) utilizada no desenvolvimento do método analítico não passou por processo de capeamento.

Para contornar o problema, foi avaliada uma solução de TEA como componente aquoso. A TEA melhorou significativamente a simetria do pico e diminuiu o tempo de retenção do ANLO. O objetivo da TEA na fase móvel é diminuir o efeito dos grupos silanóis residuais. Por ser um reagente com carga positiva no pH da fase móvel, interage com a carga negativa dos grupos silanóis, reduzindo a retenção do ANLO por troca iônica com os grupos silanóis (SNYDER *et al.*, 1997).

Foram verificados os parâmetros cromatográficos dos picos de OLMD e ANLO em função da presença de TEA em diferentes concentrações no componente aquoso da fase móvel. A composição da fase móvel foi 10% de ACN, 50% de MeOH e 40% de solução de TEA. As concentrações de TEA testadas foram: 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%. Em todas as condições, o pH foi ajustado para 3,00 com ácido fosfórico. A concentração de 0,3% de TEA foi a menor concentração que forneceu picos simétricos para ambos os fármacos e, por isso, foi escolhida para ser o componente aquoso da fase móvel.

Em seguida, os tempos de retenção (t_R) e a resolução entre os picos de OLMD e ANLO foram estudados em diferentes valores de pH da solução de TEA. O pH da solução de TEA foi ajustado com ácido fosfórico em intervalos de 0,25 compreendendo a faixa de 2,50 a 5,00. Após as análises, foi observado que a variação do t_R do ANLO não foi significativa, já para OLMD, o aumento da concentração hidrogeniônica resultou na diminuição do t_R e da R_s entre os picos. Assim, foi definido trabalhar com pH 2,75, o qual proporcionou resolução adequada entre os picos e um tempo de corrida menor.

Após a determinação do componente aquoso da fase móvel, foram avaliados os solventes ACN e MeOH como componentes orgânicos. Ao se utilizar somente ACN, o t_R do ANLO foi próximo ao t_0 do método, o que não é recomendado para análises cromatográficas. Ao se utilizar somente MeOH, a R_s entre os picos de ANLO e OLMD foi inferior ao valor preconizado na literatura, que é de 2,00. Por esses motivos, foi necessário empregar ACN e MeOH como componentes orgânicos da fase móvel. Proporções diferentes desses solventes foram testadas e os resultados estão compilados na **Tabela 2.9** (SNYDER *et al.*, 1997).

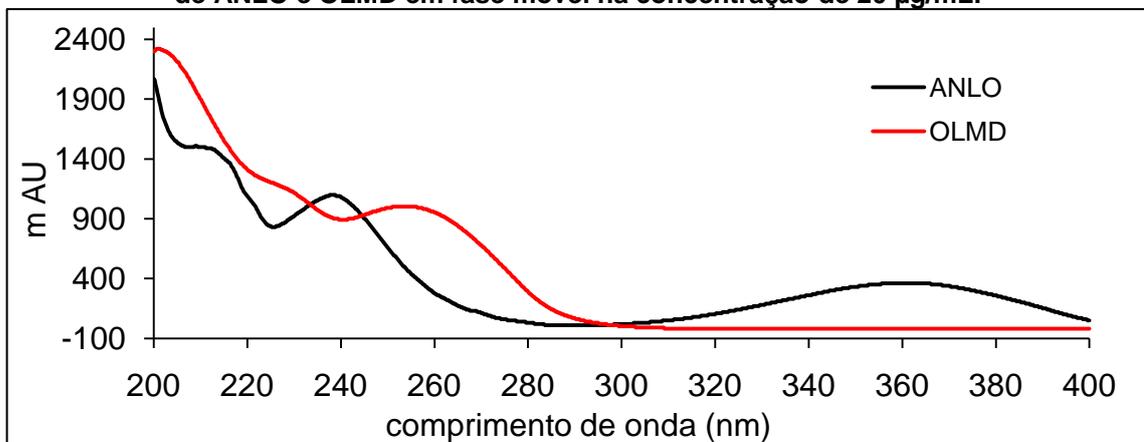
Tabela 2.9 – Parâmetros cromatográficos para ANLO e OLMD em diferentes proporções da fase móvel.

Composição da fase móvel ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75	ANLO		OLMD		R_s	Tempo de corrida (min.)
	k	T	k	T		
10:50:40	0,37	1,27	0,99	1,17	7,47	3,90
20:40:40	0,69	1,15	1,36	1,13	6,32	4,60
30:30:40	1,18	1,01	1,92	1,05	5,29	5,50
40:20:40	1,49	0,92	2,08	1,02	3,66	6,10
50:10:40	1,99	0,91	2,38	0,99	2,08	6,50

A fase móvel composta por ACN, MeOH e TEA 0,3% pH 2,75, na proporção 30:30:40, promoveu adequada separação dos picos de anlodipino e olmesartana medoxomila em um tempo de corrida de 5,5 minutos, que é considerado um tempo curto. Foi, também, a proporção na qual os picos apresentaram fatores de cauda bem próximos a 1,00. Por isso, a proporção 30:30:40 foi escolhida para ser utilizada na validação do método analítico.

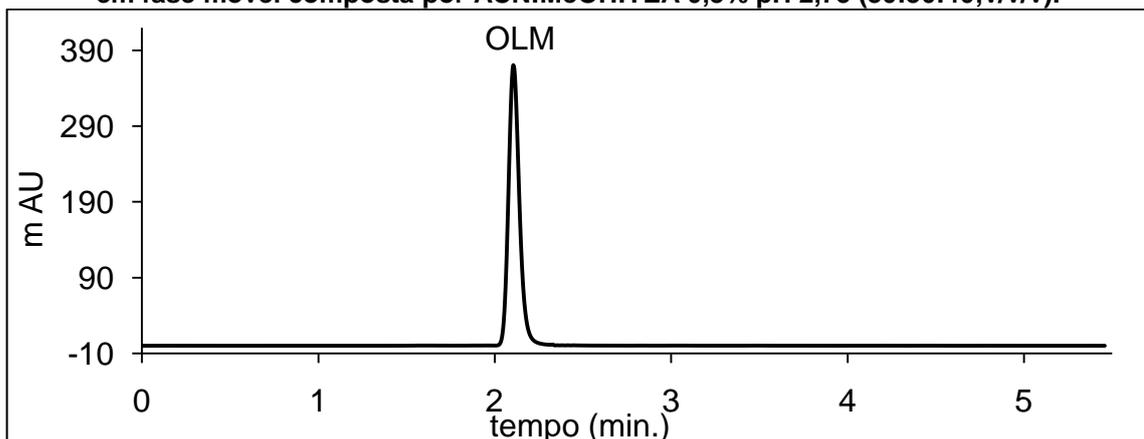
Para determinar o comprimento de onda (λ) de detecção, os espectros de absorção na região do ultravioleta de ANLO e OLMD foram obtidos na faixa λ 200 nm a 400 nm e estão demonstrados na **Figura 2.3**. Os valores dos λ máximos encontrados foram 238 e 360 nm para o ANLO e 254 nm para OLMD. Foi selecionado o λ 238 nm para ser utilizado nas análises, pois apresentou máxima absorvidade para o ANLO, que é o fármaco em menor concentração nos comprimidos de dose fixa combinada. Além disso, esse λ apresentou boa absorvidade para a OLMD.

Figura 2.3 – Espectro de absorção na região do ultravioleta das soluções de ANLO e OLMD em fase móvel na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$.



No início do desenvolvimento do método analítico, foi observado que no decorrer das análises surgia um pico com eluição no t_R de 2,10 min. Para investigar se esse pico correspondia à olmesartana, uma solução padrão de olmesartana a 60 $\mu\text{g/mL}$ foi preparada e injetada no cromatógrafo. O cromatograma obtido está mostrado na **Figura 2.4**.

Figura 2.4 – Cromatograma obtido para a solução da olmesartana a 60 $\mu\text{g/mL}$ em fase móvel composta por ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 (30:30:40;v/v/v).



Pela análise do cromatograma, pode-se observar que o pico realmente corresponde à olmesartana. Esse resultado era esperado, uma vez que a olmesartana medoxomila é facilmente hidrolisada à olmesartana na presença de água. As amostras estavam sendo diluídas em fase móvel, que contém água (BAJERSKI *et al.*, 2008; SHARMA & PANCHOLI, 2009).

Para avaliar a intensidade da degradação da OLMD em diferentes diluentes e escolher uma solução diluente adequada para o método, soluções nas concentrações de trabalho de ANLO e OLMD foram preparadas utilizando os seguintes diluentes: ACN, ACN:MeOH (50:50;v/v), ACN:MeOH:Água (30:30:40;v/v/v) e fase móvel. As áreas dos fármacos foram monitoradas a cada hora e durante 8 horas. Para o ANLO, a degradação foi inferior a 0,5% em todas as condições. Para a OLMD, a degradação em fase móvel foi de 1,4%, em ACN:MeOH:Água (30:30:40;v/v/v) foi de 5,3% e em ACN e ACN:MeOH (50:50;v/v) foi inferior a 0,5% após 8 horas. O pico da OLMD em ACN apresentou uma cauda frontal, por isso a solução diluente ACN:MeOH (50:50;v/v) foi a escolhida para ser utilizada no método analítico de quantificação dos fármacos.

As condições analíticas definidas, após o desenvolvimento do método, estão descritas na **Tabela 2.10**. Um cromatograma obtido nessas condições está representado na **Figura 2.5**. O t_R foi de 3,60 min. para o ANLO e de 4,82 min. para a OLMD.

Figura 2.5 – Cromatograma obtido para a solução de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho e nas condições analíticas definidas após o desenvolvimento do método por CLAE.

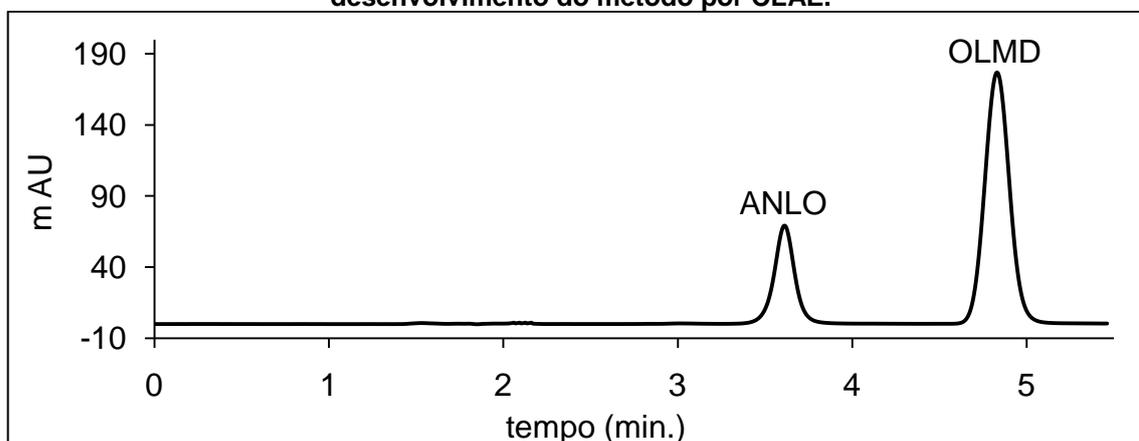


Tabela 2.10 - Condições analíticas estabelecidas para a determinação de ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE.

Parâmetro	Especificação
Coluna	C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm), SHIMADZU
Fase móvel	ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 ajustado com ácido fosfórico (30:30:40;v/v/v)
Solução diluente	ACN:MeOH (50:50;v/v)
Fluxo	1,0 mL/min.
Temperatura da coluna	30 °C
Detecção	238 nm
Volume de injeção	10 µL
Tempo de corrida	5,5 min.
Concentração de trabalho	20 µg/mL para ANLO e 80 µg/mL para OLMD

3.1.2 Validação do método analítico

3.1.2.1 Seletividade

Os cromatogramas obtidos nas análises da solução diluente, fase móvel e da solução contendo os componentes da formulação demonstraram que nenhum interferente eluiu nos tempos de retenção dos fármacos. Com o auxílio do DAD, as purezas dos picos dos fármacos obtidas em cromatogramas de soluções padrão e amostra foram calculadas. Os valores encontrados na solução padrão foram 99,95% e 99,96% para o ANLO e OLMD, respectivamente. Na solução amostra, as purezas espectrais foram 99,93% e 99,95% para o ANLO e OLMD, respectivamente. Os valores elevados de pureza dos picos indicaram que não houve interferentes que eluíram junto com os picos de interesse.

A seletividade também foi demonstrada ao submeter os fármacos a condições de estresse por hidrólise ácida e básica, calor seco, exposição à luz UV e por oxidação. O objetivo do estudo das amostras sob condições de estresse é promover uma degradação de pequena extensão dos fármacos, o que evita a formação de compostos secundários e possibilita conhecer o comportamento químico dos fármacos sob diferentes condições (BAKSHI & SINGH, 2002; SILVA *et al.*, 2009).

A porcentagem de degradação dos fármacos e a pureza dos picos de ANLO e OLMD estão relatadas na **Tabela 2.11**. Todas as purezas dos picos encontradas foram superiores a 99%, o que confirma a seletividade do método.

Tabela 2.11 – Resultados obtidos após as amostras de ANLO e OLMD serem submetidas a condições de estresse.

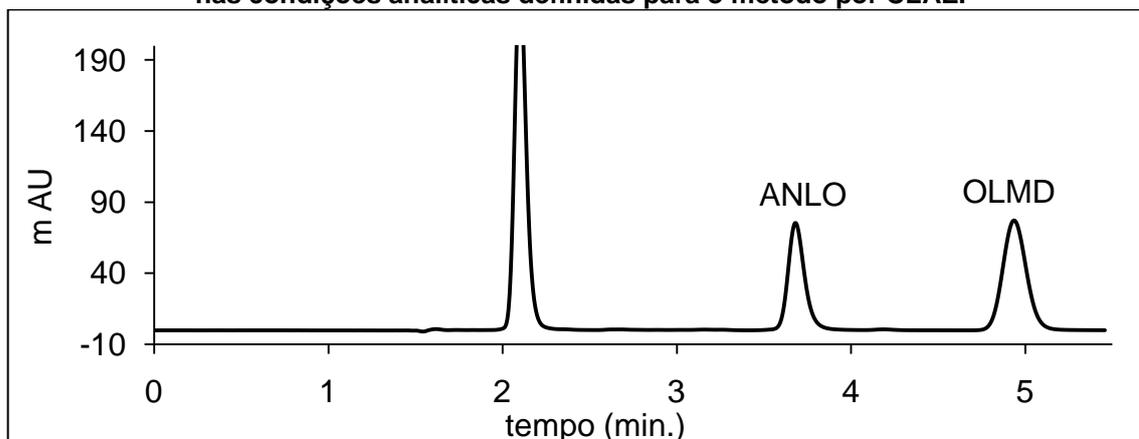
Condição	ANLO		OLMD	
	% de degradação	pureza do pico (%)	% de degradação	pureza do pico (%)
HCl 1 M em banho-maria a 60 °C por 2 horas	11,77	99,51	58,81	99,98
NaOH 1 M por 60 min.	6,54	99,97	-	-
NaOH 0,01 M por 1 min.	-	-	98,39	-
H ₂ O ₂ 3% por 10 min.	8,14	99,96	-	-
H ₂ O ₂ 30% em banho-maria a 60 °C por 2 horas	-	-	61,10	99,98
Estufa a 80 °C por 48 horas	2,21	99,93	n.s.*	99,99
λ 254 por 48 horas	n.s.	99,64	n.s.	99,99
λ 365 por 48 horas	6,41	99,75	1,86	99,98

*n.s. = não significativo.

Os fármacos, ANLO e OLMD, se mostraram estáveis quando expostos ao calor seco de 80 °C e a radiação UV. Apenas o ANLO apresentou uma degradação significativa (6,41%) em λ 365. Esses resultados são similares aos relatados por PATIL e colaboradores (2010).

O cromatograma apresentado na **Figura 2.6** foi obtido após a hidrólise ácida dos fármacos. A OLMD foi mais sensível à hidrólise do que o ANLO. Um produto de degradação foi observado no t_R de 2,10 min., pela análise do espectro desse produto e pelo tempo de retenção, pode-se inferir que possivelmente esse pico corresponde à olmesartana, que é obtida após a hidrólise da OLMD. Entretanto, a pureza desse pico foi de 98,2%, o que sugere a presença de outro(s) produto(s) co-eluído com a olmesartana.

Figura 2.6 – Cromatograma obtido após a hidrólise ácida de ANLO e OLMD nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.



Na hidrólise básica, foram testadas condições diferentes para ANLO e OLMD, uma vez que a OLMD é bem mais susceptível à degradação nessa condição. O cromatograma resultante da hidrólise básica do ANLO está ilustrado na **Figura 2.7**. A degradação desse fármaco foi de 6,54% e não foi verificado nenhum pico de degradação no cromatograma, possivelmente o produto formado não apresenta absorvidade no λ 238 nm. Para a OLMD, inicialmente foi testada hidrólise básica na condição de NaOH 0,01 M por 5 minutos. Nessa condição, foi constatada degradação total da OLMD. Por isso, na sequência, foi avaliada a condição de NaOH 0,01 M por 1 minuto. Essa condição apresentou degradação de 98,39%, como é mostrado na **Figura 2.8**. A área do pico da OLMD no cromatograma foi muito baixa, impossibilitando avaliar sua pureza espectral. Foi detectado apenas um produto de degradação com t_R de 2,10 min. e pureza espectral de 99,97%. Esse produto corresponde, provavelmente, à olmesartana. A OLMD é mais sensível à hidrólise básica que à ácida, esses resultados corroboram com os descritos por PATIL *et al.* (2010) e por SHARMA & PANCHOLI (2009).

A OLMD é um pró-fármaco que é hidrolisado à olmesartana (forma ativa) durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Por isso, a facilidade com que a OLMD é hidrolisada em meio ácido e em meio alcalino é muito importante para a eficácia da terapêutica.

Figura 2.7 – Cromatograma obtido após a hidrólise básica de ANLO nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.

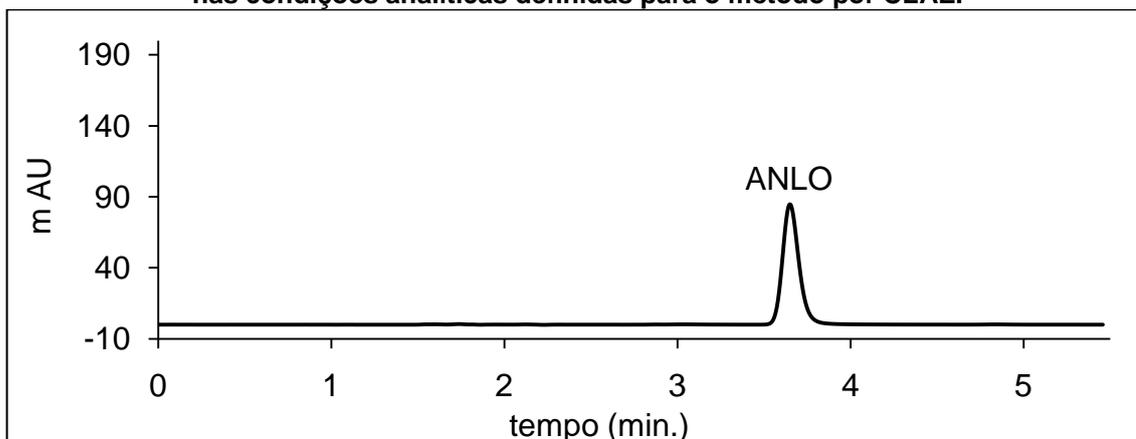
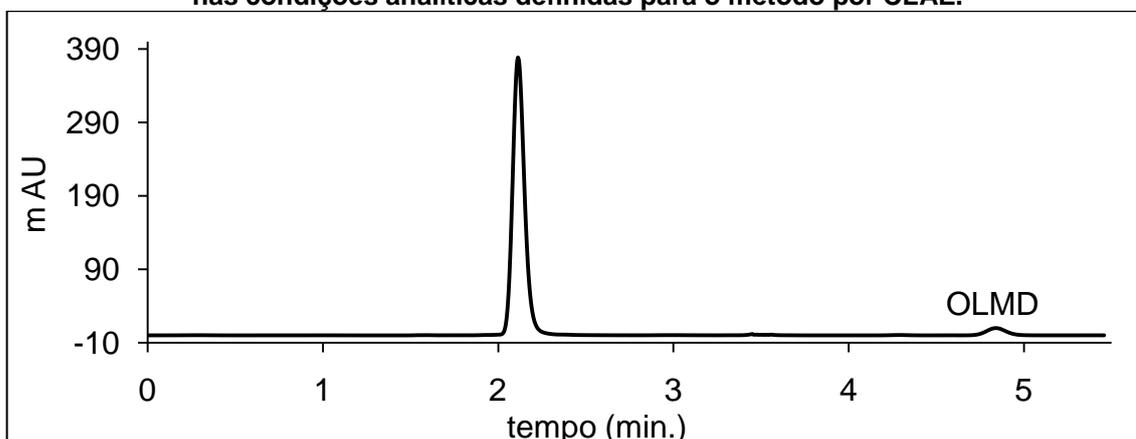


Figura 2.8 – Cromatograma obtido após a hidrólise básica de OLMD nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.



Na oxidação, também, foram testadas condições diferentes para os fármacos, pois o ANLO é mais susceptível ao processo oxidativo. O cromatograma obtido após o ANLO passar pelo processo de oxidação está evidenciado na **Figura 2.9**. A degradação desse fármaco foi de 8,14% e foi verificado um pico com tempo de retenção de 1,66 min., que se refere ao H_2O_2 . Não foi observado nenhum pico de degradação no cromatograma, possivelmente o produto formado não apresenta absorvidade no λ 238 nm. Para a OLMD, a degradação foi de 61,10% e o pico de H_2O_2 também foi detectado no cromatograma, conforme **Figura 2.10**. Para a OLMD, foi observado um produto de degradação com t_R de 2,10 min. e pureza espectral de 95,28% e outro produto com baixa absorvidade e t_R de 2,82 min. Possivelmente, o primeiro produto de degradação corresponde à olmesartana e a outro(s) produto(s) de degradação que apresentam o mesmo tempo de retenção da olmesartana.

Figura 2.9 – Cromatograma obtido após a oxidação de ANLO nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.

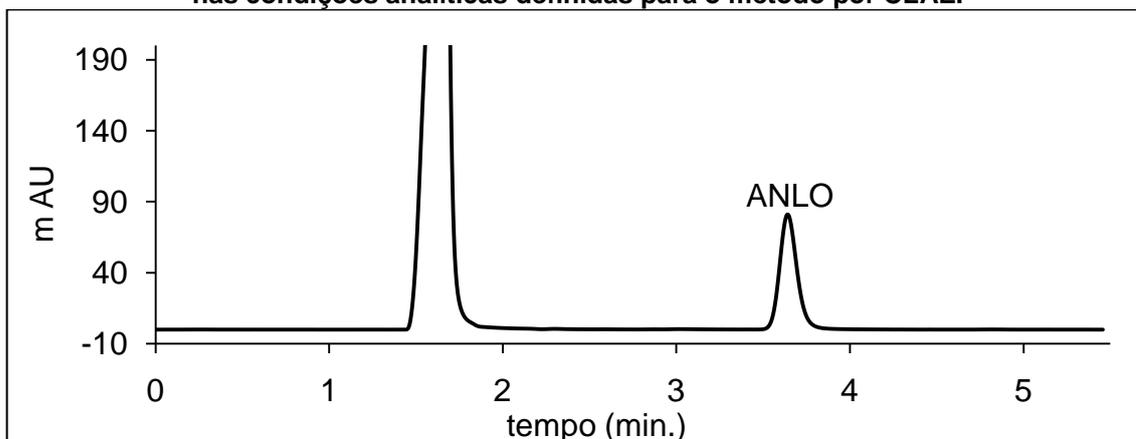
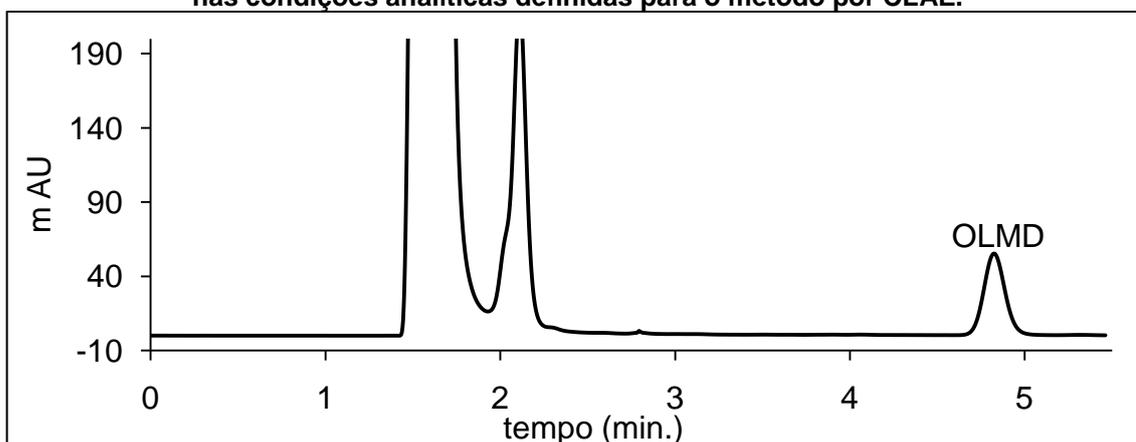


Figura 2.10 – Cromatograma obtido após a oxidação de OLMD nas condições analíticas definidas para o método por CLAE.



3.1.2.2 Linearidade

As concentrações de ANLO e OLMD e suas respectivas áreas obtidas durante a análise da linearidade estão descritas na **Tabela 2.12**. O teste de resíduo padronizado de Jackknife permitiu a identificação de 02 *outliers* para o ANLO, o ponto 1 (primeira replicata do nível de concentração a 40%) e o ponto 14 (segunda replicata do nível de concentração a 120%), os quais correspondem a 11,1% dos dados. Esses pontos foram excluídos do cálculo da regressão linear. Para a OLMD, não foi detectado a presença de *outlier*. Os gráficos dos resíduos da regressão estão apresentados nas **Figuras 2.11 e 2.12**, com indicação dos *outliers* detectados em vermelho. Como se pode observar pela inspeção visual dos gráficos, não há tendência na dispersão dos resíduos.

Tabela 2.12 – Concentração das soluções de ANLO e OLMD e respectivas áreas utilizadas para obtenção da curva analítica do método por CLAE.

PONTO	ANLO		OLMD	
	Conc. µg/mL	Área	Conc. µg/mL	Área
1		238,68		747,19
2	8,07	218,92	32,39	712,27
3		225,58		718,54
4		337,98		1076,00
5	12,10	344,75	48,59	1106,50
6		342,14		1084,60
7		447,60		1443,90
8	16,13	447,65	64,78	1439,70
9		453,6		1453,90
10		562,69		1808,30
11	20,16	563,84	80,98	1802,90
12		555,07		1797,20
13		665,71		2150,20
14	24,20	683,67	97,17	2189,20
15		666,73		2152,80
16		785,18		2529,10
17	28,23	782,21	113,37	2527,50
18		787,05		2537,10

Figura 2.11 – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de ANLO obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.

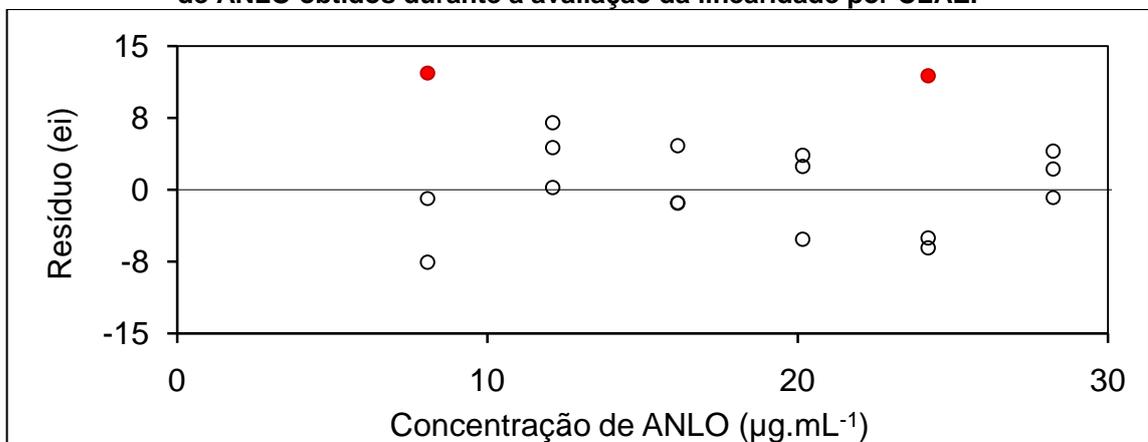
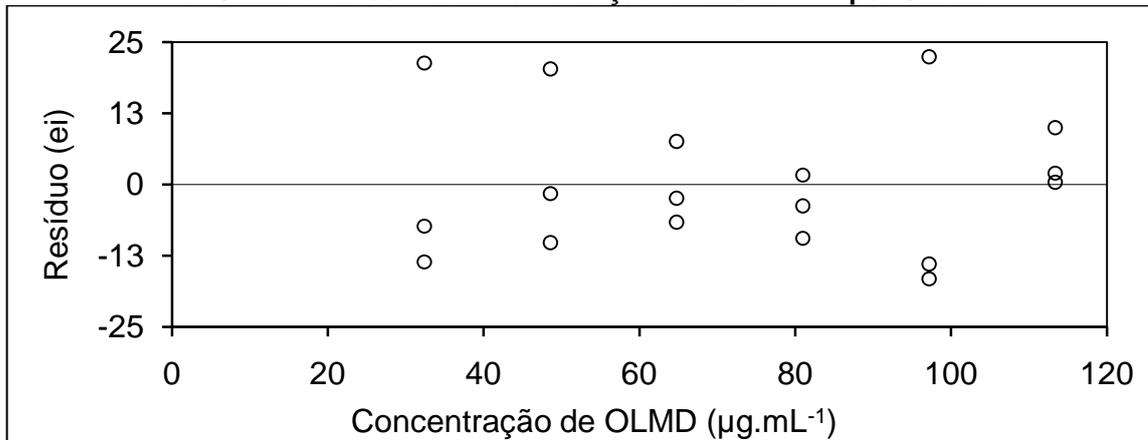


Figura 2.12 – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de OLMD obtidos durante a avaliação da linearidade por CLAE.



Para o teste de Ryan-Joiner, os R calculados foram 0,981 e 0,967 com valores críticos de 0,941 e 0,946 para ANLO e OLMD, respectivamente. Os resultados do teste denotam que o desvio da normalidade não é significativo para $\alpha=0,05$ (R calculado $>$ R crítico). Para o teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, os t_L calculados foram -0,179 e 0,159 com valores críticos de 2,145 e 2,120 para ANLO e OLMD, respectivamente, o que confirma a homoscedasticidade dos resíduos da regressão para $\alpha=0,05$ ($|t_L| < |t$ crítico). Para o teste de Durbin-Watson, os d calculados foram de 1,196 e 2,494 para ANLO e OLMD, respectivamente, e estão compreendidos entre d_U e $4-d_U$, indicando independência dos resíduos da regressão para $\alpha=0,05$.

A significância da regressão foi avaliada por ANOVA ($\alpha=0,05$). Os valores de F calculados, 27124,481 e 43567,337, foram maiores que os F críticos, 4,600 e 4,494, para ANLO e OLMD respectivamente, o que confirma a significância da regressão. O desvio de linearidade também foi avaliado por ANOVA. Os valores de F calculados, 3,024 e 0,181, foram menores que os F críticos, 3,478 e 3,254, para ANLO e OLMD respectivamente, mostrando que não há desvio de linearidade. Assim, pode-se concluir que a alta significância da regressão ($p<0,001$) com desvio de linearidade não significativo ($p>0,05$) para ambos os fármacos sugere que o modelo linear é adequado para quantificar ANLO na faixa de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$ e OLMD na faixa de 32 a 108 $\mu\text{g/mL}$.

Os parâmetros da regressão linear foram calculados para ANLO e OLMD após a ratificação das premissas do MMQO e a exclusão dos *outliers* e estão demonstrados na **Tabela 2.13**.

Tabela 2.13 – Parâmetros da regressão obtidos para a quantificação de ANLO e OLMD por CLAE.

Parâmetro da regressão	ANLO	OLMD
R ²	0,9995	0,9996
b	27,6057	22,2430
a	3,7244	5,4229

3.1.2.3 Efeito matriz

O teste de resíduo padronizado de Jackknife permitiu a identificação de: 02 *outliers* para o ANLO na curva analítica em solução, o ponto 14 (segunda replicata do nível de concentração a 120%) e o ponto 18 (terceira replicata do nível de concentração a 140%); 02 *outliers* para o ANLO na curva analítica em matriz, o ponto 15 (terceira replicata do nível de concentração a 120%) e o ponto 17 (primeira replicata do nível de concentração a 140%); 01 *outlier* para a OLMD na curva analítica em solução, o ponto 14 (segunda replicata do nível de concentração a 120%); 01 *outlier* para a OLMD na curva analítica em matriz, o ponto 15 (segunda replicata do nível de concentração a 120%). Os gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e demonstraram distribuição aleatória, não apresentando qualquer tendência. As premissas relacionadas ao MMQO e a adequação ao modelo linear foram confirmadas para as duas curvas. Os resultados estão descritos nas **Tabelas 2.14 e 2.15**.

Os parâmetros da regressão linear foram calculados para as duas curvas após a comprovação das premissas do MMQO e a exclusão dos *outliers* e estão demonstrados na **Tabela 2.16**.

Tabela 2.14 – Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em solução durante a avaliação do efeito matriz por CLAE ($\alpha = 0,05$).

Teste Estatístico	Estatística	Curva analítica em solução			
		ANLO	CA*	OLMD	CA
Ryan-Joiner	R	0,988	>0,941	0,989	>0,944
Levene modificado	t_L	-1,058	< 2,145	-1,860	< 2,131
Durbin-Watson	d	1,696	>1,37;<2,63	2,137	>1,38;<2,62
Significância da regressão	F	13554,066	>4,600	23876,016	>4,543
Desvio de linearidade	F	1,641	<3,478	0,729	<3,357

*CA - critério de aceitação

Tabela 2.15 – Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLAE ($\alpha = 0,05$).

Teste Estatístico	Estatística	Curva analítica em matriz			
		ANLO	CA*	OLMD	CA
Ryan-Joiner	R	0,976	>0,941	0,984	>0,944
Levene modificado	t_L	0,891	< 2,145	-0,968	< 2,131
Durbin-Watson	d	2,081	>1,37;<2,63	2,457	>1,38;<2,62
Significância da regressão	F	24349,409	>4,600	25052,190	>4,543
Desvio de linearidade	F	0,478	<3,478	0,303	<3,357

*CA - critério de aceitação

Tabela 2.16 – Parâmetros da regressão obtidos para a curva em solução e em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLAE.

