UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento e validação de métodos analíticos
para determinação simultânea de fármacos que
atuam no controle da hipertensão arterial**

Claudia Vilela de Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de
Mestre

Orientadora:
Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento e validação de métodos analíticos
para determinação simultânea de fármacos que
atuam no controle da hipertensão arterial**

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Claudia Vilela de Oliveira

Dissertação para obtenção do Grau de
Mestre

Orientadora:

Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Oliveira, Claudia Vilela de
048d Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para
determinação simultânea de fármacos que atuam no controle da
hipertensão arterial / Claudia Vilela de Oliveira. -- São
Paulo, 2015.
95 p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Aurora Prado, Maria segunda-feira

1. Cromatografia em líquido de alta eficiência : Análise
química : Farmacologia 2. Eletroforese capilar I. T. II.
Aurora Prado, Maria Segunda, orientador.

615.19015 CDD

À família e amigos pela força e incentivo

Ao meu querido pai pelo exemplo de sabedoria, humildade, serenidade e força.

Aos meus irmãos Silvia, Silvana, Valdir e Valéria, ao meu namorado Rafael, muito obrigada pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me iluminar e guiar nos momentos de total incerteza.

À minha família, por acreditar em mim sempre.

Ao meu namorado pelo companheirismo e incentivo.

As minhas amigas Edna e Ednir pelo exemplo de superação

Ao meu amigo Eduardo pela contribuição e estímulo.

À Profa. Dra. Maria Segunda Aurora Prado pela orientação e valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

Aos atuais e antigos colegas do laboratório: Angel, Pedro, Viviane, Cíntia, Michele, Elenice, Welington, Antônio, Laura, Aline, Adriana, Andréia e Marcela, obrigada pela companhia e auxílio.

Aos irmãos Miler Rodrigo Pereira e Valéria Adriana Pereira, pela importante contribuição na finalização deste trabalho.

Aos professores Humberto Gomes Ferraz e Felipe Rebelo Lourenço pela colaboração em etapas importantes do estudo.

Aos técnicos de laboratório Leandro, Eremita e Amanda pelas informações e auxílio.

A empresa Agilent Technologies, obrigada pela parceria.

Em especial agradeço à:

Adriano Peron, Cíntia Matuyama e Lígia Moraes pela colaboração na realização dos testes em cromatografia líquida.

Aos meus amigos da E.E Prof. Natalino Fidêncio por torcerem e sempre me incentivarem.

Aos professores e funcionários do laboratório de controle de qualidade de fármacos, Profa. Dra. Érika Rosa Maria Kedor, Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro e funcionária Íria Raimunda da Silva, muito obrigada.

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, Lorena C. Paes e Charles de Lima, pela cooperação na realização dos testes em eletroforese capilar.

Ao Prof. Dr. Claudimir L. Lago pelas informações de suma importância.

Aos funcionários Elaine Midori Ychico, Jorge Alves de Lima, David Olímpio, Elizabeth Claro de Sousa Paiva e Kelma Lydis Guitman pelos esclarecimentos.

À Dona Lurdes (*in memoriam*) pela clareza e eficiência quando me mostrava o caminho.

À todos os meus amigos e familiares, muito obrigada.

OLIVEIRA, C.V. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação simultânea de fármacos que atuam no controle da hipertensão arterial**. 2015. 95 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos – Área de Produção e Controle Farmacêuticos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015].

RESUMO

A hipertensão arterial é um fator de risco de alta prevalência para as doenças cardiovasculares, principalmente no mundo industrializado, aumentando o problema de saúde em virtude do aumento da longevidade e da prevalência de fatores contribuintes como obesidade, sedentarismo e dietas inadequadas. Estima-se que 10% das 55 milhões de mortes que acontecem a cada ano, são consequências da hipertensão arterial. Dois terços desses eventos ocorrem nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, afetando principalmente a população de menor nível socioeconômico. Diuréticos como hidroclorotiazida associados a betabloqueadores como o metoprolol são exemplos de fármacos utilizados no controle da hipertensão. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver, validar e comparar métodos analíticos para a identificação e quantificação simultânea do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida por eletroforese capilar (CE) e por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC). Para a definição das melhores condições de análise e determinação simultânea dos analitos em estudo, e otimização do método, utilizou-se metodologia de superfície de resposta (ou *Response Surface Methodology* - RSM). O método por CE utilizou um capilar de sílica fundida com comprimento total de 30,2 cm x 50 µm d.i. O tampão utilizado foi tetraborato de sódio 25,0 mmol L⁻¹, injeção hidrodinâmica 0,5 psi/6s, tensão aplicada +15 kV, detecção em 225 nm temperatura a 25°C. O tartarato de metoprolol e hidroclorotiazida foram separados em 1,2 e 2,1 min, respectivamente. O método por UHPLC foi realizado empregando uma coluna ZORBAX[®] SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila:triethylamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico, utilizou vazão de 0,9 mL min⁻¹. A hidroclorotiazida e o tartarato de metoprolol foram separados em 0,7 e 1,0 min, respectivamente. Os métodos analíticos foram validados de acordo com os requerimentos da ANVISA, ICH e Farmacopéia Americana. Os métodos apresentaram boa linearidade com coeficiente de correlação maiores que 0.99, a precisão *intra*- e *inter-day* para os tempos de migração foi apropriada (DPR < 2%), a exatidão do método foi comprovada mediante teste de recuperação, obtendo-se valores de 100±2. Portanto, os métodos propostos demonstraram ser lineares, precisos, exatos e rápidos para quantificação simultânea da hidroclorotiazida e do tartarato de metoprolol. E podem ser considerados confiáveis para serem empregados em análise de rotina para controle de qualidade destes produtos farmacêuticos.

Palavras-chave: Métodos analíticos. Eletroforese capilar. Cromatografia em fase líquida de ultra eficiência. Tartarato de metoprolol. Hidroclorotiazida.

OLIVEIRA, C.V. **Development and validation of analytical methods for simultaneous determination of drugs that act on the control of hypertension.** 2015. 95 f. Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos – Área de Produção e Controle Farmacêuticos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015].

ABSTRACT

Hypertension is a risk factor of high prevalence for cardiovascular diseases, especially in the industrialized world, increasing health problems as a result of increased longevity and the prevalence of contributing factors such as obesity, physical inactivity and inadequate diets. It is estimated that 10% of 55 million deaths that occur each year, are consequences of hypertension. Two-thirds of those events occur in developing countries, including Brazil, affecting mainly the population from lower socioeconomic backgrounds. Diuretics like hydrochlorothiazide associated with beta-blockers such as metoprolol tartrate are examples of drugs used in the control of hypertension. The present work had as objective to develop, validate and compare analytical methods for identification and simultaneous quantification of metoprolol tartrate and hydrochlorothiazide by capillary electrophoresis (CE) and ultra performance liquid chromatography (UHPLC). For the definition of the best conditions of analysis and simultaneous determination of drugs in study, and optimization of the method, it was used response surface methodology (RSM or "Response Surface Methodology). The CE method used a fused silica capillary with total length of 30.2 cm x 50 μm d.i. The electrolyte used was sodium tetraborate 25,0 mmol L⁻¹, hydrodynamic injection 0.5 psi/6s, applied voltage +15 kV, detection in 225 nm temperature at 25°C. The metoprolol tartrate and hydrochlorothiazide were separated into 1.2 and 2.1 min, respectively. The UHPLC method was carried out employing a ZORBAX SB[®] C18 (50 mm x 2.1 mm x 1.8 μm) column, mobile phase consisting of water: acetornitrila: triethylamine (83: 17: 0.2 v/v/v), 3 pH adjusted with phosphoric acid, the flow was 0.9 mL min⁻¹. Hydrochlorothiazide and metoprolol tartrate were separated in 0.7 and 1.0 min, respectively. The analytical methods have been validated in accordance with the requirements of ANVISA, ICH and American Pharmacopoeia. The methods showed good linearity with correlation coefficient greater than 0.99, precision *inter and intra day* for times of migration was appropriate (DPR < 2%), the accuracy of the method has been proven by recovery test, obtaining values of 100 $\pm$ 2. Therefore, the proposed methods have shown to be linear, precise, accurate and fast for simultaneous quantification of hydrochlorothiazide and metoprolol tartrate; and can be considered reliable to be used in routine analysis for quality control of pharmaceutical products.

Key words: Analytical methods. Capillary electrophoresis. Ultra performance liquid chromatography efficiency. Metoprolol tartrate. Hydrochlorothiazide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 Diuréticos.....	03
2.1.1 Classificação dos diuréticos e mecanismo de ação.....	03
2.2 Betabloqueadores.....	05
2.2.1 Classificação dos betabloqueadores.....	05
2.3 Propriedades físico-químicas da hidroclorotiazida e tartarato de metoprolol.....	08
2.3.1 Hidroclorotiazida.....	08
2.3.2 Tartarato de metoprolol.....	09
2.4 Metodologias analíticas.....	09
2.5 Técnicas analíticas.....	12
2.5.1 Eletroforese capilar.....	12
2.5.1.1 Instrumentação.....	12
2.5.1.2 Fluxo eletrosmótico.....	14
2.5.1.3 Classificação da eletroforese capilar.....	15
2.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	17
2.5.3 Planejamento e otimização de experimento.....	21

3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Materiais.....	26
4.1.1 Reagentes e solventes.....	26
4.1.2 Substâncias empregadas como padrão.....	26
4.1.3 Amostra.....	27
4.2 Equipamentos.....	27
4.3 Métodos.....	28
4.3.1 Métodos de identificação.....	28
4.3.1.1 Espectrofotometria no ultravioleta/vísivel.....	28
4.3.1.2 Ponto de fusão.....	28
4.3.1.3 Caracterização do tartarato de metoprolol e a hidroclorotiazida empregando técnica termoanalítica.....	28
4.3.1.3.1 Colorimetria exploratória diferencia (DSC).....	28
4.3.1.3.2 Termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG).....	29
4.3.2 Separação e determinação simultânea do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida utilizando eletroforese capilar de zona (CZE).....	29
4.3.2.1 Preparo das soluções estoque.....	29
4.3.2.2 Otimização do método por desenho experimental.....	30

4.3.2.3 Validação do método por eletroforese capilar de zona (CZE).....	32
4.3.2.3.1 Especificidade ou seletividade.....	32
4.3.2.3.1.1 Hidrólise oxidativa.....	33
4.3.2.3.1.2 Hidrólise neutra.....	33
4.3.2.3.1.3 Hidrólise ácida.....	34
4.3.2.3.1.4 Hidrólise alcalina.....	34
4.3.2.3.1.5 Fotólise	34
4.3.2.3.2 Linearidade.....	35
4.3.2.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	36
4.3.2.3.4 Repetibilidade (intra-dia).....	36
4.3.2.3.5 Precisão intermediária (inter-dia).....	36
4.3.2.3.6 Exatidão.....	37
4.3.3 Separação e determinação simultânea do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida utilizando cromatografia em fase líquida de alta eficiência.....	38
4.3.3.1 Otimização do método por desenho experimental.....	38
4.3.3.2 Validação do método por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).....	39
4.3.3.2.1 Especificidade.....	39
4.3.3.2.1.1 Hidrólise oxidativa.....	39
4.3.3.2.1.2 Hidrólise neutra.....	40
4.3.3.2.1.3 Hidrólise ácida.....	40
4.3.3.2.1.4 Hidrólise alcalina.....	40
4.3.3.2.1.5 Fotólise	40
4.3.3.2.2 Linearidade.....	41

4.3.3.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	41
4.3.3.2.4 Repetibilidade (intra-dia).....	41
4.3.3.2.5 Precisão intermediária (inter-dia).....	42
4.3.3.2.6 Exatidão.....	42
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Identificação da hidroclorotiazida e do metoprolol.....	43
5.1.1 Ponto de fusão.....	43
5.1.2 Espectrofotometria ultravioleta visível.....	43
5.1.3 Análise térmica por DSC, TG e DTG da hidroclorotiazida e do tartarato de metoprolol.....	44
5.2 Método analítico.....	46
5.2.1 Desenvolvimento do método analítico por eletroforese capilar de zona.....	46
5.2.2 Otimização do método.....	51
5.2.3 Validação do método por eletroforese capilar de zona.....	60
5.2.3.1 Linearidade.....	60
5.2.3.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	63
5.2.3.3 Repetibilidade (intra-dia).....	63
5.2.3.4 Precisão intermediária (inter-dia).....	63
5.2.3.5 Exatidão.....	64
5.2.3.6 Especificidade/seletividade.....	64
5.3 Desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).....	71
5.3.1 Otimização do método.....	74
5.3.2 Validação do método por cromatografia líquida de ultra eficiência.....	80