Parâmetro da regressão	Curva em solução		Curva em matriz	
	ANLO	OLMD	ANLO	OLMD
R^2	0,9990	0,9994	0,9994	0,9994
b	26,5550	22,2490	26,1486	22,6262
a	2,2731	8,8763	-7,3665	-12,2334

O teste F indicou homogeneidade das variâncias dos resíduos das curvas em solução e em matriz para os fármacos. Os valores de F calculados, 1,815 e 1,010, foram menores que os F críticos, 2,484 e 2,403, para ANLO e OLMD, respectivamente. Por isso, foi utilizado o teste t com variâncias combinadas para a

avaliação do efeito matriz. Os valores de t_a e t_b calculados para o ANLO foram 1,944 e 1,438, ambos menores que o t crítico de 2,048. Para a OLMD, os valores calculados de t_a e t_b foram 1,753 e 1,859, ambos, também, menores que o t crítico de 2,042 ($\alpha=0,05$). Esses resultados indicaram que não há diferenças significativas entre as inclinações e interseções das curvas, o que evidencia ausência de efeito matriz. A comprovação da ausência de efeito matriz é importante para garantir que as soluções padrão preparadas com solução diluente possam ser utilizadas para a quantificação das soluções amostra.

3.1.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método do placebo contaminado. As amostras foram quantificadas por meio de uma curva analítica e as recuperações aparentes obtidas nos níveis 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho estão reportadas na **Tabela 2.17**.

Tabela 2.17 – Valores de recuperação aparente obtidos para avaliação da exatidão de ANLO e OLMD por CLAE.

Nível (%)	Recuperação aparente ANLO (%)	Recuperação aparente OLMD (%)
80	98,32	100,86
80	99,84	99,25
80	99,23	99,00
100	99,80	99,29
100	101,59	100,94
100	101,50	101,66
120	101,38	101,53
120	100,47	100,47
120	99,81	99,79
Média (%)	100,22	100,31
DPR (%)	1,12	1,01

As médias das recuperações aparentes calculadas para ANLO e OLMD foram comparadas ao valor teórico de 100% pelo teste t ($\alpha=0,05$). Os valores de t calculado, 0,580 e 0,920, para ANLO e OLMD, respectivamente, foram inferiores ao t crítico de 2,306. Portanto, não houve diferença significativa entre as médias das

recuperações aparentes e 100%. Os valores individuais das recuperações aparentes permaneceram na faixa de 98-102% e os DPR foram inferiores a 2%, o que também comprova a exatidão do método.

3.1.2.5 Precisão

A repetitividade e a reprodutibilidade parcial foram calculadas após seis determinações do teor do medicamento BenicarAnlo® em três dias consecutivos. As médias dos teores, DP e DPR calculados para os fármacos estão descritos na **Tabela 2.18**. O DP foi estimado por ANOVA ($\alpha=0,05$) e as premissas quanto à sua utilização foram demonstradas. A normalidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner com R calculados de 0,986 e 0,974, respectivamente para ANLO e OLMD, maiores que o R crítico de 0,946 ($\alpha=0,05$). A homoscedasticidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, com *F* calculados de 0,776 e 0,715, respectivamente para ANLO e OLMD, menores que o *F* crítico de 3,682 ($\alpha=0,05$).

Tabela 2.18 – Valores do teor, DP e DPR obtidos para avaliação da precisão de ANLO e OLMD por CLAE.

Parâmetro	ANLO	OLMD
Média do teor (n=18) (%)	98,47	94,47
DP repetitividade (n=6)	0,87	0,70
DPR repetitividade (n=6) (%)	0,88	0,74
DP reprodutibilidade parcial (n=18)	0,87	0,87
DPR reprodutibilidade parcial (n=18) (%)	0,88	0,92

Para o ANLO, o DP da repetitividade e da reprodutibilidade parcial foram considerados equivalentes pelo cálculo por ANOVA, conforme relatado na **Tabela 2.18**. Todos os valores de DPR calculados foram inferiores a 2%, demonstrando a precisão do método.

2.1.2.6 Limites de detecção e quantificação

Os LD e LQ estimados a partir das equações que levam em consideração os parâmetros da curva analítica foram 0,63 µg/mL e 2,10 µg/mL para o ANLO e 1,97

$\mu\text{g/mL}$ e $6,57 \mu\text{g/mL}$ para a OLMD, respectivamente. Os cromatogramas obtidos nessas concentrações apresentaram relações sinal/ruído bem superiores a 10.

Para a determinação do LD real, as soluções de OLMD e ANLO foram diluídas sucessivamente e injetadas no cromatógrafo até a obtenção da relação sinal/ruído próxima a 3. Os valores de LD encontrados foram $0,095 \mu\text{g/mL}$ e $0,114 \mu\text{g/mL}$ para ANLO e OLMD, respectivamente. Os cromatogramas referentes aos LD estão representados nas **Figuras 2.13 e 2.14**.

Figura 2.13 – Cromatograma obtido para o LD de ANLO ($0,095 \mu\text{g/mL}$) por CLAE.

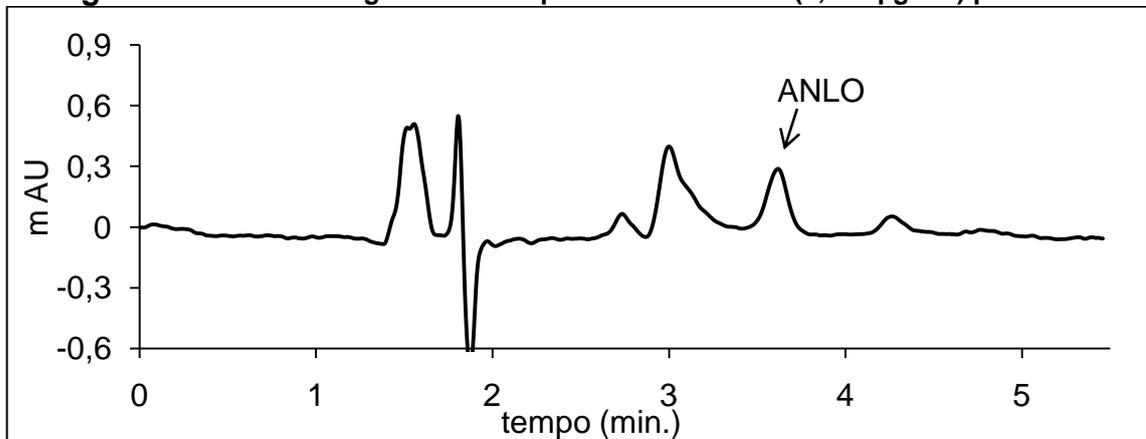
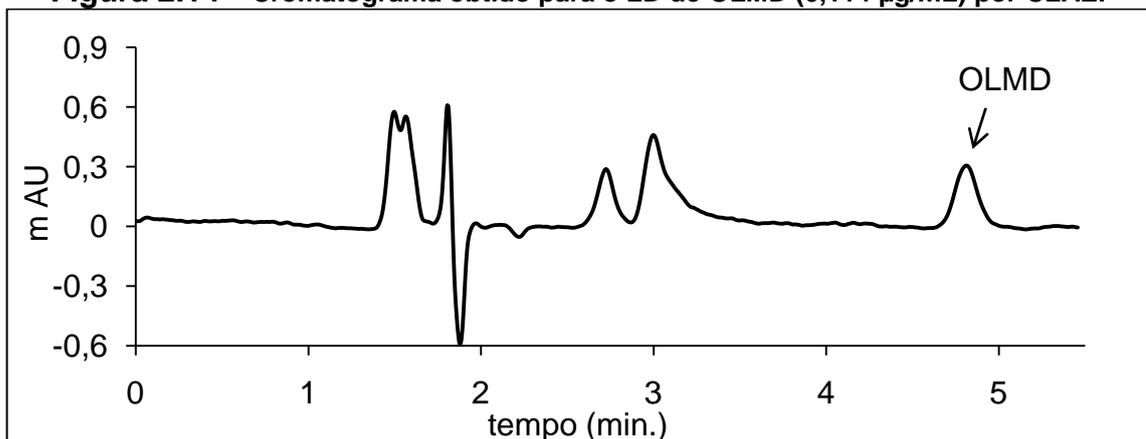


Figura 2.14 – Cromatograma obtido para o LD de OLMD ($0,114 \mu\text{g/mL}$) por CLAE.



Para a determinação do LQ real, as soluções de OLMD e ANLO foram diluídas sucessivamente e injetadas no cromatógrafo até a obtenção da relação sinal/ruído próxima a 10, entretanto, quando se obteve essa relação, os valores do DPR das áreas de três soluções foram superiores a 2%, não apresentando precisão adequada. Por isso, foi avaliada a menor concentração que proporcionou um DPR

inferior a 2% e essa concentração foi definida como LQ. Para o ANLO, o LQ foi de 0,318 $\mu\text{g/mL}$ com DPR de 1,67%, já para a OLMD, o LQ foi de 0,485 $\mu\text{g/mL}$ com DPR de 0,33%. Os cromatogramas referentes aos LQ estão representados nas Figuras 2.15 e 2.16.

Figura 2.15 – Cromatograma obtido para o LQ de ANLO (0,318 $\mu\text{g/mL}$) por CLAE.

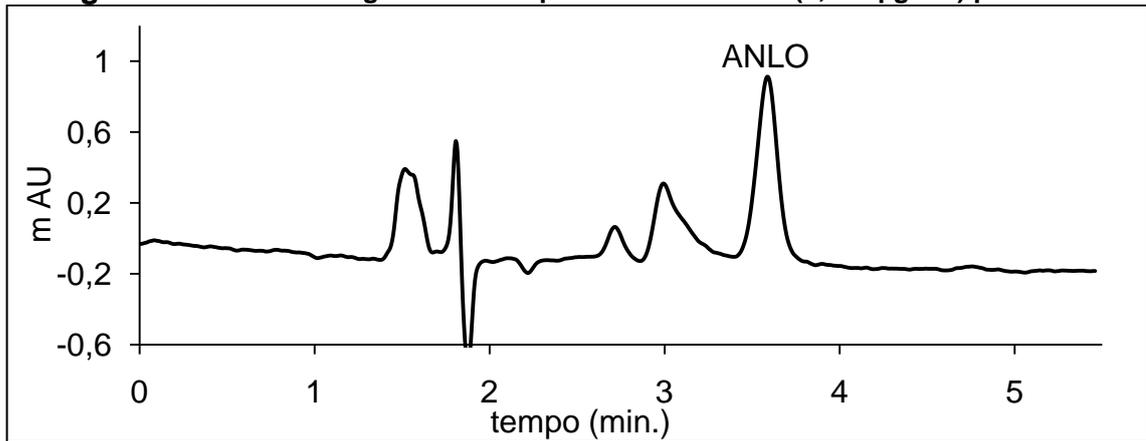
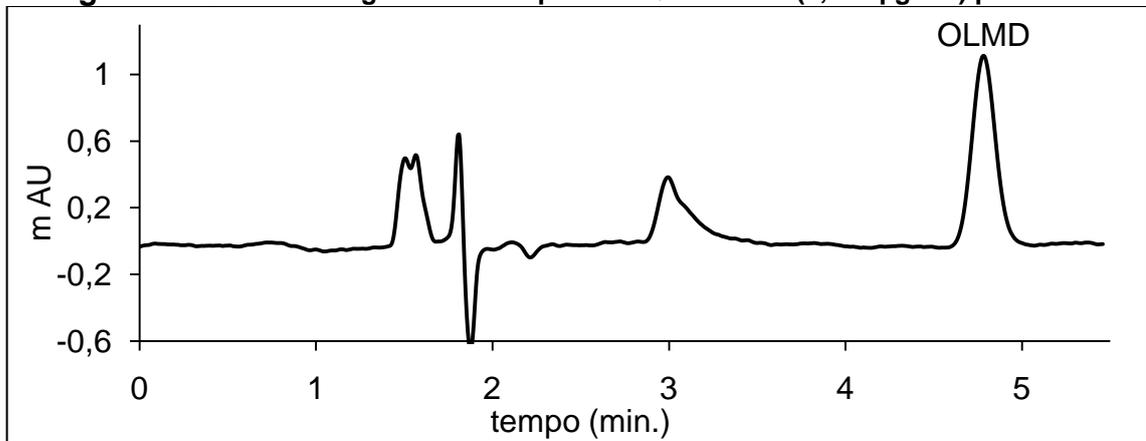


Figura 2.16 – Cromatograma obtido para o LQ de OLMD (0,485 $\mu\text{g/mL}$) por CLAE.



Como se pode observar, os LD e LQ calculados pelos parâmetros da curva analítica são significativamente maiores do que aqueles determinados pela avaliação das respostas obtidas com soluções diluídas. Esses resultados eram esperados, uma vez que para os LD e LQ calculados pelos parâmetros da curva analítica serem próximos ao valor real estimado, seria necessário construir curvas analíticas com faixa de concentrações próximas aos valores dos limites (RIBANI *et al.*, 2004).

3.1.2.7 Estabilidade das soluções de trabalho

A estabilidade de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho foi verificada injetando uma solução amostra, uma solução padrão contendo ambos os fármacos, uma solução padrão contendo somente ANLO e uma solução padrão contendo somente OLMD nos tempos 0, 1, 2, 4, 5, 6, 7, e 8 horas após o preparo. As variações das áreas em porcentagem dos picos referentes aos fármacos estão apresentadas graficamente nas **Figuras 2.17 e 2.18**.

Figura 2.17 – Variações das áreas dos picos de ANLO obtidas para avaliação da estabilidade por CLAE.

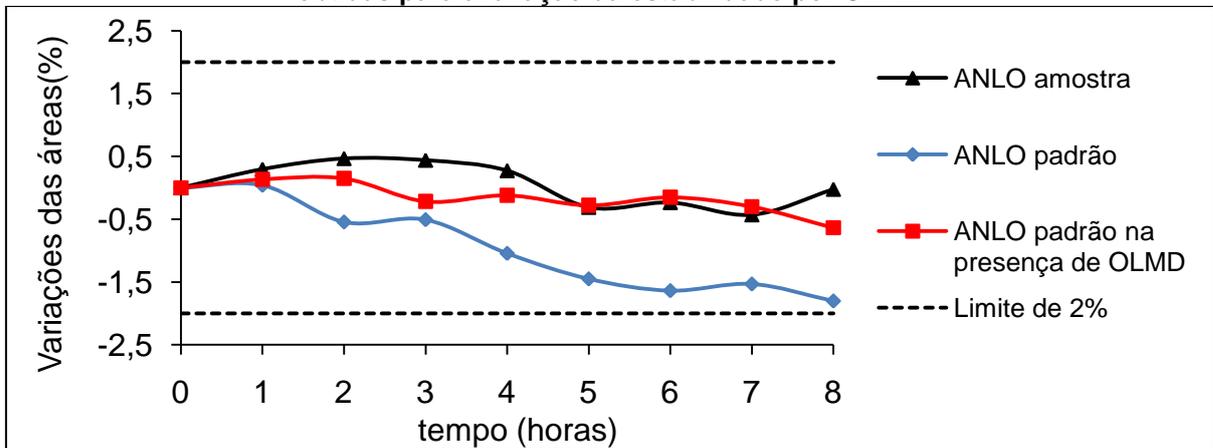
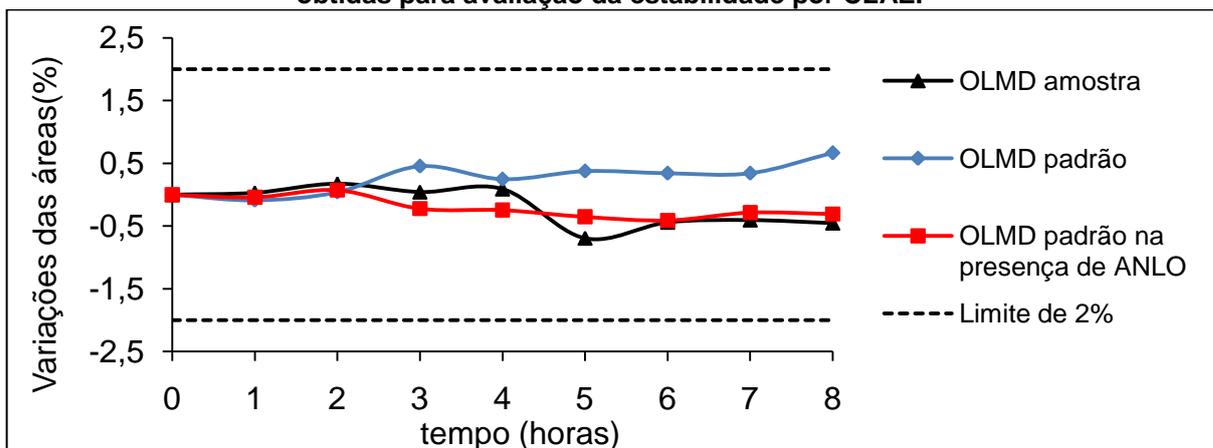


Figura 2.18 – Variações das áreas dos picos de OLMD obtidas para avaliação da estabilidade por CLAE.



Para todos os cromatogramas obtidos durante a verificação da estabilidade, as purezas dos picos de ANLO e OLMD foram superiores a 99%, indicando que não houve possíveis produtos de degradação co-eluído com os fármacos. As variações

das áreas em relação ao tempo inicial foram inferiores a 2% para os fármacos em todas as soluções analisadas, por isso, pode-se inferir que as soluções de trabalho são estáveis durante um período de 8 horas após o preparo.

3.1.2.8 Robustez

A robustez foi avaliada com o auxílio do planejamento fatorial de Plackett-Burman. Os dados foram analisados por meio do cálculo da diferença entre as somas dos resultados do teor do medicamento obtidos nas condições nominais e nas condições variadas (nível +1 e -1). Para o método ser considerado robusto, o módulo das diferenças calculadas deve ser inferior a raiz quadrada de 2 multiplicada pelo desvio padrão das diferenças. As diferenças para cada fator, os desvios padrão e os critérios de aceitação foram calculados para ANLO e OLMD conforme as equações demonstradas no item 2.2.1.3.8. Os resultados estão representados na **Tabela 2.19**.

Tabela 2.19 – Diferença entre as somas dos resultados do teor do medicamento obtidos nas condições normais e nas condições variadas (nível +1 e -1) para cada fator, desvio padrão das diferenças e critério de aceitação para a robustez por CLAE.

Diferença entre as somas	ANLO	OLMD
Da(+)	-0,45	0,47
Da(-)	-0,57	0,08
Db(+)	0,62	-0,13
Db(-)	-0,16	0,49
Dc(+)	0,09	0,17
Dc(-)	0,09	0,05
Dd(+)	-0,05	-0,55
Dd(-)	-0,21	-0,70
De(+)	-0,61	-0,15
De(-)	0,26	0,10
Df(+)	-0,13	0,01
Dg(+)	0,41	-0,09
Desvio padrão(S_D)	0,68	0,62
Critério de aceitação ($\sqrt{2 \cdot S_D}$)	0,96	0,88

Conforme observado na **Tabela 2.19**, todos os módulos das diferenças calculadas para os fármacos são inferiores ao valor máximo aceitável. Dessa forma, pode-se

concluir que o método para quantificação de ANLO e OLMD é robusto para os parâmetros testados.

Os efeitos de cada fator no teor, fator de retenção, fator de cauda, resolução entre os picos e número de pratos teóricos também foram avaliados. O objetivo dessa análise é conhecer a ordem de influência de cada uma das variações dos efeitos nos resultados finais. Para calcular o efeito, a média dos resultados obtidos nas condições variadas (nível +1 e -1) foi subtraída da média dos resultados obtidos nas condições nominais. Os efeitos estimados para cada fator estão mostrados na **Tabela 2.20** para o ANLO e na **Tabela 2.21** para a OLMD.

Tabela 2.20 – Resultados da influência dos efeitos no teor, fator de retenção, fator de cauda e números de pratos teóricos para o ANLO obtidos durante a avaliação da robustez por CLAE.

	Fator	Teor (%)	k	T	N
A	Fluxo (+) 1,2 mL/min.	98,01-97,90 = 0,11	1,12-1,10 = 0,02	0,89-0,92 = -0,03	5131-4653 = 478
	Fluxo (-) 0,8 mL/min.	97,76-97,61 = 0,15	1,05-1,05 = 0,00	1,07-1,07 = 0,00	5252-5813 = -561
B	Temperatura da coluna (+) 33 °C	97,87-98,03 = -0,15	1,13-1,09 = 0,04	0,93-0,88 = 0,05	4722-5062 = -340
	Temperatura da coluna (-) 27 °C	97,71-97,67 = 0,04	1,01-1,09 = -0,08	1,07-1,09 = -0,02	5479-5587 = -108
C	Fase móvel (+) (28:32;v/v) ACN/ MeOH	97,94-97,96 = -0,02	1,06-1,16 = -0,10	0,90-0,91 = -0,01	4882-4901 = -19
	Fase móvel (-) (32:28;v/v) ACN/ MeOH	97,67-97,70 = -0,03	1,10-1,01 = 0,09	1,06-1,09 = -0,03	5502-5564 = -62
D	pH da solução de TEA (+) 3,00	97,96-97,94 = 0,02	1,11-1,12 = -0,01	0,90-0,91 = -0,01	4834-4950 = -116
	pH da solução de TEA (-) 2,50	97,71-97,66 = 0,05	1,06-1,05 = 0,01	1,09-1,06 = 0,03	5526-5540 = -14
E	volume de injeção (+) 12 µL	98,03-97,88 = 0,15	1,12-1,11 = 0,01	0,94-0,87 = 0,07	4980-4803 = 177
	volume de injeção (-) 8 µL	97,65-97,71 = -0,06	1,05-1,05 = 0,00	1,01-1,14 = -0,13	5337-5729 = -392
F	Coluna Shimadzu B	97,97-97,94 = 0,03	1,12-1,10 = 0,02	0,94-0,87 = 0,07	5376-4407 = 969
G	Cromatógrafo Agilent 1200	97,90-98,00 = -0,10	1,07-1,15 = -0,08	0,92-0,89 = 0,03	4346-5437 = -1091

Tabela 2.21 – Resultados da influência dos efeitos no teor, fator de retenção, fator de cauda, números de pratos teóricos e resolução entre os picos para a OLMD durante a avaliação da robustez por CLAE.

	Fator	Teor (%)	k	T	N	R_s
A	Fluxo (+) 1,2 mL/min.	94,99-95,11 = -0,12	1,85-1,82 = 0,03	0,93-0,95 = -0,02	4691-4514 = 177	5,06-4,89 = 0,17
	Fluxo (-) 0,8 mL/min.	94,81-94,83 = -0,02	1,64-1,65 = -0,01	1,09-1,09 = 0,00	6469-6828 = -359	4,79-5,06 = -0,27
B	Temperatura da coluna (+) 33 °C	95,07-95,04 = 0,03	1,84-1,83 = 0,01	0,98-0,90 = 0,08	4615-4591 = 24	4,83-5,12 = -0,29
	Temperatura da coluna (-) 27 °C	94,76-94,88 = -0,12	1,61-1,67 = -0,06	1,09-1,09 = 0,00	6583-6714 = -131	5,05-4,80 = 0,25
C	Fase móvel (+) (28:32;v/v) ACN/ MeOH	95,03-95,08 = -0,05	1,78-1,89 = -0,11	0,95-0,93 = 0,02	4618-4587 = 31	5,08-4,87 = 0,21
	Fase móvel (-) (32:28;v/v) ACN/ MeOH	94,82-94,83 = -0,01	1,69-1,60 = 0,09	1,08-1,10 = -0,02	6522-6775 = -253	4,79-5,06 = -0,27
D	pH da solução de TEA (+) 3,00	95,12-94,98 = 0,14	1,79-1,88 = -0,09	0,95-0,93 = 0,02	4781-4424 = 357	4,76-5,20 = -0,44
	pH da solução de TEA (-) 2,50	94,91-94,73 = 0,18	1,74-1,55 = 0,19	1,08-1,09 = -0,01	6576-6721 = -145	5,56-4,29 = 1,27
E	volume de injeção (+) 12 µL	95,07-95,03 = 0,04	1,85-1,82 = 0,03	0,98-0,90 = 0,08	5142-4063 = 1079	5,19-4,76 = 0,43
	volume de injeção (-) 8 µL	94,81-94,83 = -0,02	1,64-1,64 = 0,00	1,06-1,11 = -0,05	6019-7278 = -1258	4,42-5,12 = -0,40
F	Coluna Shimadzu B	95,05-95,05 = 0,00	1,89-1,78 = 0,11	0,92-0,96 = -0,04	4652-4554 = 98	5,34-4,61 = 0,73
G	Cromatógrafo Agilent 1200	95,06-95,04 = 0,02	1,76-1,91 = -0,15	1,00-0,89 = 0,11	4709-4497 = 212	4,77-5,18 = -0,41

De acordo com os resultados das **Tabelas 2.20 e 2.21**, as influências dos efeitos no teor do medicamento foram inferiores a 0,15% e a 0,18% para ANLO e OLMD, respectivamente, o que comprova a robustez do método.

A modificação da proporção dos solventes orgânicos da fase móvel influenciou consideravelmente os fatores de retenção dos fármacos. O aumento da proporção de MeOH diminuiu a força da fase móvel, aumentando o *k*. Já o aumento da proporção de ACN aumentou a força da fase móvel, diminuindo o *k*. Os valores eluotrópicos em sílica é de 0,50 para a ACN e de 0,73 para o MeOH. Quanto maior o valor eluotrópico, maior a polaridade do solvente, assim a ACN é menos polar do que o MEOH, o que justifica a ACN aumentar a força de eluição da fase móvel em relação ao MEOH. A coluna de lote diferente ocasionou uma redução significativa do

k da OLMD, embora a coluna seja de mesmo fabricante da coluna utilizada no método, pode ocorrer uma pequena alteração da seletividade da coluna de um lote para outro. A alteração do cromatógrafo provocou um aumento dos k de ambos os fármacos, provavelmente isso pode ser explicado pela diferença do comprimento das tubulações que levam a amostra à coluna. Tubulações mais compridas tendem a diminuir o k (LANÇAS, 2004).

O fator cauda foi pouco influenciado pelas variações dos fatores estudados. A variação maior foi para o ANLO quando o volume de injeção foi reduzido para 8 μ L, nessa condição ocorreu um aumento do T. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da solução diluente utilizada no método ser diferente da fase móvel. Durante o desenvolvimento do método foi observado que o pico do ANLO apresentou melhor simetria com a solução diluída em ACN:MeOH (50:50;v/v) do que com a solução diluída em fase móvel.

Para o ANLO, foi observado um aumento pronunciado do número de pratos teóricos para as análises realizadas no cromatógrafo Agilent 1200. Quanto menos retido for o analito, menor é a σ^2_{coluna} e mais significativo é o efeito da $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$. Esse efeito é responsável por diminuir o N e, conseqüentemente, alargar o pico. Possivelmente a $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$ do equipamento HP1100 é maior do que a do equipamento 1200. Para se diminuir a $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$, é preciso, por exemplo, reduzir o espaço morto, o comprimento e diâmetro das tubulações e o volume da cela de detecção. Para a OLMD, foi observada uma elevação considerável do N com o aumento do volume de injeção e uma redução com a diminuição do volume de injeção. O aumento do volume de injeção provoca um aumento da massa do fármaco injetada na coluna que é responsável pela redução do N (NETO, 2011; SNYDER *et al.*, 1997).

A resolução entre os picos sofreu uma importante redução quando o pH da solução de TEA foi alterado para 2,50. Nessa condição, houve a maior redução do k da OLMD e o k do ANLO praticamente permaneceu inalterado, justificando a perda da resolução.

3.2 Transferência do método analítico de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila por CLAE-DAD para um sistema de CLUE-DAD

O novo volume de injeção e fluxo da fase móvel para o método por CLUE, calculados de acordo com as equações 3 e 4 descritas no item 1.3 desse capítulo, foram 0,7 μL e 0,613 mL/min. A temperatura da coluna cromatográfica (30 °C) e o comprimento de onda de detecção (λ 238 nm) foram os mesmos do método por CLAE. A taxa de aquisição do detector foi de 20 Hz para CLUE e 2,5 Hz para CLAE, já a constante de tempo do filtro de ruído do detector foi de 0,1 s para CLUE e 2 s para CLAE.

Após a transferência do método por CLAE utilizando uma coluna C_{18} (150 x 4,6 mm; 5 μm) para CLUE utilizando uma coluna C_{18} (50 x 2,1 mm; 1,7 μm) seria esperado que a eficiência se mantivesse, uma vez que o número de pratos teóricos é proporcional à razão entre o comprimento da coluna e o diâmetro da partícula da fase estacionária. Entretanto, como os fatores de retenção de ANLO e OLMD obtidos pelo método por CLAE são inferior a 3 (**Tabela 2.23**), houve uma redução da eficiência após a transferência. Isso ocorreu porque quando o analito fica pouco retido em colunas mais eficientes e menores, como a de CLUE, σ_{coluna}^2 é menor, o que aumenta o efeito da $\sigma_{\text{extra-coluna}}^2$. Para melhorar a eficiência, a proporção aquosa da fase móvel foi aumentada até que a razão entre a $\sigma_{\text{extra-coluna}}^2$ e a σ_{total}^2 fosse igual a 10%, valor no qual a separação cromatográfica é considerada adequada. Essa razão foi alcançada com a fase móvel ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 ajustado com ácido fosfórico (26:26:48;v/v/v), que foi a definida para ser empregada na validação do método. Os parâmetros do método por CLUE obtidos antes e após o ajuste da proporção da fase móvel estão compilados na **Tabela 2.22**. Para efeito de comparação, os parâmetros do método por CLAE estão representados na **Tabela 2.23** (NGUYEN, 2006; NETO, 2011).

Tabela 2.22 – Parâmetros cromatográficos para ANLO e OLMD obtidos para o método por CLUE antes e após a otimização da fase móvel.

Parâmetro	Condição inicial		Condição otimizada	
	ANLO	OLMD	ANLO	OLMD
N	1946	2464	4042	5084
t_R	0,38	0,45	0,84	1,04
k	0,90	1,22	3,18	4,17
T	1,37	1,41	1,22	1,16
$\sigma^2_{\text{extra-coluna}} / \sigma^2_{\text{total}}$	30,3%	29,9%	10,9%	10,6%
R_s	1,7		3,4	
Tempo de corrida	0,6 min.		1,25 min.	
Pressão	9200 psi		10800 psi	
Fase móvel	ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 ajustado com ácido fosfórico (30:30:40;v/v/v)		ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 ajustado com ácido fosfórico (26:26:48;v/v/v)	

Tabela 2.23 – Parâmetros cromatográficos para ANLO e OLMD obtidos para o método por CLAE.

Parâmetro	ANLO	OLMD
N	5081	5566
t_R	3,60	4,2
k	1,18	1,92
T	1,01	1,05
$\sigma^2_{\text{extra-coluna}} / \sigma^2_{\text{total}}$	6,4%	4,5%
R_s	5,3	
Tempo de corrida	5,5 min.	
Pressão	1450 psi	
Fase móvel	ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 ajustado com ácido fosfórico (30:30:40;v/v/v)	

Após a análise dos resultados reportados nas **Tabelas 2.22 e 2.23**, foi observado que mesmo após o aumento da proporção do componente aquoso da fase móvel, a eficiência alcançada por CLUE foi inferior a obtida por CLAE, o que é justificado pelo fato da razão entre a $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$ e a σ^2_{total} ter sido menor para o método por CLAE. Entretanto, essa redução da eficiência não comprometeu o desempenho cromatográfico e os parâmetros de conformidade do sistema foram adequados para quantificação ANLO e OLMD por CLUE. O tempo de corrida por CLUE praticamente

dobrou após o ajuste da fase móvel, mas mesmo assim foi 4,4 vezes inferior ao tempo por CLAE, garantindo uma análise muito mais rápida e um consumo menor de solvente orgânico. Dessa forma, pode-se inferir que k inferiores a 3 não foram um fator limitante para a transferência do método.

Os cromatogramas obtidos nas concentrações de trabalho antes e após a otimização da proporção da fase móvel para CLUE estão demonstrados nas **Figuras 2.19 e 2.20**, respectivamente.

Figura 2.19 – Cromatograma obtido para a solução de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho por CLUE antes da otimização, com fase móvel composta por ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 (30:30:40;v/v/v).

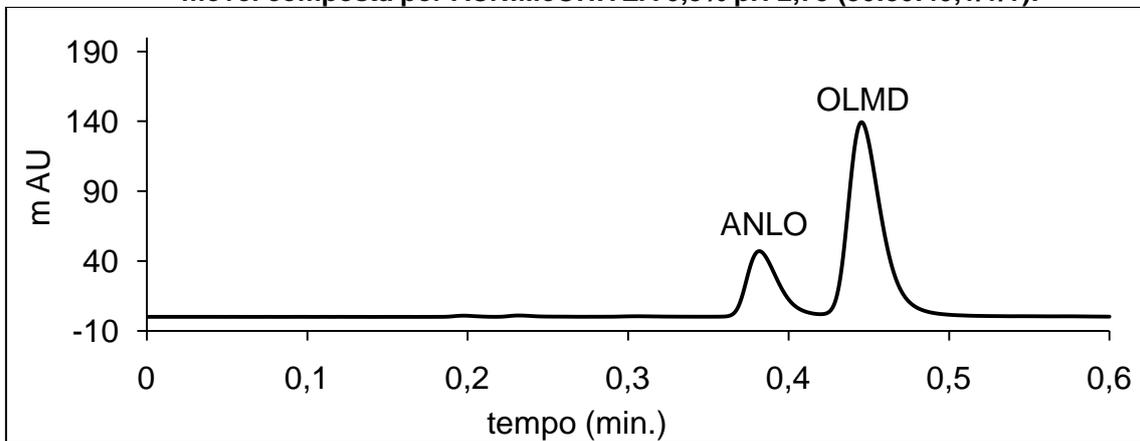
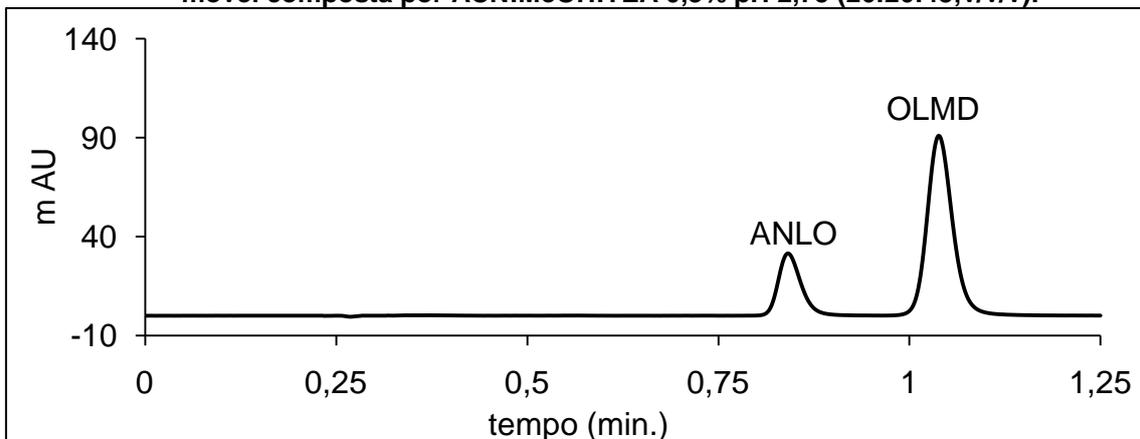


Figura 2.20 – Cromatograma obtido para a solução de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho por CLUE após a otimização, com fase móvel composta por ACN:MeOH:TEA 0,3% pH 2,75 (26:26:48;v/v/v).