5.3.2.1 Linearidade.....	80
5.3.2.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	82
5.3.2.3 Repetibilidade (intra-dia).....	82
5.3.2.4 Precisão intermediária (inter-dia).....	82
5.3.2.5 Exatidão.....	83
5.3.2.6 Especificidade/seletividade.....	84
5.4 Comparação entre técnicas de CE e UHPLC para a determinação e quantificação do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.....	88
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da hidroclorotiazida.....	08
Figura 2.	Estrutura química do tartarato de metoprolol.....	09
Figura 3.	Esquema de um equipamento de eletroforese capilar.....	13
Figura 4.	Representação esquemática do fluxo eletrosmótico em CZE..	14
Figura 5.	Representação de um equipamento de HPLC.....	19
Figura 6.	Planejamento 2 ² com ponto central.....	22
Figura 7.	Planejamento composto central.....	24
Figura 8.	Espectro de absorção da hidroclorotiazida no UV-Visível (400,0 µg mL ⁻¹)	43
Figura 9.	Espectro de absorção do tartarato de metoprolol no UV-Visível (400,0 µg mL ⁻¹).....	44
Figura 10.	Curva DSC,TG e DTG da hidroclorotiazida obtida a 10°C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50,0 mL.min ⁻¹	44
Figura 11.	Curva DSC, TG e DTG do tartarato de metoprolol obtida a 10°C min ⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50,0 mL.min ⁻¹ .	45
Figura 12.	Estrutura química e ionização do tartarato de metoprolol.....	47
Figura 13.	Estrutura química e ionização da hidroclorotiazida.....	48
Figura 14.	Eletroferogramas do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em associação. Concentrações 100,0 µg mL ⁻¹ de tartarato de metoprolol e 12,5 µg mL ⁻¹ de hidroclorotiazida. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2cm x 50 µm i.d. (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 3 s; voltagem aplicada: +20 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 225 nm. Eletrólito contendo 15 mmol L ⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9.2: (A) eletrolito, (B) hidroclorotiazida (C) metoprolol (D) hidro/meto.....	50
Figura 15.	Eletroferogramas do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em associação. Concentrações 100,0 µg mL ⁻¹ de tartarato de metoprolol e 12,5 µg mL ⁻¹ de hidroclorotiazida. Condições: Capilar de sílica fundida 30,2cm x 50 µm i.d (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 3 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 225 nm. Eletrólito contendo 25,0 mmol L ⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9.2: (A) eletrolito, (B) hidroclorotiazida (C) metoprolol (D) hidro/meto.....	51

Figura 16.	A) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração do tartarato de metoprolol em função da concentração de eletrólito e do pH; B) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração da hidroclorotiazida em função da concentração de eletrólito e do pH.....	56
Figura 17.	A) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração do tartarato de metoprolol em função da concentração de eletrólito e da tensão B) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração da hidroclorotiazida em função da concentração de eletrólito e da tensão.....	57
Figura 18.	Superfície de resposta representando a variação da resolução da hidroclorotiazida A) em função da concentração de eletrólito e do pH B) em função da concentração do eletrólito e da tensão C) em função do pH e da tensão.....	58
Figura 19.	Eletroferogramas da análise do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em associação e a sulfametoxiazol (p.i). Concentrações $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol, e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfametoxiazol. Condições: Capilar de sílica fundida $30,2\text{cm} \times 50 \mu\text{m}$ i.d (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 6 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm. Eletrólito contendo $25,0 \text{mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9.3.....	60
Figura 20.	Curva analítica da solução padrão do tartarato de metoprolol, faixa de concentração de $80,0$ a $120,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando eletroforese capilar de zona.....	61
Figura 21.	Curva analítica da solução padrão da hidroclorotiazida na faixa de $10,0$ a $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando eletroforese capilar de zona.....	62
Figura 22.	Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise oxidativa. 1) 2 horas a 80°C ; 2) 24 horas a 80°C ; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo $25,0 \text{mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{cm} \times 50 \mu\text{m}$ i.d (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 6 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm. (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametazona.....	67

- Figura 23.** Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise neutra. 1) 2 horas a 80°C; 2) 24 horas a 80°C; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo 25,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm i.d (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 6 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 225 nm. (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametazona..... 68
- Figura 24.** Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise ácido. 1) 2 horas a 80°C; 2) 24 horas a 80°C; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo 25,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm i.d (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 6 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 225 nm. (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametazona..... 69
- Figura 25.** Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise ácido. 1) 2 horas a 80°C; 2) 24 horas a 80°C; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo 25,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm i.d (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 6 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 225 nm. (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametazona..... 70
- Figura 26.** Eletroferogramas da análise de estresse por fotólise do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida. Eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo 25,0 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm i.d (20 cm até o detector); injeção hidrodinâmica por pressão 0,5 psi por 6 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25°C. Detecção UV em 225 nm. (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametazona..... 71
- Figura 27.** Estrutura da fase estacionária Zorbax StableBond. R= Isopropil (C18, C8, CN, C3, fenil) e Isopropil (C18), R1= C8,C18,CN,C3, fenil..... 72
- Figura 28.** Cromatograma da solução padrão de tartarato de metoprolol 100,0 µg mL⁻¹ e hidroclorotiazida 12,5 µg mL⁻¹ coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm) λ = 225 nm, fase móvel: acetonitrila/ água (70/30, v/v) pH=3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, volume de injeção: 2,0 µL, temperatura da coluna: 25°C. (H) hidroclorotiazida, (M) metoprolol..... 73

Figura 29.	Cromatograma da solução padrão de tartarato de metoprolol 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e hidroclorotiazida 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm) $\lambda = 225$ nm, fase móvel: acetonitrila/ água (80/20, v/v) pH=3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, volume de injeção: 2,0 μL , temperatura da coluna: 25°C. (H) hidroclorotiazida, (M) metoprolol.....	73
Figura 30.	Cromatograma da solução padrão de tartarato de metoprolol 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e hidroclorotiazida 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm) $\lambda = 225$ nm, fase móvel: acetonitrila/ água/trietilamina (80/20/0,1, v/v/v) pH=3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, volume de injeção: 2,0 μL , temperatura da coluna: 25°C. (H) hidroclorotiazida, (M) metoprolol.....	74
Figura 31.	Superfície de resposta representando a variação na resolução da hidroclorotiazida em função da concentração da acetonitrila e do pH.....	77
Figura 32.	Superfície de resposta representando a variação na resolução do tartarato de metoprolol em função do pH e da concentração de acetonitrila.....	78
Figura 33.	Gráfico global do resultado da otimização do método por UHPLC.....	79
Figura 34.	Cromatograma da determinação simultânea do tartarato de metoprolol (M) e da hidroclorotiazida (H). Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm), fase móvel constituída por água:acetornitrila:trietilamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico.Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min^{-1} , 2,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.....	80
Figura 35.	Curva analítica resultante da análise da solução padrão do tartarato de metoprolol utilizando UHPLC.....	80
Figura 36.	Curva analítica resultante da análise da solução padrão da hidroclorotiazida utilizando UHPLC.....	81
Figura 37.	Cromatograma da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise neutra. 1) 0 hora, 2) 2 horas a 80°C, 2) 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm), fase móvel constituída por água:acetornitrila:trietilamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico.Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min^{-1} , 2,0 μL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.....	85

- Figura 38.** Cromatograma da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise oxidativa. 1) 0 hora, 2) 2 horas a 80°C, 2) 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila: trietilamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm..... 86
- Figura 39.** Cromatograma da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise básica. 1) 0 hora, 2) 2 horas a 80°C, 2) 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila: trietilamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm..... 86
- Figura 40.** Cromatograma da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise ácida. 1) 0 hora, 2) 2 horas a 80°C, 2) 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila: trietilamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm..... 87
- Figura 41.** Cromatogramas da análise de estresse por fotólise do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida. 1) sem estresse, 2) após estresse 2 horas a 80°C, (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água: acetornitrila: trietilamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Planejamento de superfície de resposta para estudar o efeito da concentração do eletrólito, pH e voltagem na resolução e no tempo de migração do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.....	31
Tabela 2.	Procedimento experimental para o teste de recuperação do método específico por CZE.....	38
Tabela 3.	Planejamento de superfície de resposta para estudar o efeito do pH e da concentração do solvente orgânico, na resolução e na área do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.....	39
Tabela 4.	Procedimento experimental para o teste de recuperação do método específico por UHPLC.....	42
Tabela 5.	Dados de temperatura onset (Tonset), temperatura de pico (Tpico) e entalpia de fusão da hidroclorotiazida e do metoprolol, obtidos pela curva de DSC.....	45
Tabela 6.	Dados da temperatura de decomposição e variação de massa (Δm) do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida, obtido pela curva de TG/DTG.....	46
Tabela 7.	Nível das variáveis otimizadas e resultados obtidos utilizando DCC.....	52
Tabela 8.	Análise de variância (ANOVA) para o tempo de migração do tartarato de metoprolol e hidroclorotiazida e resolução da hidroclorotiazida.....	54
Tabela 9.	Valores dos coeficientes para a correlação das variáveis respostas.....	55
Tabela 10.	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por CZE para o tartarato de metoprolol.....	61
Tabela 11.	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por CZE para a hidroclorotiazida.....	62
Tabela 12.	Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por CZE.....	63
Tabela 13.	Resultados obtidos empregando CE após condições de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.....	64
Tabela 14.	Nível das variáveis otimizadas e resultados obtidos utilizando DCC.....	64

Tabela 15.	Análise de variância (ANOVA) para a resolução do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.....	75
Tabela 16.	Valores dos coeficientes para a correlação das variáveis respostas.....	76
Tabela 17.	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por UHPLC para o tartarato de metoprolol.....	76
Tabela 18.	Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por UHPLC para a hidroclorotiazida.....	81
Tabela 19.	Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por UHPLC.....	82
Tabela 20.	Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por UHPLC.....	83
Tabela 21.	Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por UHPLC.....	83
Tabela 22.	Resultados obtidos empregando UHPLC após condições de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.....	84
Tabela 23.	Parâmetros estatístico e estudo comparativo entre CE e UHPLC, para a determinação quantitativa do tartarato de metoprolol e a hidroclorotiazida.....	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Métodos analíticos para a determinação da hidroclorotiazida empregando HPLC e CE.....	10
Quadro 2.	Métodos analíticos para a determinação do metoprolol empregando HPLC, LC-MS e CE.....	11
Quadro 3.	Reagentes que foram utilizados no trabalho.....	26
Quadro 4.	Condições empregadas no teste de estresse.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AVC	Acidente vascular cerebral
CE	Eletroforese capilar
CEC	Eletrocromatografia capilar
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CGE	Eletroforese capilar em gel
CIEF	Focalização isoelétrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
CN	Cianopropil
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CZE	Eletroforese capilar de zona
d.i.	Diâmetro interno
DAD	Detector de arranjo diodo
DCV	Doença cardiovascular
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DPR	Desvio padrão relativo
DTG	Termogravimetria derivada
FE	Fase estacionária
FEO	Fluxo eletrosmótico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FM	Fase móvel
FSCE	Eletroforese capilar de solução livre
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HT	Hipertensão
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
MEEKC	Cromatografia eletrocinética em microemulsão
MeOH	Metanol
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Ponto isoelétrico

p.i	Padrão interno
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBS	Tetraborato de sódio
TR	Tempo de migração
TM	Tempo de migração
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Hipertensão é uma das formas mais comuns de doença; idade, dieta, histórico familiar e obesidade podem ser fatores para o desenvolvimento da hipertensão. Ela é usualmente caracterizada pela pressão sistólica maior que 140 mmHg¹.

A hipertensão (HT) é a mais predominante de todas as doenças cardiovasculares (DCV), afetando mais de 36 milhões de brasileiros adultos, sendo o maior fator de risco para lesões cardíacas e cerebrovasculares e a terceira causa de invalidez².

O risco atribuído à hipertensão arterial é de cerca de 40% para as doenças cardiovasculares e de 25% para as coronárias, o desafio de diagnosticar e tratar a hipertensão no Brasil é imenso. Pois, a maioria dos hipertensos são assintomáticos e os sintomas quando surgem, geralmente estão associados aos chamados órgãos vitais: cérebro, coração e rins. No entanto, é claro que todos os órgãos sofrem as consequências dos níveis de pressão elevados, pois todos os vasos são atingidos^{4,17}.

Os vasos são recobertos internamente por uma camada muito fina e delicada, e quando o sangue está circulando com pressão elevada causa uma lesão. Com isso os vasos se tornam endurecidos e estreitados podendo, com o passar dos anos, entupir ou romper. Quando o entupimento de um vaso acontece no coração, causa a angina que pode ocasionar um infarto. No cérebro, o entupimento ou rompimento de um vaso, leva ao “derrame cerebral”. Nos rins podem ocorrer alterações na filtração até a paralisia dos órgãos. Todas essas situações são muito graves e podem ser evitadas com o tratamento adequado³.

O diurético hidroclorotiazida pertence à classe dos tiazídicos é um dos mais antigos diuréticos, usados no controle da hipertensão arterial sistêmica. É prescrito em combinação com outros fármacos anti-hipertensivos como o beta bloqueador adrenérgico, tartarato de metoprolol, que apresenta ação terapêutica também como anti-hipertensivo, na cardiomiopatia hipertrófica, no infarto do miocárdio, na cefaleia vascular e na enxaqueca. A combinação demonstrou maior efetividade que qualquer outro fármaco aplicado isoladamente^{5,12,6}.

Em busca de novas alternativas, o desenvolvimento de técnicas analíticas instrumentais tem sido de grande valor para o avanço em diversas áreas da pesquisa científica. Dentro do contexto da indústria farmacêutica, o controle de qualidade de matérias primas e produtos acabados apresenta especial relevância, em função da necessidade de se garantir qualidade e segurança nos produtos oferecidos à população⁷.

Pela revisão da literatura observa-se que as Farmacopeias Americana e Britânica identificam a hidroclorotiazida e o metoprolol separadamente por espectrofotometria de absorção no infra vermelho e por espectrofotometria no ultravioleta (UV) e a quantificação é realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)^{8,16}. Somente a Farmacopeia Americana identifica e determina a hidroclorotiazida e metoprolol simultaneamente.

Na determinação isolada ou em associação da hidroclorotiazida com benazepril, cloridrato de moexipril, losartana em comprimidos foram utilizados técnicas analíticas como a espectrofotometria derivada de primeira ordem, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar (CE)^{19,20,29}.

O metoprolol foi determinado isoladamente ou em associação com hidroclorotiazida, em comprimidos e fluidos biológicos por espectrofotometria e espectrometria de absorção atômica, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida de ultra eficiência com espectrometria de massa e eletroforese capilar^{5, 24, 27}.

Neste estudo a hidroclorotiazida e o tartarato de metoprolol serão analisados utilizando os métodos de cromatografia líquida de ultra eficiência e eletroforese capilar para a separação e quantificação simultânea desses fármacos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diuréticos

Os diuréticos são fármacos que atuam nos rins, aumentando o volume e grau do fluxo urinário, também promovem a eliminação de eletrólitos como sódio e o potássio, sendo usado no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca ou cirrose hepática.

Esses fármacos ainda são os mais estudados clinicamente e têm sido utilizados na terapia farmacológica da hipertensão arterial por quase cinco décadas.

Os diuréticos tiazídicos, isolados ou associados a outros anti-hipertensivos, reduzem a pressão arterial tanto sistólica como diastólica na grande maioria dos portadores de hipertensão arterial não complicada. Eles são eficazes, bem tolerados, têm baixo custo e poucos efeitos colaterais, além de potencializar a ação de outras classes de drogas anti-hipertensivas. O maior benefício desses fármacos é obtido nos hipertensos idosos e negros e na insuficiência cardíaca congestiva⁹.

Eles são eficazes, bem tolerados, têm baixo custo e poucos efeitos colaterais, além de potencializar a ação de outras classes de drogas anti-hipertensivas

2.1.1 Classificação dos diuréticos e mecanismo de ação:

Existem três classes de diuréticos anti-hipertensivos, classificados de acordo com o mecanismo de ação no tubo renal.

- a) **Diuréticos da alça:** furosemida, bumetanida, piretanida. São potentes natriuréticos e agem em uma porção do túbulo renal onde ocorre uma grande reabsorção de sódio e, por esta razão, são utilizados preferencialmente no tratamento da hipertensão associada à doença renal crônica e insuficiência cardíaca congestiva.

- b) Diuréticos poupadores de potássio:** amilorida, riantereno, espironolactona, eplerenona⁹. São diuréticos de pouca potência natriurética. Amilorida e riantereno agem bloqueando o canal de sódio da membrana apical da porção final do túbulo contornado distal. Espironolactona e eplerenona, são antagonistas competitivos do receptor da aldosterona e consequentemente inibem a atividade da Na-K-ATPase^{9,11}.
- c) Diuréticos tiazídicos e correlatos:** hidroclorotiazida, clortalidona, indapamida. São os diuréticos mais utilizados na terapia da hipertensão arterial e agem na porção inicial do túbulo contorcido proximal, iniciando o co-transportador Na-K localizado na membrana epical. Este segmento do tubo renal é responsável por aproximadamente 10% do sódio filtrado, o que explica a baixa potência natriurética deste grupo de diuréticos^{9,11}.
- **Hidroclorotiazida:**
 - ✓ Mecanismo de ação: age por inibição da reabsorção de sódio, e pode causar depleção de potássio. Tem efeito anti-hipertensivo por ação direta sobre os vasos sanguíneos. A absorção gastrointestinal é completa e rápida, com início de efeito em 2 horas, pico em 4 horas e duração de efeito de 12 horas. Excretado quase totalmente por via renal, na forma inalterada, com meia vida entre 6 e 12 horas¹².
 - ✓ Indicação: edema, hipertensão (uso isolada ou associado), diabetes insípido central ou nefrogênica, cálculo renal cálcico(profilaxia)¹².
 - ✓ Posologia (adulto): Diabetes, iniciar com 25,0 a 100,0 mg, 1 a 2 vezes/dia, em dias alternados, ou 1 vez/dia durante 3 a 5 dias alternados. Manter com 2,5 a 5,0 mg 1 vez/dia em dias alternados ou 1 vez/dia durante 3 a 5 dias da semana¹². Anti-hipertensivo, iniciar com 25,0 a 100,0 mg/dia, via oral, em dose única ou fracionar em 2 vezes, ajustando-se a posologia de acordo com a resposta.

- **Reações adversas:** Pode causar sintomas como perda de apetite, desconforto gástrico, náusea, vômito, prisão de ventre, tontura, dormência, dor de cabeça, anemia, queda de pressão ao levantar-se, alergia, boca seca, sede excessiva, diminuição da capacidade sexual, fraqueza e contração muscular^{12,13}.
- **Contra-indicações:** Aos pacientes com anúria, pacientes com insuficiência renal grave e aqueles que apresentam hipersensibilidade à hidroclorotiazida ou outros fármacos derivados da sulfonamida^{12,13}.

2.2 Betabloqueadores

Os bloqueadores beta-adrenérgicos ou betabloqueadores são uma classe de fármacos que têm em comum a capacidade de bloquear os receptores β (beta) da noradrenalina.

Em circulação desde o final dos anos 50, os betabloqueadores têm sido utilizados com sucesso especialmente na hipertensão arterial, cardiopatia isquêmica e arritmias cardíacas. Apesar do amplo uso permanecem sem entendimento pleno os mecanismos pelos quais esses fármacos reduzem os níveis pressóricos⁹.

O efeito hipotensor do betabloqueio competitivo parece envolver, além da redução do débito cardíaco, menor liberação de noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas pós-ganglionares, redução do fluxo simpático central e diminuição da secreção de renina⁹.

Os vários antagonistas beta-adrenérgicos diferem quanto à sua solubilidade em água e em lipídios. Os agentes lipofílicos são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal e metabolizados pelo fígado e apresentam grandes volumes de distribuição e boa penetração no sistema nervoso central. Os agentes hidrofílicos são absorvidos com menor rapidez, não são extensamente metabolizados e possuem meia vida plasmática relativamente longa; conseqüentemente podem ser administrados uma vez ao dia. A meia vida plasmática dos fármacos lipofílicos pode ser prolongada pela insuficiência hepática, enquanto a insuficiência renal pode

prolongar a ação do grupo hidrofílico. Assim a presença desses distúrbios pode influenciar na escolha do betabloqueador⁹.

2.2.1 Classificação dos betabloqueadores

- a)** Antagonistas beta-adrenérgicos não-seletivos: propranolol, nadolol, timolol.
- b)** Antagonistas beta-adrenérgicos não-seletivos com atividade agonista parcial: pindolol, carteolol, penbutolol.
- c)** Betabloqueadores não seletivos com atividade antagonista parcial não apresentam atividade estabilizadora de membrana.
- d)** Antagonista adrenérgicos beta seletivos com adrenérgica parcial: acebutolol.
- e)** Antagonista beta-adrenérgico não-seletivos com antagonismo alfa-adrenérgico ou outros mecanismos de ação anti-hipertensivos: corvedilol, labetalol⁹.
- f)** Antagonistas adrenérgicos beta seletivos: atenolol, metoprolol, bisoprolol, betaxolol.

Bloqueador beta seletivo, sem atividade agonista parcial ou ação estabilizadora da membrana. Hidrofílico é excretado na urina, em grande parte na sua forma inalterada.

Metoprolol:

- ✓ Mecanismo de ação: Age predominantemente nos receptores beta 1 e é relativamente cardiosseletivo. Como antiangina, reduz a demanda de oxigênio miocárdico devido aos efeitos cronotrópico e inotrópico negativos. Como antiarrítmico, reduz a velocidade de disparos espontâneos dos seios e dos marca passos ectópicos. Tem ação terapêutica também como anti-hipertensivo, na cardiomiopatia hipertrófica, no infarto do miocárdio, na cefaleia vascular e na enxaqueca. Possui absorção gastrintestinal de 95%,

lipossolubilidade moderada e ligação proteica baixa. O efeito máximo é atingido entre 1 e 2 horas com comprimido comum e em 6 a 12 horas em comprimido de ação prolongada; a excreção é renal, sendo 3 a 10% excretado na forma inalterada. Possui meia vida entre 3 a 7 horas¹².

- ✓ Indicação: Angina de peito crônica, arritmias cardíacas, hipertensão, cardiomiopatia hipertrófica, infarto do miocárdio, feocromocitoma, cefaleia vascular, enxaqueca, tremores, ansiedade, tirotoxicose, síndrome do prolapso da válvula mitral, acatisia neuroléptica¹².
- ✓ Posologia: Antiangina, via oral, 100,0 mg (succinato de metoprolol, comprimido de liberação prolongada) 1 vez/dia, aumentar gradualmente, em intervalos semanais até o máximo de 400 mg/dia, 100 mg (tartarato de metoprolol), em dose única fracionada, aumentar em intervalos semanais até o máximo de 450 mg/dia²¹.

Anti-hipertensivos, via oral, 50,0 a 100,0 mg (succinato de metoprolol), 1 vez/dia, aumentar a dose em intervalos semanais (ou mais) até o máximo 400,0 mg/dia, 100,0 mg (tartarato de metoprolol) em dose única ou fracionada, aumentar em intervalos semanais até no máximo 450,0 mg/dia¹².

Infarto do miocárdio, via intravenosa (injeção rápida) e 2,0 mg (tartarato de metoprolol), a cada 2 minutos, 3 vezes (3 doses), 15 minutos após a última dose intravenosa, seguir com dose oral(tartarato de metoprolol), 50,0 mg (para pacientes que toleram a dose total intravenosa) ou 25,0 a 50,0 mg (para pacientes que não toleram a dose intravenosa), cada 6 horas, durante 48 horas¹².

Cefalia vascular, enxaqueca, via oral, 200,0 mg (succinato de metoprolol) uma vez/dia ou 50,0 a 100,0 mg (tartarato) 2 a 4 vezes/dia ¹².

- ✓ Reações adversas: Mais frequentes, diminuição do desempenho sexual, sonolência (dose alta), dificuldade em dormir, cansaço, fraqueza. Ocasionais, distúrbio gastrointestinal, congestão nasal, constipação, ansiedade ou irritabilidade, tontura, broncoespasmo, insuficiência cardíaca congestiva, depressão mental, redução da circulação periférica. Raras, exantemas, arritmias, dor nas costas e articulações, confusão mental, alucinação, leucopenia, alteração de paladar, irritação ocular, pesadelos. Estudos em animais mostraram que o metoprolol diminui a sobrevivência neonatal. Riscos na gravidez¹².
- ✓ Contra indicações: Insuficiência cardíaca, choque cardiogênico, bloqueio cardíaco, bradicardia sinusal, hipotensão¹².

2.3 Propriedades físico-químicas da hidroclorotiazida e do tartarato de metoprolol

2.3.1 Hidroclorotiazida

Hidroclorotiazida é um pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, pouco solúvel em água e etanol, solúvel em acetona e em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos⁸. Possui faixa de fusão de 273-275°C⁴⁹ e valores de pKa de 9,0; 9,7 e 11,3^{14,68}.

Figura 1. Estrutura química da hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida contém no mínimo 98% e, no máximo 102% de C₇H₈ClN₃O₄S₂^{8,16}.

2.3.2 Tartarato de metoprolol

Pó cristalino, branco, ou cristais incolores, inodoro. Muito solúvel em água, facilmente solúvel em etanol, solúvel em clorofórmio e em diclorometano, pouco solúvel em acetona, insolúvel em éter etílico¹⁵.

Figura 2. Estrutura química do tartarato de metoprolol

Contém, no mínimo 99% e, no máximo 101% de $(C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6$, em relação à substância seca¹⁶. Possui faixa de fusão de 120-123°C⁴⁹ e valores de pKa de 9,67⁶⁸.

2.4 Metodologias analíticas

Na literatura estão disponíveis diversos métodos analíticos para a determinação da hidroclorotiazida em associação com eprosartan, alisquen, vasartan, entre outros, utilizando HPLC e CE. Técnicas hifenadas também foram utilizadas para a determinação e quantificação da hidrolorotizida (**Quadro 1**).

Para a determinação do metoprolol foram descritos na literatura métodos analíticos empregando a HPLC e técnicas hifenadas à HPLC (**Quadro 2**). Entretanto somente foi encontrado na literatura um único método utilizando técnicas hifenadas à HPLC para a determinação simultânea do metoprolol e da hidroclorotiazida em plasma. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase estacionária C18, fase móvel composta por metanol/ acetato de amônio/ácido fórmico, (50:50:0,05)(v/v/v) e vazão de 0,8 mL.min⁻¹.

Em estudo recente foi desenvolvido metodologia analítica utilizando a eletroforese capilar para a determinação simultânea do metoprolol e da hidroclorotiazida em formulas farmacêuticas⁶³.