3.3 Validação do método analítico por CLUE-DAD para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada

3.3.1 Seletividade

Os cromatogramas adquiridos nas análises da solução diluente, fase móvel e da solução contendo os componentes da formulação demonstraram que nenhum interferente eluiu nos tempos de retenção dos fármacos. O cromatograma obtido após a análise da solução de olmesartana a 60 µg/mL, indicou que o fármaco eluiu no t_R de 0,31 min., que é bem inferior aos t_R de ANLO e OLMD.

Os ângulos de pureza e os ângulos limite dos picos dos fármacos registrados em cromatogramas de soluções padrão e amostra nas concentrações de trabalho estão descritos na **Tabela 2.24**. Para todos os picos, o ângulo de pureza foi inferior ao ângulo limite, indicando que não houve interferentes que eluíram junto com os picos de ANLO e OLMD.

Tabela 2.24 - Ângulos de pureza e ângulos limites obtidos para ANLO e OLMD durante a avaliação da seletividade do método analítico por CLUE.

Fármaco	Ângulo de pureza	Ângulo limite
ANLO padrão	0,44	2,04
ANLO amostra	0,41	2,02
OLMD padrão	16,74	90,00
OLMD amostra	9,93	46,39

3.3.2 Linearidade

As concentrações de ANLO e OLMD e suas respectivas áreas obtidas durante a análise da linearidade estão descritas na **Tabela 2.25**. O teste de resíduo padronizado de Jackknife permitiu a identificação de 02 *outliers* para o ANLO, o ponto 1 (primeira replicata do nível de concentração a 40%) e o ponto 17 (segunda replicata do nível de concentração a 140%), os quais correspondem a 11,1% dos dados. Esses pontos foram excluídos do cálculo da regressão linear. Para a OLMD, não foi detectado a presença de *outliers*. Os gráficos dos resíduos da regressão

estão apresentados nas **Figuras 2.21 e 2.22**, com indicação dos *outliers* detectados em vermelho. Como se pode observar pela inspeção visual dos gráficos, não há tendência na dispersão dos resíduos.

Tabela 2.25 – Concentração das soluções de ANLO e OLMD e respectivas áreas utilizadas para obtenção da curva analítica do método por CLUE.

PONTO	ANLO		OLMD	
	Conc. µg/mL	Área	Conc. µg/mL	Área
1		24214,78		82407,73
2	8,20	25661,14	32,40	83448,83
3		25068,88		82512,77
4		37670,55		123193,35
5	12,30	38733,29	48,60	125880,21
6		37857,67		124497,66
7		52029,39		170252,08
8	16,40	51080,60	64,80	167184,94
9		51159,39		166535,86
10		64799,81		212844,56
11	20,49	63340,69	81,00	207774,42
12		64164,93		211778,71
13		77367,20		254557,77
14	24,59	76718,36	97,20	249353,25
15		76590,4		250678,48
16		89057,05		292436,14
17	28,69	87971,60	113,40	289277,69
18		89028,52		291030,32

Figura 2.21 – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de ANLO obtidos durante a avaliação da linearidade por CLUE.

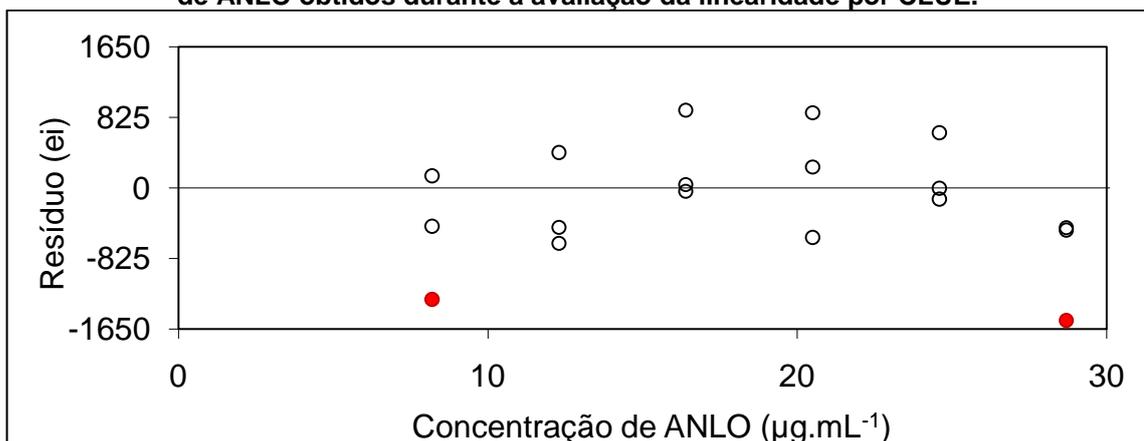
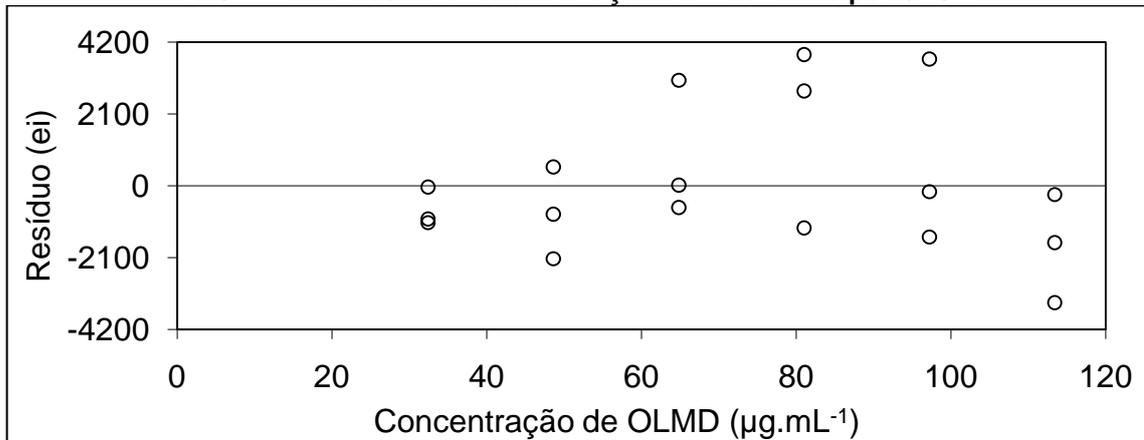


Figura 2.22 – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão de OLMD obtidos durante a avaliação da linearidade por CLUE.



Para o teste de Ryan-Joiner, os R calculados foram 0,967 e 0,951 com valores críticos de 0,941 e 0,946 para ANLO e OLMD, respectivamente. Os resultados do teste denotam que o desvio da normalidade não é significativo para $\alpha=0,05$ (R calculado $>$ R crítico). Para o teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, os t_L calculados foram -0,273 e -1,588 com valores críticos de 2,145 e 2,120 para ANLO e OLMD, respectivamente, o que confirma a homoscedasticidade dos resíduos da regressão para $\alpha=0,05$ ($|t_L| < |t$ crítico). Para o teste de Durbin-Watson, os d calculados foram de 2,371 e 1,974 para ANLO e OLMD, respectivamente, e estão compreendidos entre d_U e $4-d_U$, indicando independência dos resíduos da regressão para $\alpha=0,05$.

A significância da regressão foi avaliada por ANOVA ($\alpha=0,05$). Os valores de F calculados, 23402,056 e 20434,426, foram maiores que os F críticos, 4,600 e 4,494, para ANLO e OLMD respectivamente, o que confirma a significância da regressão. O desvio de linearidade também foi avaliado por ANOVA. Os valores de F calculados, 1,012 e 1,686, foram menores que os F críticos, 3,478 e 3,254, para ANLO e OLMD respectivamente, mostrando que não há desvio de linearidade. Assim, pode-se concluir que a alta significância da regressão ($p < 0,001$) com desvio de linearidade não significativo ($p > 0,05$) para ambos os fármacos sugere que o modelo linear é adequado para quantificar ANLO na faixa de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$ e OLMD na faixa de 32 a 108 $\mu\text{g/mL}$.

Os parâmetros da regressão linear foram calculados para ANLO e OLMD após a ratificação das premissas do MMQO e a exclusão dos *outliers* e estão demonstrados na **Tabela 2.26**.

Tabela 2.26 – Parâmetros da regressão obtidos para a quantificação de ANLO e OLMD por CLUE.

Parâmetro da regressão	ANLO	OLMD
R ²	0,9994	0,9992
b	3122,9614	2582,9143
a	-82,7262	-195,2126

3.3.3 Efeito matriz

O teste de resíduo padronizado de Jackknife permitiu a identificação de: 02 *outliers* para o ANLO na curva analítica em solução, o ponto 10 (primeira replicata do nível de concentração a 100%) e o ponto 14 (segunda replicata do nível de concentração a 120%); nenhum *outlier* para o ANLO na curva analítica em matriz; 03 *outliers* para a OLMD na curva analítica em solução, o ponto 9 (terceira replicata do nível de concentração a 80%), o ponto 10 (primeira replicata do nível de concentração a 100%) e o ponto 16 (primeira replicata do nível de concentração a 140%); nenhum *outlier* para a OLMD na curva analítica em matriz. Os gráficos dos resíduos da regressão foram construídos e demonstraram distribuição aleatória, não apresentando qualquer tendência. As premissas relacionadas ao MMQO e a adequação ao modelo linear foram confirmadas para as duas curvas. Os resultados estão descritos nas **Tabelas 2.27 e 2.28**.

Os parâmetros da regressão linear foram calculados para as duas curvas após a comprovação das premissas do MMQO e a exclusão dos *outliers* e estão demonstrados na **Tabela 2.29**.

Tabela 2.27 – Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em solução durante a avaliação do efeito matriz por CLUE ($\alpha = 0,05$).

Teste Estatístico	Estatística	Curva analítica em solução			
		ANLO	CA*	OLMD	CA
Ryan-Joiner	R	0,990	>0,941	0,986	>0,938
Levene modificado	t_L	-0,646	< 2,145	-0,158	< 2,160
Durbin-Watson	d	2,552	>1,37;<2,63	1,499	>1,36;<2,64
Significância da regressão	F	78649,929	>4,600	297807,610	>4,667
Desvio de linearidade	F	0,392	<3,478	1,799	<3,633

*CA - critério de aceitação

Tabela 2.28 – Resultados dos testes de premissas e de adequação ao modelo linear obtidos para a curva analítica em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLUE ($\alpha = 0,05$).

Teste Estatístico	Estatística	Curva analítica em matriz			
		ANLO	CA*	OLMD	CA
Ryan-Joiner	R	0,985	>0,946	0,976	>0,946
Levene modificado	t_L	-1,032	< 2,120	-0,939	< 2,120
Durbin-Watson	d	1,871	>1,39;<2,61	1,902	>1,39;<2,61
Significância da regressão	F	16532,353	>4,494	23498,526	>4,94
Desvio de linearidade	F	2,918	<3,259	2,894	<3,259

*CA - critério de aceitação

Tabela 2.29 – Parâmetros da regressão obtidos para a curva em solução e em matriz durante a avaliação do efeito matriz por CLUE.

Parâmetro da regressão	Curva em solução		Curva em matriz	
	ANLO	OLMD	ANLO	OLMD
R^2	0,9998	0,9999	0,9990	0,9993
b	3272,9827	2654,0188	3277,2334	2636,1754
a	465,0072	-55,4599	852,4940	534,6198

O teste F indicou heteroscedasticidade das variâncias dos resíduos das curvas em solução e em matriz para os fármacos. Os valores de F calculados, 5,041 e 14,675, foram maiores que os F críticos, 2,445 e 2,515, para ANLO e OLMD, respectivamente. Por isso, foi utilizado o teste t com variâncias distintas ($\alpha=0,05$) para a avaliação do efeito matriz. Os valores de t_a e t_b calculados para o ANLO

foram 1,474 e 0,152, ambos menores que o t crítico de 2,074. Para a OLMD, os valores calculados de t_a e t_b foram 1,512 e 0,998, ambos, também, menores que o t crítico de 2,101. Esses resultados indicaram que não há diferenças significativas entre as inclinações e interseções das curvas, o que evidencia ausência de efeito matriz.

3.3.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método do placebo contaminado. As amostras foram quantificadas por meio de uma curva analítica e as recuperações aparentes obtidas nos níveis 80%, 100% e 120% da concentração de trabalho estão demonstradas na **Tabela 2.30**.

Tabela 2.30 – Valores de recuperação aparente obtidos para avaliação da exatidão de ANLO e OLMD por CLUE.

Nível (%)	Recuperação aparente ANLO (%)	Recuperação aparente OLMD (%)
80	99,05	99,19
80	99,42	98,40
80	99,11	98,93
100	100,50	99,90
100	99,45	99,63
100	101,37	99,87
120	98,65	98,19
120	98,74	98,10
120	98,75	101,27
Média (%)	99,45	99,28
DPR (%)	0,92	1,03

As médias das recuperações aparentes calculadas para ANLO e OLMD foram comparadas ao valor teórico de 100% pelo teste t ($\alpha=0,05$). Os módulos dos valores de t calculado, -1,806 e -2,133, para ANLO e OLMD, respectivamente, foram inferiores ao de t crítico de 2,306. Portanto, não houve diferença significativa entre as médias das recuperações aparentes e 100%. Os valores individuais das

recuperações aparentes permaneceram na faixa de 98-102% e os DPR foram inferiores a 2%, o que também comprova a exatidão do método.

3.3.5 Precisão

A repetitividade e a reprodutibilidade parcial foram calculadas após seis determinações do teor do medicamento BenicarAnlo® em três dias consecutivos. As médias dos teores, DP e DPR calculados para os fármacos estão descritos na **Tabela 2.31**. O DP foi estimado por ANOVA ($\alpha=0,05$) e as premissas quanto à sua utilização foram demonstradas. A normalidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner com R calculados de 0,948 e 0,985, respectivamente para ANLO e OLMD, maiores que o R crítico de 0,946 ($\alpha=0,05$). A homoscedasticidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, com F calculados de 0,816 e 1,582, respectivamente para ANLO e OLMD, menores que o F crítico de 3,682 ($\alpha=0,05$).

Tabela 2.31 – Valores do teor, DP e DPR obtidos para avaliação da precisão de ANLO e OLMD por CLUE.

Parâmetro	ANLO	OLMD
Média do teor (n=18) (%)	98,26	95,19
DP repetitividade (n=6)	0,82	0,57
DPR repetitividade (n=6) (%)	0,83	0,60
DP reprodutibilidade parcial (n=18)	0,88	0,59
DPR reprodutibilidade parcial (n=18) (%)	0,89	0,62

Todos os valores de DPR calculados foram inferiores a 2%, demonstrando a precisão do método.

3.3.6 Limites de detecção e quantificação

Os LD e LQ estimados a partir das equações que levam em consideração os parâmetros da curva analítica foram 0,41 $\mu\text{g/mL}$ e 1,38 $\mu\text{g/mL}$ para o ANLO e 1,09 $\mu\text{g/mL}$ e 3,64 $\mu\text{g/mL}$ para a OLMD, respectivamente. Os cromatogramas obtidos nessas concentrações apresentaram relações sinal/ruído bem superiores a 10.

Para a determinação do LD real, as soluções de OLMD e ANLO foram diluídas sucessivamente e injetadas no cromatógrafo até a obtenção da relação sinal/ruído próxima a 3. Os valores de LD encontrados foram 0,085 $\mu\text{g/mL}$ e 0,065 $\mu\text{g/mL}$ para ANLO e OLMD, respectivamente. Os cromatogramas referentes aos LD estão representados nas **Figuras 2.23 e 2.24**.

Figura 2.23 – Cromatograma obtido para o LD de ANLO (0,085 $\mu\text{g/mL}$) por CLUE.

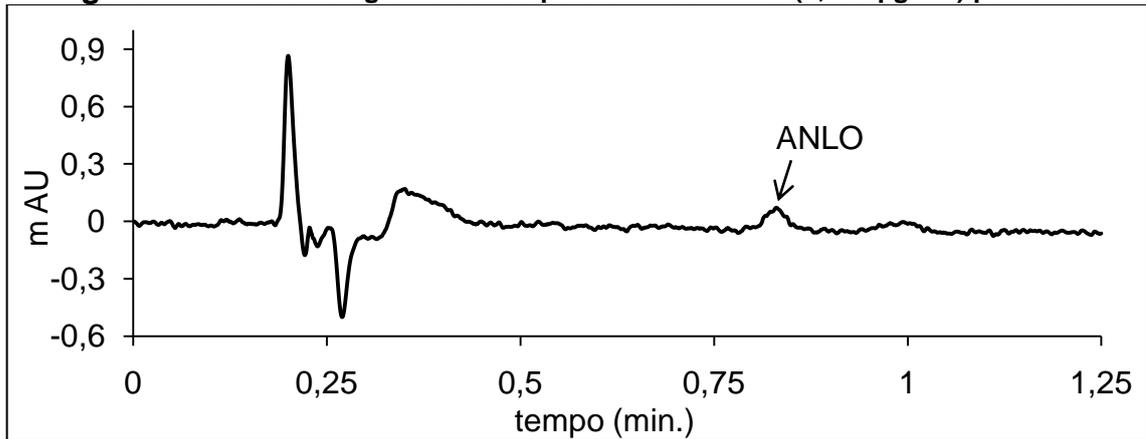
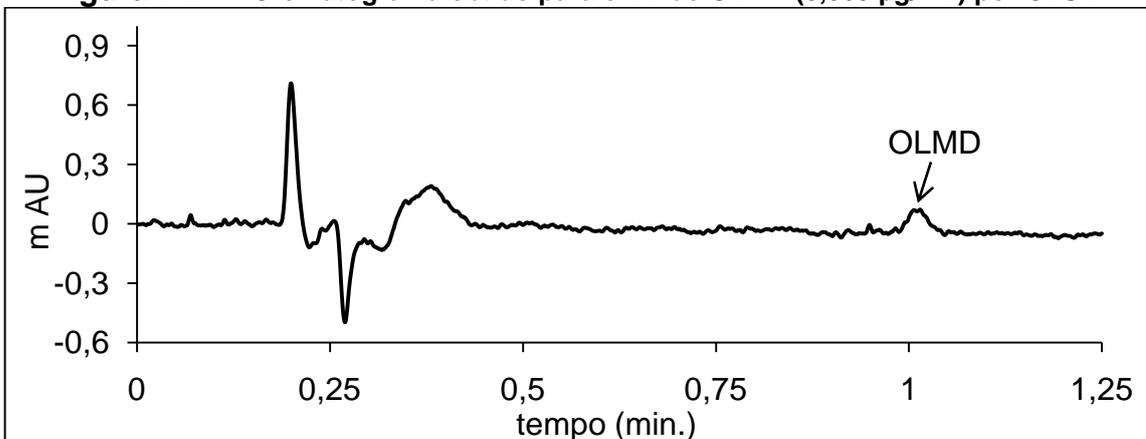


Figura 2.24 – Cromatograma obtido para o LD de OLMD (0,065 $\mu\text{g/mL}$) por CLUE.



Para a determinação do LQ real, as soluções de OLMD e ANLO foram diluídas sucessivamente e injetadas no cromatógrafo até a obtenção da relação sinal/ruído próxima a 10, entretanto, quando se obteve essa relação, os valores do DPR das áreas de três soluções foram superiores a 2%, não apresentando precisão adequada. Por isso, foi avaliada a menor concentração que proporcionou um DPR inferior a 2% e essa concentração foi definida como LQ. Para o ANLO, o LQ foi de 0,290 $\mu\text{g/mL}$ com DPR de 1,77%, já para a OLMD, o LQ foi de 0,400 $\mu\text{g/mL}$ com

DPR de 1,61%. Os cromatogramas referentes aos LQ estão representados nas Figuras 2.25 e 2.26.

Figura 2.25 – Cromatograma obtido para o LQ de ANLO (0,290 µg/mL) por CLUE.

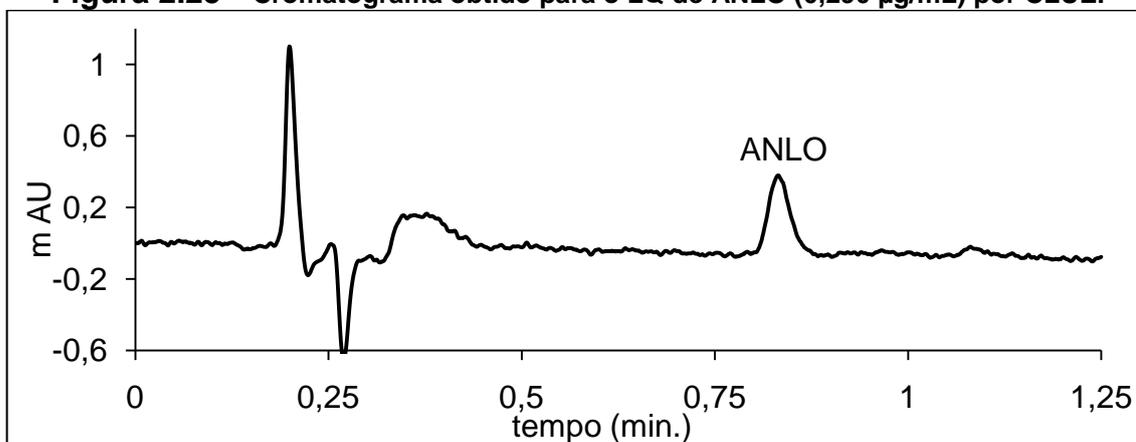
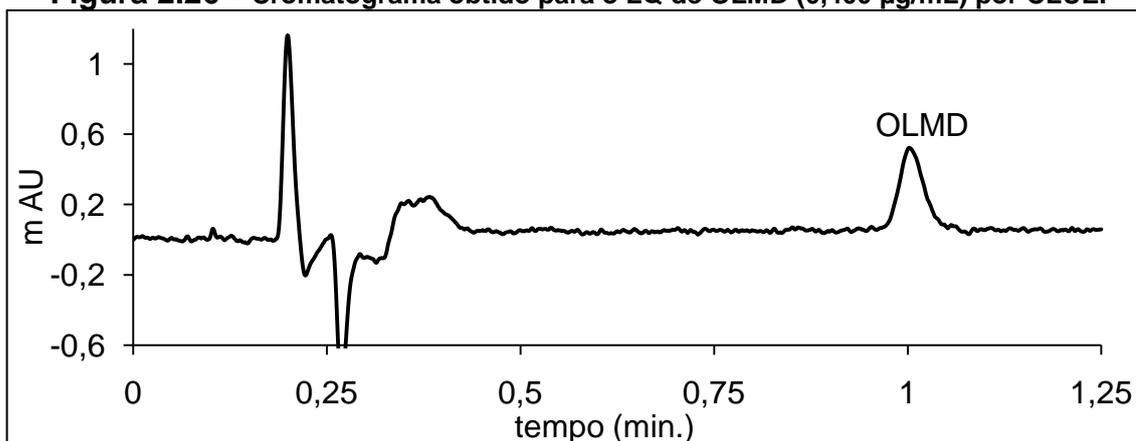


Figura 2.26 – Cromatograma obtido para o LQ de OLMD (0,400 µg/mL) por CLUE.



Como se pode observar, os LD e LQ calculados pelos parâmetros da curva analítica são significativamente maiores do que aqueles determinados pela avaliação das respostas obtidas com soluções diluídas.

3.3.7 Estabilidade das soluções de trabalho

A estabilidade de ANLO e OLMD nas concentrações de trabalho foi verificada injetando uma solução amostra, uma solução padrão contendo ambos os fármacos, uma solução padrão contendo somente ANLO e uma solução padrão contendo somente OLMD nos tempos 0, 1, 2, 4, 5, 6, 7, e 8 horas após o preparo. As

variações das áreas em porcentagem dos picos referentes aos fármacos estão apresentadas graficamente nas **Figuras 2.27 e 2.28**.

Figura 2.27 – Variações das áreas dos picos de ANLO obtidas para avaliação da estabilidade por CLUE.

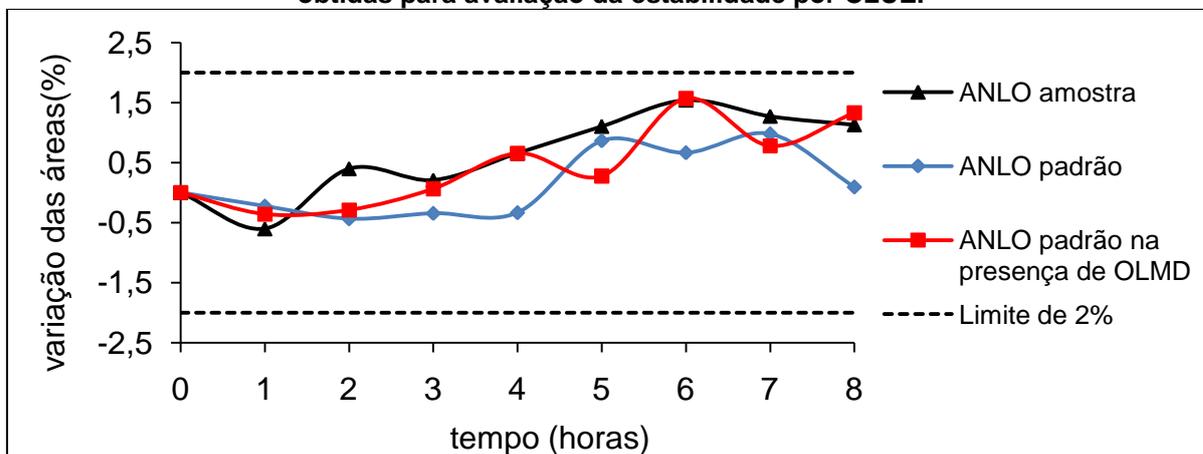
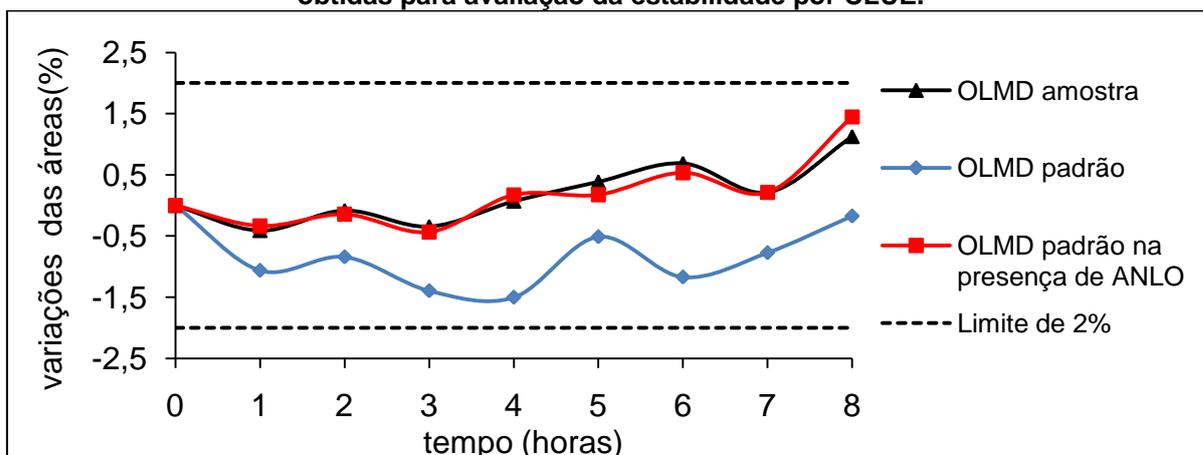


Figura 2.28 – Variações das áreas dos picos de OLMD obtidas para avaliação da estabilidade por CLUE.



Para todos os cromatogramas obtidos durante a verificação da estabilidade, os ângulos de pureza foram inferiores aos ângulos limite para os picos de ANLO e OLMD, indicando que não houve possíveis produtos de degradação co-eluidos com os fármacos. As variações das áreas em relação ao tempo inicial foram inferiores a 2% para os fármacos em todas as soluções analisadas, por isso, pode-se inferir que as soluções de trabalho são estáveis durante um período de 8 horas após o preparo.

3.3.8 Robustez

Os resultados da média dos teores de ANLO e OLMD e os parâmetros de conformidade do sistema obtidos nas condições nominais e variando-se o fluxo da fase móvel, temperatura da coluna cromatográfica, proporção de orgânico da fase móvel e pH da solução de TEA estão apresentados nas **Tabelas 2.32 e 2.33**.

Tabela 2.32 – Resultados da média dos teores, do DPR dos teores e dos parâmetros de conformidade do sistema obtidos em condições nominais e com variações das condições analíticas para avaliação da robustez do método por CLUE para quantificação de ANLO.

Condição	Teor (%)	DPR (%)	k	T	N
Nominal	98,79	0,41	3,26	1,24	3927
Fluxo da FM* 0,513 mL/min.	97,94	0,43	3,09	1,23	4461
Fluxo da FM 0,713 mL/min.	97,95	0,73	2,52	1,28	3260
Temperatura da coluna 27 °C	98,24	0,82	2,61	1,25	3635
Temperatura da coluna 33 °C	97,96	0,84	2,47	1,28	3667
Proporção de orgânico/ aquoso na FM 50:50 (v/v)	97,94	0,76	3,34	1,23	4142
Proporção de orgânico/ aquoso na FM 54:46 (v/v)	98,02	0,77	2,21	1,28	3240
pH da solução de TEA 2,65	97,71	0,69	2,97	1,24	3750
pH da solução de TEA 2,85	97,80	0,81	2,8	1,26	3667

*FM – fase móvel

Tabela 2.33 – Resultados da média dos teores, do DPR dos teores e dos parâmetros de conformidade do sistema obtidos em condições nominais e com variações das condições analíticas para avaliação da robustez do método por CLUE para quantificação de OLMD.

Condição	Teor (%)	DPR (%)	k	T	N	R_s
Nominal	94,89	0,34	4,23	1,16	5307	3,39
Fluxo da FM 0,513 mL/min.	94,17	0,46	3,98	1,14	5810	3,44
Fluxo da FM 0,713 mL/min.	94,20	0,53	3,32	1,21	4476	3,11
Temperatura da coluna 27 °C	94,52	0,93	3,31	1,18	4813	2,83
Temperatura da coluna 33 °C	94,38	0,66	3,31	1,2	4986	3,14
Proporção de orgânico/ aquoso na FM 50:50 (v/v)	94,09	0,77	4,3	1,15	5518	3,38
Proporção de orgânico/ aquoso na FM 54:46 (v/v)	94,51	0,50	2,92	1,2	4432	3,02
pH da solução de TEA 2,65	94,45	0,89	3,72	1,17	5017	2,82
pH da solução de TEA 2,85	94,38	0,95	3,74	1,15	5046	3,58

Os teores de ANLO e OLMD obtidos nas condições nominais e nas condições variadas foram estatisticamente comparados por ANOVA e as premissas quanto à sua utilização foram demonstradas. A normalidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Ryan-Joiner com R calculados de 0,988 e 0,981, respectivamente para ANLO e OLMD, maiores que o R crítico de 0,978 ($\alpha=0,05$). A homoscedasticidade dos resíduos foi confirmada pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe, com F calculados de 0,494 e 0,526, respectivamente para ANLO e OLMD, menores que o F crítico de 2,152 ($\alpha=0,05$).

Após a comparação dos teores por ANOVA, os F calculados, 1,230 e 0,781, respectivamente para ANLO e OLMD, foram inferiores ao F crítico 2,152, indicando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos teores estimados em cada uma das condições testadas ($p > 0,05$). Dessa forma, o método por CLUE pode ser considerado robustez para as condições analisadas.

De acordo com os dados dos parâmetros de conformidade do sistema registrados nas **Tabelas 2.32 e 2.33**, foi observado que a diminuição do fluxo da fase móvel promoveu o maior aumento do número de pratos teóricos dos fármacos. Isso ocorreu, provavelmente, porque com um fluxo menor, a altura do prato teórico da coluna foi menor, se aproximando da altura do prato teórico ótima da coluna, fato que pode ser evidenciado pela curva de van Deemter. O aumento da proporção de orgânico da fase móvel aumentou a força eluente da fase, ocasionando uma redução significativa dos fatores de retenção dos fármacos, além disso, foi nessa condição em que a redução do número de pratos teóricos foi maior, o que era esperado, uma vez que quanto menos retido for o analito, menor é a σ^2_{coluna} , mais significativo é o efeito da $\sigma^2_{\text{extra-coluna}}$ e menor a eficiência da coluna. A variação do pH da solução de TEA foi o fator que mais impactou na resolução dos picos, ao diminuir o pH da solução, a resolução diminuiu e ao aumentar o pH, a resolução aumentou. Os fatores de cauda dos fármacos foram pouco influenciados pelas condições analisadas (WAINER & LOUGH, 1996; NETO, 2011).

3.4 Comparação entre os métodos de quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila: CLAE e CLUE

Amostras de três lotes do medicamento BenicarAnlo® (lotes 10406, 11073 e 20168) foram quantificadas, em sextuplica, por CLAE e por CLUE. Os resultados obtidos estão demonstrados nas **Tabelas 2.34** e **2.35**. Todos os lotes analisados apresentaram teores de ANLO e OLMD dentro da faixa de 95% a 105% do valor rotulado.

Tabela 2.34 – Teores de ANLO em comprimidos de dose fixa combinada determinados por CLAE e por CLUE.

Amostra	Teor (%) - lote 10406		Teor (%) - lote 11073		Teor (%) - lote 20168	
	CLAE	CLUE	CLAE	CLUE	CLAE	CLUE
1	97,65	97,38	97,99	97,55	98,54	99,64
2	97,67	98,59	97,18	97,31	98,84	99,84
3	97,37	98,36	96,52	97,72	100,14	99,39
4	98,55	99,25	97,87	97,92	98,14	99,79
5	97,50	98,80	98,54	99,16	98,82	98,85
6	98,40	98,54	98,91	98,63	99,16	99,56
Média	97,85	98,49	97,83	98,05	98,94	99,51
DPR(%)	0,51	0,63	0,90	0,72	0,69	0,36

Tabela 2.35 – Teores de OLMD em comprimidos de dose fixa combinada determinados por CLAE e por CLUE.

Amostra	Teor (%) - lote 10406		Teor (%) - lote 11073		Teor (%) - lote 20168	
	CLAE	CLUE	CLAE	CLUE	CLAE	CLUE
1	96,89	95,80	96,57	96,37	96,76	97,62
2	96,76	95,70	95,93	96,13	96,95	97,69
3	96,70	97,47	95,29	96,59	98,48	97,62
4	96,65	96,90	96,90	97,14	96,61	97,76
5	95,70	95,55	97,31	98,16	97,15	97,00
6	96,35	96,66	97,52	97,13	97,35	97,44
Média	96,51	96,35	96,59	96,92	97,22	97,52
DPR(%)	0,45	0,81	0,88	0,75	0,69	0,29

Antes de realizar as comparações das médias obtidas por CLAE e CLUE pelo teste t , as premissas relacionadas a esse teste foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner e homoscedasticidade dos resíduos pelo teste F .

Para os resíduos dos teores do lote 10406, a normalidade foi ratificada com R calculados de 0,959 e 0,957, respectivamente para ANLO e OLMD, maiores que o R crítico de 0,928 ($\alpha=0,05$). A homoscedasticidade foi ratificada com F calculados de 1,012 e 1,003, respectivamente para ANLO e OLMD, menores que o F crítico de 6,388 ($\alpha=0,05$). Para os resíduos dos teores do lote 11073, a normalidade foi ratificada com R calculados de 0,990 e 0,993, respectivamente para ANLO e OLMD, maiores que o R crítico de 0,928 ($\alpha=0,05$). A homoscedasticidade foi ratificada com F calculados de 1,004 e 1,007, respectivamente para ANLO e OLMD, menores que o F crítico de 6,388 ($\alpha=0,05$). Para os resíduos dos teores do lote 20168, a normalidade foi ratificada com R calculados de 0,986 e 0,978, respectivamente para ANLO e OLMD, maiores que o R crítico de 0,928 ($\alpha=0,05$). A homoscedasticidade foi ratificada com F calculados de 1,012 e 1,006, respectivamente para ANLO e OLMD, menores que o F crítico de 6,388 ($\alpha=0,05$).

Após a confirmação das premissas, a comparação entre as médias dos teores pelo teste t foi realizada. Os valores de t calculados foram: -1,949 e 0,442 para ANLO e OLMD, respectivamente, no lote 10406; -0,464 e -0,725 para ANLO e OLMD, respectivamente, no lote 11073; -1,825 e -1,033 para ANLO e OLMD, respectivamente, no lote 20168. Os módulos de todos os valores de t calculados foram inferiores ao t crítico de 2,228 ($\alpha=0,05$; $GL= 10$). Dessa forma, não houve diferença significativa dos teores dos fármacos quantificados por CLAE e por CLUE, indicando que ambos os métodos estão aptos para serem utilizados no controle de qualidade de ANLO e OLMD em comprimidos de dose fixa combinada.

A capacidade de analisar grandes números de amostras em pequenos intervalos de tempo e com gasto reduzido de solvente impulsiona o emprego da CLUE em relação à CLAE em análises farmacêuticas. Além disso, a facilidade com que um método já desenvolvido por CLAE pode ser transferido para CLUE, conforme evidenciado neste trabalho, e a possibilidade de se conseguir métodos mais eficientes e com limites de detecção menores também favorecem a prática dessa técnica. Assim, o

uso da CLUE assegura que o controle de qualidade de matérias-primas e medicamentos seja mais rápido e sustentável e com excelência igual ou superior a obtida pela CLAE (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2006).

Apesar das vantagens inerentes à CLUE, seus equipamentos e colunas cromatográficas são mais caros e poucos estudos foram realizados para avaliar o tempo de vida dessas colunas, que são submetidas a pressões extremamente elevadas (MALDANER & JARDIM, 2009).

4 CONCLUSÕES

Um método por CLAE-DAD no modo isocrático foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada. O método foi preciso, exato, robusto e linear na faixa de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$ para anlodipino e de 32 a 108 $\mu\text{g/mL}$ para olmesartana medoxomila. Além disso, o método foi seletivo a presença de produtos de degradação por hidrólise ácida e básica, calor seco, exposição à luz UV e por oxidação.

O método validado por CLAE-DAD foi transferido para um sistema de CLUE-DAD com o auxílio de fórmulas matemáticas para calcular o novo volume de injeção e fluxo da fase móvel. A transferência foi bem sucedida e rápida e demonstrou que fatores de retenção inferiores a 3 não foram um fator limitante.

O método por CLUE-DAD foi validado e se mostrou seletivo, preciso, exato, robusto e linear na faixa de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$ para anlodipino e de 32 a 108 $\mu\text{g/mL}$ para olmesartana medoxomila. No método por CLUE, o tempo de análise foi reduzido em 4,4 vezes e houve uma economia de solvente de 7 vezes. Os limites de detecção e quantificação determinados foram inferiores quando comparados aos obtidos por CLAE.

Os métodos por CLAE e CLUE demonstraram ser estatisticamente equivalentes após a análise de três lotes do medicamento BenicarAnlo®. Assim, ambos os métodos podem ser utilizados para proceder ao controle de qualidade de anlodipino e olmesartana medoxomila em comprimidos de dose fixa combinada.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO BIOANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANLÓDIPINO E OLMESARTANA EM PLASMA HUMANO

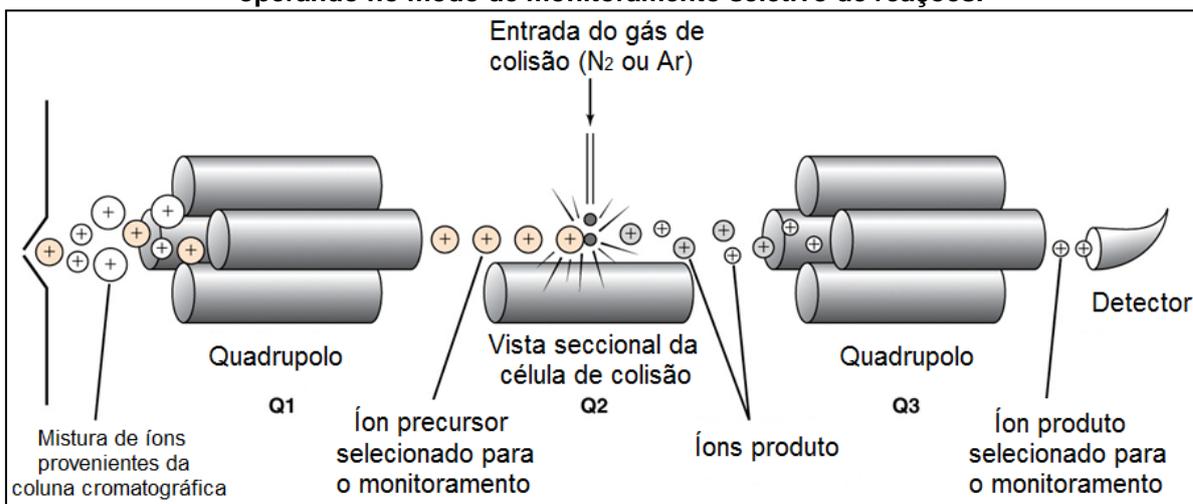
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Espectrometria de massas

O primeiro espectrômetro de massas foi construído em 1912 pelo cientista americano Thomson e a partir da década de 40 o equipamento se tornou comercialmente disponível. Desde então, a espectrometria de massas (EM) tem revolucionado diversas áreas da ciência devido a características como alta seletividade, alta sensibilidade e limites de detecção cada vez mais baixos. É uma técnica analítica empregada na identificação e quantificação de substâncias orgânicas ou inorgânicas presentes em matrizes sólidas, líquidas ou gasosas, e, também, é utilizada na elucidação da estrutura das moléculas. A essência da EM se baseia na geração de íons que depois são detectados de acordo com sua razão massa-carga (m/z). Um espectrômetro de massas é composto basicamente de um sistema de introdução de amostra, uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; GRIFFITHS, 2008).

Para realizar a quantificação de fármacos em matrizes biológicas, a CLAE acoplada à espectrometria de massas sequencial (EM/EM) com fonte de ionização por *electrospray* é a principal técnica utilizada. Essa técnica permite distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção, garantindo o desenvolvimento de métodos seletivos e rápidos. Na EM/EM, três analisadores são combinados em série, sendo que o mais comumente empregado é o triplo quadrupolo no modo de monitoramento seletivo de reações (**Figura 3.1**). Nesse modo de varredura, um íon precursor é selecionado no primeiro quadrupolo e, em seguida, é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo (célula de colisão), onde colide com um gás inerte, geralmente nitrogênio (N_2) ou argônio (Ar), e se fragmenta formando os íons produto. O terceiro quadrupolo atua como um segundo filtro de massa e permite que somente o íon produto escolhido passe para o detector. Quando se monitora a fragmentação de vários íons precursores simultaneamente, esse modo de varredura é denominado monitoramento de reações múltiplas (MRM). O modo MRM aumenta a seletividade e a sensibilidade da técnica, o que favorece a sua aplicação à análise de traços (HOPFGARTNER & BOURGOGNE, 2003; CHIARADIA *et al.*, 2008).

Figura 3.1 – Ilustração de um analisador triplo quadrupolo operando no modo de monitoramento seletivo de reações.



Fonte: adaptado de HARRIS, 2005

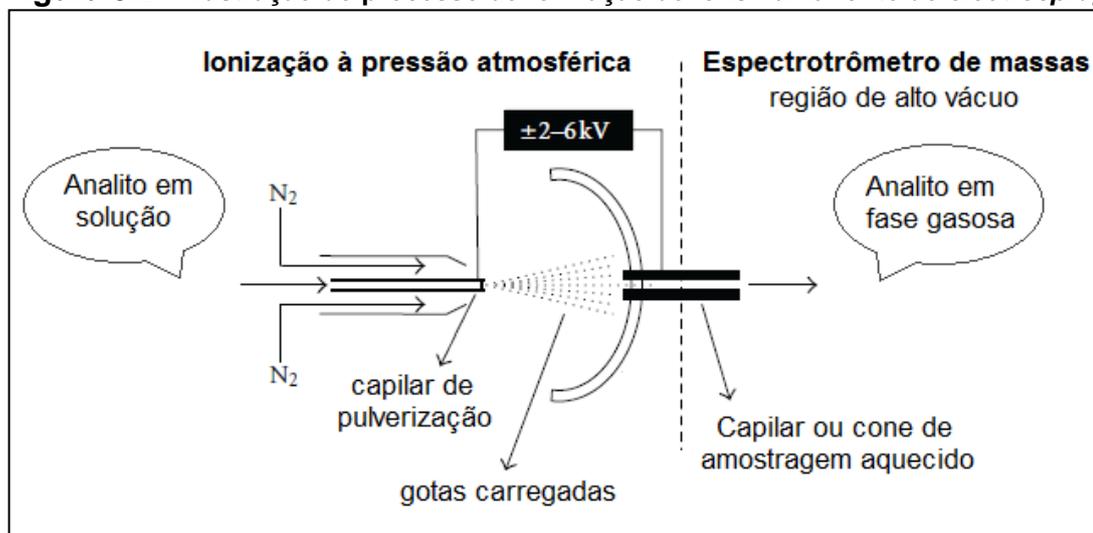
1.1.1 Ionização por *electrospray*

A ionização por *electrospray* é uma técnica branda de ionização à pressão atmosférica, na qual os analitos são ionizados em solução e posteriormente transferidos para fase gasosa. Pode ocorrer pouca ou nenhuma fragmentação do analito. As principais vantagens relacionadas a esse tipo de ionização são a possibilidade de analisar compostos polares (pouco voláteis) e termicamente instáveis e a capacidade de produzir íons multiplamente carregados, reduzindo assim a razão m/z , de tal modo que é possível analisar compostos de elevada massa molecular (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; BANERJEE & MAZUMDAR, 2012).

Um spray eletrostático é produzido por meio da aplicação de uma diferença de potencial quando a solução contendo o analito é bombeada através de um tubo capilar estreito (0,1 a 0,2 mm de diâmetro) com um fluxo baixo. A diferença de potencial varia de 2 a 6 kV e é aplicada entre o capilar e um contra-eletrodo separados por uma distância de 1 a 3 cm. Se a diferença de potencial aplicada na solução for positiva, são formados íons positivos que migram em direção ao contra-eletrodo negativo. O contra-eletrodo encontra-se em um cone de amostragem ou em um capilar com temperaturas elevadas e orifícios estreitos, onde os íons seguem para o analisador de massas. Um esquema da ionização por *electrospray* está

demonstrado na **Figura 3.2** (KERBALE & VERKERK, 2009; BANERJEE & MAZUMDAR, 2012).

Figura 3.2 – Ilustração do processo de formação de íons numa fonte de *electrospray*.



Fonte: adaptado de BANERJEE & MAZUMDAR, 2012

Na ponta do capilar são formadas gotas altamente carregadas. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra-eletrodo aumenta, provocando a deformação da gota. A gota ganha forma de um cone, denominado cone de Taylor. Após desprender do capilar, as gotas caminham em direção ao contra-eletrodo e são dessolvatadas. A evaporação do solvente é assistida pela energia térmica do ambiente (capilar aquecido) e pelo fluxo contínuo de N_2 . À medida que a gota perde solvente, a densidade de carga aumenta até um ponto em que a tensão superficial é rompida e as gotículas são liberadas num processo conhecido como explosão de Coulomb. Na sequência, outras explosões ocorrem, produzindo íons do analito a partir destas gotas. Este modelo de formação de íons é chamado de carga residual (*charged residue model*, CRM). Outro modelo que explica a formação de íons baseia na evaporação das gotas carregadas até o ponto em que as cargas presentes começam a sofrer repulsão eletrostática ocasionando a evaporação dos íons. Este modelo é chamado de evaporação de íons (*ion evaporation model*, IEM) (MORAES & LAGO, 2003; KERBALE & VERKERK, 2009).

As principais espécies iônicas formadas após a aplicação da diferença de potencial no capilar são os íons pseudo-moleculares obtidos a partir de reações do tipo ácido-base, sendo $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo. Pode ocorrer também a formação de adutos entre os íons moleculares e, por exemplo, Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cl^- , $HCOO^-$, CH_3COO^- , que estão presentes na fase móvel quando a CLAE é acoplada à EM. Alguns fatores que influenciam a extensão com a qual ocorrem reações ácido-base e formação de adutos são estrutura química do analito, pH da fase móvel, potencial aplicado ao cone de amostragem, temperatura da fonte de ionização e temperatura de dessolvatação (CROTTI *et al.*, 2006; BANERJEE & MAZUMDAR, 2012).

A ionização por *electrospray* é uma excelente interface de acoplamento entre técnicas de separação, como a CLAE, e o analisador de massas. Para tornar possível esse acoplamento, é preciso utilizar divisores de fluxo para diminuir a vazão da fase móvel para o interior da interface. Isso ocorre porque a CLAE, geralmente, trabalha com fluxo alto (maior que 0,5 mL/min.) e a fonte de ionização por *electrospray* opera com fluxo baixo. Os divisores de fluxo não afetam, de forma notável, a detectabilidade do espectrômetro de massas, pois a intensidade da ionização é dependente da concentração do analito no processo por *electrospray* (CHIARADIA *et al.*, 2008).

Uma limitação associada ao uso do *electrospray* em métodos bioanalíticos por CLAE-EM/EM é a ocorrência de efeito matriz. Esse efeito, que acontece durante a ionização, é caracterizado pela diminuição ou aumento da intensidade do sinal devido a interferentes da matriz que co-eluem com os analitos de interesse. Para minimizar ou reduzir o efeito, uma alternativa é modificar o preparo de amostra ou alterar as condições cromatográficas para separar os analitos dos interferentes responsáveis pela supressão ou indução iônica (TAYLOR, 2005).

1.2 Preparo de amostra

O preparo de amostra é uma das etapas mais crítica do desenvolvimento de métodos bioanalíticos para quantificação de fármacos em plasma. A finalidade

dessa etapa é conseguir uma amostra enriquecida com os analitos de interesse e com baixo teor de compostos endógenos e de proteínas da matriz biológica. As proteínas são incompatíveis com sistemas cromatográficos e, frequentemente, são as causadoras do efeito matriz. As técnicas mais tradicionais utilizadas no preparo de amostra são precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida (CHANG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007).

A extração por precipitação de proteínas pode ser feita por aquecimento, adição de sais, ácidos, bases ou solventes orgânicos miscíveis em água, como por exemplo, acetona, ACN e MeOH. Essa técnica é a mais rápida e simples, porém apresenta pouca eficiência na retirada dos interferentes, sendo, por isso, mais susceptível ao efeito matriz. A extração líquido-líquido consiste na partição da amostra entre duas fases imiscíveis, orgânica e aquosa, e sua eficiência depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão entre os volumes das fases e do ajuste do pH da amostra. Na extração líquido-líquido, pode ser utilizada uma grande variedade de solventes orgânicos, o que garante ampla faixa de solubilidade e seletividade. A extração em fase sólida se baseia na adsorção seletiva do analito em sorventes sólidos e posterior dessorção com solventes. Os materiais utilizados como sorventes são semelhantes àqueles utilizados em colunas cromatográficas e empacotados na forma de cartuchos ou discos. A seletividade dessa técnica depende dos sorventes e solventes de eluição utilizados (QUEIROZ *et al.*, 2001; LANÇAS, 2004; TAYLOR, 2005).

Grandes avanços foram alcançados na área de preparo de amostra nos últimos anos. Vários procedimentos de precipitação de proteínas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida realizados por meio de processos automatizados ou semi-automatizados têm surgido, garantindo uma diminuição significativa no tempo de preparo e aumento da eficiência do processo. Entretanto, os equipamentos utilizados são, relativamente, caros e, por isso, o custo/benefício de se utilizar um processo desse tipo deve ser avaliado (QUEIROZ *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2007).

1.3 Métodos bioanalíticos para quantificação de anlodipino e olmesartana

Até o final do presente trabalho, sete publicações que descreveram a quantificação de ANLO e OLM em matriz biológica foram encontradas na literatura. Os dois primeiros artigos foram publicados por ROHATAGI *et al.* (2008a, 2008b) e utilizaram a técnica CLAE-EM/EM. Nesses artigos, o enfoque foi nos dados farmacocinéticos obtidos para ANLO e OLM, sendo que pouco foi relatado sobre o método bioanalítico. Foi descrito apenas as transições dos analitos e dos padrões internos e as concentrações das curvas de calibração e dos controles de qualidade. As informações estão idênticas nos dois trabalhos. Para a OLM, o padrão interno (PI) foi um análogo denominado RNH-6272 e para o ANLO, foi utilizado um padrão deuterado (d_9 -ANLO). A faixa linear foi de 1 a 1000 ng/mL para OLM e de 1,0 a 50 ng/mL para ANLO.

BOLBRINKER *et al.* (2009) publicou um artigo cuja ênfase também foi dada nos estudos farmacocinéticos, que foram realizados para os fármacos ANLO, OLM e atenolol. A técnica empregada foi CLAE-EM/EM e em relação ao método bioanalítico, foi descrito somente os limites de quantificação. Os LQ encontrados foram 0,41 ng/mL para OLM, 0,1 ng/mL para ANLO e 1,01 ng/mL para atenolol.

No trabalho de CAMPBELL *et al.* (2010), um método bioanalítico foi desenvolvido por CLAE-EM/EM para quantificar ANLO, OLM e hidroclorotiazida em plasma humano. A extração foi realizada em fase sólida com cartuchos de troca catiônica e tomada de amostra de 200 μ L. Os PI foram isótopos estáveis dos fármacos e a ionização foi feita por *electrospray* no modo positivo para ANLO e OLM e no modo negativo para hidroclorotiazida. A fase móvel foi constituída por um gradiente de ácido fórmico 0,05%, ACN e MeOH. A coluna cromatográfica utilizada foi uma fenil (50 x 2,1 mm; 5 μ m) e a faixa linear do método foi de 1 a 1000 ng/mL para OLM e hidroclorotiazida e de 0,05 a 50 ng/mL para ANLO. As transições dos analitos, o tempo de retenção dos fármacos e o tempo da corrida cromatográfica não foram informados.

No método descrito por ROTE e KANDE (2011), a quantificação de ANLO e OLM em plasma humano foi realizada pela técnica Cromatografia em Camada Delgada de

Alta Eficiência com detecção por UV. Paracetamol foi escolhido como PI do método. A extração foi realizada por meio de precipitação de proteínas com MeOH:ACN (3:0,1 mL), o sobrenadante foi evaporado e reconstituído com 1,0 mL de metanol. A detecção foi realizada em λ 254 nm.

No método relatado por SHAH *et al.* (2012), foi empregado CLAE-UV para quantificar ANLO e OLM em plasma de rato. Não foi utilizado PI nas análises e a extração foi feita por precipitação de proteínas com ACN, a tomada de amostra foi de 1000 μ L. A fase móvel foi composta por ACN:acetato de amônia 0,05 M:TEA, sendo que não foi mencionado a proporção dos solventes. O fluxo da fase móvel foi 1,0 mL/min. e a detecção foi realizada em λ 239 nm. A coluna cromatográfica foi uma C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 μ m) e o tempo de corrida foi de 7,0 min. A faixa linear foi de 8 a 10000 ng/mL para OLM e de 2 a 2500 ng/mL para ANLO.

Em novembro de 2012, CHEN *et al.* publicou um artigo no qual a técnica CLUE-EM/EM foi utilizada para determinar ANLO e OLM em plasma humano. Para a OLM, o PI foi o análogo RNH-6272 e para o ANLO, foi utilizado um padrão deuterado (d₄-ANLO). A extração líquido-líquido foi realizada no preparo de amostra e o procedimento definido foi: 100 μ L da solução de PI, 200 μ L de ácido fórmico 1% e 1000 μ L de acetato de etila foram adicionados a 100 μ L da amostra; em seguida, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm por 5 min. e, ao final, 800 μ L foram transferidos para um tubo limpo; a amostra foi seca com auxílio de um fluxo de N₂ e o resíduo foi reconstituído com 200 μ L de MeOH:água:ácido fórmico (50:50:0,1; v/v/v). A fase móvel foi constituída de ACN e ácido fórmico 1%, mas a proporção dos solventes não foi informada. Também não foi mencionado na publicação o tempo de corrida, os tempos de retenção dos fármacos, o fluxo da fase móvel, as transições dos fármacos e a fonte de ionização. A coluna cromatográfica empregada foi uma C₁₈ (50 x 2,1 mm; 1,7 μ m). A faixa linear do método foi de 0,2 a 500 ng/mL para OLM e de 0,1 a 50 ng/mL para ANLO.

Foi observado que os artigos publicados que usaram a técnica de EM-EM não deram relevância à validação do método bioanalítico. Parâmetros de desempenho avaliados durante a validação e informações importantes como recuperação, efeito matriz e estabilidade dos analitos não foram descritos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Padrões analíticos

Os seguintes padrões analíticos foram utilizados para a execução desse trabalho:

- besilato de anlodipino proveniente da USP, lote H01102, teor: 99,8%, válido por todo o período de estudo;
- felodipino proveniente da USP, lote H01178, teor: 99,8%, válido por todo o período de estudo;
- olmesartana proveniente da SRP, lote 0706011204o, teor: 99,3%, válido por todo o período de estudo;
- valsartana proveniente da USP, lote K1K224, teor: 99,7%, validade 08/2013.

2.1.2 Solventes e vidrarias

Os seguintes solventes e vidrarias foram utilizados para a execução desse trabalho:

- água destilada e ultra purificada em sistema Milli-Q;
- balões volumétricos calibrados;
- béqueres e provetas;
- solventes e reagentes grau analítico: acetato de amônio, acetato de etila, ácido fórmico, ácido fosfórico, cloreto de sódio, diclorometano, éter metil *terc*-butílico (MTBE) e hexano;
- solventes grau cromatográfico: acetonitrila e metanol;
- tubos de vidro de 10 e 12,5 cm.

2.1.3 Equipamentos e materiais

Os seguintes equipamentos e materiais foram utilizados para a execução desse trabalho:

- agitador tipo vórtex IKA;
- aparelho de ultrassom BRANSON, modelo 1510;

- aparelho para infusão direta KD Scientific;
- balança analítica SARTORIUS com precisão de 0,01 mg, modelo BP211D;
- centrífuga JOUAN, modelo MR23i.
- coluna cromatográfica ACE para CLAE C₁₈ (100 x 4,6 mm; 5 µm);
- concentrador de amostras TECNAL, modelo TE-0194.
- cromatógrafo a líquido de alta eficiência WATERS, com bomba binária 1525 µ, autor injetor 2777, forno de colunas DCM/CHM, acoplado a espectrômetro de massas WATERS Quattro LC com fonte de ionização por *electrospray*, *software Masslynx 4.1*;
- eppendorf AXYGEN de 1,5 mL;
- freezer REVCO -70 °C;
- *inserts* de 200 µL;
- pipeta eletrônica HandyStep, BRAND;
- pipetas GILSON, volume ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL;
- ponteiras plásticas AXYGEN de 200 µL e 1000 µL;
- refrigerador CÔNSUL 240;
- sistema de purificação de água MILLIPORE, modelo DIRECT-Q 3;
- tubos de plástico TPP do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL;
- *vials* de vidro âmbar WATERS de 2 mL com tampa e septos de teflon.

2.2 Métodos

2.2.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana em plasma humano

Os plasmas humano utilizados foram fornecidos pelo Laboratório de Bioequivalência do Centro de Estudos e Desenvolvimento Analítico Farmacêutico da Faculdade de Farmácia da UFMG em parceria com o Instituto de Ciências Farmacêuticas, Goiânia, GO. O anticoagulante empregado na coleta dos plasmas foi a heparina.

A quantificação de ANLO e OLM foi feita por meio da padronização interna. Os fármacos felodipino (FELO) e valsartana (VALS) foram escolhidos como padrões internos de ANLO e OLM, respectivamente.

2.2.1.1 Determinação das condições de detecção por espectrometria de massas sequencial

Para selecionar as melhores condições de detecção por EM/EM, foram realizadas separadamente infusões diretas no espectrômetro de massas das soluções dos fármacos a um fluxo de $600 \mu\text{L}\cdot\text{hora}^{-1}$. As soluções foram preparadas em ACN:água (80:20;v/v) com ácido fórmico 0,1% na concentração de 500 ng/mL. Os parâmetros de detecção foram otimizados para obter fragmentos de alta intensidade nos espectros, com o objetivo de alcançar baixos limites de quantificação para os analitos.

2.2.1.2 Determinação das condições cromatográficas

Para selecionar as condições cromatográficas para a quantificação de ANLO e OLM em plasma, várias composições de fase móvel foram testadas. A fase móvel escolhida foi aquela que proporcionou a maior área para os picos cromatográficos em um tempo de corrida curto.

As análises cromatográficas foram conduzidas em coluna ACE C₁₈ (100 x 4,6 mm; 5 μm) a 30 °C. A temperatura do auto-injetor foi mantida a 8 °C, o volume de injeção foi de 20 μL e o fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min. Como a fonte de ionização não suporta esse fluxo, uma divisão de fluxo (*split*) foi utilizada, de maneira que 80% da fase móvel proveniente do cromatógrafo fosse descartada e apenas 20% fosse introduzida na fonte de ionização.

2.2.1.3 Determinação do preparo de amostra

Para a extração dos fármacos, as técnicas precipitação de proteínas e extração líquido-líquido foram avaliadas. Vários solventes foram testados e ajustes de pH da amostra foram feitos durante a otimização do método de extração. O objetivo foi desenvolver um método reprodutível, com boa recuperação para os analitos e livre de efeito matriz.

Inicialmente, foi testada a técnica de precipitação por proteínas por ser a mais simples e rápida. Os agentes precipitantes avaliados foram MeOH e ACN. 100 µL de plasma contaminado com concentrações de CQB, CQM e CQA e 25 µL de uma solução de padrão interno (500 ng/mL de FELO e de VALS) foram adicionados em tubo eppendorf, o qual foi submetido à agitação em vórtex por 5 s. Em seguida, 400 µL de agente precipitante foram adicionados, o tubo foi submetido à agitação em vórtex por 60 s e, posteriormente, foi centrifugado a $18407 \times g$ (14000 rpm) por 5 min. a 4 °C. 200 µL do sobrenadante foram transferidos para *vial* e 20 µL foram injetados no cromatógrafo. As recuperações de ANLO e OLM foram baixas (na faixa de 10 a 40%) para ambos agentes precipitantes. Além disso, para a OLM o DPR das áreas das amostras extraídas de cada nível de controle foi alto, indicando baixa reprodutibilidade do método para esse fármaco. Por esses motivos, foi decidido avaliar o preparo de amostra por meio da extração líquido-líquido.

Para avaliar diferentes solventes extratores, dois procedimentos de extração líquido-líquido foram testados simultaneamente. O procedimento 01 apresenta a vantagem de ser mais rápido, já o procedimento 02 apresenta a vantagem de consumir um volume menor de solvente. Esses procedimentos estão descritos a seguir:

Procedimento 01: em tubo de vidro de 10 cm, 25 µL de uma solução de padrão interno foram adicionados a 100 µL de plasma contendo os fármacos. O tubo de vidro foi agitado em vórtex por 5 s. Em seguida, 2 mL do solvente extrator foram adicionados ao tubo que foi submetido à agitação em vórtex por 60 s e, posteriormente, centrifugado a $1945 \times g$ (3500 rpm) por 5 min. a 4 °C para separação das fases aquosa e orgânica. Uma alíquota de 1,6 mL da camada orgânica foi transferida para outro tubo de vidro e evaporada no concentrador de amostras, sob fluxo de ar comprimido e banho-maria a 40 °C, durante 10 min. O resíduo foi reconstituído em 80 µL de fase móvel, com agitação em vórtex por 40 s, e transferido para *vial*. 20 µL foram injetados no cromatógrafo.

Procedimento 02: em tubo de eppendorf de 2 mL, 25 µL de uma solução de padrão interno foram adicionados a 100 µL de plasma contendo os fármacos. O tubo foi agitado em vórtex por 5 s. Em seguida, 1,5 mL do solvente extrator foram adicionados ao tubo que foi submetido à agitação em vórtex por 60 s e,

posteriormente, centrifugado a $18407 \times g$ (14000 rpm) por 5 min. a 4°C para separação das fases aquosa e orgânica. O tubo foi colocado em freezer a -70°C por 15 min. para que apenas a fase aquosa fosse congelada. Na sequência, a fase orgânica foi transferida para tubo de vidro e evaporada no concentrador de amostras, sob fluxo de ar comprimido e banho-maria a 40°C , durante 10 min. O resíduo foi reconstituído em $100\ \mu\text{L}$ de fase móvel, com agitação em vórtex por 40 s, e transferido para *vial*. $20\ \mu\text{L}$ foram injetados no cromatógrafo.

2.2.1.4 Determinação das concentrações da curva de calibração e dos controles de qualidade e preparo das amostras plasmáticas

As faixas de concentração plasmática avaliadas foram definidas com base em dados farmacocinéticos obtidos na literatura para uma dose oral única de 40 mg de olmesartana medoxomila e 10 mg de anlodipino. Na **Tabela 3.1**, estão descritos a concentração plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$) e o tempo para atingir essa concentração ($T_{\text{máx}}$) relatados nos artigos analisados durante a determinação das faixas de concentração. O objetivo foi garantir que o limite superior de quantificação (LSQ) fosse superior ao $C_{\text{máx}}$ dos fármacos, para que todas as amostras reais estejam compreendidas nas faixas estabelecidas.

Tabela 3.1 – $C_{\text{máx}}$ e $T_{\text{máx}}$ de estudos farmacocinéticos de dose oral única descritos na literatura para ANLO e OLM.

Referência	Fármaco	Dosagem (mg)	$C_{\text{máx}}$ (ng/mL)	$T_{\text{máx}}$ (horas)
CARVALHO <i>et al.</i> , 2001	ANLO	5	3,9	6,0
MA <i>et al.</i> , 2007	ANLO	10	8,7	5,3
SARKAR <i>et al.</i> , 2008	ANLO	10	7,1	6,8
ROHATAGI <i>et al.</i> , 2008b	ANLO	10	7,7	8,0
LIU <i>et al.</i> , 2009	ANLO	10	5,9	7,7
BOLBRINKER <i>et al.</i> , 2009	ANLO	5	4,8	8,0
YU <i>et al.</i> , 2006	OLM	40	1049	2,6
VAIDYA <i>et al.</i> , 2008	OLM	20	546,8	2,0
ROHATAGI <i>et al.</i> , 2008b	OLM	40	928,2	2,0
BOLBRINKER <i>et al.</i> , 2009	OLM	20	465,7	1,5
LI <i>et al.</i> , 2010	OLM	40	728,6	1,8

As faixas determinadas foram de 3 a 1800 ng/mL para olmesartana e de 1 a 100 ng/mL para anlodipino. Cada curva de calibração foi composta por 6 pontos. Os pontos da curva de calibração da OLM foram: 3, 30, 300, 800, 1300 e 1800 ng/mL. Os pontos da curva de calibração do ANLO foram: 1, 10, 40, 60, 80 e 100 ng/mL.

A concentração do controle de qualidade de baixa concentração (CQB) dever ser de até três vezes a concentração do limite inferior de quantificação do método (LIQ). A concentração do controle de qualidade de média concentração (CQM) deve ser próxima à média entre o LIQ e o LSQ. A concentração do controle de qualidade de alta concentração (CQA) dever estar entre 75% e 85% do LSQ. A concentração do controle de qualidade de diluição (CQD) deve ser superior ao LSQ e este deve ser analisado por procedimento e proporção de diluição pré-definido (BRASIL, 2012).

O CQB foi definido em 3 e 9 ng/mL para ANLO e OLM, respectivamente. O CQM foi definido em 50 e 900 ng/mL para ANLO e OLM, respectivamente. O CQA foi definido em 85 e 1500 ng/mL para ANLO e OLM, respectivamente. O CQD foi definido como sendo duas vezes a concentração do CQA e, por isso, foi de 170 e 3000 ng/mL para ANLO e OLM, respectivamente.

Para preparar as amostras plasmáticas utilizadas durante o desenvolvimento e validação do método bioanalítico, foram feitas adições de soluções de trabalho contendo concentrações conhecidas de ANLO e OLM em plasma humano branco, obtido de voluntários que não estavam fazendo uso de qualquer medicação. O fator de diluição utilizado foi de 100 de modo que para se obter, por exemplo, 5,0 mL de amostra, foi adicionado 0,05 mL de solução contendo os fármacos ANLO e OLM em 4,95 mL de plasma branco. Dessa forma, as soluções padrão dos fármacos foram diluídas para uma concentração 100 vezes maior do que as concentrações plasmáticas, conforme mostrado no item 2.2.1.5.

As amostras plasmáticas foram preparadas em tubos do tipo Falcon. Após a adição da solução dos fármacos ao plasma, as amostras foram agitadas em vórtex por 30 s e centrifugadas a $1945 \times g$ (3500 rpm) por 5 min. a 4 °C, na sequência as amostras foram armazenadas em freezer a -70 °C.

2.2.1.5 Preparo das soluções padrão, intermediária e de trabalho de anlodipino e olmesartana

Solução padrão de ANLO (1000 µg/mL): cerca de 10 mg de ANLO SQR foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. 7 mL de MeOH:água (50:50;v/v) foram adicionados ao balão que na sequência foi submetido ao ultrassom por 2 minutos. Ao final, o volume da solução foi completado com o mesmo solvente.

Solução intermediária 01 de ANLO (200 µg/mL): 2 mL da solução padrão de ANLO foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com MeOH:água (50:50;v/v).

Solução intermediária 02 de ANLO (10 µg/mL): 0,5 mL da solução intermediária 01 de ANLO foi transferido para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com MeOH:água (50:50;v/v).

Solução padrão de OLM (1000 µg/mL): cerca de 10 mg de OLM SQR foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. 7 mL de MeOH:água (50:50;v/v) foram adicionados ao balão que na sequência foi submetido ao ultrassom por 2 minutos. Ao final, o volume da solução foi completado com o mesmo solvente.