Quadro 1. Métodos analíticos para a determinação da hidroclorotiazida empregando HPLC e CE

Método	Amostra	Fase estacionária ou capilar	Fase móvel ou eletrólito	Deteção	Ref.
HPLC isocrático	Formulação farmacêutica	Inertsil ODS 3V (25cmx4.6mm) 5um	Na ₂ HPO ₄ 0,1 M Acetonitrila (70/30) v/v	228 nm	41
HPLC Gradiente	Plasma	C4 (150x4.6mm) 5um	Acetonitrila/Fosfato (87 /27v/v)	225nm	44
HPLC isocrático	Formulação farmacêutica	C18 (150x4.6mm) 5um	Metanol/Tetraidrofurano/ Acetato (47:10:43 v/v/v)	271nm	43
CE	Formulação farmacêutica	capilar de cílica fundida 4.5 cm x 50um d.i	Tris 47mM/SDS 47mM (pH.10,2)	217 nm	30
HPLC gradiente	Formulação farmacêutica	C18 (100x2.1mm) 1.7um	Percolato de sódio 0.05M/ Acetonitrila (90:10 - 20:80 v/v)	271 nm 237 nm	45
HPLC isocrático	Formulação farmacêutica	C18 (50x4.6 mm) 1.8um	água/acetonitrila/trietilamina/ ácido ortofosforico (60:40:0,1:0,1)v/v	225 nm	23
LC-MS/MS isocrático	Plasma	Xterra RP18(150x4.6mm) 5um	formato de amônio 2mM (pH.3,3+-0.1 ác.formico)/acetonitrila 30:70v/v	225nm	46
HPLC gradiente	Formulação farmacêutica	Zorbax SPC8 (150x4.6mm) 5um	ácido fosforico 0,025M/ acetonitrila 30,70% v/v	225 nm 238 nm	47
HPLC gradiente	Plasma	Germine C18(250x4.6 mm) 5um	acetonitrila/formato de amônio 10mM 20:80, 70:30 (v/v pH.3,5)	254 nm	26
HPLC gradiente	Formulação farmacêutica	HSS C18 (150x2.1 mm) 1.7um	Na ₂ HPO ₄ 0,01 M/acetonitrila/metanol	274 nm	48

Quadro 2. Métodos analíticos para a determinação do metoprolol empregando HPLC, LC-MS e CE

Método	Amostra	Fase estacionária ou capilar	Fase móvel ou eletrólito	Deteção	Ref.
CE	Urina	capilar de sílica fundida 47 cm x 75µm d.i	10mM CM-β-CD/ 100mM fosfato 5% propanol	210 nm 280 nm	28
HPLC isocrático	Plasma	coluna quiromiotica (250 x 4.6 mm)	acetonitrila/metanol/ metileno glicol/ ác.acético glacial/trietilamina (56:30:14:2:2)	225nm 310nm	29
CE	Formulação farmacêutica	capilar de sílica fundida 45 cm x 50µm d.i	Tris -H ₃ PO ₄ 35,6 mM (pH.2,3)		31
LC-MS isocrático	Plasma	MP- C18(100X4.6mm) 5µm	Metanol/acetato de amônio/ ác.fórmico (50:50:0,05 v/v/v)		42
LC-MS/MS isocrático	Formulação farmacêutica	C18 (250x4.6mm) 5µm	formato de amônio/metanol/ acetonitrila 85:15:5 (pH.3)	225nm	33

2.5 Técnicas analíticas

2.5.1 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar é um método de separação baseado nas velocidades de migração diferenciais de espécies carregadas em um campo elétrico. Essa técnica de separação para as amostras de tamanho macro foi desenvolvida inicialmente por Arne Tiselius, um químico sueco, no ano de 1930, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo, que ganhou o Prêmio Nobel por esse trabalho³⁴.

O rápido avanço da eletroforese capilar é decorrente, da simplicidade instrumental, baixo custo de operação, facilidade de automação, alta eficiência de separação, baixo consumo de amostra, da diversidade dos compostos passíveis de análise em cada modo e principalmente da variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna. As análises por CE podem ser realizadas em grande intervalo de pH, podendo ser utilizada para caracterizar o comportamento de analitos fortemente ácidos ou básicos^{35,10}.

2.5.1.1 Instrumentação

A instrumentação é constituída de um fornecedor de alta voltagem, capilar de sílica fundida de diâmetro estreito (25–100 μm), eletrodos (geralmente de platina), e um detector apropriado. A aplicação de um potencial de 10–30 kV sobre o capilar provoca movimentos eletroforéticos, resultando em movimento das espécies iônicas da amostra ao longo do capilar e passando através do detector³⁶.

Os capilares são revestidos externamente por um polímero de poliamida, que confere alta flexibilidade ao capilar, tornando-o resistente a possíveis quedas. Estes capilares possuem normalmente de 20 a 100 cm de comprimento. O volume de injeção da amostra varia entre 1 e 20 nL³⁶. A **Figura 3** demonstra o esquema de um aparelho de eletroforese capilar.

Figura 3. Esquema de um equipamento de eletroforese capilar⁶⁹

A introdução da amostra no capilar pode ser realizada por injeção hidrodinâmica e eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é realizada por pressão, vácuo e por gravidade. Na injeção da amostra por pressão, a extremidade do capilar é submersa no reservatório que contém a solução da amostra, uma diferença de pressão é aplicada e a amostra é introduzida no capilar. A injeção por vácuo pode ser feita pela aplicação do vácuo no reservatório destino enquanto o extremo do capilar está mergulhado no reservatório da amostra. Na injeção por gravidade, o capilar mergulhado no reservatório da amostra é mecanicamente elevado acima do nível do reservatório que contém o eletrólito, permitindo a introdução da amostra no capilar^{36,50}.

Para efetuar-se a injeção eletrocinética, o capilar e o ânodo são mergulhados no reservatório que contém a amostra. A tensão aplicada provoca a migração dos íons da amostra dentro do capilar devido à mobilidade eletroforética. A quantidade da amostra injetada depende da mobilidade eletroforética dos solutos, do fluxo eletrosmótico (EOF), da tensão aplicada, do tamanho do capilar e da concentração do soluto^{36,50}.

A vantagem da injeção hidrodinâmica é que a quantidade do soluto injetada é constante, independente da sua própria mobilidade, ao contrário do que acontece quando se procede à injeção eletrocinética^{36,50}.

2.5.1.2 Fluxo eletrosmótico

O fluxo eletrosmótico (FEO) tem sua origem na atuação de um campo elétrico sobre as espécies carregadas na região difusa da dupla camada elétrica, formada devido à carga da parede interna do capilar. Para um capilar de sílica fundida em contato com uma solução com valor de pH acima de 3 os grupos silanol da superfície apresentam-se desprotonados e proporcionam carga negativa à parede. Para contrabalancear as cargas da parede, há na região próxima a esta, o excesso de cargas positivas, provenientes dos cátions da solução. A aplicação do campo elétrico ao longo do capilar causa a movimentação dos íons positivamente carregados, presentes na camada difusa, no sentido do cátodo³⁶, como mostra a **Figura 4**.

Figura 4. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico em CZE⁷⁰

A formação do FEO a partir das paredes do capilar origina um perfil radial planar que contrasta com o perfil radial parabólico observado nos sistemas de alta pressão, como a HPLC, o que contribui significativamente para a elevada eficiência dos picos obtidos³⁸.

2.5.1.3 Classificação da eletroforese capilar

A eletroforese capilar é classificada de acordo com o modo de separação empregado. Esses modos incluem a eletroforese capilar de zona (CZE), compreendendo a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), a cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC), a eletrocromatografia capilar (CEC) e a eletroforese capilar em gel (CGE). Outros modos também bastante utilizados são a focalização isoelétrica capilar (CIEF) e a isotacoforese capilar (CITP).

✓ Eletroforese capilar de zona (CZE)

A eletroforese capilar de zona ou eletroforese capilar de solução livre (FSCE), como é ainda comumente conhecida, é um dos modos de eletroforese mais usado na prática, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais³⁵.

Esta técnica de separação está baseada somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (analitos), em eletrólitos que podem ser aquoso ou orgânicos³⁹.

As moléculas são separadas de acordo com o tamanho e o número de agrupamento ionizáveis. Sendo a mobilidade eletrosmótica dependente somente das características do tampão, isto é constante dielétrica, viscosidade, pH e concentração (à qual influencia o potencial zeta), sendo independente da tensão aplicada³⁹.

✓ Cromatografia eletrocinética micelar (MECK)

É o caso especial de cromatografia eletrocinética, em que a fase dispersa no capilar é micelar³⁹.

A MECK foi introduzida em 1984, é um tipo de CE onde a solução contendo um tensoativo atua de maneira similar à fase estacionária de uma coluna reversa. Agentes tensoativos são introduzidos dentro do capilar em concentração acima da concentração micelar crítica, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. Os compostos hidrofóbicos permanecem mais tempo na micela carregada negativamente, e conseqüentemente, eluem por último. Os compostos hidrofílicos não são solubilizados na micela, sendo separado de acordo com a mobilidade eletroforética⁷.

✓ **Eletroforese capilar em gel (CGE)**

Caso especial de eletroforese capilar de peneiramento, no qual o capilar é preenchido com gel contendo ligação cruzada. A CGE está baseada nas diferenças dos tamanhos dos solutos que migram através de uma estrutura polimérica do capilar preenchido com gel. É utilizado na separação de compostos iônicos de alta massa molecular^{36,42}.

✓ **Focalização isoelétrica capilar (CIEF)**

Técnica eletroforética utilizada para a separação de analitos anfóteros de acordo com seu ponto isoelétrico (PI), através da aplicação de um campo elétrico ao longo de um gradiente de pH gerado no capilar. A movimentação das moléculas permite sua concentração em bandas de migração de acordo com seu PI específico. Compostos com diferentes PI como proteínas, peptídios, aminoácidos e fármacos, podem ser resolvidos por essa técnica⁷.

✓ **Isotacforese capilar (CITP)**

Técnica de separação eletroforética efetuada em um sistema descontínuo de eletrólitos, no qual os analitos migram de acordo com suas mobilidades eletroforéticas, formando uma cadeia de zonas adjacentes que se movem com igual

velocidade entre duas soluções, os eletrólitos líder e o terminador. As condições que devem ser satisfeitas para que os analitos migrem em zonas adjacentes são que as mobilidades dos íons do eletrólito líder e terminador sejam maior e menor respectivamente, que as mobilidades dos íons na amostra^{36,42}.

✓ **Cromatografia eletrocinética em microemulsão (MEEKC)**

Caso especial da cromatografia eletrocinética no qual uma microemulsão é empregada como fase dispersa. As microemulsões mais utilizadas como meios de separação são formadas por gotas de óleo dispersas num líquido imiscível, já que existe tensão superficial entre eles. Para reduzir a tensão superficial entre as duas camadas líquidas, as gotículas de óleo são revestidas com um tensoativo. Com o objetivo de promover a estabilidade da microemulsão utiliza-se o butanol, que reduz a tensão superficial para próximo de zero^{36,42}.

✓ **Eletrocromatografia capilar (CEC)**

É a cromatografia líquida capilar no qual a movimentação da fase móvel através de um capilar preenchido ou recoberto com a fase estacionária é promovido pelo fluxo eletrosmótico (que pode ser assistido por pressão). O tempo de retenção é determinado pela combinação da migração eletroforética e da retenção cromatográfica^{36,42}.

2.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciadas desses componentes³².

O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico russo ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou a separação dos componentes em faixas coloridas³³.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. A HPLC é um tipo de cromatografia que emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária muito finamente dividida, as colunas empregadas são recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase, móvel eluída sob alta pressão^{32,34}.

O tipo de HPLC é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária. Chama-se, cromatografia líquida com fase normal, quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, e cromatografia com fase reversa quando se tem o inverso, ou seja, a fase móvel é mais polar e a fase estacionária é mais apolar³².

Considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que dar-se por processos físicos, químicos ou mecânicos.

A HPLC é basicamente constituída de seis componentes, são eles, os reservatórios de solventes, um sistema de bombas, um injetor, a coluna cromatográfica, um detector e um computador que registra os dados. Algumas configurações são constituída de degaseificadores (**Figura 5**)³².

Figura 5. Representação de um equipamento de HPLC⁶⁴

A HPLC é uma técnica de separação bem estabelecida e é empregada nas diversas áreas, entre elas, química, forense, toxicológica, clínica e ambiental, para solucionar inúmeros problemas analíticos. Durante os últimos anos, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica, como desenvolvimentos de novas fases estacionárias e suportes cromatográficos⁵⁶.

A eficiência de uma coluna cromatográfica é usualmente medida pelo número de pratos (N), o que é determinado diretamente do cromatograma por meio da relação entre o tempo de retenção de um composto e a largura de sua base³².

$$N=(t_R/w_b)^2 \times 16$$

equação 2

Em que N é número de pratos da coluna, uma medida de eficiência; t_R é o tempo de retenção do analito empregado na medida e w_b , a largura na base desse mesmo analito.

Outro parâmetro que exerce bastante influencia na eficiência de uma coluna é o tamanho (diâmetro) e a distribuição das partículas da fase estacionária⁵⁵.

Desde o surgimento da teoria dos pratos para cromatografia, originalmente desenvolvida para cromatografia gasosa e depois adaptada para UHPLC, ficou óbvio que a diminuição do tamanho das partículas seria o caminho natural para o aumento do número de pratos. Em sua versão original, Van Deemter normatizou o cálculo da eficiência de uma coluna dividindo seu comprimento (L) pelo número de pratos (N) resultado denominado de altura equivalente a um prato (H), ou seja:

$$H=L/N$$

equação 3

Essa proposta permite então comparar colunas de diferentes comprimentos (L) e tamanhos de partículas (dp), uma vez que, independente dos detalhes, quanto menor o valor de H, maior será N e, portanto, a eficiência da coluna^{32,55}.

Na forma original, Van Deemter desenvolveu uma equação empírica em que associou o valor de H com vários parâmetros, agrupados na forma de constantes A, B, e C.

$$H=A+B/\mu+C\mu$$

equação 4

O termo A depende de dois fatores principais: do quadrado do tamanho médio das partículas (dp) e do fator de empacotamento da coluna (f). Assim H depende diretamente do tamanho das partículas. Dessa forma, e em consonância com a teoria, a maneira ideal de aumentar a eficiência da coluna seria a diminuição das partículas⁵⁵.