Solução intermediária 01 de OLM (30 µg/mL): 0,3 mL da solução padrão de OLM foi transferido para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com MeOH:água (50:50;v/v).

As soluções padrão e intermediárias de ANLO e OLM foram diluídas para as concentrações de trabalho, conforme demonstrado na **Tabela 3.2**. A solução diluente utilizada foi MeOH:água (50:50;v/v). As soluções padrão e intermediária foram referidas na **Tabela 3.2** como soluções estoque. Após o preparo das soluções de trabalho, estas foram utilizadas no preparo das amostras plasmáticas.

Tabela 3.2 – Preparo das soluções de trabalho de ANLO e OLM utilizadas durante o desenvolvimento e validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM e concentrações de trabalho obtidas após a diluição.

Ponto da curva	ANLO		OLM		Solução diluente q.s.p. (mL)	Conc. de trabalho ANLO ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. de trabalho OLM ($\mu\text{g/mL}$)
	Conc. solução estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Volume solução estoque (mL)	Conc. solução estoque ($\mu\text{g/mL}$)	Volume solução estoque (mL)			
1	10	0,1	30	0,1	10	0,1	0,3
2	10	1	30	1	10	1	3
3	200	0,2	1000	0,3	10	4	30
4	200	0,3	1000	0,8	10	6	80
5	200	0,4	1000	1,3	10	8	130
6	200	0,5	1000	1,8	10	10	180
CQB	10	0,3	30	0,3	10	0,3	0,9
CQM	200	0,25	1000	0,9	10	5	90
CQA	200	0,425	1000	1,5	10	8,5	150
CQD	200	0,85	1000	3	10	17	300

2.2.1.6 Preparo das soluções padrão e de trabalho dos padrões internos

Solução padrão de FELO (400 $\mu\text{g/mL}$): cerca de 4 mg de FELO SQR foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. 7 mL de MeOH foram adicionados ao balão que na sequência foi submetido ao ultrassom por 2 minutos. Ao final, o volume da solução foi completado com o mesmo solvente.

Solução intermediária de FELO (40 $\mu\text{g/mL}$): 1 mL da solução estoque de ANLO foi transferido para balão volumétrico de 10 mL. O volume foi completado com MeOH.

Solução padrão de VALS (300 $\mu\text{g/mL}$): cerca de 3 mg de VALS SQR foram, exatamente, pesados e transferidos para balão volumétrico de 10 mL. 7 mL de MeOH foram adicionados ao balão que na sequência foi submetido ao ultrassom por 2 minutos. Ao final, o volume da solução foi completado com o mesmo solvente.

Solução trabalho (0,8 $\mu\text{g/mL}$ de FELO e 12 $\mu\text{g/mL}$ de VALS): 1 mL da solução intermediária de FELO e 2 mL da solução estoque de VALS foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL. O volume foi completado com MeOH.

2.2.1.7 Validação do método bioanalítico

O método bioanalítico desenvolvido para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana em plasma humano por CLAE-EM/EM foi validado de acordo com as recomendações da Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012 da ANVISA, do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (*Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation, 2001*) e do Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da *European Medicines Agency (EMA) (Guideline on bioanalytical method validation, 2011)*. Todos os cálculos foram feitos com auxílio dos softwares *Masslynx 4.1* e *Microsoft Excel 2007*.

2.2.1.7.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da análise de oito pools de plasma provenientes de fontes distintas. Os plasmas foram coletados de voluntários que não estavam fazendo uso de qualquer medicamento e, por isso, foram considerados plasmas brancos. Das oito amostras analisadas, duas eram compostas por plasmas hemolisados, duas por plasmas lipêmicos e quatro por plasmas normais. O plasma lipêmico é um plasma com alto teor de lipídeos e foi coletado após voluntários receberem uma refeição rica em gorduras. O plasma hemolisado é um plasma que contém hemácias lisadas. No processo de coleta de plasma normal, ocorreu hemólise de amostras de alguns voluntários durante o procedimento. Essas amostras foram utilizadas para fazer os pools hemolisados empregados na validação.

Além disso, foram avaliadas também amostras de plasma branco contaminado com fármacos de uso comum. Os fármacos avaliados e suas respectivas concentrações plasmáticas analisadas foram: cafeína (1 µg/mL), paracetamol (20 µg/mL), dipirona (5 µg/mL) e dexclorfeniramina (76 ng/mL). As concentrações desses fármacos foram estimadas com base nas concentrações plasmáticas máximas obtidas em estudos farmacocinéticos.

O objetivo deste teste de seletividade é garantir que não há interferentes plasmáticos nos mesmos tempos de retenção dos analitos. Assim, para ratificar a

seletividade os cromatogramas obtidos dos plasmas analisados foram comparados com um cromatograma obtido de LIQ extraído. Caso seja detectada a presença de picos interferentes no mesmo tempo de retenção de algum dos fármacos, a área do pico interferente deve ser inferior a 20% da área do pico de ANLO e OLM no LIQ e inferior a 5% da área do pico do padrão interno (FELO e VALS).

Qualquer amostra de plasma branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção dos fármacos deve ser rejeitada. Se isso ocorrer, novas amostras de, no mínimo, outras seis fontes devem ser testadas. Se amostras deste novo grupo apresentar interferências significativas no tempo de retenção dos fármacos, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

2.2.1.7.2 Detecção cruzada

O teste de detecção cruzada (*cross talk*), que verifica se algum fármaco apresenta possíveis interferentes na transição de outro fármaco, também foi realizado para auxiliar na avaliação da seletividade do método. Nesse teste, amostras contendo cada fármaco isoladamente nas concentrações do LSQ para ANLO e OLM e nas concentrações de trabalho para os padrões internos foram extraídas e analisadas. Para efeito de comparação, uma amostra de LIQ extraído foi injetada ao final do teste. Se for detectada alguma interferência de um fármaco no tempo de retenção dos outros fármacos, essa interferência deve ser inferior a 20% da área do pico de ANLO e OLM no LIQ e inferior a 5% da área do pico do padrão interno (FELO e VALS).

2.2.1.7.3 Efeito residual

O efeito residual (*carry over*) é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento da área dos fármacos causado por contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente.

Para avaliar esse efeito, primeiramente uma amostra de plasma branco extraído foi injetada. Na sequência uma amostra do LSQ extraído foi analisada e, posteriormente, a mesma amostra de plasma branco foi injetada duas vezes. Para

efeito de comparação, uma amostra de LIQ extraído foi injetada ao final do teste. O ideal é que nenhuma contaminação ocasionada pelo LSQ seja detectada na amostra branca injetada imediatamente após o LSQ. Entretanto, caso algum pico interferente seja visualizado nos tempos de retenção dos fármacos, a área do pico interferente deve ser inferior a 20% da área do pico de ANLO e OLM no LIQ e inferior a 5% da área do pico do padrão interno (FELO e VALS).

Vale ressaltar que o teste de efeito residual não é mencionado no Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos do FDA (2001).

2.2.1.7.4 Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio de curvas de calibração que foram extraídas e analisadas em três dias consecutivos e em três corridas analíticas diferentes. Cada corrida analítica consistiu de 2 amostras brancas (plasma branco no qual não foi adicionado nenhum fármaco), 2 amostras zero (plasma branco no qual foi adicionado solução trabalho de PI), 6 pontos da curva de calibração em duplicata, 5 pontos do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD. A faixa linear, os pontos da curva de calibração e os níveis de controle de qualidade determinados para ANLO e OLM estão relatados no item 2.2.1.4. As análises do LIQ e dos controles de qualidade foram empregadas para o cálculo da exatidão e precisão do método.

Os critérios de aceitação para avaliar cada curva de calibração foram: desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração nominal para o LIQ e desvio menor ou igual 15% em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva. No mínimo nove dos doze pontos da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, sendo que não pode ser excluído dois pontos do mesmo nível de concentração. Vale destacar que o critério de aceitação empregado está de acordo com o preconizado na RDC 27 (2012) e no guia do EMA (2011), diferindo, portanto, do critério especificado no guia do FDA (2001).

2.2.1.7.5 Precisão e exatidão

A precisão de um método bioanalítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de uma mesma amostra de plasma. É expressa como uma estimativa do DPR. A exatidão representa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais e é uma medida dos erros sistemáticos. É expressa como uma estimativa do erro padrão relativo (EPR), que é o desvio em % da concentração calculada em relação à concentração nominal (CASSIANO *et al.*, 2009; BRASIL, 2012).

Para determinar a precisão e a exatidão intra e intercorrida, 5 replicatas do LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD foram analisadas durante três dias consecutivos nas três corridas analíticas mencionadas no item 2.2.1.7.4.

O critério de aceitação utilizado para precisão intra e intercorrida foi que o DPR deve ser igual ou inferior a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valor menor ou igual a 20%. Já para a exatidão intra e intercorrida foi que o EPR deve estar dentro da faixa de $\pm 15\%$ do valor nominal, exceto para o LIQ, para o qual se admite valor dentro da faixa de $\pm 20\%$ do valor nominal. Todos os valores obtidos nas análises devem ser incluídos no cálculo do DPR e do EPR.

O processo de análise do CQD (170 e 3000 ng/mL de ANLO e OLM, respectivamente) foi executado diluindo esse controle 2 vezes. Como a tomada de amostra do método foi de 100 μL , no início do processo de extração foi adicionado ao tubo eppendorf, 50 μL de CQD e 50 μL de plasma branco, obtendo, dessa forma, concentrações de 85 e 1500 ng/mL para ANLO e OLM, respectivamente. Os valores de concentração quantificados pela curva de calibração foram multiplicados pelo fator de diluição 2 e os cálculos de precisão e exatidão foram executados.

2.2.1.7.6 Recuperação

A recuperação avalia a eficiência do método de extração das amostras biológicas. Embora altos valores de recuperação sejam desejáveis para maximizar a

sensibilidade do método, não é necessário que este valor seja de 100% e, sim, que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutível.

A recuperação do método foi avaliada por meio da análise em quintuplicata de amostras de plasma extraídas contendo ANLO e OLM nos níveis de concentração do CQB, CQM e CQA. A recuperação dos padrões internos foi avaliada nas concentrações obtidas ao final do processo de extração (200 ng/mL de FELO e 3000 ng/mL de VALS). Esse parâmetro foi calculado comparando a média das áreas obtidas para as amostras extraídas com a média das áreas obtidas para as amostras preparadas em fase móvel, as quais representam 100%.

Vale destacar que a recuperação não é um parâmetro requerido pela RDC 27 (2012) e pelo guia do EMA (2011), sendo citado apenas pelo guia do FDA (2001). Tal fato pode ser devido a recuperação não ser um parâmetro importante para garantir a confiabilidade dos resultados. É um parâmetro que avalia exclusivamente a eficiência do processo de extração e seu principal impacto é nos limites de detecção e quantificação do método.

2.2.1.7.7 Efeito matriz

O efeito matriz é um importante parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento e validação de um método bioanalítico, pois pode comprometer a confiabilidade dos resultados. O efeito matriz ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica co-eluem com os compostos de interesse. O mecanismo exato do efeito é desconhecido, mas, provavelmente, é originado da competição entre o analito e um componente da matriz não monitorado. Dependendo do ambiente no qual a ionização e o processo de evaporação estejam ocorrendo, esta competição deve diminuir (supressão da ionização) ou aumentar (indução da ionização) a eficiência de formação dos íons do analito. Sendo assim, a eficiência de formação dos íons do analito é fortemente dependente da natureza da matriz na fonte de ionização. Além disso, o efeito matriz é dependente da estrutura química do analito (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003; TAYLOR, 2005).

Para a execução do teste, amostras brancas provenientes dos oito pools (4 normais, 2 lipêmicos e 2 hemolisados) utilizados na determinação da seletividade foram extraídas em duplicata. Ao final do processo de extração, os resíduos de uma simplicata das amostras foram reconstituídos com uma solução em fase móvel contendo ANLO e OLM nas concentrações de CQB e FELO e VALS nas concentrações obtidas ao final do processo de extração. Os resíduos da outra simplicata das amostras foram reconstituídos com uma solução em fase móvel contendo ANLO e OLM nas concentrações de CQA e FELO e VALS nas concentrações obtidas ao final do processo de extração. As amostras foram injetadas juntamente com as soluções utilizadas para a reconstituição. Cada solução foi injetada cinco vezes. A avaliação do efeito matriz foi realizada por dois procedimentos.

No primeiro procedimento, o efeito matriz foi calculado comparando as áreas obtidas para as amostras reconstituídas com a média das áreas obtidas para as amostras preparadas em fase móvel, as quais representam 100%. O critério de aceitação utilizado foi de que a variação entre as áreas deve estar compreendida na faixa de $\pm 15\%$ (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003; TAYLOR, 2005; CHAMBERS *et al.*, 2007).

No segundo procedimento, o efeito matriz foi avaliado por meio do fator de matriz normalizado pelo PI (FMN), que foi calculado conforme equação 18. O critério de aceitação utilizado foi de que o DPR dos FMN relativos a todas as amostras de cada nível de controle deve ser inferior a 15%.

$$FMN = \frac{\text{área do analito em matriz} / \text{área do PI em matriz}}{\text{média das áreas do analito em solução} / \text{média das áreas do PI em solução}} \quad (18)$$

A RDC 27 (2012) preconiza que o efeito matriz seja calculado por meio do FMN. O guia do EMA (2011) relata que o efeito matriz pode ser calculado por qualquer um dos dois procedimentos. O guia do FDA (2001) reporta que o efeito matriz deve ser avaliado, mas não menciona de qual maneira.

2.2.1.7.8 Estabilidade

A estabilidade de fármacos em fluidos biológicos é uma função do tempo, da temperatura de estocagem, das propriedades químicas do fármaco, da matriz biológica e do recipiente no qual as amostras estão armazenadas. A avaliação da estabilidade é um importante parâmetro que deve ser avaliado durante a validação de métodos bioanalíticos, uma vez que degradação não é rara, mesmo quando todas as precauções são tomadas para evitar especificamente problemas de estabilidade dos fármacos (BRASIL, 2002).

Para a avaliação da estabilidade dos analitos em plasma, foram analisados os níveis de controle CQB e CQA em quintuplicata. A corrida analítica dos testes de estabilidade em matriz biológica foi constituída por curva de calibração recém-preparada em duplicata, CQB e CQA recém-preparados em quintuplicata e CQB e CQA testes em quintuplicata. Se algum controle de qualidade recém-preparado apresentar desvio fora da faixa de $\pm 15\%$, deve ser excluído do cálculo. Todas as amostras testes devem ser incluídas no cálculo da média independente do valor do desvio. A estabilidade é confirmada quando se observar desvios entre a média das amostras testes e a média das amostras recém-preparadas compreendidos na faixa de $\pm 15\%$. Além disso, a precisão e exatidão das análises também devem ser confirmadas por meio de valores de DPR inferiores a 15% e valores de EPR dentro da faixa de $\pm 15\%$.

Para a avaliação da estabilidade das soluções estoque e de trabalho dos analitos e padrões internos, as soluções dos analitos foram diluídas para níveis de controle CQB e CQA em plasma e as soluções dos padrões internos foram diluídas para as concentrações de 200 ng/mL de FELO e de 3000 ng/mL de VALS. A corrida analítica do teste de estabilidade em solução foi constituída de soluções de CQB e CQA recém-preparadas contendo os PI e soluções teste de CQB e CQA contendo os PI. Cada solução foi injetada cinco vezes e todas as áreas obtidas devem ser incluídas no cálculo da média. A estabilidade é confirmada quando se observar desvios entre a média das áreas das soluções testes e a média das áreas das soluções recém-preparadas compreendidos na faixa de $\pm 10\%$. Além disso, a precisão das análises também deve ser confirmada por meio de valores de DPR inferiores a 15%.

2.2.1.7.8.1 Estabilidade de curta duração (ECD)

O objetivo da ECD é avaliar a estabilidade das amostras plasmáticas a temperatura ambiente por um período superior ao que as amostras em estudo serão mantidas nessa condição.

Para a avaliação da ECD, amostras plasmáticas de CQB e CQA foram descongeladas e mantidas à temperatura ambiente por um período de 6 horas. Ao final do período, amostras da curva de calibração e de CQB e CQA foram descongeladas e extraídas juntamente com as amostras testes. As médias das concentrações obtidas das amostras testes foram comparadas com as médias das concentrações das amostras de controle recém-preparadas.

2.2.1.7.8.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD)

O objetivo da ECCD é avaliar a estabilidade das amostras plasmáticas após serem submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento. A cada ciclo, as amostras devem ser mantidas congeladas por um período de no mínimo 12 horas.

Para a avaliação da ECCD, as amostras plasmáticas de CQB e CQA foram congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Ao final desse período, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente. Após completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e assim sucessivamente, até completar três ciclos. Ao final do terceiro ciclo, amostras da curva de calibração e de CQB e CQA foram descongeladas e extraídas juntamente com as amostras testes. As médias das concentrações obtidas das amostras testes foram comparadas com as médias das concentrações das amostras de controle recém-preparadas.

2.2.1.7.8.3 Estabilidade de pós-processamento (EPP)

Problemas de instabilidade podem ocorrer não somente na matriz biológica, mas também nas amostras processadas. Por isso, o objetivo da EPP é avaliar a estabilidade dos fármacos após a extração na temperatura do auto-injetor do

equipamento, local em que as amostras processadas são armazenadas. Em relação ao tempo, o mesmo deve ser superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término do preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa.

Para avaliação da EPP, as amostras plasmáticas de CQB e CQA foram submetidas ao processo de extração e mantidas no injetor auto-injetor a 8 °C por 27 horas e 50 minutos antes da injeção. As concentrações obtidas foram comparadas com aquelas de amostras injetadas imediatamente após a extração. As médias das concentrações obtidas das amostras testes foram comparadas com as médias das concentrações das amostras de controle recém-preparadas.

2.2.1.7.8.4 Estabilidade das soluções estoque e das soluções de trabalho dos analitos e dos padrões internos

A estabilidade das soluções dos fármacos foi avaliada em temperatura ambiente e sob refrigeração a 8 °C. Foram avaliadas as estabilidades das soluções estoque dos analitos e dos padrões internos e as estabilidades das soluções de CQB e CQA e da solução trabalho de padrão interno.

Primeiramente, foram preparadas soluções estoque de OLM, VALS, FELO e ANLO. A partir da diluição dessas soluções, foram preparadas soluções de CQB, CQA e solução trabalho de padrão interno. Todas as soluções foram armazenadas em geladeira a 8 °C durante 11 dias.

Após 10 dias, foram preparadas novamente soluções estoque de OLM, VALS, FELO e ANLO. A partir da diluição dessas soluções, foram preparadas soluções de CQB, CQA e solução trabalho de padrão interno. Todas as soluções foram mantidas a temperatura ambiente até o dia seguinte, totalizando 22 horas.

No 11º dia, as soluções estoque dos fármacos, as soluções de CQB e CQA e a solução trabalho de padrão interno mantidas em geladeira e em temperatura ambiente foram diluídas para os níveis de concentrações plasmáticas. De forma que as soluções de CQB e CQA foram diluídas por um fator de 100 vezes e as solução trabalho de PI por um fator de 4 vezes. A solução de PI foi diluída para o mesmo

balão volumétrico de CQB e CQA e fase móvel foi utilizada como diluente. Na sequência, foram preparadas amostras recentes e injetadas juntamente com as amostras testes. As médias das áreas obtidas das soluções testes foram comparadas com as médias das áreas obtidas das soluções de controle recém-preparadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento e validação do método bioanalítico por CLAE-EM/EM para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana em plasma humano

A primeira etapa do desenvolvimento do método bioanalítico foi a escolha do PI. O ideal é que o PI apresente comportamento químico similar à substância a ser quantificada, tenha tempo de retenção próximo a esta substância, não reaja com a substância ou com outro componente da matriz e não faça parte da amostra. Pelo fato de OLM e ANLO apresentarem estruturas e propriedades físico-químicas muito diferentes, foi decidido trabalhar com um PI para cada analito. O fármaco felodipino foi escolhido como PI do ANLO e o fármaco valsartana foi escolhido como PI da OLM. As estruturas dos analitos e de seus padrões internos estão representadas nas **Figuras 3.3 e 3.4** (RIBANI *et al.*, 2004).

Figura 3.3 – Estruturas químicas de ANLO e FELO.

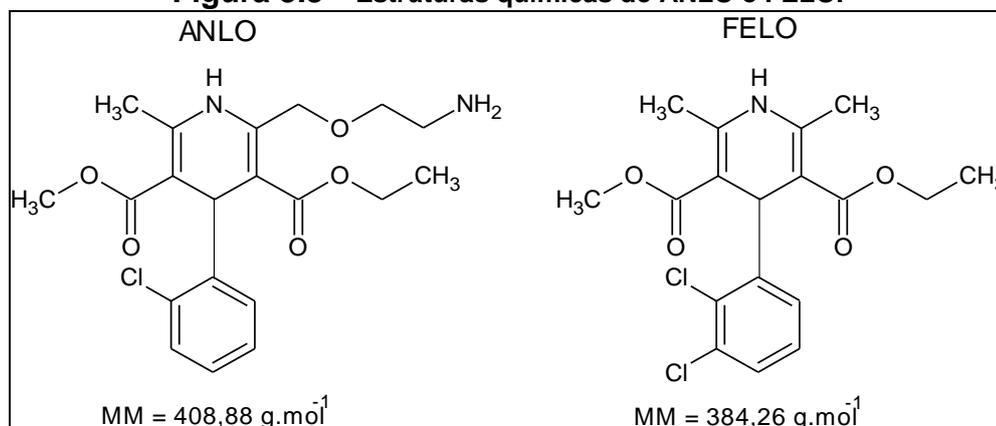
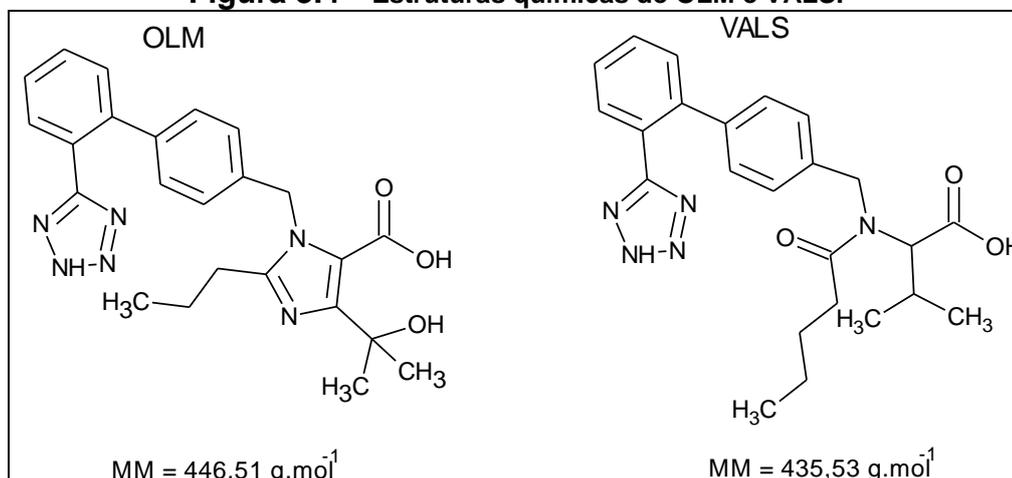


Figura 3.4 – Estruturas químicas de OLM e VALS.



A padronização interna foi utilizada para quantificar os analitos em plasma. Por esse método, a curva analítica é traçada usando a resposta (área do fármaco/área do padrão interno) *versus* a concentração do fármaco. A padronização interna é útil para minimizar erros devido ao preparo da amostra, aparelhagem e técnica de análise (WAINER & LOUGH, 1996).

3.1.1 Determinação das condições de detecção por espectrometria de massas sequencial

A ionização por *electrospray* foi realizada no modo positivo (ESI+), o que possibilitou aos fármacos receberem uma carga positiva. Os íons foram monitorados no modo de varredura MRM.

A ionização para o ANLO foi avaliada por meio da infusão de uma solução contendo 500 ng/mL. Para determinar o íon precursor e os parâmetros relacionados à fonte de ionização, a função *MS Scan* foi selecionada. Primeiramente, a voltagem do cone foi determinada. Foi observado que, com voltagem superior a 15 V, o ANLO fragmentava na própria fonte de ionização. Assim, a voltagem do cone que apresentou maior intensidade de sinal foi 15 V. Na sequência, os outros parâmetros relacionados à fonte de ionização foram otimizados com o objetivo de promover um pico do íon precursor com alta intensidade de sinal e estável, os valores definidos estão relatados a seguir: voltagem do capilar 3 kV, cone extrator 3 V, lentes RF 0,5, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C e fluxo do gás N₂ de dessolvatação 500 L.hora⁻¹. Esses parâmetros, com exceção da voltagem do cone, são comuns a todos os fármacos monitorados. Foi decidido determiná-los com o auxílio da solução de ANLO para garantir alta intensidade do sinal do íon precursor desse fármaco e, conseqüentemente, baixo limite de quantificação. O LQ desse fármaco deve ser inferior ao LQ da OLM, uma vez que o ANLO apresenta concentração plasmática máxima menor. Posteriormente, os parâmetros otimizados se mostraram adequados para a ionização dos outros fármacos.

Nas condições otimizadas, foi escolhido o íon precursor [M+H]⁺ com *m/z* igual a 409,4 que corresponde à massa nominal do ANLO (408,40 g/mol), calculada com a massa atômica do ³⁵Cl, somada a massa molar do hidrogênio. Substâncias cloradas

apresentam padrão isotópico característico no espectro de massas, devido ao cloro apresentar os isótopos ^{35}Cl e ^{37}Cl , com abundância de 75,78% e 24,22%, respectivamente. Para moléculas com um átomo de Cl, como é o caso do ANLO, é esperado, conforme descrito na literatura, um espectro de massas com o íon molecular (M^+) apresentando abundância de 100% e o íon $M+2$ apresentando abundância de 32,6%. Pelo fato do ANLO estar protonado, foi possível visualizar no espectro do íon precursor (**Figura 3.5A**) o íon $[M+H]^+$ com abundância de 100% e m/z de 409,4 e o íon $[M+2+H]^+$ com abundância de, aproximadamente, 30% e m/z de 411,4. Assim, os resultados obtidos no espectro corroboram com as informações da literatura (HARRIS, 2005; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Para determinar o íon produto do ANLO e os parâmetros relacionados ao analisador de massas, a função *Daughter Scan* foi selecionada. O gás de colisão foi ligado e a energia de colisão foi aumentada gradativamente para fragmentar o íon precursor. O íon produto com m/z 237,7 (**Figura 3.5B**) foi escolhido e a energia de colisão que promoveu maior intensidade do fragmento foi de 10 eV. Os seguintes parâmetros relacionados ao analisador de massas foram otimizados: resolução 1 LM/HM de 10/10, resolução 2 LM/HM de 7,5/7,5, energia do íon 1 de 0,5 V, energia do íon 2 de 1,0 V, entrance e exit de 10 V e multiplier de 750 V. Esses parâmetros otimizados, com exceção da energia de colisão, também são comuns a todos os outros fármacos monitorados e, posteriormente, se mostraram adequados para a ionização de OLM, FELO e VALS.

Após a otimização da detecção para ANLO, foram feitas infusões, isoladamente, de soluções a 500 ng/mL de OLM, FELO e VALS. As transições, voltagens do cone e energias de colisão foram selecionadas de acordo com o mesmo procedimento relatado para ANLO.

Para a OLM, o íon precursor selecionado $[M+H]^+$ foi de m/z 447,6 (**Figura 3.6A**) e a voltagem do cone que alcançou maior intensidade do sinal foi de 20 V. No processo de fragmentação, o íon de maior intensidade obtido foi de m/z 206,8 (**Figura 3.6B**) com uma energia de colisão de 28 eV.

Para o FELO, foi observado que, com voltagem do cone superior a 10 V, o composto fragmentava na própria fonte de ionização assim como ocorreu com o ANLO. Assim, a voltagem do cone que apresentou maior intensidade de sinal foi 10 V. Para moléculas com dois átomos de Cl, como é o caso do FELO, é esperado, conforme descrito na literatura, um espectro de massas com o íon molecular apresentando abundância de 100%, o íon M+2 apresentando abundância de 65,3% e o íon M+4 apresentando abundância de 10,6%. Pelo fato do FELO estar protonado, foi possível visualizar no espectro do íon precursor (**Figura 3.7A**) o íon $[M+H]^+$ com abundância de 100% e m/z 384,7, o íon $[M+2+H]^+$ com abundância de, aproximadamente, 60% e m/z 386,4 e o íon $[M+4+H]^+$ com abundância de, aproximadamente, 12% e m/z 388,5. Os resultados obtidos no espectro corroboram com as informações da literatura. O íon precursor $[M+H]^+$ foi selecionado para ser utilizado na quantificação do método, sua m/z igual a 384,7 corresponde à massa nominal do FELO (383,30 g/mol), calculada com a massa atômica do ^{35}Cl , somada a massa molar do hidrogênio. No processo de fragmentação, o íon de maior intensidade obtido foi o de m/z 338,2 (**Figura 3.7B**) com energia de colisão de 10 eV (HARRIS, 2005; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Para a VALS foi observado que o íon de maior intensidade no espectro do íon precursor foi o aduto $[M+\text{Na}]^+$ com m/z igual a 458,8 que corresponde a massa molar da VALS (435,53 g/mol) somada a massa molar do sódio (23,00). Como a VALS é PI e, por isso, não precisa apresentar intensidade de sinal tão elevada, foi decidido escolher o íon $[M+H]^+$ com m/z igual a 436,5 para ser o íon precursor (**Figura 3.8A**). Além disso, o sódio não está presente da fase móvel, sendo proveniente de alguma contaminação, o que diminui a confiabilidade dos resultados, caso o íon aduto fosse escolhido. A voltagem do cone foi de 15 V. Após a fragmentação, o íon produto de maior intensidade com m/z 291,0 (**Figura 3.8B**) foi obtido com energia de colisão de 18 eV.

O *dwell time* selecionado para todos os fármacos foi de 0,5 s. Esse valor indica o tempo de aquisição para o monitoramento de cada transição. A pressão do Ar na célula de colisão foi mantida na faixa de $1,8 \times 10^{-3}$ a $2,2 \times 10^{-3}$ mbar durante todo desenvolvimento e validação do método. Os espectros dos íons precursores e de fragmentação dos fármacos estão representados nas **Figuras 3.5 a 3.8**.

Figura 3.5 – Espectros ESI(+) de anlodipino. (A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 409,4; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal m/z 237,7.

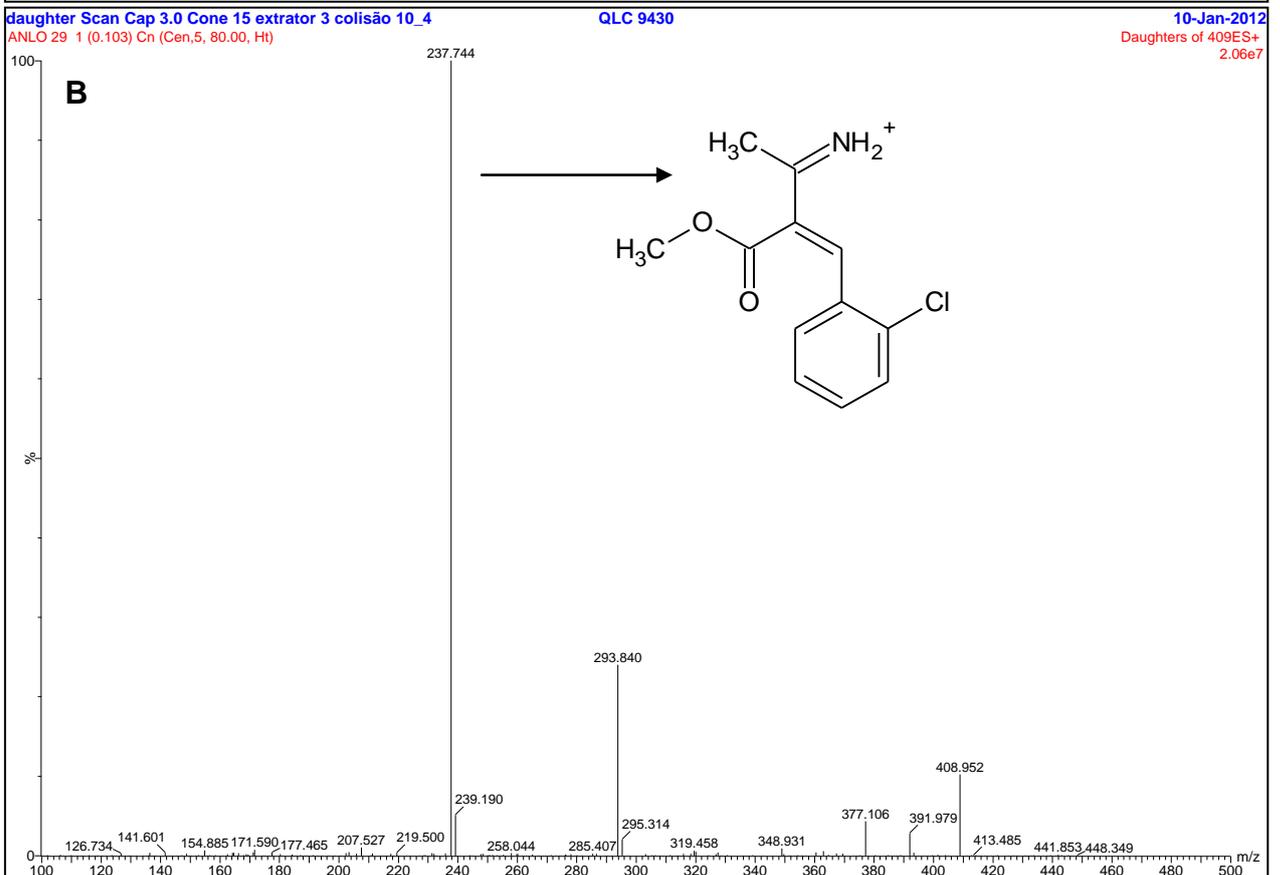
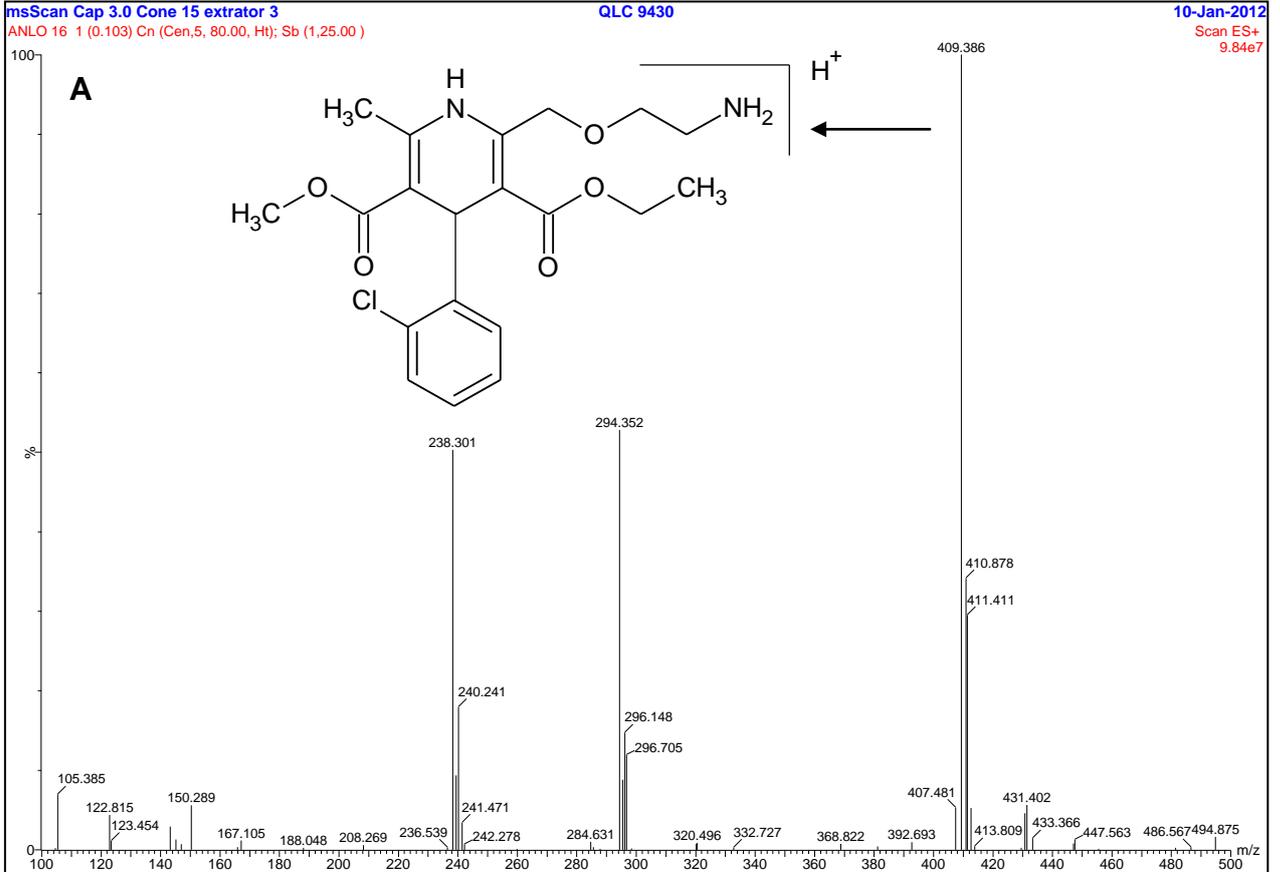


Figura 3.6 – Espectros ESI(+) de olmesartana. (A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 447,6; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal m/z 206,8.