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) ou *ultra-high performance liquid chromatography* (UHPLC), desenvolveu-se a partir da introdução das partículas de FE porosas $\leq 2\mu\text{m}$, em resposta à busca contínua por análises mais rápidas e eficientes. A UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográfica que são de dimensões reduzidas (5–10 cm de comprimento e diâmetros internos de 1–2,1 mm), recheadas com partículas de FE $\leq 2\mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas

velocidades lineares de fase móvel (FM) aumenta a resolução e a detectabilidade, diminuem o tempo das análises, porém geram um aumento significativo na pressão cromatográfica. Em vista disso, um equipamento adequado, capaz de operar a altas pressões, acima de 1.000 bar, (~15.000 psi), é empregado para extrair um desempenho cromatográfico máximo dessa técnica⁵⁶.

2.5.3 Planejamento e otimização de experimento

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura⁵⁹. Em um sistema analítico, diversos fatores ou variáveis podem influenciar a resposta desejada. Dentre as técnicas utilizadas destaca-se a otimização multivariada, pois apresenta menor custo efetivo, além de permitir que mais de uma variável seja otimizada simultaneamente^{57,59}.

Diversos modelos de planejamentos experimentais estão disponíveis e podem ser aplicados para a otimização multivariada em diferentes casos. Se for detectar fatores afluentes, planejamento experimentais de primeira ordem, como os modelos de Plackett-Burman, podem ser usados. Por outro lado, para aproximar a função resposta ou para otimizar o processo, modelos de segunda ordem (superfície de resposta) devem ser usados^{57,59}.

Em um planejamento fatorial são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na resposta. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial de 2^k experimentos. Normalmente, os níveis dos fatores quantitativos (i.e. concentrações de uma substância, valor de pH, etc.) são nomeados pelo sinal – (menos) para os níveis mais baixos e + (mais) para os níveis mais altos, porém o que importa é a relação inicial entre o sinal dado e o efeito obtido, para fatores qualitativos (i.e. tipos de ácidos, tipos de catalizadores, etc), como não existe valores altos ou baixos, fica a critério do experimentalista nomear os seus níveis⁵⁷.

Para contornar o inconveniente da realização de repetições autênticas e obter uma boa estimativa dos erros, um experimento é normalmente incluído no centro do planejamento (**Figura 6**), em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado. São os conhecidos experimentos do ponto central (nível zero). Deste modo, é possível avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes, tanto em planejamentos de triagem (completo ou fracionado) como em metodologia de superfície de resposta. Além destas vantagens, recomenda-se este tipo de experimento para que o risco de perder a relação não linear entre os intervalos possa ser minimizado e a possibilidade de estimar um modelo razoável e verificar se há falta de ajuste.

Figura 6. Planejamento 2^2 com ponto central ⁵⁷

A metodologia de superfície de resposta baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização. Neste sentido otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores^{57,61}.

Um planejamento experimental construído para estimar coeficiente, segundo alguns modelos aproximados, devem reunir certos critérios desejáveis, sendo os principais; proporcionar boas estimativas para todos os coeficientes, exigindo poucos experimentos e fornecer condições de avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste⁵⁷.

Na otimização do método proposto será utilizado o Planejamento Composto Central “*Central Composite Design - CCD*”, que juntamente com o Doehlert, são as classes de planejamento mais utilizadas para ajustar modelos quadráticos⁵⁶.

Em 1951, Box e Wilson, apresentaram os planejamentos compostos centrais (CCD) como uma evolução dos planejamentos 3^3 , que necessitavam de muitos experimentos para um pequeno número de fatores, mesmo para planejamentos fracionários⁵⁷. Outras vantagens, além do pouco número de ensaios, foram obtidos devido à presença das seguintes partes no planejamento:

1. Um planejamento fatorial completo de dois níveis, podendo ser usado ainda, um planejamento fatorial fracionário de dois níveis;
2. Experimentos nos pontos axiais em $x_i = 0$ para todo i e;
3. Experimentos nos pontos axiais em que $x_i = \pm \alpha$ com $x_j \neq x_i$, e $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm \alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento.

A **Figura 7** ilustra os pontos experimentais no sistema de coordenadas definidas pelo eixo x_i .

Figura 7. Planejamento Composto Central: a) $k=2$ e $\alpha=1,414$; b) $k=3$ e $\alpha=1,682$. (●) planejamento fatorial (■) ponto axial e (○) ponto central^{57,61}

Para a construção de um planejamento CCD é necessário definir o número de variáveis a serem estudadas (k), no qual planejamento fatorial será empregado completo 2^k ou fracionado 2^{k-b} e quantos experimentos serão realizados no ponto central $(2k)^{59}$.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação simultânea de fármacos que atuam no controle da hipertensão arterial.

3.2 Objetivos específicos

O presente estudo tem os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver métodos analíticos simples, rápidos e confiáveis para separação simultânea e quantificação do tartarato de metoprolol e hidroclorotiazida em comprimidos por cromatografia líquida de ultra eficiência e eletroforese capilar.
- Validar as metodologias analíticas desenvolvidas segundo critérios da ANVISA e da Farmacopeia dos Estados Unidos da América com respeito à especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.
- Comparar estatisticamente as metodologias analíticas utilizadas com respeito à exatidão e precisão (testes t e F , respectivamente).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e solventes

Quadro 3. Reagentes que foram utilizados no trabalho

Descrição	Finalidade
Água (purificada através do Milli-Q®)	Preparo de soluções, preparo de eletrólito, fase móvel e lavagem de coluna
Metanol – MeOH (J.T.Baker®)	Preparo de soluções estoque
Acetonitrila – ACN (J.T.Baker®)	Lavagem de coluna, fase móvel (UHPLC)
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂ 3%) (Merck®)	Teste de estresse
Hidróxido de sódio (NaOH) 1 M (Merck®)	Teste de estresse e lavagem do capilar
Ácido clorídrico (HCl) 1 M (Merck®)	Teste de estresse
Ácido fosfórico (H ₃ PO ₄) 1M (Merck®)	Acidificar a fase móvel (UHPLC)
Tetraborato de sódio (TBS) (Sigma-Aldrich®)	Preparo de eletrólito
Trietilamina (TEA)	Modificador em fase móvel (UHPLC)

4.1.2 Substâncias empregadas como padrão

Os fármacos empregados como substâncias químicas de referência, hidroclorotiazida (98% ± 2) foi gentilmente cedido pela Fundação para o Remédio Popular (FURP), e o tartarato de metoprolol (98% ± 2) adquirido da Sigma-Aldrich®). O padrão interno utilizado foi a Sulfametoxazona.

4.1.3 Amostra

Comprimido revestido contendo 12,5 mg de hidroclorotiazida e 100,0 mg de tartarato de metoprolol, fabricante Astra Zeneca, Lote:32523

4.2 Equipamentos

- Aparelho MilliQ®-Plus, Millipore.
- Balança analítica, Mettler Toledo®.
- Agitador magnético com aquecimento FISATON.
- Medidor de pH DIGIMED® modelo TE-901.
- Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu.
- Célula DSC-50 Shimadzu®.
- Termobalança TG/DTG série 60 Shimadzu ®.
- Equipamento de eletroforese capilar Beckman and Coulter P/ACE MDQ equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos, que permite a obtenção de espectro UV-VIS em tempo real de cada pico, controlador de temperatura e *software* Karat® V.8.0 para aquisição e tratamento de dados.
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência, UHPLC Agilent 1200, composto por injetor automático, bomba quaternária, degaseificador e detector de arranjo de diodos (DAD).
- Unidade filtrante FG Millex em polietileno c/membrana PTFE 0,22 e 0,45 µm de poro (MILLIPORE).
- Coluna capilar de sílica fundida de 30,2 cm de comprimento total e 50 µm de diâmetro interno.
- Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8).
- Aparelho de determinação de ponto de fusão Stuart Scientific SMP1.

4.3 Métodos

4.3.1 Métodos de identificação

4.3.1.1 Espectrofotometria no ultravioleta/visível

Foram pesados exatamente cerca de 40,0 mg de tartarato de metoprolol, e transferidos para balão volumétrico de 100,0 mL, logo depois dissolveu-se com 30,0 mL de uma mistura de metanol e água 50/50 (v/v), e completou-se o volume com o mesmo solvente. Obteve-se concentração final de 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A leitura da solução no espectrofotômetro foi realizada na faixa de 200 a 350 nm.

O mesmo procedimento foi realizado para o preparo da solução de hidroclorotiazida.

4.3.1.2 Ponto de fusão

O tartarato de metoprolol (matéria prima) foi introduzido em capilar de vidro e submetido à determinação do ponto de fusão. A amostra de tartarato de metoprolol foi colocada em um tubo capilar de vidro com uma das extremidades seladas até cerca de 3,0 mm de altura em aparelho convencional de ponto de fusão. Começou-se a aquecer a uma razão de 5°C /min; quando a temperatura chegou a 10°C abaixo do início de fusão teórico da amostra, reduziu-se a velocidade de aquecimento a cerca de 1°C /min. O ensaio foi realizado em triplicata.

O mesmo procedimento foi realizado para a determinação do ponto de fusão da hidroclorotiazida.

4.3.1.3 Caracterização do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida (matéria prima) empregando técnica termoanalítica

4.3.1.3.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida (matéria prima) por DSC foi realizada obedecendo-se as seguintes condições experimentais: massa em torno de 2,0 mg, atmosfera dinâmica de nitrogênio (vazão 50,0 mL min⁻¹) razão de aquecimento de 10°C min⁻¹.

4.3.1.3.2 Termogravimetria/Termogravimetria derivada (TG/DTG)

As curvas TG/DTG do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida foram obtidas entre 25 e 600°C, utilizou-se cadinho de platina, massa em torno de 5,4 mg e 2,0 mg, atmosfera de nitrogênio (100,0 mL.min⁻¹) e razão de aquecimento de 10°C min⁻¹.

4.3.2. Separação e determinação simultânea do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida utilizando eletroforese capilar de zona (CZE)

4.3.2.1 Preparo das soluções estoque

- Solução tampão tetraborato de sódio 100 mmol L⁻¹: foram pesados 1,9068 g de tetraborato de sódio, transferido para balão volumétrico de 50,0 mL. O volume foi completado com água Milli-Q e logo submetido a banho de ultrassom por 40 min para ajudar a dissolução.
- Solução de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹: foram pesados 2,0 g de hidróxido de sódio, transferidos para balão volumétrico de 50,0 mL e dissolvidos com água Milli-Q. Logo depois submetido a banho de ultrassom por 20 min para ajudar a dissolução.
- O eletrólito de corrida foi preparado em um balão volumétrico de 10,0 mL. Foram transferidos 2,5 mL de solução de tetraborato de sódio 100,0 mmol L⁻¹ e 0,4 mL de metanol em seguida completou-se o volume com água Milli-Q. Sonicou-se a solução por 10 min, obtendo pH final igual a 9,3.
- Solução padrão estoque de tartarato de metoprolol: foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de tartarato de metoprolol e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionou-se 5,0 mL de metanol e agitou-se até total dissolução em seguida completou-se o volume com água Milli-Q e a solução foi submetida a banho de ultrassom por 5 min. Obteve-se concentração final igual a 1.000 µg mL⁻¹.

- No preparo da hidroclorotiazida foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionou-se 5,0 mL de metanol e agitou-se até total dissolução em seguida completou-se o volume com água Milli-Q. Sonicou-se a solução por 5 min, obtendo-se concentração igual a 1.000 µg mL⁻¹.
- No preparo do padrão interno sulfametazona foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg e transferidos para balão volumétrico de 10,0 mL, adicionou-se 5,0 ml de metanol e agitou-se até total dissolução em seguida completou-se o volume com o mesmo solvente. Sonicou-se a solução por 5 min, obtendo-se concentração igual a 1.000 µg mL⁻¹.

4.3.2.1.2 Otimização do método por desenho experimental

Com o objetivo de definir melhores condições de análise e determinação simultânea dos analitos em estudo, e otimização do método, utilizou-se metodologia de superfície de resposta (RSM)

A superfície de resposta pode ser representada pelo modelo matemático a seguir:

$$Y = b_0 + b_1X + b_2Z + b_{11}X^2 + b_{22}Z^2 + b_{12}XZ \quad \text{equação 5}$$

Na equação, a resposta (Y) ou variável dependente foi a resolução e o tempo de migração, os valores b são as estimativas dos coeficientes do polinômio, os valores X e Z representam os valores codificados dos fatores (concentração, pH e voltagem). Os termos lineares b_1X e b_2Z , são responsáveis pelos efeitos principais, os termos quadráticos, $b_{11}X^2$ e $b_{22}Z^2$, são responsáveis pelos efeitos da curvatura e pelo produto bifatorial dos termos, e $b_{12}XZ$, é responsável pelos efeitos das interações.

Um delineamento estatístico de composição central (DCC), com pontos axiais foi escolhido para investigar a linearidade ou não dos efeitos dos fatores, pH,

concentração do eletrólito e voltagem (**Tabela 1**) na resolução e no tempo de análise do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.

Um DCC com k-fatores em três níveis requer $2^k + 2k + C$ experimentos, onde 2^k pontos estão nos cantos do quadrado, representando a amplitude (o domínio) do experimento. Os pontos axiais $2k$ estão numa distância codificada de $\pm 0,00 (\pm\alpha)$ do centro do delineamento medem a possibilidade da não linearidade nos valores obtidos de resolução e tempo de migração em função dos fatores. Os pontos C em replicata no centro do quadrado (ponto central) são uma estimativa do erro experimental.

Tabela 1. Planejamento de superfície de resposta para estudar o efeito da concentração do eletrólito, pH e voltagem na resolução e no tempo de migração do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida: valores nas unidades originais e valores codificados

Ensaio	[JTB	pH	Voltagem (Kv)	x1	x2	x3
1	20	8,8	12	-1	-1	-1
2	30	8,8	12	1	-1	-1
3	20	9,8	12	-1	1	-1
4	30	9,8	12	1	1	-1
5	20	8,8	18	-1	-1	1
6	30	8,8	18	1	-1	1
7	20	9,8	18	-1	1	1
8	30	9,8	18	1	1	1
9	16	9,3	15	0	0	0
10	33	9,3	15	- α	0	0
11	25	8,5	15	α	0	0
12	25	10	15	0	- α	0
13	25	9,3	10	0	α	0
14	25	9,3	20	0	0	- α
15	25	9,3	15	0	0	+ α

Nas análises dos fármacos, foi utilizado capilar de sílica fundida 30,2 cm x 50 µm d.i., temperatura de 25°C, comprimento de onda de 225 nm, a análise estatística foi conduzida utilizando Minitab 15.

4.3.2.3 Validação do método por eletroforese capilar de zona (CZE)

A validação foi realizada segundo os parâmetros propostos pela ANVISA⁵¹ Farmacopéia Americana⁸ e *International Conference on Harmonization* (ICH)⁴⁰.

4.3.2.3.1 Especificidade ou seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz⁵¹.

Para determinar a especificidade do método foram realizados testes de estresse, sendo este definido como um teste de estabilidade para fármacos e medicamentos sob condições extremas. Um dos principais objetivos a serem atingidos por meio desse teste é demonstrar a especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade²².

No **Quadro 4** são demonstradas as condições utilizadas no teste de estresse.

Quadro 4. Condições empregadas no teste de estresse

Condições de estresse		Exposição	duração (horas)
Hidrólise ácida	HCl 1 mol L ⁻¹	80°C	2 e 24
Hidrólise básica	NaOH 1 mol L ⁻¹	80°C	2 e 24
Hidrólise neutra	H ₂ O	80°C	2 e 24
Oxidação	H ₂ O ₂ 3%	80°C	2 e 24
Fotólise	60		

Preparou-se uma solução estoque dos padrões de tartarato de metoprolol em associação com a hidroclorotiazida em balão volumétrico de 25,0 mL, foram pesadas 100,0 mg de tartarato de metoprolol, 12,5 mg de hidroclorotiazida e adicionado 10,0 mL de metanol, após agitação e observação da total dissolução dos padrões, completou-se o volume, obtendo concentração final de $4.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metoprolol e $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, a solução foi mantida em ultrassom por 5 min.

4.3.2.3.1.1 Hidrólise oxidativa

Transferiu-se alíquotas de 2,5 mL da solução padrão de tartarato de metoprolol em associação com hidroclorotiazida cujo preparo foi mencionado anteriormente, para dois balões volumétricos de 5,0 mL, em seguida completou-se o volume dos balões com 2,5 mL de H_2O_2 3%, um dos balões foi mantidos em banho maria por 2 horas e o outro por 24 horas, após resfriamento à temperatura ambiente, transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL para dois balões volumétricos de 10,0 mL, adicionou-se 0,400 mL do padrão interno sulfametoxazona e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de metoprolol, $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida e $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfametoxazona, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.2.3.1.2 Hidrólise neutra

Transferiu-se alíquotas de 2,5 mL da solução padrão de tartarato de metoprolol em associação com hidroclorotiazida cujo preparo foi mencionado anteriormente, para dois balões volumétricos de 5,0 mL, em seguida completou-se o volume dos balões com 2,5 mL de H_2O , um dos balões foi mantidos em banho maria por 2 horas e o outro por 24 horas, após resfriamento à temperatura ambiente, transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL para dois balões volumétricos de 10,0 mL, adicionou-se 0,400 mL do padrão interno sulfa e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol, $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida e $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.2.3.1.3 Hidrólise ácida

Transferiu-se alíquotas de 2,5 mL da solução padrão de tartarato de metoprolol em associação com hidroclorotiazida cujo preparo foi mencionado anteriormente, para dois balões volumétricos de 5,0 mL, em seguida completou-se o volume dos balões com 2,5 mL de HCl 1 mol. L⁻¹, um dos balões foi mantidos em banho maria por 2 horas e o outro por 24 horas, após resfriamento à temperatura ambiente e neutralização das soluções, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para dois balões volumétricos de 10,0 mL, adicionou-se 0,400 mL do padrão interno sulfa completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de 100,0 µg mL⁻¹ de tartarato de metoprolol, 12,5 µg mL⁻¹ de hidroclorotiazida e 40,0 µg mL⁻¹, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.2.3.1.4 Hidrólise alcalina

Transferiu-se alíquotas de 2,5 mL da solução padrão de tartarato de metoprolol em associação com hidroclorotiazida cujo preparo foi mencionado anteriormente, para dois balões volumétricos de 5,0 mL, em seguida completou-se o volume dos balões com 2,5 mL de NaOH 1mol.L⁻¹, um dos balões foi mantidos em banho maria por 2 horas e o outro por 24 horas, após resfriamento à temperatura ambiente e neutralização das soluções, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para dois balões volumétricos de 10,0 mL, adicionou-se 0,400 mL do padrão interno sulfa e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de 100,0 µg mL⁻¹ de tartarato de metoprolol, 12,5 µg mL⁻¹ de hidroclorotiazida e 40,0 µg mL⁻¹, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.2.3.1.5 Fotólise

Foram pesados 100,0 mg de tartarato de metoprolol e 12,5 mg de hidroclorotiazida em dois vidros de relógio. Os vidros de relógio foram expostos à condição ICH, opção 2, por 60 horas³⁷, sob temperatura de 25± 0,5°C. Manteve-se o controle protegido da luz com papel alumínio durante o mesmo período. Após a exposição preparou-se uma solução obtendo concentração final de 1.000 µg mL⁻¹ de tartarato de metoprolol e 125,0 µg mL⁻¹ de hidroclorotiazida, transferiu-se uma

alíquota de 1 mL para um balão volumétrico de 10,0 mL, adicionou-se 0,400 mL do padrão interno sulfa e completou-se o volume com água Milli-Q[®], obtendo concentração final de 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol, 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, submeteu-se a solução ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.2.3.2 Linearidade

De acordo com a Resolução da nº 899 da ANVISA⁵¹, linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico.

No cálculo de linearidade foram tomadas alíquotas no intervalo de concentração de 80,0 a 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão estoque de tartarato metoprolol e transferidos para cinco balões volumétricos de 1,0 mL em seguida completou-se o volume com água Milli-Q[®].

Para o hidroclorotiazida foram tomadas alíquotas da solução padrão estoque alíquotas no intervalo de concentração de 10,0 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e transferidos para balões volumétricos de 1,0 mL, em seguida completou-se o volume com água Milli-Q[®].

As curvas analíticas foram construídas a partir dos resultados das áreas dos picos obtidos dessas injeções vs concentrações.

4.3.2.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode

ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas⁶⁷.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através do desvio padrão (DP) e inclinação (I) da curva de calibração³⁹.

Foram efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para a LD e LQ foi realizado pelas equações a seguir:

$$LD = (\text{Desvio Padrão}/\text{Inclinação da Curva}) \times 3,3$$

$$LQ = (\text{Desvio Padrão}/\text{inclinação da Curva}) \times 10$$

4.3.2.3.4 Repetibilidade (intra-dia)

A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo obtidos pelo mesmo analista e utilizando a mesma instrumentação³⁹.

Para este estudo foram preparados soluções padrão de tartarato de metoprolol ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e hidroclorotiazida ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e feito a adição de $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do padrão interno, a solução foi mantida em banho de ultrassom por 2 minutos, em seguida realizou-se a injeção 10 vezes no aparelho de eletroforese capilar.

4.3.2.3.5 Precisão intermediária (inter-dia)

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes³⁹.

Para a determinação da precisão intermediária foram preparadas três amostras do comprimido (20% acima e abaixo da concentração nominal), para isso foram pesados 276,0; 345,0 e 414,0 mg do fármaco para balão volumétrico de 100,0 mL;

adicionou-se 50,0 mL de metanol, as amostras foram agitadas manualmente por alguns minutos e em seguida completou-se o volume com água e sonicou-se os balões por 10 min. Obteve-se concentração final de 800,0; 1.000 e 1.200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol e 100,0; 125,0 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. De cada balão de 100,0 mL com concentrações mencionadas, foram retiradas alíquotas de 1,0 mL logo transferidos para balões volumétricos de 10,0 mL cada, adicionou-se 0,4 mL do padrão interno sulfa. Em seguida completou-se o volume com água Milli-Q®.

Foram obtidas concentrações finais de 80,0 100,0 e 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol e 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. Os testes foram realizadas em triplicata durante 3 dias consecutivos.

A precisão foi expressa em termos de porcentagem de desvio padrão relativo (%DPR).

4.3.2.3.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão de um método deve ser realizada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada à partir de, no mínimo, 9 determinações completando o intervalo linear do procedimento ou seja em concentrações baixa, média e alta, com 3 replicatas de cada³⁹.

Foram transferidas alíquotas de 0,8; 1,0 e 1,2 mL de solução padrão do tartarato de metoprolol, 100,0; 125,0 e 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão da hidroclorotiazida e 400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução do padrão interno sulfa para três balões volumétricos de 10,0 mL. Também foram adicionadas alíquotas de 1 ml de cada solução da amostra comercial 80,0; 100,0 e 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (a preparação foi mencionada anteriormente na precisão intermediária). O volume foi completo com água Milli-Q®, para obter concentração final de 80,0; 100,0 e 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol, 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotizaida e 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de

sulfametazona (**Tabela 2**). As soluções foram filtradas e injetadas no equipamento de eletroforese capilar. Os testes de exatidão foram realizados em triplicata.

Tabela 2. Procedimento experimental para o teste de recuperação do método específico por CZE

Solução p. meto ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução p. hidro ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução da amostra comercial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Sulfa (p.i) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração final			Volume final
1.000	1.000	800	1.000	1.200	1.000	Metó	hidro	sulfa	(mL)
Alíquota (mL)						$\mu\text{g.mL}^{-1}$			
0,8	0,1	1			0,4	80	10	40	10
1,0	0,125		1		0,4	100	12,5	40	10
1,2	0,15			1	0,4	120	15	40	10

4.3.3 Separação e determinação simultânea do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida utilizando cromatografia em fase líquida de ultra eficiência

Conforme mencionado anteriormente o tartarato de metoprolol apresenta pka 9,67 e a hidroclorotiazida apresenta pka 9; 9,7 e 11,3, nas **Figuras 8 e 9** é possível verificar a protonação e a deprotonação das estruturas do metoprolol e da hidroclorotiazida. Em valores altos de pH, a hidroclorotiazida se apresenta em diferentes espécies protonadas.

Com a finalidade de padronizar uma metodologia eficiente para a análise da formulação de tartarato de metoprolol associado a hidroclorotiazida, foi utilizado metodologia de Superfície e Resposta.

4.3.3.1 Otimização do método por desenho experimental

Um delineamento estatístico de composição central (DCC), com pontos axiais foi escolhido para investigar a linearidade ou não dos efeitos dos fatores, pH, concentração do solvente orgânico (**Tabela 3**) na resolução e na área tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.

Tabela 3. Planejamento de superfície de resposta para estudar o efeito do pH e da concentração do solvente orgânico, na resolução e na área do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida: valores nas unidades originais e valores codificados

Ensaio	pH	[]ACN	x1	x2
1	2,3	17	-1	-1
2	2,5	22	1	-1
3	2,5	12	-1	1
4	3	24	1	1
5	3	10	0	0
6	3	17	- α	0
7	3,5	12	α	0
8	3,5	24	0	- α
9	3,7	17	0	α

4.3.3.2 Validação do método por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

4.3.3.2.1 Especificidade

A especificidade do método foi determinada realizando testes de estresse, as condições utilizadas são demonstradas na **Tabela 5**.

4.3.3.2.1.1 Hidrólise oxidativa

Após o estresse em meio oxidativo, mencionados no item **4.3.2.3.1.1**, e resfriamento das soluções, transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL das soluções para dois balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de 100,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metoprolol e 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.3.2.1.2 Hidrólise neutra

Após o estresse em meio neutro, mencionados no item **4.3.2.3.1.2**, e resfriamento das soluções, transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL das soluções para

dois balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de metoprolol e $12,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.3.2.1.3 Hidrolise ácida

Após o estresse em meio ácido, mencionados no item **4.3.2.3.1.3**, resfriamento e neutralização das soluções, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para dois balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de $100,0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol e $12,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.3.2.1.4 Hidrólise alcalina

Após o estresse em meio alcalino, mencionados no item **4.3.2.3.1.4**, resfriamento e neutralização das soluções, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para dois balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de $100,0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol e $12,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.3.2.1.5 Fotólise

Após o estresse por fotólise, mencionados no item **4.3.2.3.1.5**, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para dois balões volumétricos de 10,0 mL, adicionou-se 0,400 mL de sulfa e completou-se o volume com água Milli-Q®, obtendo concentração final de $100,0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol e $12,5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, submeteu-se as soluções ao banho de ultrassom por 3 min.

4.3.3.2.2 Linearidade

No cálculo de linearidade foram tomadas alíquotas no intervalo de concentração de 80,0 a $120,0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão estoque de tartarato

metoprolol e transferidos para cinco balões volumétricos de 1,0 mL em seguida completou-se o volume com água Milli-Q®.

Para o hidroclorotiazida foram tomadas alíquotas da solução padrão estoque alíquotas no intervalo de concentração de 10,0 a 15,0 µg mL⁻¹ e transferidos para balões volumétricos de 1,0 mL, em seguida completou-se o volume com água Milli-Q®.