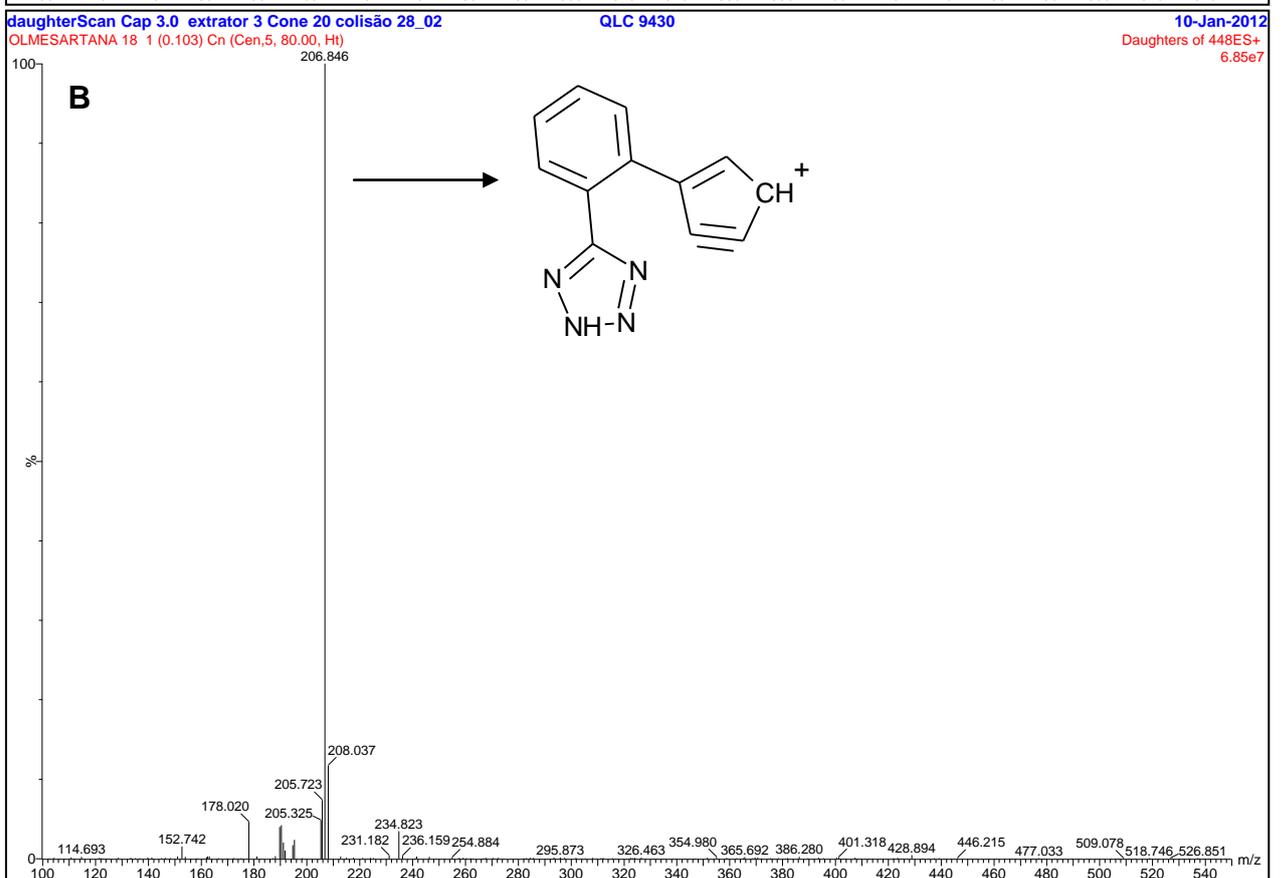
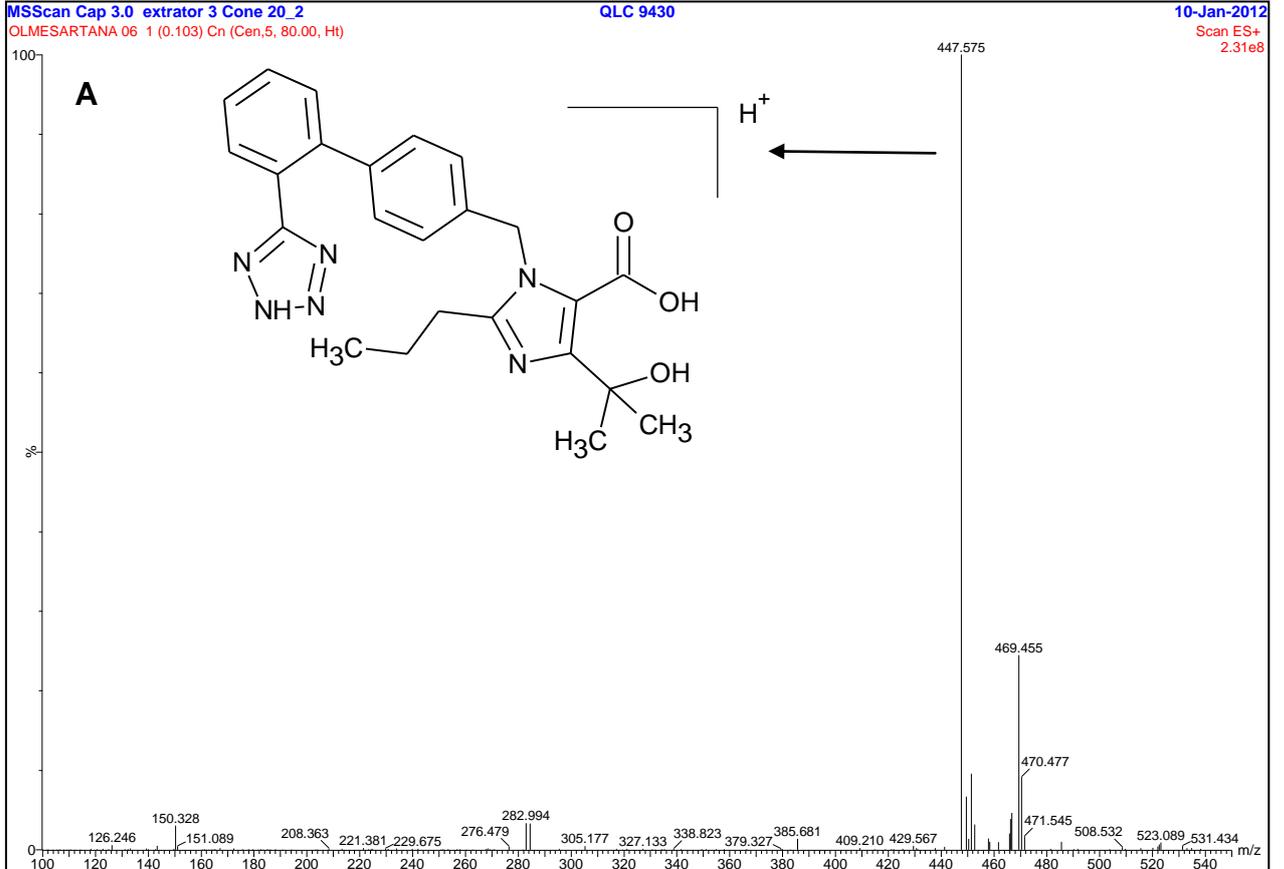


Figura 3.7 – Espectros ESI(+) de felodipino. (A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 384,7; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal m/z 338,2.

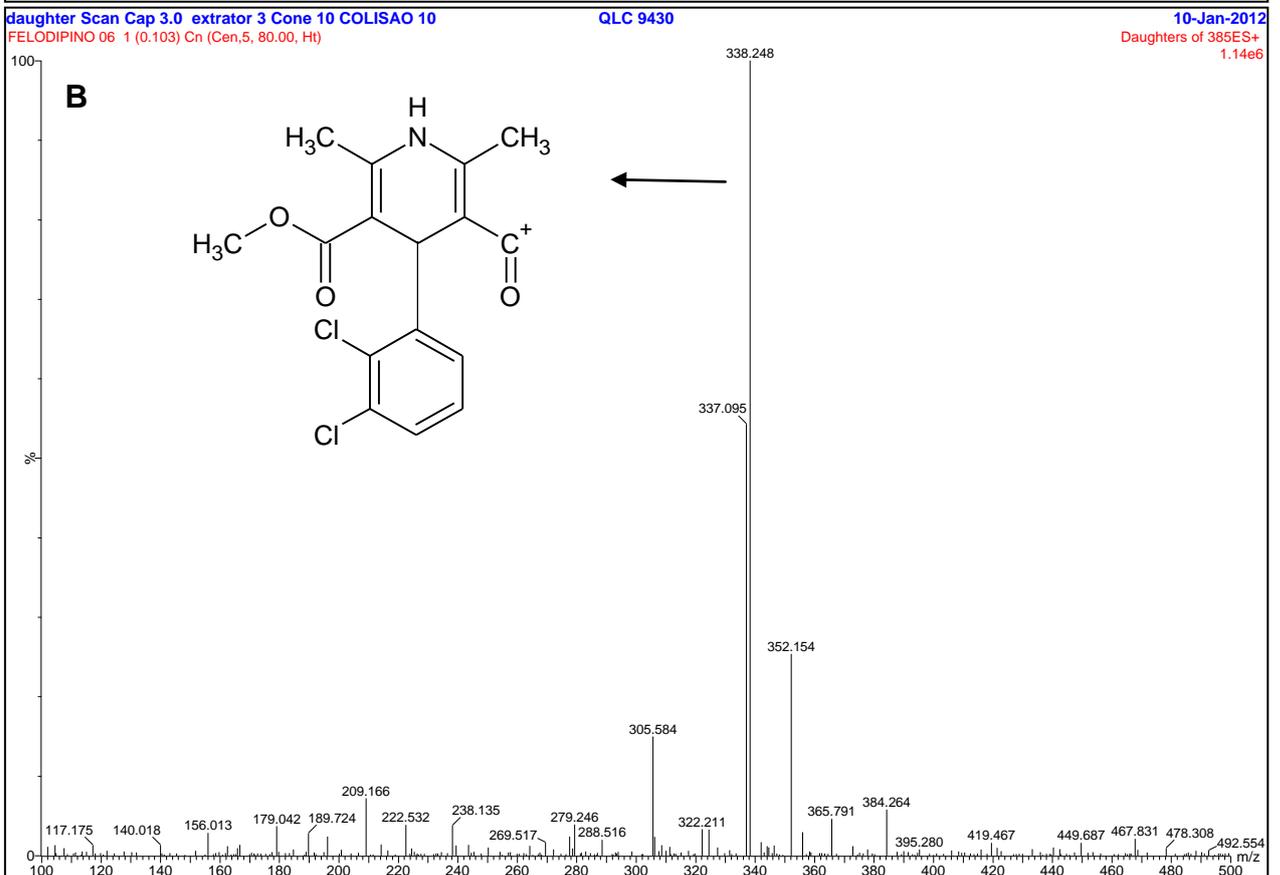
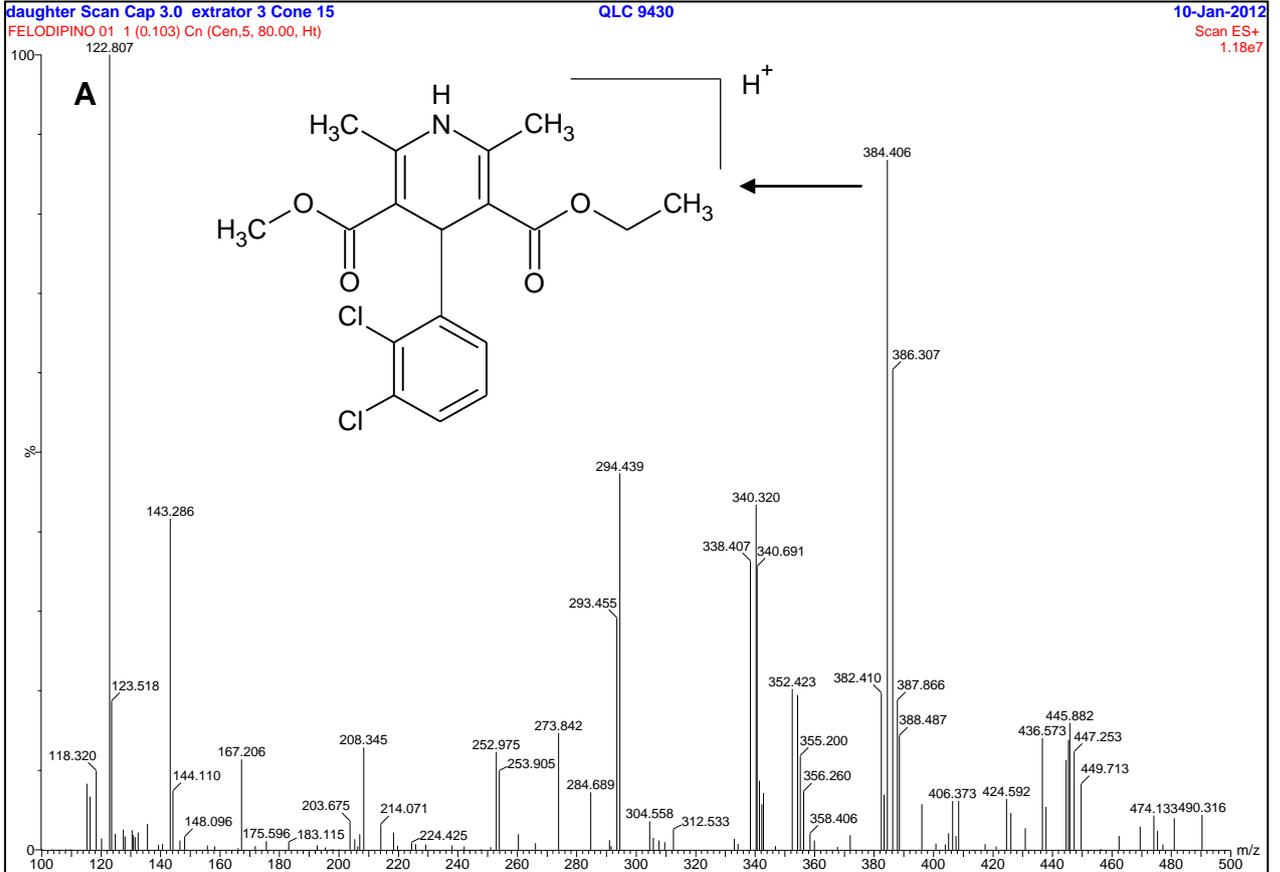
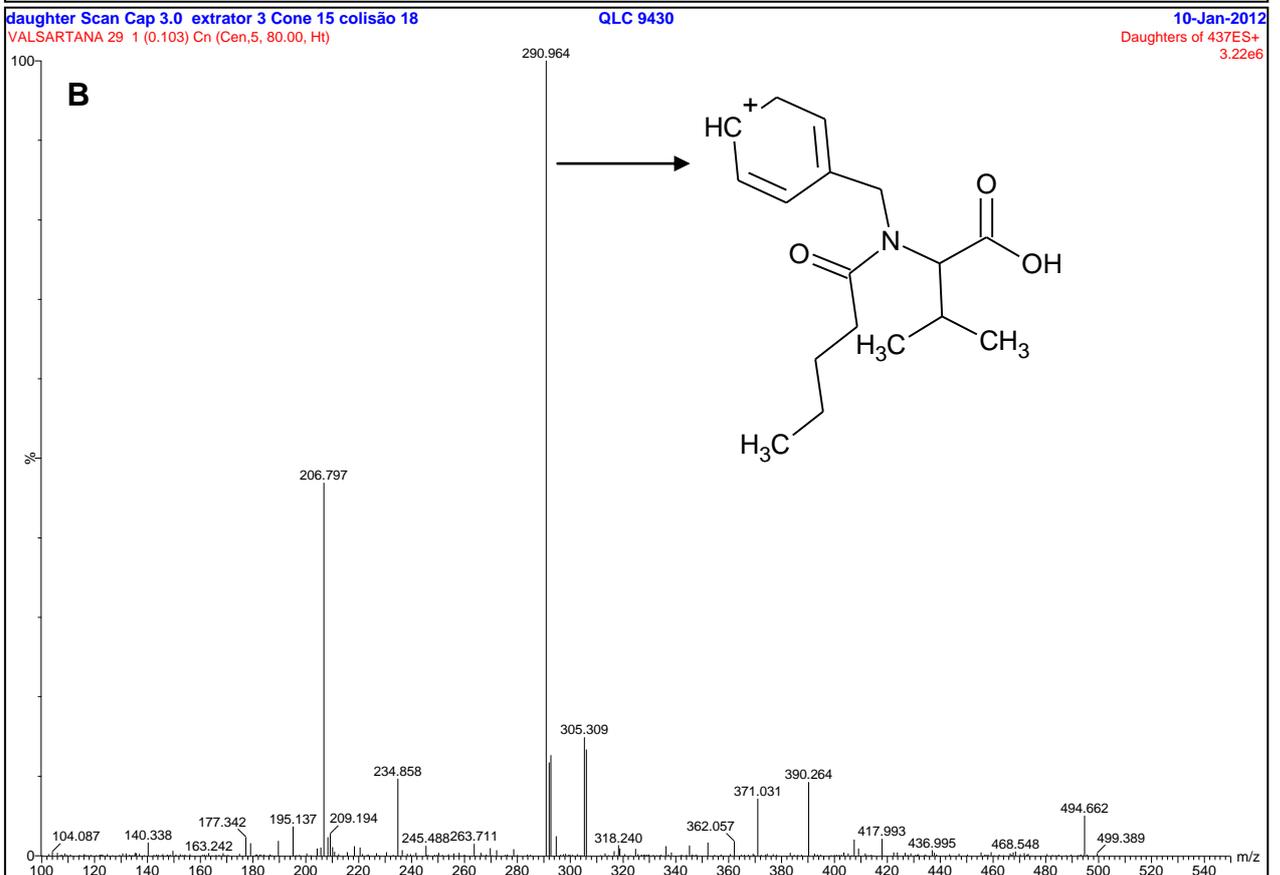
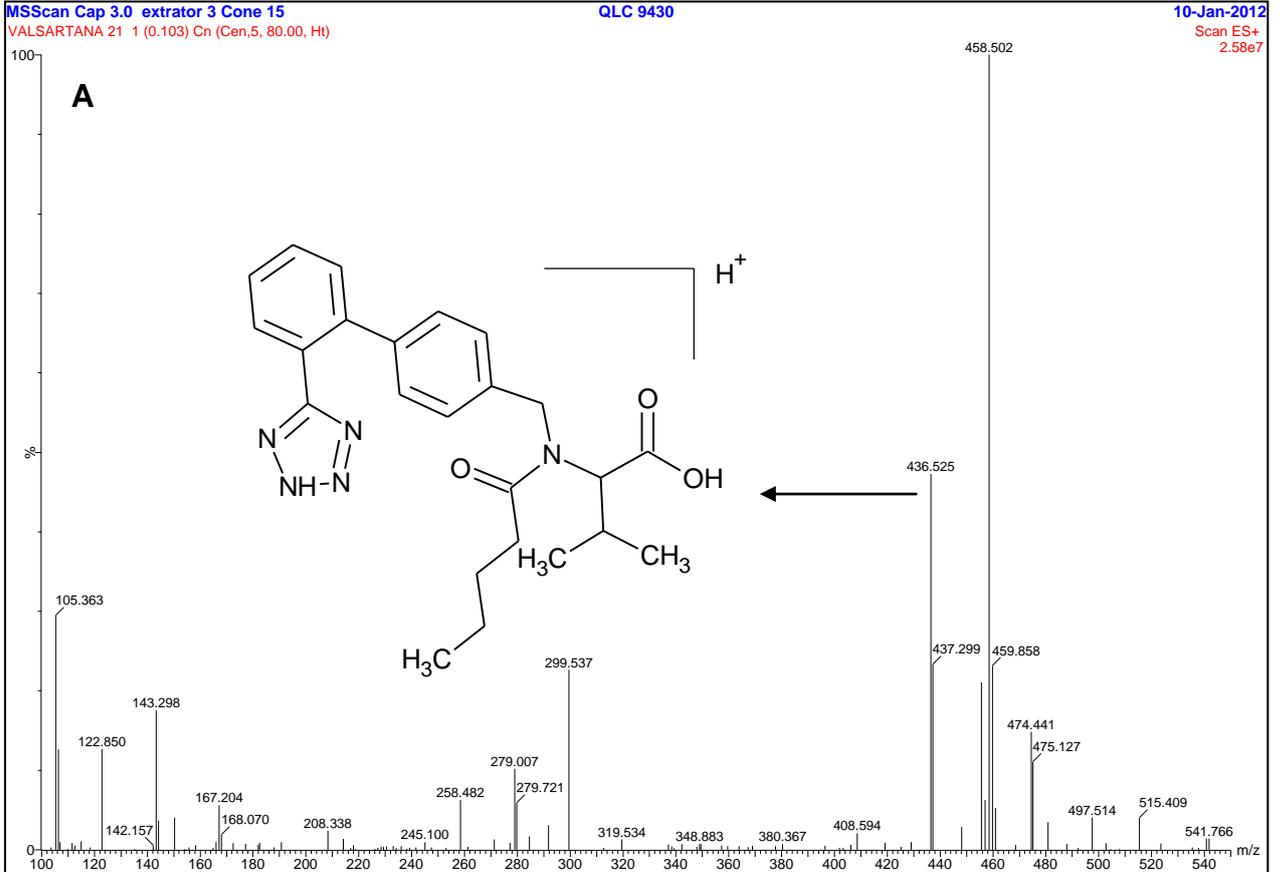


Figura 3.8 – Espectros ESI(+) de valsartana. (A) espectro e estrutura do íon precursor m/z 436,5; (B) espectro de fragmentação e estrutura proposta para o fragmento principal m/z 291,0.



A estrutura do íon produto selecionado para o ANLO está representada na **Figura 3.5B** e foi proposta por MASSAROTI *et al.* (2005). A estrutura do íon produto escolhido para OLM está mostrada na **Figura 3.6B** e foi proposta por LIU *et al.* (2007). A estrutura do íon produto selecionado para o FELO está representada na **Figura 3.7B** e foi proposta por MIGLIORANÇA *et al.* (2005). A estrutura do íon produto escolhido para VALS está mostrada na **Figura 3.8B** e foi proposta por KOSEKI *et al.* (2007).

3.1.2 Determinação das condições cromatográficas

A composição e proporção dos solventes da fase móvel foram otimizadas com o auxílio de uma solução contendo todos os fármacos a 500 ng/mL. Nos primeiros testes realizados, foi verificado que o solvente orgânico ACN fragmentava o pico cromatográfico da OLM, por isso, foi decidido empregar o MeOH como componente orgânico da fase móvel. Para garantir a ionização dos fármacos no modo ESI(+), foram testados, como componente aquoso, acetato de amônio 2 mM contendo ácido fórmico 0,025%, acetato de amônio 4 mM contendo ácido fórmico 0,025%, ácido acético 0,05% e 0,1% e ácido fórmico 0,05% e 0,1%. Para decidir qual solução utilizar na fase móvel, a simetria e a área dos picos foram avaliadas. Em relação à simetria, todas as condições proporcionaram picos simétricos e em relação à área, as soluções de ácido fórmico 0,05% e 0,1% promoveram áreas consideravelmente maiores, o que aumenta o limite de detecção do método. Dessa forma, a solução de ácido fórmico 0,05% foi escolhida para ser o componente aquoso da fase móvel.

Na sequência, diferentes proporções de MeOH e ácido fórmico 0,05% foram avaliadas. A OLM é uma molécula de elevada polaridade ($\log P = 2,14$) e, por isso, o pico cromatográfico desse fármaco apresentou tempo de retenção inferior a 2 min., mesmo quando a proporção aquosa da fase móvel foi alta. Para tentar aumentar o t_R desse fármaco, uma coluna C_8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) foi testada, mas não se obteve êxito. Já o FELO, por apresentar baixa polaridade ($\log P = 3,86$), foi sensível a pequenas variações da proporção da fase móvel e apresentou tempo de retenção superior a 3,5 min. em todas as condições testadas (MOFFAT *et al.*, 2004).

Para tentar contornar o problema devido à grande diferença de polaridade dos fármacos analisados, o modo de eluição em gradiente foi avaliado. Entretanto, nessa condição os picos cromatográficos da OLM e da VALS ficaram assimétricos, o que inviabilizou o seu uso. Por isso, foi necessário trabalhar numa condição isocrática na qual o t_R da OLM fosse baixo para que o tempo de análise não fosse tão elevado. A fase móvel escolhida foi MeOH:ácido fórmico 0,05% (75:25;v/v) e o tempo de corrida foi definido em 5,5 minutos. Os tempos de retenção de OLM, VALS, ANLO e FELO foram 1,51, 2,41, 1,66 e 4,59 minutos, respectivamente. Não foi preciso obter uma resolução adequada entre os picos, pois na CLAE-EM/EM cada fármaco é determinado por uma transição distinta.

Um risco associado em analisar compostos com t_R baixos é a grande possibilidade de ocorrência de efeito matriz, uma vez que os principais interferentes causadores desse efeito eluem no início da corrida cromatográfica. Logo a OLM é mais susceptível. Durante o desenvolvimento do método de extração, realmente foi observado efeito matriz para a OLM. Entretanto, otimizações na extração foram realizadas para contornar o problema e não foi necessário alterar a composição da fase móvel (TAYLOR, 2005; XU *et al.*, 2007).

3.1.3 Determinação do preparo de amostra

Os solventes orgânicos extratores avaliados foram MTBE e acetato de etila e misturas de acetato de etila:MTBE (80:20;v/v), acetato de etila:MTBE (50:50;v/v), acetato de etila:hexano (80:20;v/v), MTBE:hexano (80:20;v/v) e acetato de etila:diclorometano:MTBE (40:30:30;v/v). A recuperação determinada para todos os solventes avaliados foi inferior a 5% para OLM e VALS. Esses fármacos possuem em suas estruturas químicas o grupo funcional ácido carboxílico, que nas condições avaliadas se encontra na forma desprotonada (íon carboxilato). O íon carboxilato é altamente polar e, por isso, apresenta alta afinidade pela fase aquosa, justificando a baixa recuperação. A mistura de solvente orgânico que promoveu melhor recuperação (superior a 80%) para ANLO e FELO nos três níveis de controle de qualidade foi acetato de etila:MTBE (80:20;v/v) e, por isso, os testes seguintes foram realizados com essa mistura de solvente orgânico.

Para tentar aumentar a recuperação de OLM e VALS, foi testada a adição de 100 µL de ACN antes do solvente extrator para verificar se um agente precipitante auxiliaria a extração. Outro procedimento testado foi a adição de 100 µL de uma solução saturada de cloreto de sódio antes do solvente extrator. O sal diminui a solubilidade dos fármacos na fase aquosa e esse efeito é denominado *salting out*. Ambos os testes não promoveram melhora da eficiência da extração e a recuperação de OLM e VALS permaneceu inferior a 5 % (SNYDER *et al.*, 1997).

Outra alternativa testada para aumentar a recuperação, foi a adição de uma solução ácida antes do solvente extrator. A diminuição do pH garante que a função orgânica ácido carboxílico (pKa próximo a 4) se encontre na forma protonada, o que aumenta a afinidade dos fármacos OLM e VALS pelo solvente orgânico. Primeiramente, foi testada a adição de 25 µL de ácido fórmico 1% e 5% antes do solvente extrator. Para ácido fórmico 5%, foi verificado para a OLM que a área obtida na solução utilizada para reconstituição do resíduo do plasma branco foi em torno de 50% superior à área da solução em fase móvel para os três níveis de controle de qualidade, indicando a ocorrência de indução de ionização para esse fármaco. Para ácido fórmico 1%, não foi verificado efeito matriz significativo e a recuperação foi superior a 60% para todos os analitos, entretanto para a OLM o DPR das áreas das amostras extraídas foi superior a 15%, indicando que essa quantidade de ácido não foi suficiente para garantir um método de extração reprodutível. Diante do exposto, para avaliar o comportamento da OLM frente a quantidades diferentes de ácido, foram testadas concentrações de ácido fórmico em intervalos de 0,5% compreendendo a faixa de 1% a 5%. A partir da concentração de ácido fórmico 3%, foi observado que a área obtida na solução utilizada para reconstituição do resíduo do plasma branco foi superior a 15% da área da solução em fase móvel, o que já caracteriza efeito matriz segundo as referências consultadas. A concentração 2,5% de ácido fórmico foi a que proporcionou melhores resultados e por isso foi definida para ser empregada no processo de extração. Nessa condição, o DPR das áreas das amostras extraídas de OLM foi inferior a 10%. Além disso, a recuperação foi superior a 60% e o efeito matriz foi inferior a $\pm 15\%$ para todos analitos nos três níveis de controle de qualidade (TAYLOR, 2005).

O ANLO é uma base orgânica fraca de $pK_a = 8,3$. Em meio ácido, o grupo funcional amina primária desse fármaco encontra-se na forma protonada (ion amínio), o que diminui sua afinidade pela fase orgânica. As referências bibliográficas consultadas que extraíram somente ANLO de matrizes biológicas adicionaram solução básica antes do solvente extrator ou somente adicionaram solvente orgânico extrator no preparo da amostra. Provavelmente, o ANLO apresentou recuperação satisfatória na presença de ácido pelo fato do acetato de etila, que foi o solvente orgânico empregado em maior quantidade no processo de extração, apresentar polaridade elevada quando comparado a outros solventes orgânicos. Assim, foi possível obter um método de extração com eficiência adequada para dois fármacos com características químicas tão distintas, como é o caso da OLM e do ANLO.

Após a definição do solvente extrator e da quantidade de ácido fórmico, curvas de calibração juntamente com controles de qualidade em triplicata foram extraídas pelos procedimentos de extração 01 e 02 para definir qual procedimento seria o melhor. Anteriormente apenas controles de qualidade haviam sido extraídos e ambos os procedimentos foram adequados. Pelo procedimento 01, muitos pontos da curva de ANLO tiveram que ser excluídos, isso ocorreu devido a uma variação significativa da área do padrão interno FELO ao longo da curva. Esse fato foi comprovado ao quantificar o ANLO por meio da padronização externa e observar que, nessa condição, nenhum ponto da curva precisava ser excluído. Já pelo procedimento 02, os desvios obtidos para a curva de calibração e controles de qualidades foram baixos para OLM e ANLO. Dessa forma, o procedimento 02 foi escolhido para o preparo de amostra. Com auxílio das áreas de ANLO e OLM obtidas durante as análises das curvas de calibração, as concentrações de trabalho dos padrões internos foram determinadas em $0,8 \mu\text{g/mL}$ para FELO e em $12 \mu\text{g/mL}$ para VALS.