As curvas analíticas foram construídas a partir dos resultados das áreas dos picos obtidos dessas injeções x concentrações.

4.3.3.2.3 Limite de Detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados através do desvio padrão (DP) e inclinação (I) da curva de calibração ³⁹.

Fora, efetuadas três leituras para cada concentração e calculado o desvio padrão dos resultados obtidos na linearidade.

O cálculo para a LD e LQ foi realizado pelas equações a seguir:

$$LD = (\text{Desvio Padrão}/\text{Inclinação da Curva}) \times 3,3$$

$$LQ = (\text{Desvio Padrão}/\text{inclinação da Curva}) \times 10$$

4.3.3.2.4 Repetibilidade (intra-dia)

Para a determinação da repetibilidade, foram preparadas soluções padrão de tartarato de metoprolol (100,0 µg mL⁻¹) e hidroclorotiazida (12,5 µg mL⁻¹) , a solução foi mantida em banho de ultrassom por 2 minutos, em seguida realizou-se a injeção 10 vezes no aparelho de UHPLC.

4.3.3.2.5 Precisão intermediária (inter-dia)

Após o preparo de amostra mencionados no item **4.3.2.3.5**. Foram obtidas concentrações finais de 80,0 100,0 e 120,0 µg mL⁻¹ de tartarato de metoprolol e

10,0, 12,5 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. Os testes foram realizadas em triplicata durante 3 dias consecutivos.

A precisão foi expressa em termos de porcentagem de desvio padrão relativo (%DPR).

4.3.3.2.6 Exatidão

Foram transferidas alíquotas de 0,8; 1,0 e 1,2 mL de solução padrão do tartarato de metoprolol, 100,0; 125,0 e 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da solução padrão da hidroclorotiazida para três balões volumétricos de 10,0 mL. Também, foram adicionadas alíquotas de 1,0 mL de cada solução da amostra comercial 80,0; 100,0 e 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (a preparação foi mencionada anteriormente na precisão intermediária). O volume foi completo com água Milli-Q®, para obter concentração final de 80,0; 100,0 e 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol, 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida (**Tabela 4**). As soluções foram filtradas e injetadas no equipamento de UHPLC. Os testes de exatidão foram realizados em triplicata.

Tabela 4 Procedimento experimental para o teste de recuperação do método específico por UHPLC

Solução p. meto ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução p. hidro ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Solução da amostra comercial ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			Concentração final		Volume final
1.000	1.000	800	1.000	1.200	Meto	hidro	
Alíquota (mL)					$\mu\text{g.mL}^{-1}$		mL
0,8	0,1	1			80	10	10
1,0	0,125		1		100	12,5	10
1,2	0,15			1	120	15	10

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Identificação da hidroclorotiazida e do metoprolol

5.1.1 Ponto de fusão

O valor encontrado na determinação do ponto de fusão da hidroclorotiazida indicou transição para o estado líquido à temperatura de 275°C e para o metoprolol o valor encontrado foi de 122°C. Esses valores estão de acordo com faixa descrita nos documentos oficiais⁴⁹.

5.1.2 Espectrofotometria ultravioleta visível

O espectro de absorção da hidroclorotiazida (400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no UV, mostra dois picos de absorbância em 225 e 275 nm, como apresentado na **Figura 8**.

Figura 8. Espectro de absorção da hidroclorotiazida no UV-Visível (400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

O espectro de absorção do tartarato de metoprolol (400,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) no UV, mostra dois picos de absorbância em 225 e 275, como apresentado na **Figura 9**.

Figura 9. Espectro de absorção do tartarato de metoprolol no UV-Visível ($400,0 \mu\text{g mL}^{-1}$)

5.1.3 Análise térmica por DSC, TG e DTG da hidroclorotiazida e do tartarato de metoprolol

A **Figura 10** mostra os picos correspondente ao ponto de fusão da hidroclorotiazida, igual a 270°C e a sua decomposição começou em 306°C ⁵². As curvas de TG e DTG da hidroclorotiazida mostram o começo da decomposição térmica em 310°C . As perdas de massa e temperatura características da hidroclorotiazida estão descritas nas **Tabelas 5 e 6**.

Figura 10. Curva DSC, TG e DTG da hidroclorotiazida obtida a $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio $50,0 \text{ mL.min}^{-1}$.

A curva DSC (**Figura 11**) mostra um pico endotérmico a 125 °C do tartarato de metoprolol correspondente ao pico de fusão⁵³. A TG mostra que o tartarato de metoprolol é termoe estável até aproximadamente 180°C e a degradação térmica ocorrendo em 190°C. As perdas de massa e temperatura características do tartarato de metoprolol estão descritas nas **Tabela 5** e **6**.

Figura 11. Curva DSC, TG e DTG do tartarato de metoprolol obtida a 10°C min⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50,0 mL.min⁻¹

Tabela 5. Dados de temperatura onset (Tonset), temperatura de pico (Tpico) e entalpia de fusão da hidroclorotiazida e do metoprolol, obtidos pela curva de DSC com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹

Amostra	T onset	T pico	ΔH fusão
	°C	°C	J.g ⁻¹
Hidroclorotiazida	266,72	270,0	-119,86
Metoprolol	121,19	125,0	-97,60

Tabela 6. Dados da temperatura de decomposição e variação de massa (Δm) da hidroclorotiazida e do metoprolol, obtidos pelas curvas de TG/DTG com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Amostra	T decomposição °C	Δm %	Produto final %
Hidroclorotiazida	310	60	40
Metoprolol	190	90	10

5.2 Método analítico

5.2.1 Desenvolvimento do método analítico por eletroforese capilar de zona

Os testes preliminares para a separação simultânea da hidroclorotiazida e do tartarato de metoprolol, foram realizados utilizando o modo mais simples de eletroforese capilar, a eletroforese capilar de zona (CZE), sendo está amplamente utilizada para a quantificação de fármacos, e indicada para a separação de compostos com carga⁵⁰. Nesta etapa foram considerados parâmetros que influenciam a separação eletroforética, os principais aqui considerados são: determinação do comprimento de onda mais adequado, tensão aplicada, pH e concentração do sal que compõe o eletrólito.

Teoricamente para a melhor resolução, o pH deve ser próximo ao pKa dos solutos em questão, pois as diferenças de ionização são máximas levando a migração diferenciadas⁵⁰.

O tartarato de metoprolol apresenta em sua estrutura grupos amina, conferindo ao analito um caráter básico e pKa igual a 9,7. A **Figura 12** mostra a protonação e a deprotonação do hidrogênio na estrutura química do tartarato de metoprolol em valores de pH abaixo de 10 e acima de 13.

Figura 12. Estrutura química e ionização do tartarato de metoprolol⁶⁸

A hidroclorotiazida também apresenta em sua estrutura grupos amina, porém a presença de grupos sulfonados confere um caráter ácido a estrutura (pK_a 9; 9,8 e 11,3). A **Figura 13** mostra que ocorre a deprotonação do hidrogênio na estrutura da hidroclorotiazida em valores de pH maiores que 9.

Figura 13. Estrutura química e ionização da hidroclorotiazida^{43,68}

Assim, optou-se por desenvolver um método para a determinação simultânea do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida trabalhando com pH acima de 8 e abaixo de 10, pois nesta faixa de pH as substâncias apresentam-se ionizadas.

Para a determinação do comprimento de onda adequado foi necessário à obtenção dos espectros de absorção no UV-Vis.

Na escolha do capilar, foi considerado o diâmetro interno do mesmo, pois quanto maior, mais calor será gerado e maior será a diferença de temperatura entre os centros e as paredes do capilar, e quanto maior o comprimento, maior será o tempo de análise³⁶. Como um dos propósitos do método é a praticidade, optou-se por usar um capilar de diâmetro interno igual a 50,0 μm e comprimento total de 30,2 cm.

O tartarato de metoprolol e a hidroclorotiazida foram determinados e quantificados simultaneamente por eletroforese capilar de zona, utilizando tampão fosfato em pH 9,3 e 25 kV⁶³. No desenvolvimento do método aqui descrito, optou-se

por trabalhar com o tampão tetraborato, por ser comumente utilizado em eletroforese capilar, apresentar pKa igual a 9.2, sabendo-se que, os tampão são eficientes em um intervalo de pH correspondente ao pKa, mais ou menos uma unidade, apresentar baixa mobilidade, podendo ser usado em altas concentrações, sem a desvantagem de gerar calor excessivo³⁵.

Quanto à temperatura observou-se boa estabilidade dos analitos a 25°C, mantendo o capilar nesta temperatura.

O comprimento de onda escolhido foi de 225 nm, pois neste, os analitos apresentam maior absorbância (**Figuras 6 e 7**).

Foram testados voltagens de 15, 18 e 20 kV, pois segundo Altria (1996), os valores de corrente devem ser mantidos em um máximo de 50 µA. Com o aumento da concentração do eletrólito ocorre também o aumento de corrente. Assim, quando a tensão foi de 15 kV a corrente foi menor comparado a 18 e 20 kV, observou-se um maior tempo de migração dos analitos ao se utilizar 15 kV.

As **Figuras 14 e 15** são resultados de alguns dos sistemas testados.

Figura 14. Eletroferogramas do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em associação. Concentrações $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. Condições: Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m i.d.}$. Injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 3 s ; voltagem aplicada: $+20 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm . Eletrólito contendo 15 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, pH 9.2: (A) eletrólito, (B) hidroclorotiazida (C) metoprolol (D) hidro/meto.

Neste sistema (**Figura 14**) foi utilizado eletrólito apresentando concentração igual a 15 mmol L^{-1} . A separação ocorreu em menos de 2 min , porém ao utilizar 20 kV de voltagem, observou-se um aumento de corrente ultrapassando os $50,0 \mu\text{A}$.

Figura 15. Eletroferogramas do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em associação. Concentrações $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida. Condições: Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m i.d}$ Injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 3 s ; voltagem aplicada: $+15 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm . Eletrólito contendo 25 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, $\text{pH } 9.2$: (A) eletrólito, (B) hidroclorotiazida (C) metoprolol (D) hidro/meto.

O sistema observado (**Figura 15**) apresenta uma concentração de tetraborato de sódio de 25 mmol L^{-1} e voltagem de 15 kV . Constatou-se boa seletividade e resolução dos picos.

5.2.2 Otimização do método

Para a determinação das condições experimentais mais adequadas e maior sensibilidade da técnica, foram utilizados experimentos estatisticamente planejados, que permitem modelar matematicamente os processos estudados, possibilitando o cálculo de condições otimizadas.

Neste estudo, a otimização do tempo de análise da hidroclorotiazida e do tartarato de metoprolol e resolução da hidroclorotiazida, foi avaliada através de um

desenho experimental por DCC, que possibilita a modelagem da superfície de resposta e por consequência, calcular as condições experimentais que maximizam a resposta.

As variáveis otimizadas foram os tempos de migração do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida e a resolução da hidroclorotiazida. As condições otimizadas foram avaliadas visualmente através das superfícies de resposta (**Figuras 10,11 e 12**) e calculadas através do programa Minitab 15.

Os níveis de variáveis otimizados e os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Nível das variáveis otimizadas e resultados obtidos utilizando DCC

Ensaio	[]TB	pH	Voltagem(kV)	TMM	TMH	RH
1	20	8,8	12	1,2067	1,9833	3,863
2	30	8,8	12	1,4803	2,1553	3,3117
3	20	9,8	12	0,975	1,746	2,349
4	30	9,8	12	1,7553	3,4527	4,1097
5	20	8,8	18	1,1407	1,8803	3,544
6	30	8,8	18	1,2487	1,7567	3,544
7	20	9,8	18	1,971	3,4097	5,8647
8	30	9,8	18	1,3053	2,25	4,7393
9	16	9,3	15	0,9597	1,6347	3,5857
10	33	9,3	15	1,6237	4,5513	1,2563
11	25	8,5	15	1,485	2,2903	3,7247
12	25	10	15	0,979	1,504	2,7963
13	25	9,3	10	1,983	4,2903	4,7323
14	25	9,3	20	1,2597	2,6833	4,8027
15	25	9,3	15	1,4	2,5183	5,401

TMM= tempo de migração do metoprolol (min)

TMH= tempo de migração da hidroclorotiazida (min)

RH= resolução da hidroclorotiazida

A resposta foi modelada através de uma equação quadrática, incluindo todos os fatores. O modelo reduzido expresso nas equações 4, 5, 6, avaliado através da análise de variância (ANOVA), apresentou adequação de ajuste significativo e falta de ajuste não significativo.

Considerando a adequação do modelo, foi possível calcular condições operacionais otimizadas com base nas equações a seguir:

$$\text{TMM} = 11,9423 + (0,0142 \times \text{eletrólito}) - (2,083 \times \text{pH}) - (0,285 \times \text{tensão}) - (0,0014 \times \text{eletrolito}^2) - (0,1382 \times \text{pH}^2) + (0,0063 \times \text{tensão}^2) \quad \text{equação 6}$$

$$\text{TMH} = 150,778 + (0,0408 \times \text{eletrólito}) - (34,6832 \times \text{pH}) - (0,4760 \times \text{tensão}) - (0,0049 \times \text{eletrolito}^2) - (1,9651 \times \text{pH}^2) + (0,0111 \times \text{tensão}^2) \quad \text{equação 7}$$

$$\text{RH} = -601,981 + (0,1559 \times \text{eletrólito}) + (130,589 \times \text{pH}) - (0,1817 \times \text{tensão}) - (0,0016 \times \text{eletrolito}^2) - (7,0265 \times \text{pH}^2) - (5,3143 \times \text{tensão}^2) \quad \text{equação 8}$$

Para verificar o quanto o modelo matemático calculado representa os dados experimentais foi conduzido análise de variância (ANOVA). As razões entre o quadrado médio da regressão pelo quadrado médio do resíduo $F_{\text{cal}} = (\text{QM}_{\text{regressão}} / \text{QM}_{\text{resíduo}})$, variaram de 54,2 a 263,52 (**Tabela 8**), os valores obtidos foram superiores ao valor tabelado de $F_{5,6} = 4,39$ para o nível de 95% de confiança, indicando equações de regressão significativas, ou a validade do modelo experimental.