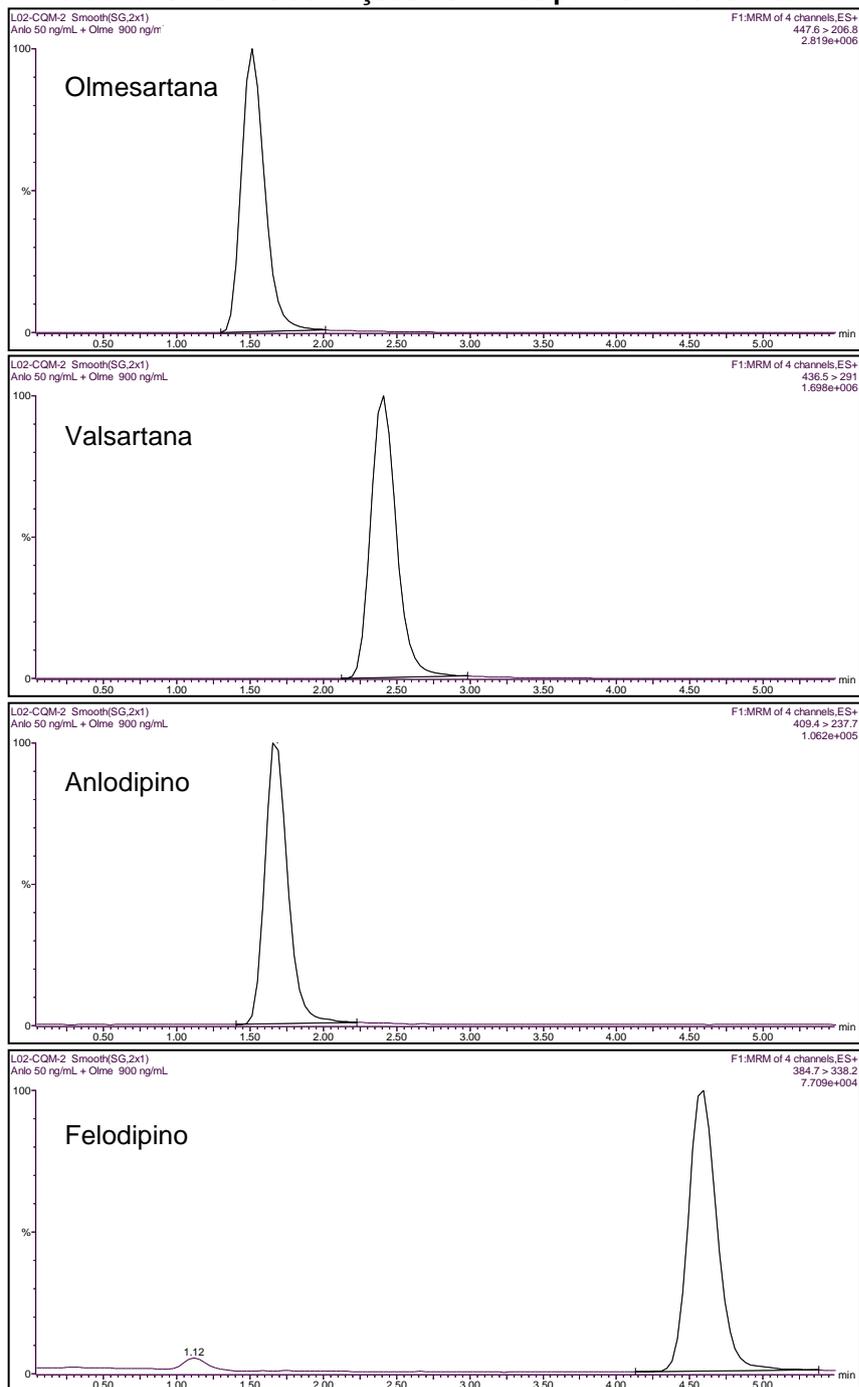
O protocolo de extração definido para ser utilizado na validação do método bioanalítico está descrito a seguir:

- em um tubo eppendorf de 2 mL, adicionar 100 μ L de plasma branco, plasma contaminado ou amostra;
- adicionar 25 μ L da solução de trabalho de padrão interno (0,8 μ g/mL de FELO e 12 μ g/mL de VALS);
- adicionar 25 μ L de uma solução de ácido fórmico 2,5%;
- agitar por 5 segundos em agitador do tipo vórtex;
- adicionar 1,5 mL de acetato de etila:MTBE (80:20;v/v);
- agitar por 60 segundos em agitador do tipo vórtex;
- centrifugar a $18407 \times g$ (14000 rpm) por 5 minutos a 4 °C;
- congelar por 15 minutos a -70 °C;
- verter a fase orgânica para tudo de vidro;
- secar sob fluxo de ar comprimido e banho-maria a 40 °C durante 10 minutos;
- reconstituir o resíduo com 100 μ L da fase móvel MeOH:ácido fórmico 0,05% (75:25;v/v);
- agitar por 40 segundos em agitador do tipo vórtex;
- transferir para *vial* com *insert* e injetar 20 μ L no cromatógrafo.

Parâmetros relacionados ao número de lavagem da seringa e do *loop* foram otimizados para garantir que não ocorresse efeito residual durante a validação do método bioanalítico. Os solventes de limpeza empregados foram isopropanol e uma solução de MeOH:água (80:20;v/v).

Um cromatograma obtido para um CQM extraído após a otimização de todas as etapas de desenvolvimento está ilustrado na **Figura 3.9**.

Figura 3.9 – Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM para um CQM extraído e analisado nas condições definidas para o método bioanalítico.



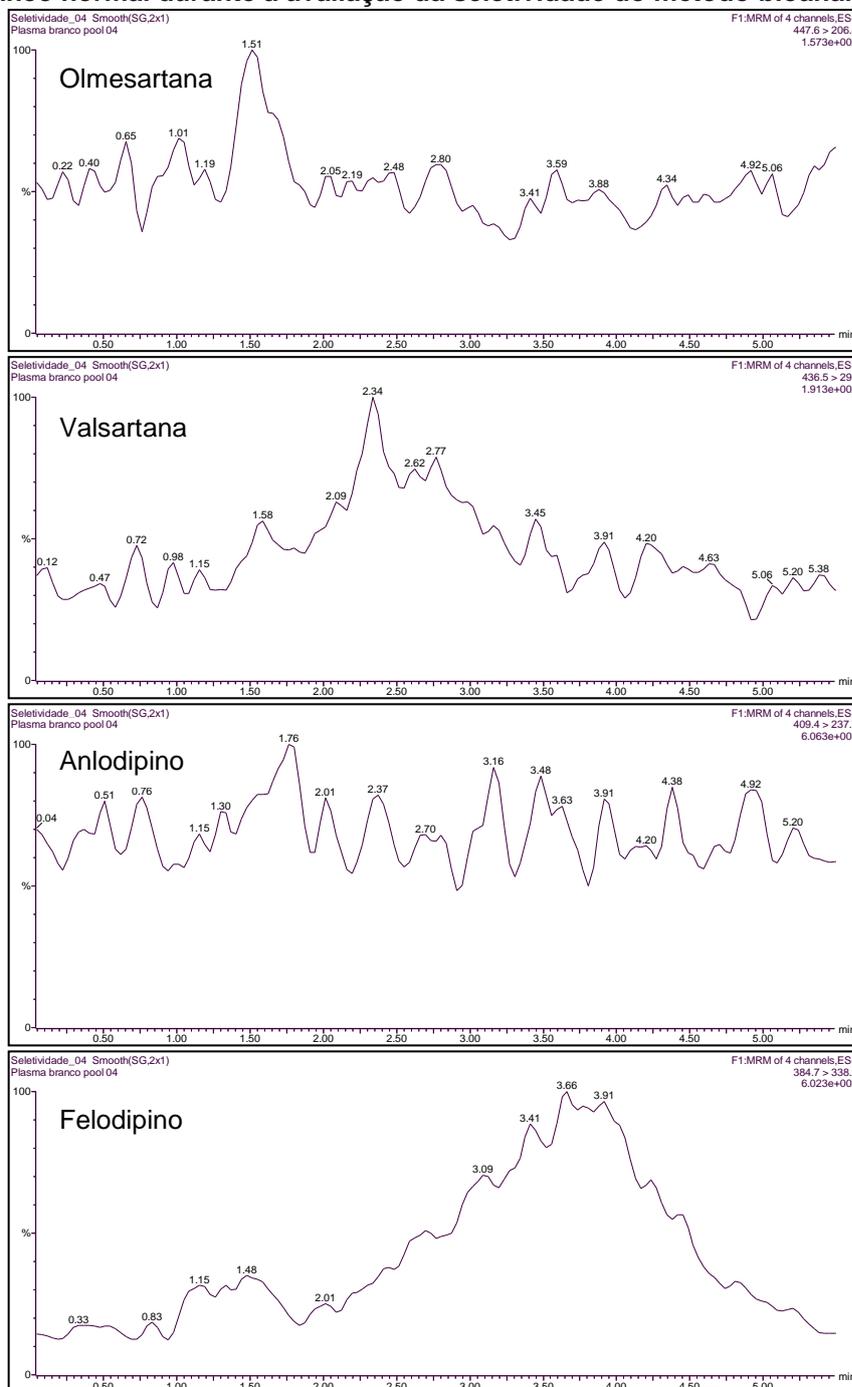
3.1.4 Validação do método bioanalítico

3.1.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi confirmada após verificar que nenhuma das amostras provenientes dos oito pools apresentou pico interferente significativo no mesmo

tempo de retenção dos fármacos. Para exemplificar, um cromatograma obtido durante a análise de um pool de plasma normal está ilustrado na **Figura 3.10**.

Figura 3.10 – Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM para amostra de plasma branco normal durante a avaliação da seletividade do método bioanalítico.



A seletividade também foi confirmada em relação à presença de cafeína, paracetamol, dipirona e dexclorfeniramina no plasma, pois não foram verificados interferentes nos tempos de retenção dos fármacos quando os cromatogramas

referentes a essas amostras foram comparados com o cromatograma do LIQ extraído.

3.1.4.2 Detecção cruzada

Durante a avaliação do teste de detecção cruzada, foi verificada uma pequena interferência da VALS na transição da OLM. Essa interferência não se encontra no tempo de retenção da OLM, portanto, não influencia a seletividade do método.

3.1.4.3 Efeito residual

Nenhum pico interferente foi observado na amostra de plasma branco extraída injetada imediatamente após a análise do LSQ extraído, o que comprova a ausência de efeito residual no método.

3.1.4.4 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada na faixa de 1 a 100 ng/mL para ANLO e de 3 a 1800 ng/mL para OLM, por meio da construção de curvas de calibração de seis pontos, cada um em duplicata, em três dias consecutivos. As equações das retas e os respectivos coeficientes de determinação estão demonstrados na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3 – Equações da reta e coeficientes de determinação obtidos para ANLO e OLM durante a avaliação das três curvas calibração.

Corrida Analítica	ANLO		OLM	
	Equação da reta	R ²	Equação da reta	R ²
1	$y = 0,02338x - 0,00288$	0,995	$y = 0,00180x + 0,00148$	0,999
2	$y = 0,02332x + 0,00092$	0,996	$y = 0,00167x + 0,00102$	0,999
3	$y = 0,02489x - 0,00022$	0,998	$y = 0,00171x + 0,00113$	0,996

Os desvios e concentrações experimentais obtidos para as curvas de calibração de ANLO e OLM após a exclusão dos pontos que apresentaram valores superiores ao preconizado estão descritos nas **Tabelas 3.4** e **3.5**. Os pontos excluídos estão evidenciados em negrito, um ponto foi excluído das curvas de calibração 01 e 03 de ANLO. Para a OLM não foi necessário a exclusão de nenhum ponto

Tabela 3.4 – Dados obtidos para a construção das 03 curvas de calibração de ANLO durante a análise da linearidade do método bioanalítico.

Conc. nominal (ng/mL)	Corrida analítica 01		Corrida analítica 02		Corrida analítica 03	
	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio
1	1,12	11,7	1,02	1,9	1,02	1,9
1	0,90	-10,5	0,99	-0,7	0,99	-0,7
10	8,76	-12,4	9,74	-2,6	9,97	-0,3
10	9,87	-1,3	8,74	-12,6	10,23	2,3
40	48,87	22,2	42,50	6,3	39,15	-2,1
40	41,20	3,0	43,21	8,0	37,49	-6,3
60	60,09	0,1	62,75	4,6	58,46	-2,6
60	61,19	2,0	55,28	-7,9	62,24	3,7
80	85,01	6,3	77,69	-2,9	97,32	21,7
80	83,17	4,0	83,95	4,9	87,30	9,1
100	102,88	2,9	100,90	0,9	98,13	-1,9
100	94,33	-5,7	100,13	0,1	98,09	-1,9

Tabela 3.5 – Dados obtidos para a construção das 03 curvas de calibração de OLM durante a análise da linearidade do método bioanalítico.

Conc. nominal (ng/mL)	Corrida analítica 01		Corrida analítica 02		Corrida analítica 03	
	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio	Conc. obtida (ng/mL)	%Desvio
3	3,05	1,7	2,84	-5,3	3,11	3,7
3	2,99	-0,5	2,99	-0,2	2,91	-3,1
30	30,14	0,5	29,55	-1,5	26,44	-11,9
30	29,45	-1,8	31,36	4,5	31,91	6,4
300	299,32	-0,2	296,10	-1,3	296,98	-1
300	300,68	0,2	310,11	3,4	330,46	10,2
800	795,68	-0,5	787,96	-1,5	738,47	-7,7
800	777,82	-2,8	807,94	1	783,82	-2
1300	1355,63	4,3	1310,97	0,8	1422,43	9,4
1300	1335,23	2,7	1339,82	3,1	1299,34	-0,1
1800	1730,57	-3,9	1808,17	0,5	1860,41	3,4
1800	1805,45	0,3	1738,19	-3,4	1669,72	-7,2

Conforme se pode observar nas **Tabelas 3.4** e **3.5**, os desvios de todas as curvas de calibração atenderam aos critérios de aceitação estabelecidos, confirmando a linearidade do método bioanalítico para ANLO e OLM.

Uma premissa relacionada à aplicação do MMQO é que os resíduos da regressão possuam variância constante ao longo do eixo x (homoscedasticidade). Por meio da inspeção visual do gráfico dos resíduos da regressão *versus* a concentração, foi possível inferir que os dados são heterocedásticos para ANLO e OLM, uma vez que foi observada uma tendência significativa dos resíduos. Em métodos bioanalíticos, pelo fato da faixa linear ser consideravelmente ampla, é comum que os resíduos associados a valores maiores de x tenham variância maior, caracterizando a ocorrência de heteroscedasticidade. Para contornar o problema e garantir a homoscedasticidade dos resíduos, os parâmetros da regressão foram calculados pelo Método dos Mínimos Quadrados Ponderados. O fator de peso ($1/x$, $1/x^2$, $1/y$, $1/y^2$) determinado foi aquele que proporcionou menores desvios entre as concentrações experimentais e as nominais e apresentou uma distribuição aleatória dos resíduos no gráfico dos resíduos da regressão *versus* a concentração. Assim fator de peso empregado foi igual a $1/x^2$ para ANLO e igual a $1/x$ para OLM (ALMEIDA *et al.*, 2002; ROZET *et al.*, 2007; STORPIRTIS *et al.*, 2009).

A curva de calibração e o gráfico dos resíduos da regressão obtidos na corrida analítica 01 para ANLO e OLM estão representados nas **Figuras 3.11** e **3.12**. Pela análise das figuras, pode-se confirmar que os resíduos estão distribuídos de forma aleatória no gráfico, ratificando a homoscedasticidade. Na **Figura 3.11**, é possível visualizar um ponto com um círculo preto, que corresponde ao ponto excluído do cálculo da curva de calibração 01 de ANLO.

Figura 3.11 – Gráfico de resíduo da regressão e curva analítica obtidos para ANLO na corrida analítica 01, faixa linear 1 a 100 ng/mL.

Compound name: anlodipino
 Correlation coefficient: $r = 0.997708$, $r^2 = 0.995421$
 Calibration curve: $0.0233765 * x + -0.0028796$
 Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None

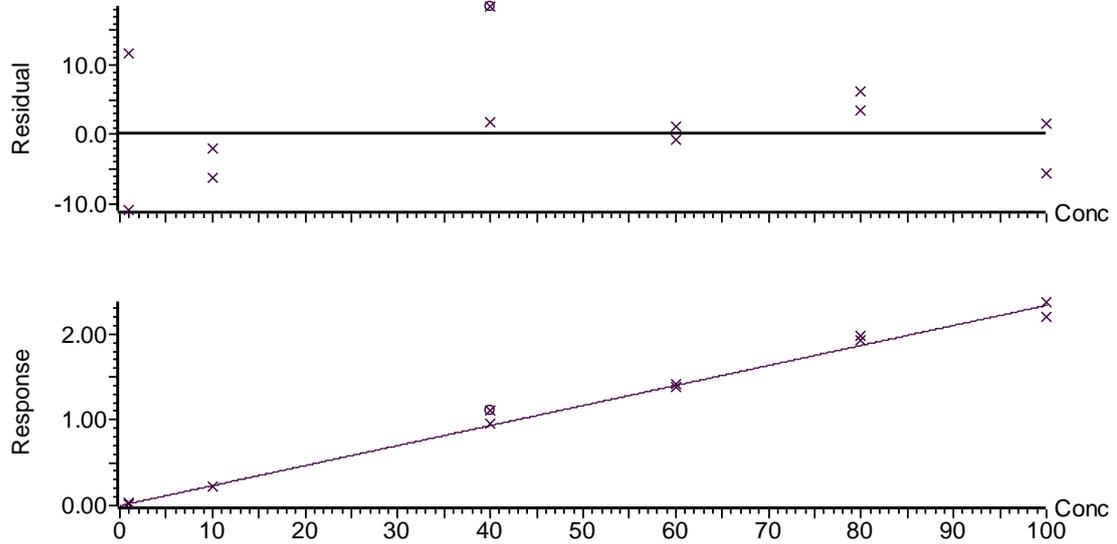
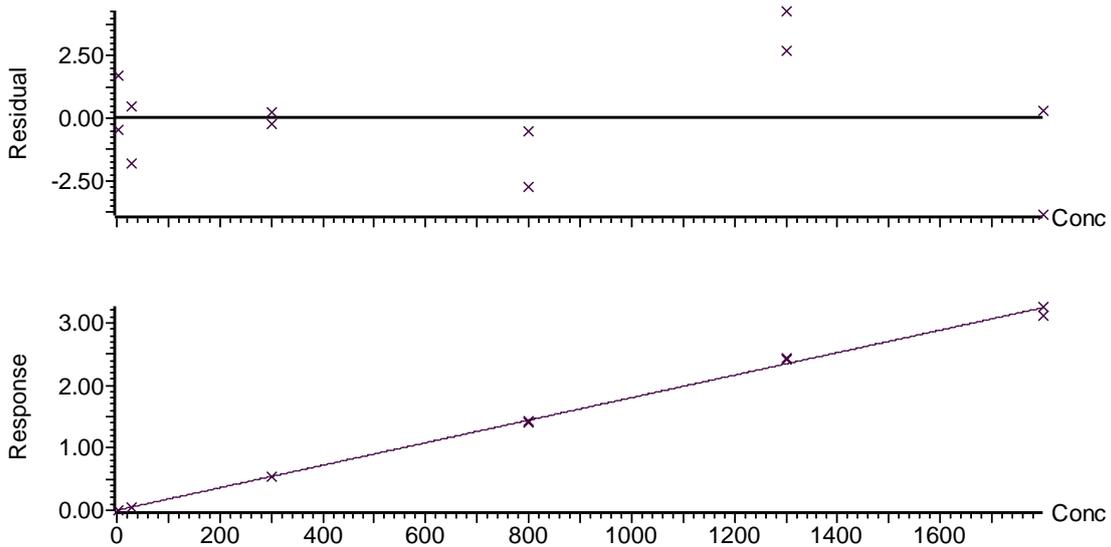


Figura 3.12 – Gráfico de resíduo da regressão e curva analítica obtidos para OLM na corrida analítica 01, faixa linear 3 a 1800 ng/mL.

Compound name: Olmesartana medoxomila
 Correlation coefficient: $r = 0.999596$, $r^2 = 0.999193$
 Calibration curve: $0.00180337 * x + 0.00147588$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x$, Axis trans: None



3.1.4.5 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão foram avaliadas em cinco concentrações diferentes de ANLO e OLM (LIQ, CQB, CQM, CQA e CQD), em quintuplicata, em três dias consecutivos. Os valores obtidos nas análises intra e intercorridas estão demonstrados nas Tabelas 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10.

Tabela 3.6 – Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o LIQ de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.

Amostras	ANLO (1 ng/mL)			OLM (3 ng/mL)		
1	1,17	0,93	0,88	2,86	3,49	2,99
2	1,15	0,99	1,13	2,77	3,25	3,06
3	1,01	0,99	0,96	3,42	3,38	2,89
4	1,11	0,91	0,93	2,97	3,43	2,96
5	1,15	1,01	0,94	3,31	3,39	2,94
Média intracorrida	1,12	0,96	0,97	3,07	3,39	2,97
DPR(%) intracorrida	5,53	4,62	9,84	9,25	2,52	2,16
EPR (%) intracorrida	11,78	-3,58	-3,46	2,25	12,88	-1,07
Média intercorrida	1,02			3,14		
DPR(%) intercorrida	9,75			7,83		
EPR (%) intercorrida	1,58			4,69		

Tabela 3.7 – Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQB de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.

Amostras	ANLO (3 ng/mL)			OLM (9 ng/mL)		
1	3,25	2,99	2,65	10,15	9,77	9,48
2	3,16	3,35	2,90	9,54	9,83	9,68
3	3,60	2,92	2,58	8,49	9,90	9,62
4	2,91	3,08	2,56	9,96	10,09	8,90
5	3,13	3,00	2,79	8,66	9,69	9,15
Média intracorrida	3,21	3,07	2,70	9,36	9,86	9,36
DPR(%) intracorrida	7,84	5,54	5,38	8,04	1,55	3,52
EPR (%) intracorrida	6,97	2,25	-10,13	3,98	9,53	4,05
Média intercorrida	2,99			9,53		
DPR(%) intercorrida	9,60			5,33		
EPR (%) intercorrida	-0,30			5,85		

Tabela 3.8 – Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQM de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.

Amostras	ANLO (50 ng/mL)			OLM (900 ng/mL)		
	1	47,73	52,16	45,31	879,48	902,56
2	41,30	49,14	47,77	917,23	894,78	850,18
3	47,96	47,45	48,93	920,14	894,10	915,25
4	49,36	49,70	47,85	952,96	826,13	895,91
5	48,82	50,09	45,89	929,78	892,41	806,50
Média intracorrida	47,03	49,71	47,15	919,92	882,00	866,97
DPR(%) intracorrida	6,96	3,43	3,18	2,89	3,57	4,86
EPR (%) intracorrida	-5,93	-0,58	-5,70	2,21	-2,00	-3,67
Média intercorrida		47,96			889,63	
DPR(%) intercorrida		5,18			4,39	
EPR (%) intercorrida		-4,07			-1,15	

Tabela 3.9 – Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQA de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.

Amostras	ANLO (85 ng/mL)			OLM (1500 ng/mL)		
	1	69,64	87,93	81,55	1496,09	1443,55
2	84,77	87,26	86,15	1490,66	1459,61	1431,74
3	87,79	88,08	75,20	1386,81	1418,44	1383,76
4	83,50	90,53	80,36	1475,26	1477,35	1363,30
5	79,43	84,53	84,88	1477,54	1592,85	1402,40
Média intracorrida	81,03	87,66	81,63	1465,27	1478,36	1394,15
DPR(%) intracorrida	8,69	2,45	5,27	3,05	4,57	1,82
EPR (%) intracorrida	-4,68	3,13	-3,97	-2,32	-1,44	-7,06
Média intercorrida		83,44			1445,93	
DPR(%) intercorrida		6,61			4,11	
EPR (%) intercorrida		-1,84			-3,60	

Tabela 3.10 – Resultados de precisão e exatidão intra e intercorridas obtidos para o CQD de ANLO e OLM pelo método bioanalítico.

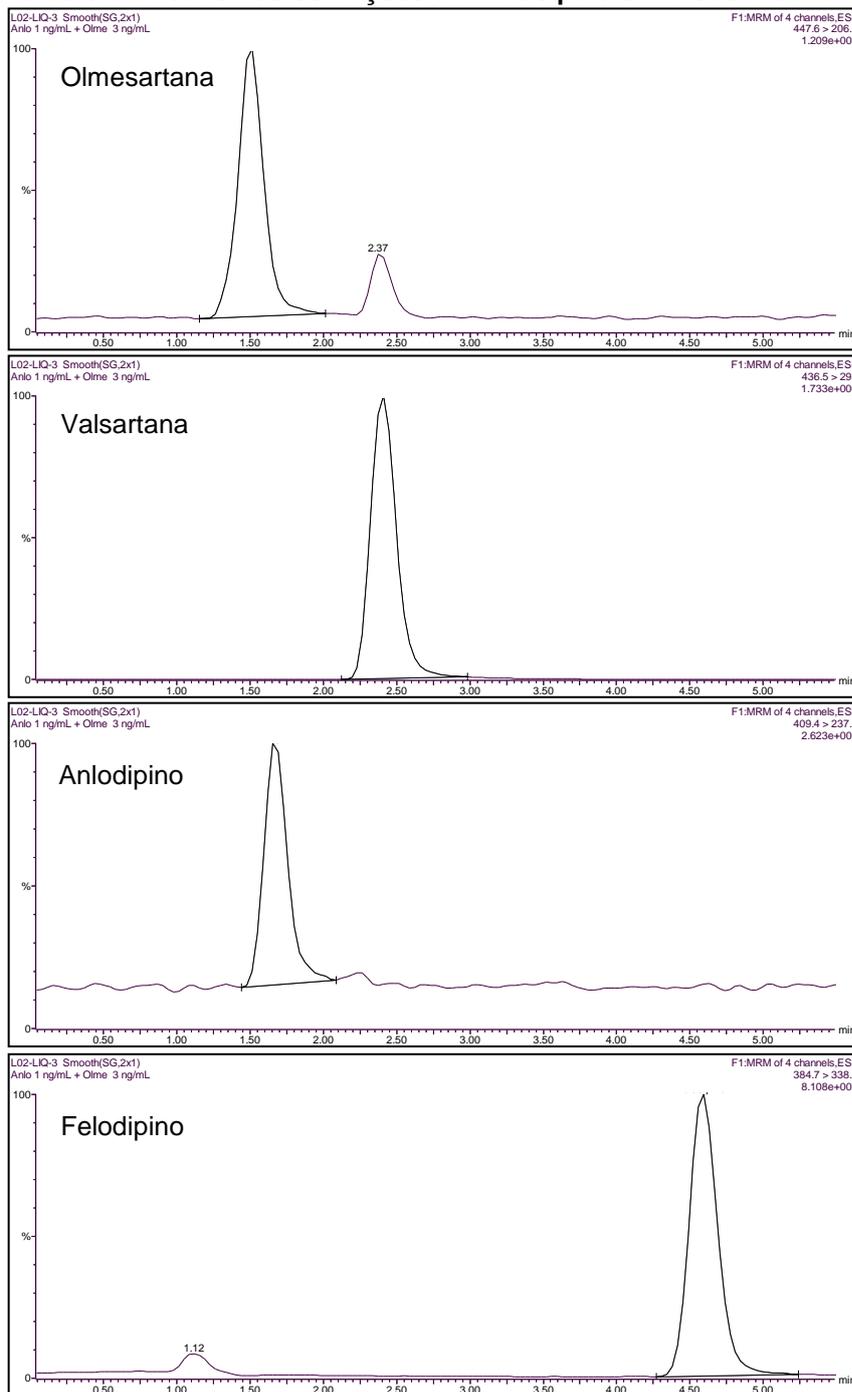
Amostras	ANLO (170 ng/mL)			OLM (3000 ng/mL)		
1	151,49	179,81	146,24	2904,58	2820,12	2524,78
2	147,51	174,45	165,15	3009,35	2816,71	2938,15
3	164,92	165,35	155,96	3056,10	2685,73	3048,59
4	168,95	160,74	164,55	2911,18	2564,56	2809,59
5	158,55	163,84	169,65	2865,06	2712,59	2839,60
Média intracorrida	158,28	168,84	160,31	2949,25	2719,94	2832,14
DPR(%) intracorrida	5,65	4,73	5,80	2,71	3,89	6,91
EPR (%) intracorrida	-6,89	-0,68	-5,70	-1,69	-9,34	-5,60
Média intercorrida	162,48			2833,78		
DPR(%) intercorrida	5,78			5,62		
EPR (%) intercorrida	-4,42			-5,54		

De acordo com os resultados das **Tabelas 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10**, todos os DPR foram inferiores a 15% e todos EPR foram inferiores a $\pm 15\%$ para todas as concentrações analisadas, inclusive para o LIQ. Por isso, o método demonstrou ser preciso e exato para quantificação simultânea de ANLO e OLM em plasma humano. Não foi observado uma correlação entre os níveis de concentração dos controles e os valores de DPR e EPR.

A comprovação da precisão e exatidão do CQD visa garantir que caso alguma amostra real apresente concentração superior ao LSQ, essa possa ser diluída para uma concentração compreendida na faixa linear do método e quantificada com exatidão e precisão adequada.

Além de confirmar a exatidão e precisão do LIQ de ANLO e OLM, a relação sinal/ruído foi determinada. Para o LIQ do ANLO a relação foi de 25,5, e para o LIQ da OLM a relação foi de 46,5. Um cromatograma do LIQ extraído está demonstrado na **Figura 3.13**. Ao observar nessa figura a transição referente à OLM, é possível visualizar um pico com t_R igual a 2,37 ao lado do pico da OLM. Esse pico se refere à interferência da transição da VALS mencionada no item 3.1.4.2.

Figura 3.13 – Cromatograma obtido por CLAE-EM/EM para um LIQ extraído e analisado nas condições definidas para o método bioanalítico.



3.1.4.6 Recuperação

A recuperação foi avaliada comparando as áreas obtidas para as amostras extraídas com as áreas obtidas para as amostras preparadas em fase móvel. As concentrações analisadas foram do CQB, CQM e CQA para ANLO e OLM, já para os padrões internos FELO e VALS foram analisadas as concentrações obtidas ao

final do processo de extração. Os resultados encontrados estão reportados na **Tabela 3.11**.

Tabela 3.11 – Resultados de recuperação do método bioanalítico para os fármacos ANLO, OLM, FELO e VALS.

Fármaco	Conc. ng/mL	Área média das amostras extraídas (n=5)	Área média das amostras em fase móvel (n=5)	Recuperação (%)	Recuperação Média (%)
ANLO	3	1024	1319	77,61	72,53
	50	17050	23744	71,81	
	85	28075	41178	68,18	
OLM	9	6165	9420	65,45	62,90
	900	521729	860497	60,63	
	1500	842015	1344583	62,62	
FELO	200	13264	16912	78,43	78,43
VALS	3000	305153	345091	88,43	88,43

De acordo com as informações da **Tabela 3.11**, as recuperações nos três níveis de controle de ANLO e OLM foram consistentes e reprodutíveis, o que evidencia eficiência de extração similar para diferentes concentrações. Além disso, a recuperação foi superior a 60% para todos os fármacos, mostrando que o método de extração foi eficiente mesmo para analitos com propriedades físico-químicas bem diferentes.

3.1.4.7 Efeito matriz

Os resultados do experimento relativo ao efeito matriz foram avaliados por meio de dois procedimentos. No primeiro procedimento, as áreas obtidas das amostras de plasma branco reconstituídas com soluções em fase móvel de CQA e CQB que continham padrões internos nas concentrações de 200 ng/mL de FELO e 3000 ng/mL de VALS foram comparadas com a média das áreas das mesmas soluções em fase móvel. O desvio individual da área de cada amostra plasmática foi calculado em relação à área média da solução em fase móvel. Os valores encontrados estão descritos nas **Tabelas 3.12, 3.13 e 3.14**.

Após a análise dos resultados reportados nas **Tabelas 3.12, 3.13 e 3.14**, pode-se inferir que não houve efeito matriz significativo para ANLO, OLM, FELO e VALS, pois todos os desvios calculados foram inferiores a $\pm 15\%$. Valores de desvio negativos indicam supressão da ionização, enquanto valores positivos indicam indução da ionização. Para OLM e VALS, todos os desvios foram positivos e inferiores a 15%, indicando que para esses fármacos houve apenas ligeira indução da ionização.

Tabela 3.12 – Avaliação do efeito matriz para ANLO por meio da comparação entre as áreas das soluções em plasma e a média das soluções em fase móvel.

Amostra	CQB (3 ng/mL)			CQA (85 ng/mL)		
	Área média em fase móvel (n=5)	Área da solução em plasma	Desvio (%)	Área média em fase móvel (n=5)	Área da solução em plasma	Desvio (%)
Pool normal 01		2383	7,6		65400	5,5
Pool normal 02		2380	7,5		65697	6,0
Pool normal 03		2386	7,7		64639	4,3
Pool normal 04		2347	6,0		64756	4,4
Pool hemolisado 01	2215	2430	9,7	62002	65924	6,3
Pool hemolisado 02		2478	11,9		65773	6,1
Pool lipêmico 01		2355	6,3		65077	5,0
Pool lipêmico 02		2424	9,4		69568	12,2

Tabela 3.13 – Avaliação efeito matriz para OLM por meio da comparação entre as áreas das soluções em plasma e a média das soluções em fase móvel.

Amostra	CQB (9 ng/mL)			CQA (1500 ng/mL)		
	Área média em fase móvel (n=5)	Área da solução em plasma	Desvio (%)	Área média em fase móvel (n=5)	Área da solução em plasma	Desvio (%)
Pool normal 01		12390	8,7		1793719	3,8
Pool normal 02		11711	2,7		1743018	0,9
Pool normal 03		10815	-5,2		1769982	2,4
Pool normal 04		11939	4,7		1749571	1,2
Pool hemolisado 01	11403	12445	9,1	1727996	1844415	6,7
Pool hemolisado 02		12126	6,3		1683573	-2,6
Pool lipêmico 01		11089	-2,8		1739124	0,6
Pool lipêmico 02		11598	1,7		1688085	-2,3

Tabela 3.14 – Avaliação do efeito matriz para FELO e VALS por meio da comparação entre as áreas das soluções em plasma e a média das soluções em fase móvel.

Amostra	FELO (200 ng/mL)			VALS (3000 ng/mL)		
	Área média em fase móvel (n=5)	Área da solução em plasma	Desvio (%)	Área média em fase móvel (n=5)	Área da solução em plasma	Desvio (%)
Pool normal 01		29848	3,5		516994	3,6
Pool normal 02		30719	6,5		522837	4,8
Pool normal 03		28997	0,5		515633	3,3
Pool normal 04		28358	-1,7		520941	4,4
Pool hemolisado 01	28845	29337	1,7	498949	531733	6,6
Pool hemolisado 02		27946	-3,1		524410	5,1
Pool lipêmico 01		29039	0,7		521977	4,6
Pool lipêmico 02		28043	-2,8		530226	6,3

No segundo procedimento, o efeito matriz foi avaliado por meio do FMN, que foi calculado conforme equação 18 descrita no item 2.2.1.7.7. Os resultados obtidos estão compilados na **Tabela 3.15**.

Tabela 3.15 – Avaliação do efeito matriz para ANLO e OLM por meio do cálculo do FMN.

Amostra	FMN de ANLO		FMN de OLM	
	CQB (3 ng/mL)	CQA (85 ng/mL)	CQB (9 ng/mL)	CQA (1500 ng/mL)
Pool normal 01	1,04	1,02	1,05	1,00
Pool normal 02	1,01	0,99	0,98	0,96
Pool normal 03	1,07	1,04	0,92	0,99
Pool normal 04	1,08	1,06	1,00	0,97
Pool hemolisado 01	1,08	1,05	1,02	1,00
Pool hemolisado 02	1,15	1,09	1,01	0,93
Pool lipêmico 01	1,06	1,04	0,93	0,96
Pool lipêmico 02	1,13	1,15	0,96	0,92
Média	1,08	1,06	0,98	0,97
DPR (%)	4,29	4,65	4,70	3,25

Conforme se pode observar na **Tabela 3.15**, todos os DPR calculados foram inferiores a 15%, confirmando que não há efeito matriz significativo no método bioanalítico para quantificação simultânea de ANLO e OLM.

O efeito matriz, calculado conforme o primeiro procedimento, é chamado de efeito matriz absoluto, pela sua análise é possível inferir a influência da matriz sobre cada fármaco do método, separadamente. Quando se utiliza apenas os critérios desse procedimento para aprovação do método, muitas vezes o desenvolvimento é mais trabalhoso e demorado, uma vez que é preciso eliminar qualquer efeito matriz existente. Já para o efeito matriz calculado pelo FMN, quando se verifica efeito matriz para algum analito, pode-se empregar um PI que apresente efeito matriz na mesma extensão, uma vez que esse PI irá normalizar o efeito matriz do analito. Por isso, quando se trabalha com FMN é recomendado utilizar como PI uma substância com comportamento químico muito similar ao do analito ou um isótopo estável do analito. Com a escolha adequada do PI, o uso do FMN para avaliar o efeito matriz pode facilitar o desenvolvimento de métodos bioanalíticos, visto que não é necessário eliminar o efeito matriz, apenas normalizá-lo. Vale destacar que independentemente de qual procedimento for adotado, é muito importante avaliar o efeito com no mínimo seis fontes distintas de plasmas, pois a variação interindividual pode ser significativa (MATUSZEWSKI *et al.*, 2003; VISWANATHAN *et al.*, 2007).

3.1.4.7 Estabilidade

3.1.4.7.1 Estabilidade de curta duração (ECD)

A ECD foi avaliada mantendo-se as amostras plasmáticas de CQB e CQA à temperatura ambiente por um período de 6 horas. Ao final do período, amostras da curva de calibração e de CQB e CQA foram descongeladas e extraídas juntamente com as amostras testes. As concentrações das amostras testes foram comparadas com aquelas obtidas das amostras recém-preparadas e os resultados estão demonstrados nas **Tabelas 3.16** e **3.17**. Conforme se pode observar nessas tabelas, para os dois níveis de controle (CQB e CQA), as variações entre as médias foram inferiores a $\pm 15\%$, comprovando a estabilidade de curta duração das amostras. Os valores de precisão e exatidão encontrados estão dentro do preconizado para o método bioanalítico.

Tabela 3.16 – Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade de curta duração do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (3 ng/mL)		CQA (85 ng/mL)	
	Amostra recente	Amostra ECD	Amostra recente	Amostra ECD
Conc. média (ng/mL) (n=5)	3,07	3,17	87,66	91,48
DPR (%)	5,54	2,40	2,45	4,47
EPR (%)	2,25	5,66	3,13	7,63
Varição (%)	3,34		4,36	

Tabela 3.17 – Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade de curta duração do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (9 ng/mL)		CQA (1500 ng/mL)	
	Amostra recente	Amostra ECD	Amostra recente	Amostra ECD
Conc. média (ng/mL) (n=5)	9,86	8,67	1478,36	1406,67
DPR (%)	1,55	6,06	4,57	2,96
EPR (%)	9,53	-3,72	-1,44	-6,22
Varição (%)	-12,10		-4,85	

3.1.4.7.2 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento (ECCD)

As amostras plasmáticas de CQB e CQA foram submetidas a 3 ciclos de congelamento. Ao final do terceiro ciclo, amostras da curva de calibração e de CQB e CQA foram descongeladas e extraídas juntamente com as amostras testes. As médias das concentrações das amostras testes foram comparadas com as médias das concentrações das amostras de controle recém-preparadas. Os resultados estão reportados nas **Tabelas 3.18 e 3.19**.

Tabela 3.18 – Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (3 ng/mL)		CQA (85 ng/mL)	
	Amostra recente	Amostra ECCD	Amostra recente	Amostra ECCD
Conc. média (ng/mL) (n=5)	2,70	2,78	81,63	81,79
DPR (%)	5,38	6,74	5,27	4,57
EPR (%)	-10,13	-7,34	-3,97	-3,77
Varição (%)	3,10		0,21	

Tabela 3.19 – Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (9 ng/mL)		CQA (1500 ng/mL)	
	Amostra recente	Amostra ECCD	Amostra recente	Amostra ECCD
Conc. média (ng/mL) (n=5)	9,36	9,25	1394,15	1436,96
DPR (%)	3,52	4,85	1,82	8,45
EPR (%)	4,05	2,80	-7,06	-4,20
Varição (%)	-1,20		3,07	

Conforme demonstrado nas Tabelas 3.18 e 3.19, as variações entre as médias foram inferiores a $\pm 15\%$, indicando a estabilidade das amostras após 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os valores de precisão e exatidão encontrados estão dentro do preconizado para o método bioanalítico.

3.1.4.7.3 Estabilidade de pós-processamento (EPP)

A EPP foi determinada após as amostras extraídas de CQB e CQA ser mantidas por 27 horas e 50 minutos dentro do autor-injetor a 8 °C. Após esse período, as amostras foram analisadas juntamente com amostras recém-preparadas. As médias das concentrações das amostras testes foram comparadas com as médias das concentrações das amostras recém-preparadas. Os resultados estão relatados nas Tabelas 3.20 e 3.21. A estabilidade dos padrões internos também foi avaliada, comparando-se as áreas das amostras teste com aquelas das amostras recém-preparadas, os resultados estão demonstrados na Tabela 3.22.

Tabela 3.20 – Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade de pós-processamento do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (3 ng/mL)		CQA (85 ng/mL)	
	Amostra recente	Amostra EPP	Amostra recente	Amostra EPP
Conc. média (ng/mL) (n=5)	3,07	2,91	87,66	86,75
DPR (%)	5,54	5,12	2,45	4,16
EPR (%)	2,25	-3,17	3,13	2,05
Varição (%)	-5,29		-1,05	

Tabela 3.21 – Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade de pós-processamento do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (9 ng/mL)		CQA (1500 ng/mL)	
	Amostra recente	Amostra EPP	Amostra recente	Amostra EPP
Conc. média (ng/mL) (n=5)	9,86	9,37	1478,36	1512,46
DPR (%)	1,55	4,31	4,57	1,66
EPR (%)	9,53	4,12	-1,44	0,83
Varição (%)	-4,94		2,31	

Tabela 3.22 – Resultados obtidos para FELO e VALS durante a avaliação da estabilidade de pós-processamento do método bioanalítico.

Parâmetro	FELO (200 ng/mL)		VALS (3000 ng/mL)	
	Amostra recente	Amostra EPP	Amostra recente	Amostra EPP
Média das áreas (n=5)	16992	17905	347969	339998
DPR (%)	8,86	5,67	6,81	4,47
Varição (%)	5,37		-2,29	

Após a análise das **Tabelas 3.20, 3.21 e 3.22**, é possível verificar que todas as variações foram inferiores a $\pm 15\%$, ratificando a estabilidade de pós-processamento. Os valores de precisão e exatidão encontrados estão dentro do preconizado para o método bioanalítico.

O período de estabilidade avaliado foi longo, o que possibilita reinjetar alguma amostra ao final da corrida ou esperar um tempo maior para o início das análises devido a circunstâncias não previstas como, por exemplo, problemas relacionados ao equipamento.

3.1.4.7.4 Estabilidade das soluções estoque e das soluções de trabalho dos analitos e dos padrões internos

A estabilidade das soluções estoque de todos os fármacos e das soluções de CQB e CQA dos analitos e da solução de trabalho dos padrões internos foram avaliadas armazenadas em geladeira (8 °C) por um período de 11 dias e em temperatura ambiente por um período de 22 horas. A média das áreas das soluções testes foram comparadas com a média das áreas das soluções recém-preparadas. Os resultados

obtidos para as soluções de trabalho estão reportados nas **Tabelas 3.23, 3.24 e 3.25**. Os resultados obtidos para as soluções estoque estão reportados nas **Tabelas 3.26 e 3.27**. Todas as variações foram inferiores a $\pm 10\%$, indicando que não houve degradação significativa das soluções estoque e de trabalho durante as condições e períodos avaliados.

Tabela 3.23 – Resultados obtidos para ANLO durante a avaliação da estabilidade das soluções de trabalho do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (3 ng/mL)			CQA (85 ng/mL)		
	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente
Média das áreas (n=5)	2326	2271	2357	64698	60349	64811
DPR (%)	1,67	2,88	1,24	1,07	2,88	0,95
Variação (%)		-2,34	1,35		-6,72	0,18

Tabela 3.24 – Resultados obtidos para OLM durante a avaliação da estabilidade das soluções de trabalho do método bioanalítico.

Parâmetro	CQB (9 ng/mL)			CQA (1500 ng/mL)		
	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente
Média das áreas (n=5)	11831	10997	11085	1852550	1713983	1761589
DPR (%)	2,34	1,95	1,08	1,35	1,91	1,40
Variação (%)		-7,05	-6,30		-7,48	-4,91

Tabela 3.25 – Resultados obtidos para FELO e VALS durante a avaliação da estabilidade das soluções de trabalho do método bioanalítico.

Parâmetro	FELO (200 ng/mL)			VALS (3000 ng/mL)		
	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente
Média das áreas (n=5)	30013	31259	30082	518474	535279	506315
DPR (%)	2,03	0,79	0,46	0,82	1,51	0,65
Variação (%)		4,15	0,23		3,24	-2,35

Tabela 3.26 – Resultados obtidos para ANLO e OLM durante a avaliação da estabilidade das soluções estoque do método bioanalítico.

Parâmetro	ANLO (3 ng/mL)			OLM (9 ng/mL)		
	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente
Média das áreas (n=5)	2326	2262	2106	11831	12197	10686
DPR (%)	1,67	9,01	2,71	2,34	4,88	3,62
Varição (%)		-2,76	-9,45		3,09	-9,68

Tabela 3.27 – Resultados obtidos para FELO e VALS durante a avaliação da estabilidade das soluções estoque do método bioanalítico.

Parâmetro	FELO (200 ng/mL)			VALS (3000 ng/mL)		
	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente	Solução recente	Solução geladeira	Solução temp. ambiente
Média das áreas (n=5)	30013	30612	28997	518474	526694	506164
DPR (%)	2,03	7,31	0,77	0,82	7,20	1,74
Varição (%)		2,00	-3,39		1,59	-2,37

4 CONCLUSÕES

Um método bioanalítico por CLAE-EM/EM com fonte de ionização por *electrospray* no modo positivo foi desenvolvido e validado para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana em plasma humano. Os íons foram monitorados no modo de varredura MRM e felodipino e valsartana foram empregados como padrões internos de anlodipino e olmesartana, respectivamente.

O método bioanalítico no modo de eluição isocrático foi seletivo, preciso, exato e linear na faixa de 1 a 100 ng/mL para anlodipino e de 3 a 1800 ng/mL para olmesartana, comprovando que baixos limites de quantificação foram alcançados.

Não foi evidenciado efeito matriz significativo e a recuperação foi satisfatória para todos os fármacos. Os estudos de estabilidade dos fármacos em matriz biológica e em solução demonstraram que os fármacos são estáveis por períodos de tempo adequados para validação e quantificação de amostras de voluntários.

Dessa forma, o método bioanalítico para quantificação simultânea de anlodipino e olmesartana em plasma humano poderá ser aplicado em estudos futuros de monitorização terapêutica e de biodisponibilidade e bioequivalência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M.; CASTEL-BRANCO, M. M.; FALCÃO, A. C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 2, p. 215 – 222, 2002.

BANERJEE S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1 – 40, 2012.

BAJERSKI, L.; ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; BERGOLD, A. M.; FROEHLICH, P. E. Development and validation of a discriminating In Vitro dissolution method for a poorly soluble drug, olmesartan medoxomil: comparison between commercial tablets. **AAPS PharmaSciTech**, v. 11, n. 2, p. 637 – 644, 2010.

BAJERSKI, L.; ROSSI, R. C.; DIAS, C. L.; BERGOLD, A. M.; FROEHLICH P.E. Stability-Indicating LC Determination of a New Antihypertensive, Olmesartan Medoxomil in Tablets. **Chromatographia**, v. 68, p. 991 - 996, 2008.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p.1011-1040, 2002.

BASILE, J. Critical appraisal of amlodipine and olmesartan medoxomil fixed-dose combination in achieving blood pressure goals. **Dovepress Journal: Integrated Blood Pressure Control**, v. 3, p. 91 – 104, 2010.

BERZAS, J. J.; GUIBERTEAU, M.J.; VILLASENÖR, M. J.; RODRÍGUEZ, V. Development of a capillary gas chromatographic procedure. **Analytica Chimica Acta**, v. 519, p. 219 - 230, 2004.

BOLBRINKER, J.; HUBER, M.; SCHOLZE, J.; KREUTZ, R. Pharmacokinetics and safety of olmesartan medoxomil in combination with either amlodipine or atenolol compared to respective monotherapies in healthy subjects. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 6, p. 767 - 774, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Registro de Associações em Dose Fixa para o Tratamento da Hipertensão Arterial**. 1 ed. 18 p., Brasília, 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/600d4a0047458ec797d6d73fbc4c6735/Guia+para+Registro+de+Associa%C3%A7%C3%B5es+em+Dose+Fixa+para+o+Tratamento+da+Hipertens%C3%A3o+Arterial.pdf>>. Acesso em: 30 novembro 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de Boas Práticas em Biodisponibilidade e Bioequivalência**. 1 ed. v.1. 146 p., Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/publicacoes/index.asp>>. Acesso em: 29 dezembro 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a

validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 maio 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 15 junho 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 31 maio 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 15 outubro 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Caderno de atenção básica: hipertensão arterial sistêmica**. n. 15, 51 p., Brasília, 2006. Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcad15.pdf>. Acesso em: 30 novembro 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação nacional de medicamentos essenciais RENAME**. 131 p., Brasília, 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/anexos_rename_2012_pt_533_27_09_12.pdf>. Acesso em: 01 dezembro 2012.

BRITISH Pharmacopoeia 2013. London: The Stationary Office, 2 v., p. 01 – 2390, 2012.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (ED). **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1821p., 2006.

CAMPBELL, D. A.; NORWOOD, K. L.; MULVANA, D. E.; BATHALA, M. S.; HE, L.; TOKUI, T. Development and Validation of an LC/MS/MS Method for CS8635, a Novel Combination Antihypertensive Agent, in Human Plasma. **The AAPS Journal**, v. 12, n. S2, 2010.

CARVALHO, M.; OLIVEIRA, C. H.; MENDES, G. D.; SUCUPIRA, M; MORAES, M. E. A.; NUCCI, G. Amlodipine Bioequivalence Study: Quantification by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 22, n. 9, p. 383 – 390, 2001.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021 – 1030, 2009.

CHABUKSWAR, A. R.; KUCHEKAR, B. S.; JAGDALE, S. C.; MEHETRE, D. M.; MORE, A. S.; LOKHANDE, P. D. Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous estimation of Olmesartan Medoxomil and Amlodipine Besylate in tablet dosage form. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, n. 4, p. 307 – 312, 2010.

CHAMBERS, E.; WAGROWSKI-DIEHL, D. M.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 22 - 34, 2007.

CHANG M. S.; JI Q.; ZHANG J.; EL-SHOUBAGY T.A. Historical Review of Sample Preparation for Chromatographic Bioanalysis: Pros and Cons. **Drug Development Research**, v. 68, p. 107 - 133, 2007.

CHEN, X.; HU, P.; JIANG, J.; LIU, T.; ZHONG, W.; LIU, H.; ZHAO, Q. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profiles of a Fixed-Dose Combination of Olmesartan Medoxomil and Amlodipine in Healthy Chinese Males and Females. **Clinical Drug Investigation**, v. 32, n. 12, p. 782 - 790, 2012.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H; JARDIM, C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623 - 636, 2008.

CLEOPHAS, T. J.; NIEMEIJER, M. G. Combination therapy with olmesartan and amlodipine in the treatment of hypertension. **The Pharmaceutical Journal**, v. 2, -p 125 – 133, 2009.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de ions de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287 - 292, 2006.

EUROPEAN COMMISSION. Commission decision 2002/675/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of European Communities**, p. L 221/8 – L 221/36, 17 agosto 2002.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on bioanalytical method validation**. London, julho 2011 Disponível em: < http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/Document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf>. Acesso em: 20 junho 2012.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), v. 2, p. 1299 - 3310, 2011.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 7 ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), supplement 7.4, p. 4369 - 4754, 2012.

FEKETE, S.; FEKETE J. The impact of extra-column band broadening on the chromatographic efficiency of 5 cm long narrow-bore very efficient columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 5286 – 5291, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation**. Rockville, maio 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guindance/4252fnl.pdf>>. Acesso em: 15 junho 2012.

GOMES M. A. M.; FEITOSA, A. D. M.; OIGMAN, W.; RIBEIRO, J. M.; MORIGUCHI, H.; SARAIVA, J. F. K.; PRÉCOMA D. B.; RIBEIRO, A. B.; AMODEO, C. BRANDÃO, A. A. Tratamento da Hipertensão Arterial com Olmesartana Medoxomila em

Escalonamento. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n.3, p. 185 -193, 2008.

GREEN, J. M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry**, v.68, p. 305A – 309A, 1996.

GRIFFITHS J. A Brief History of Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 80, n.15, p. 5678 -5683, 2008.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part I: Isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 475-482, 2007.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 876 p., 2005.

HOFFMANN E., STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 489 p., 2007.

HOPFGARTNER, G.; BOURGOGNE, E. Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, n. 22, p. 195 – 214, 2003.

INTERNATIONAL Conferene on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH topic Q1A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products**, Genebra, fevereiro 2003. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf>. Acesso em: 15 janeiro 2012.

JAIN, P. S.; PATE, M. K.; GORLE, A. P.; CHAUDHARI, A. J.; SURANA, S. J. Stability-Indicating Method for Simultaneous Estimation of Olmesartan Medoxomile, Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide by RP-HPLC in Tablet Dosage Form **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, p 680 – 687, 2012.

KAMBLE, A. Y.; MAHADIK, M. V.; KHATAL, L. D.; DHANESHWAR, S. R. Validated HPLC and HPTLC Method for Simultaneous Quantitation of Amlodipine besylate and Olmesartan medoxomila in Bulk Drug and Formulation. **Analytical Letters**, v. 43, p. 251 – 258, 2010.

KARDILE, D.P.; KALYANE, N. V.; THAKKAR, T. H.; PATEL, M. R.; MORADIYA, R. W. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil drug formulations by HPLC and UV-spectrophotometric methods. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, n. 9, p. 499 – 514, 2010.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica & clínica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 991 p., 2005.

KERBALE, P.; VERKERK, U. H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 28, p. 898 – 917, 2009.

KIBBE, A. H. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 3 ed. Washington: American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 665 p., 2000.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário terapêutico Guanabara 06/07**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KOSEKI, N.; KAWASHITA, H.; HARA, H.; NIINA, M.; TANAKA, M.; KAWAI, R.; NAGAE, Y.; MASUDA, N. Development and validation of a method for quantitative determination of valsartan in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 5, p. 1769 - 1774, 2007.

KUMAR, K. K.; RAO, C. K.; MADHUSUDAN, G.; MUKKANTI, K. Rapid Simultaneous Determination of Olmesartan —Amlodipine and Hydrochlorothiazide in Combined Pharmaceutical Dosage Form by Stability-Indicating Ultra Performance Liquid Chromatography. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 50 – 58, 2012.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. 1 ed. São Carlos: Rima, 96 p., 2004.

LI, K.; LIANG, J.; HU, B.; QIU, Y.; LUO, C.; JIANG, H.; LIN, X.; YANG, N. The Relative Bioavailability and Fasting Pharmacokinetics of Three Formulations of Olmesartan Medoxomil 20 mg Capsules and Tablets in Healthy Chinese Male Volunteers: An Open-Label, Randomized-Sequence, Single-Dose, Three-Way Crossover Study. **Clinical Therapeutics**, v. 32, n. 9, p. 1674 - 1680, 2010.

LIU, D.; HU, P.; MATSUSHIMA, N.; LI, X.; LI, L.; JIANG, J. Quantitative determination of olmesartan in human plasma and urine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 856, p. 190 – 197, 2007.

LIU, Y.; JIA, J.; LIU, G.; LI, S.; LU, C.; LIU, Y.; YU, C. Pharmacokinetics and Bioequivalence Evaluation of Two Formulations of 10-mg Amlodipine Besylate: An Open-Label, Single-Dose, Randomized, Two-Way Crossover Study in Healthy Chinese Male Volunteers. **Clinical Therapeutics**, v. 31, n. 4, p. 777 – 783, 2009.

MA, S. F.; ANRAKU, M.; IWAO, Y.; YAMASAKI, K.; HANSEN, U. K.; YAMAOSTSU, N.; HIRONO, S.; IKEDA, T.; OTAGIRI, M. Hydrolysis of Angiotensin II Receptor Blocker Prodrug Olmesartan Medoxomil by Human Serum Albumin and Identification of Its Catalytic Active Sites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 12, p. 1911 - 1919, 2005.

MA, Y.; QIN, F.; SUN, X.; LU, X.; LI, F. Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 4, p. 1540 – 1545, 2007.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra-eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214 - 222, 2009.

MASSAROTI, P.; MORAES, L. A. B.; MARCHIORETTO, M. A. M.; CASSIANO, N. M.; BERNASCONI, G.; CALAFATTI, S. A.; BARROS, F. A. P.; MEURER, E. C.; PEDRAZZOLI, J. Development and validation of a selective and robust LC-MS/MS method for quantifying amlodipine in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 4, p. 1049 - 1054, 2005.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTAZER, M. L.; CHAVEZ, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 13, p. 3019 - 3030, 2003.

MEREDITH P. A.; ELLIOTT H. A. Clinical Pharmacokinetics of Amlodipine. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 22, n. 1, p. 22 - 31, 1992.

MIGLIORANÇA, L. H.; ASTIGARRAGA, R. E. B.; SCHUG, B. S.; BLUME, H. H.; PEREIRA, A. S.; NUCCI, G. Felodipine quantification in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 814, n. 2, p. 217 - 223, 2005.

MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. (ED). **Clarke's analysis of drugs and poisons**. 3. ed., v. 2, London: Pharmaceutical Press, 1632 p., 2004.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray" Aplicada ao Estudo de Espécies Inorgânicas e Organometálicas. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 556 - 563, 2003.

NETO, A. J. S. Como obter maior eficiência com partículas superficialmente porosas em HPLC. **Scientia Chromatographica**, v.3, n. 1, p. 65 - 87, 2011.

NGUYEN, D. T. T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1836 - 1848, 2006.

NORWOOD, D.; BRANCH, E.; SMITH, B.; HONEYWELL M. Olmesartan Medoxomil for Hypertension: A Clinical Review. **P & T Journal**, v.27, n. 12, p. 611 - 618, 2002.

NOVÁKOVÁ L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v.68, p. 908 - 918, 2006.

ORTIZ, R. S.; ANTUNES M. V.; LINDEN R. Determinação de citrato de sildenafil e de tadalafila por cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 389 - 393, 2010.

PATIL, K. R.; RANE, V. P.; SANGSHETTI, J. N.; YEOLE, R.D.; SHINDE, D.B. Stability Indicating LC Method For the Simultaneous Determination of Amlodipine and Olmesartan in Dosage Form. **Journal Chromatographic Science**, v.48, n. 7, p. 601 - 606, 2010.

PATIL, P. S.; CHIVATE, N. D.; SHINDE, S. S.; MORE, H. N.; PISHWIKAR, S. A. Simultaneous determination of Olmesartan medoxomil and Amlodipine besylate from Tablet Formulation by Multiwavelength Method. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n 1, p. 267 – 273, 2011b.

PATIL, P. S.; MORE, H. N.; PISHWIKAR, S. A. RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate and Olmesartan Medoxomil from Tablet. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.3, n. 3, p. 146 - 149, 2011a.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68 - 76, 2001.

QUTAB, S. S.; RAZZAQ, S. N.; ASHFAQ, M.; KHAN, I. U.; MUMTAZ, A. M. Simultaneous Quantitation of Olmesartan Medoxomil and Amlodipine Besylate in Combined Tablets using HPLC. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v.54, n. 3, p. 234 - 237, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validações em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 – 780, 2004.

ROHATAGI, S.; CARROTHERS, T. J.; KSHIRSAGAR, S.; KHARITON, T.; LEE, J.; SALAZAR, D. Evaluation of Population Pharmacokinetics and Exposure-Response Relationship With Coadministration of Amlodipine Besylate and Olmesartan Medoxomil. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 7, p. 823 – 836, 2008a.

ROHATAGI, S.; LEE, J.; SHENOUDA, M.; HAWORTH, S.; BATHALA, M. S.; ALLISON, M.; RUBETS, I.; HEYRMAN R.; NOVECK, R.; SALAZAR, D. E. Pharmacokinetics of amlodipine and olmesartan after administration of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil in separate dosage forms and as a fixed-dose combination. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 11, p. 1309 – 1322, 2008b.

ROTE, A. R.; KANDE, S. K. Development of HPTLC Method for Determination of Amlodipine Besylate and Olmesartan Medoxomil Using Human Plasma by Liquid Liquid Extraction. **Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 2, n. 5, p. 1 – 4, 2011.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B. HUBERT P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111 - 125, 2007.

SAMINATHAN, J.; VETRICHELVAN, T. Method Development and Validation of Olmesartan, Amlodipine and Hydrochlorothiazide in Combined Tablet Dosage Form. **International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis**, v. 1, n. 1, p. 7 – 14, 2011.

SARKAR, A. K.; GHOSH, D.; DAS, A.; SELVAN, P. S.; GOWDA, K. V.; MANDAL, U.; BOSE, A.; AGARWAL, S.; BHAUMIK, U.; PAL, T. K. Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method and its application in bioequivalence study. **Journal of Chromatography B**, v. 873, n. 1, p. 77 – 85, 2008.

SHAH, S.; ASNANI, A.; KAWADE, D.; DANGRE, S.; ARORA, S.; YENDE, S. Simultaneous quantitative analysis of olmesartan medoxomil and amlodipine besylate in plasma by high-performance liquid chromatography technique. **Journal of Young Pharmacists**, v. 4, n. 2, p. 88 – 94, 2012.

SHARMA, R. N.; PANCHOLI, S. S. Validated stability indicating LC-DAD method for determination of olmesartan medoxomil in tablets exposed to stress conditions. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 51, p. 323 – 331, 2009.

SHOHIN, I. E.; RAMENSKAYA, G. V.; VASILENKO, G. F.; MALSHENKO, E. A.. In vitro dissolution kinetics of amlodipine tablets marketed in Russia under biowaiver conditions. **Dissolution technologies**, v. 17, n. 3, p. 20 – 22, 2010.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; NETO, P. J. N. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129 - 135, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification Organic Compounds**. 7 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 502 p., 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI diretrizes brasileiras de hipertensão. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 13, n.1, p. 1-68, 2010.

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

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos**. Originalmente apresentada como tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 765 p., 1997.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**, 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 321 p., 2009.

SWARTZ, M. E. UPLC: An Introduction and Review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 1253 – 1263, 2005.

SWEETMAN S. C. (ED). **MARTINDALE The Complete Drug Reference**. 36 ed. London: Pharmaceutical Press, 3709 p. 2009.

TAYLOR, P.J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 328 - 334, 2005.

TECHNICAL Report How to Measure and Reduce HPLC Equipment Extra Column Volume, Chadds Ford: MAC-MOD Analytical, 6 p. Disponível em: < <http://www.mac-mod.com/pdf/technical-report/084-ReducingExtraColumnVolumes.pdf>>. Acesso em 03 março. 2012.

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 14 ed. Rahway:Merck & Co., 1818 p., 2006.

THE SEVENTH Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7), 86 p., 2004. Disponível em: < <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/jnc7full.pdf>>. Acesso em 29 novembro 2012.

THE UNITED States Pharmacopeia. 35 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, v. 2, p. 2021 - 3613, 2011.

THE UNITED States Pharmacopeia. 35 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, supplement 2, p. 5561 - 6013, 2012.

VAIDYA, V.V.; ROY, S. M. N.; YETAL, S. M.; JOSHI, S. S.; PAREKY, S. A. LC–MS–MS Determination of Olmesartan in Human Plasma. **Chromatographia**, v. 67, p. 147 – 150, 2008.

VISWANATHAN, C. T.; BANSAL, S.; BOOTH, B.; DESTEFANO, A. J.; ROSE, M. J.; SAILSTAD, J.; SHAH, V. P.; SKELLY, J. P.; SWANN, P. G.; WEINER R. Workshop/Conference — Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation: Best Practices for Chromatographic and Ligand Binding Assays. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 1, p. E30 – E42, 2007.

WAINER, I. W.; LOUGH, W. J. **High Performance Liquid Chromatography fundamental principles and practice**. 1 ed. London: Chapman & Hall, 276 p. 1996.

WANKHEDE, S. B.; WADKAR, S. B.; RAKA, K. C.; CHITLANGE, S. S. Simultaneous Estimation of Amlodipine Besilate and Olmesartan Medoxomil in Pharmaceutical Dosage Form. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 5, p. 563 – 567, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Society of hypertension (ISH) statement on management of hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 21, n. 11, p. 1983-1992, 2003. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/hypertension_guidelines.pdf>. Acesso em 29 novembro 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of Cardiovascular Disease**. Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. Genebra, 86p., 2007. Disponível em: <http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/Fulltext.pdf>. Acesso em: 29 novembro 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO model list of essential medicines**. v. 17, 41 p., 2011. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf>. Acesso em: 01 dezembro 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics 2012**. Genebra, 180p., 2012. Disponível em:< http://www.who.int/healthinfo/EN_WHS2012_Full.pdf>. Acesso em: 29 novembro 2012.

WREN, S. A. C.; TCHELITCHEFF, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 140 - 146, 2006.

XU, R. N.; FAN, L.; RIESER, M. J.; EL-SHOUBAGY. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 342 – 355, 2007.

YU, Y.; HOU, Y.; HU, Y.; LIU, J.; ZHAO, W. Pharmacokinetics of olmesartan, a new angiotensin II receptor blocker, in Chinese healthy subjects. **Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics**, v. 6, n. 2, p. 219 – 223, 2009.

ZHOU, S.; SONG, Q.; TANG, T.; NAIDONG, W. Critical Review of Development, Validation, and Transfer for High Throughput Bioanalytical LC-MS/MS Methods. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.1, p. 3 – 14, 2005.

APÊNDICE A – Resumos enviados ao XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO)

Dois trabalhos foram apresentados no XIV COLACRO que aconteceu entre os dias 01 e 05 de outubro de 2012 em Florianópolis – SC.

Resumo 01

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE OLMESARTANA MEDOXOMILA E ANLODIPINO EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA

Mariana de Oliveira Almeida, Isabela da Costa César, Priscilla Fernanda de Oliveira, Gerson Antônio Pianetti

Olmesartana medoxomila (OLMD) e besilato de anlodipino (ANLO) são fármacos utilizados no tratamento da hipertensão. A OLMD é um antagonista seletivo dos receptores AT₁ de angiotensina II e o ANLO é um bloqueador dos canais lentos de cálcio. A associação desses fármacos em comprimidos de dose fixa combinada mostrou-se efetiva para a redução da pressão arterial. Não há monografia farmacopeica para proceder ao controle de qualidade desse medicamento. Nesse contexto, desenvolveu-se e validou-se um método por CLAE para quantificar OLMD e ANLO em comprimidos de dose fixa combinada. Utilizou-se coluna C₁₈ (150 x 4.6mm; 5 µm), fase móvel composta de ACN:MeOH:triethylamina 0,3% (30:30:40) pH 2,75 (ajustado com ácido fosfórico) a 1,0 mL/min. e volume de injeção de 10 µL. O tempo de corrida foi 5,5 min. e a resolução entre os picos foi 5,3. A linearidade foi confirmada pelo método dos mínimos quadrados ordinários após a avaliação das seguintes premissas: normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos. A faixa de trabalho foi de 8,0 – 28,0 µg/mL para o ANLO e de 32,0 – 112,0 µg/mL para a OLMD. A seletividade foi testada ao submeter os fármacos a condições de degradação forçada. O efeito matriz foi avaliado após comparar, pelo teste t de *Student*, o coeficiente angular e linear de duas curvas analíticas, uma preparada em solução diluente e outra em solução de placebo do comprimido. Não foi verificado efeito matriz. A recuperação para avaliar a exatidão foi feita em três níveis de concentração pelo método do placebo contaminado, os valores obtidos se encontram entre 98,3 – 101,7%. A repetitividade foi feita por meio de seis determinações de um pool de comprimidos, para avaliar a reprodutibilidade parcial foram feitas análises em três dias consecutivos, o DPR foi calculado e obteve-se 0,88% e 0,89% para o ANLO, 0,74% e 0,92% para a OLMD, respectivamente para repetitividade e reprodutibilidade parcial. A estabilidade da solução de trabalho foi verificada por 8 horas e a degradação foi inferior a 2%. Para determinar a robustez, se recorreu ao planejamento de Plackett Burman, pelo qual se avaliou a influência de sete parâmetros analíticos. O método se mostrou robusto e adequado para o doseamento dos comprimidos e pode ser aplicado ao controle de qualidade da associação de OLMD e ANLO.

/continua.

APÊNDICE A (conclusão)

Resumo 02

TRANSFERÊNCIA DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-UV PARA UM SISTEMA DE CLUE-UV PARA QUANTIFICAÇÃO DE OLMESARTANA MEDOXOMILA E ANLODIPINO EM COMPRIMIDOS DE DOSE FIXA COMBINADA

Mariana de Oliveira Almeida, Isabela da Costa César, Priscilla Fernanda de Oliveira, Gerson Antônio Pianetti

A necessidade de analisar grandes números de amostras em pequenos intervalos de tempo e com gasto reduzido de solvente impulsiona o uso da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) em relação à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O objetivo desse trabalho foi, através de uma metodologia simples, realizar a transferência de método por CLAE para CLUE. O método transferido foi o validado para quantificar olmesartana medoxomila (OLMD) e besilato de anlodipino (ANLO) em comprimidos de dose fixa combinada por CLAE-UV. No método por CLAE, utilizou-se coluna C₁₈ (150 x 4.6 mm; 5 µm), fase móvel composta de ACN:MeOH:triethylamina 0,3% (30:30:40) pH 2,75 (ajustado com ácido fosfórico) a 1,0 mL/min. e volume de injeção de 10 µL. Para se manter a mesma eficiência após a transferência, a coluna utilizada na CLUE foi C₁₈ (50 x 2.1 mm; 1,7 µm). Por meio de fórmulas matemáticas, calculou-se o volume de injeção e fluxo da fase móvel para CLUE, com objetivo de evitar o alargamento do pico e manter constante a relação entre a velocidade linear e o diâmetro da partícula da coluna. O novo volume de injeção foi 0,7 µL e o fluxo 0,613 mL/min. Por CLAE, o fator de retenção (*k*) foi 1,1 para ANLO e 1,8 para a OLMD, a resolução entre os picos foi 5,3 e o tempo de corrida de 5,5 min. Pelo fato do *k* ser baixo, observou-se perda da eficiência após a transferência do método, embora fosse esperado que a eficiência se mantivesse. Isso ocorreu porque quando o analito fica pouco retido em colunas mais eficientes, como a de CLUE, a variância (σ^2) do pico é menor, o que aumenta o efeito da σ^2 extra-coluna. Com o objetivo de melhorar a eficiência, aumentou-se a proporção aquosa da fase móvel até que a taxa entre a σ^2 extra-coluna e a σ^2 total fosse igual a 10%, valor no qual a separação cromatográfica é considerada adequada. A taxa foi alcançada com fase móvel ACN:MeOH:triethylamina 0,3% (26:26:48) pH 2,75. Nessa condição o *k* foi 3,2 para ANLO e 4,2 para OLMD, a resolução entre os picos foi 3,4 e o tempo de corrida de 1,25 min. Foi obtida redução de 4,4 vezes no tempo de análise e o consumo de solvente foi reduzido de 7 vezes. Após a transferência, o método foi validado e se mostrou adequado para o doseamento dos comprimidos e pode ser aplicado ao controle de qualidade da associação de OLMD e ANLO.

APÊNDICE B – Certificados de apresentação dos trabalhos enviados ao COLACRO