Em nível de 95% de confiança, todos os parâmetros do modelo (**Tabela 9**), para tempo de migração do tartarato de metoprolol/hidroclorotiazida e para a resolução da hidroclorotiazida, foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Tabela 8. Análise de variância (ANOVA) para o tempo de migração do tartarato de metoprolol e hidroclorotiazida e resolução da hidroclorotizida

Variável dependente	Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de liberdade	Quadrado médio	Fcalculado	Ftabelado
TMM	Regressão	2,52065	6	0,42011	263,52	F= 4,28
	Resíduo	0,03348	21	0,00159		
	Falta de Ajuste	0,03297	3			
	Erro puro	0,00051	18			
	Total	2,55412	27			
TMH	Regressão	20,8604	6	3,47673	54,2	F= 4,28
	Resíduo	1,3472	21	4,3839		
	Falta de Ajuste	0,8547	3			
	Erro puro	0,4925	18			
	Total	22,2076	27			
RH	Regressão	49,9162	6	8,3194	216,11	F= 4,39
	Resíduo	0,8084	21	4,3074		
	Falta de Ajuste	0,5839	3			
	Erro puro	0,2245	18			
	Total	50,7246	27			

Tabela 9. Valores dos coeficientes para a correlação das variáveis respostas

Variável dependente	Termos	Estimativa do coeficiente	Erro puro	P
TMM	Constante	1,2392	0,2310	0,000
	[Eletrólito]	0,0631	0,0128	0,000
	pH	0,2540	0,0170	0,000
	Tensão	-0,4701	0,0135	0,000
	pH ²	0,0736	0,0299	0,023
	Tensão ²	0,1595	0,0291	0,000
TMH	Constante	2,1832	0,1470	0,000
	[Eletrólito]	0,1400	0,0813	0,009
	pH	1,2545	0,1079	0,000
	Tensão	-0,7021	0,0858	0,000
	pH ²	1,1054	0,1902	0,000
	Tensão ²	0,2796	0,1850	0,046
RH	Constante	4,7243	0,1139	0,000
	[Eletrólito]	0,6254	0,0629	0,000
	pH	0,4481	0,0836	0,000
	Tensão	-0,9885	0,0664	0,000
	pH ²	-3,9524	0,1473	0,000
	Tensão ²	-0,0132	0,1433	0,027

A relação entre as variáveis independentes e a dependente é representada tridimensionalmente pela superfície e resposta gerada pelos modelos, conforme **Figuras 16, 17 e 18**. As condições otimizadas foram analisadas visualmente através da superfície de resposta.

A)

B)

Figura 16. A) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração do metoprolol em função da concentração de eletrólito e do pH; B) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração da hidroclorotiazida em função da concentração de eletrólito e do pH

Na **Figura 16** é possível observar que com o aumento do pH, o tempo de migração do metoprolol e da hidroclorotiazida aumentou, pois com o aumento do pH do meio, ocorre também um aumento de concentração de espécies carregadas (íons), o mesmo não ocorreu de forma significativa quando observou-se o aumento da concentração do eletrólito.

A)

B)

Figura 17. A) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração do metoprolol em função da concentração de eletrólito e da tensão B) Superfície de resposta representando a variação no tempo de migração da hidroclorotiazida em função da concentração de eletrólito e da tensão

Com o aumento da tensão observado na **Figura 17**, ocorreu a diminuição do tempo de migração, pois favorece a mobilidade das espécies carregadas (íons) e novamente é possível observar que a variação da concentração de eletrólito tem pouca influência no tempo de migração dos analitos.

A)

B)

C)

Figura 18. Superfície de resposta representando a variação da resolução da hidroclorotiazida A) em função da concentração de eletrólito e do pH B) em função da concentração do eletrólito e da tensão C) em função do pH e da tensão

Na análise de superfície de resposta para a variação da resolução, **Figura 18** observou-se que o pH é a variável que teve maior influência, em pH próximo de 9,3, observou-se um valor de resolução maior, e segundo a literatura, o pH deve ser próximo ao pKa ou maior que o pKa dos solutos em questão, pois as diferenças de ionização são máximas levando a migração diferenciadas⁵⁰.

Assim, optou-se por trabalhar em pH 9.3, para se obter maior resolução da hidroclorotiazida, quanto a análise dos resultados encontrados com a variação da concentração de eletrólito e variação de tensão, optou-se por trabalhar utilizando a média das concentrações de eletrólito e tensão utilizadas nos experimentos e visualizadas através da análise de superfície de resposta, pois observou-se que ao se aumentar a tensão o tempo de análise diminuiu, porém não se obteve um ganho de resolução significativo, o mesmo ocorreu com a concentração de eletrólito.

Portanto, a condição selecionada para a obtenção da curva analítica, para os demais ensaios de validação e para a aplicação do método, empregou:

- Coluna capilar: sílica fundida 30,2 cm de comprimento total x 50 µm d.i.
- Eletrólito: 25 mmol L⁻¹ de tetraborato de sódio, pH 9,3.
- Detecção UV: 225 nm
- Temperatura: 25°C
- Tensão aplicada: +15kV,
- Injeção hidrodinâmica por pressão: 0,5 psi/6 s

Na **Figura 19** pode ser visto o eletroferograma da solução padrão do tartarato de metoprolol em associação a hidroclorotiazida e a sulfametoxazol utilizada como padrão interno.

Figura 19. Eletroferogramas da análise do tartarato de metoprolol (M) e da hidroclorotiazida (H) em associação e a sulfametoxazol (S) (p.i). Concentrações $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol, e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de hidroclorotiazida, e $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfametoxazol. Condições: Capilar de sílica fundida $30,2\text{cm} \times 50 \mu\text{m i.d}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 6 s ; voltagem aplicada: $+15 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm . Eletrólito contendo 25 mmol L^{-1} de tetraborato de sódio, $\text{pH } 9.3$

5.2.3 Validação do método por eletroforese capilar de zona

A validação de um método analítico deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências desejadas, fornecendo uma evidência documentada que o método realiza função para a qual é indicada. A validação de um método analítico inclui a validação da exatidão, especificidade, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez^{51,58,60,66}.

5.2.3.1 Linearidade

Após serem definidos os parâmetros, foram construídas as curvas analíticas num intervalo de concentrações de $80,0$ a $120,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tartarato de metoprolol (**Figura 20 e Tabela 10**) e hidroclorotiazida num intervalo de concentrações de $10,0$ a $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfametoxazona, (**Figura 21 e Tabela 11**). Obteve-se boa linearidade, com coeficientes de determinação superiores a $0,99$.

Figura 20. Curva analítica da solução padrão do tartarato de metoprolol, faixa de concentração de 80,0 a 120,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando eletroforese capilar de zona

Tabela 10. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por CZE para o tartarato de metoprolol

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico* (A/A)**
80,0	0,530
90,0	0,641
100,0	0,791
110,0	0,887
120,0	1,086
Intercepto(A)	-0,5721
Inclinação (B)	0,0135
Desvio-padrão	0,0277
Coeficiente de determinação [r^2]	0,9938

*Media de três leituras

**Razão das áreas dos picos
(metoprolol/sulfametoxazona)

Figura 21. Curva analítica da solução padrão da hidroclorotiazida na faixa de 10,0 a 15,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando eletroforese capilar de zona

Tabela 11. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por CZE para a hidroclorotiazida

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico* (A/A)**
10,0	0,450
11,25	0,525
12,5	0,590
13,75	0,684
15	0,804
Intercepto(A)	-0,2568
Inclinação (B)	0,0694
Desvio-padrão	0,0198
Coeficiente de determinação [r^2]	0,9922

*Média de três leituras

**Razão das áreas dos picos
(hidroclorotiazida/sulfametazona)

5.2.3.2 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação para o tartarato de metoprolol foi de 6,73 e 20,40 e para a hidroclorotiazida foi de 0,94 e 2,85 respectivamente, os resultados indicam que o método utilizado apresenta boa sensibilidade.

5.2.3.3 Repetibilidade (intra-dia)

O desvio-padrão relativo (% DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2% (**Tabela 12**). Portanto a precisão de injeção foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação⁵⁰.

5.2.3.4 Precisão intermediária (inter-dia)

A precisão intermediária foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação, pois foi observado que o desvio-padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2% para as três concentrações com as que se trabalhou nos três dias consecutivos (**Tabela 12**).

Tabela 12. Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por CZE

	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Repetibilidade do Método (%DPR)	Precisão intermediária do método (%DPR)
Tartarato de metoprolol	80,0	-----	0,62
	100,0	1,83	0,43
	120,0	-----	0,33
Hidroclorotiazida	10,0		0,88
	12,5	0,55	0,53
	15,0	-----	0,31

5.2.3.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para o tartarato de metoprolol foi de 98,95 % e para a hidroclorotiazida foi de 99,36 %, indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas. A **Tabela 13** mostra os resultados para o teste de recuperação para os fármacos em estudo.

Tabela 13. Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por CZE

	Quantidade de Padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de Padrão recuperado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação* %
Tartarato de metoprolol	80	79,95	99,94
	100	98,05	98,65
	120	117,93	98,28
Hidroclorotiazida	10	10,12	101,29
	12,5	12,25	98,01
	15	14,81	98,78

*Média de três determinações

5.2.3.6 Especificidade/seletividade

A especificidade do método foi avaliada através de testes de estresse do tartarato de metoprolol em associação com a hidroclorotiazida após aquecimento em meio neutro, básico, ácido e em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio por 2 horas e por 24 horas, e estresse por fotólise (**Tabela 4**). O objetivo foi verificar se os produtos de degradação interferem na determinação do tartarato de metoprolol e hidroclorotiazida.

Em estudos de estresse da hidroclorotiazida realizados isoladamente e em associação com alisquireno, observou-se a formação de um produto de degradação, proveniente da hidroclorotiazida^{18,30}. Em outro estudo, realizou-se a identificação dos produtos de degradação do metoprolol após 24 e 48 horas a 80°C, foram identificados 14 produtos de degradação⁶⁵. No presente estudo observou-se a formação de um produto de degradação, e degradação significativa da hidroclorotiazida, porém não se observou degradação significativa do tartarato de metoprolol (**Tabela 14**).

Tabela 14. Resultados obtidos empregando CE após condições de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida

% de resposta em relação a condição não estressada			
Condição		Tartarato de metoprolol ¹	hidroclorotiazida ¹
Hidrólise oxidativa	(2h)	21,58%	29,39%
	(24h)	18,80%	43,50%
Hidrólise neutra	(2h)	6,10%	19,44%
	(24h)	1,46%	64,78%
Hidrólise ácida	(2h)	11,62%	25,20%
	(24h)	5,94%	13,06%
Hidrólise básica	(2h)	12,98%	12,44%
	(24h)	5,76%	34,69%
Fotólise		0%	0%

Nota: ¹ Neste caso corresponde à porcentagem da área de tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida formado no estudo de estresse, em relação à resposta da solução não estressada do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.

Verificando os dados descritos na **Tabela 13** e os eletroferogramas apresentados nas **Figuras 22, 23, 24, 25 e 26**, observa-se que nas condições avaliadas, a concentração de hidroclorotiazida diminui significativamente quando comparada a concentração inicial. Ao ser analisado a concentração do tartarato de metoprolol observa-se diminuição da concentração em todas as condições de

hidrolise descritas, porém não tão significativa, observando-se degradação maior em meio oxidativo. No estudo de estresse por fotólise não foi observado diminuição nas concentrações do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida, desta forma conclui-se que não houve degradação dos fármacos nesta última condição testada. Observou-se que o produto de degradação formado, não interferem na determinação e quantificação dos analitos em estudo.

Hidrólise em meio oxidativo

1)

2)

Figura 22. Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da hidroclorotiazida ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) em hidrólise oxidativa. **1)** 2 horas a 80°C ; **2)** 24 horas a 80°C ; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ i.d; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 6 s ; voltagem aplicada: $+15 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção a 225 nm . (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametoxazol

Hidrólise em meio neutro

1)

2)

Figura 23. Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da hidroclorotiazida ($12,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) em hidrólise neutra. **1)** 2 horas a 80°C ; **2)** 24 horas a 80°C ; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ i.d; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 6 s ; voltagem aplicada: $+15 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm . (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametoxazol

Hidrólise em meio ácido

1)

2)

Figura 24. Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da hidroclorotiazida ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) em hidrólise ácido. **1)** 2 horas a 80°C ; **2)** 24 horas a 80°C ; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m i.d.}$; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 6 s ; voltagem aplicada: $+15 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm . (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametoxazol.

Hidrólise em meio básico

1)

2)

Figura 25. Eletroferogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da hidroclorotiazida ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) em hidrólise ácido. **1)** 2 horas a 80°C ; **2)** 24 horas a 80°C ; eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ i.d; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 6 s ; voltagem aplicada: $+15 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm . (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametoxazol

Figura 26. Eletroferogramas da análise de estresse por fotólise do tartarato de metoprolol ($100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da hidroclorotiazida ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Eletroforese capilar de zona. Condições: eletrólito contendo $25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de tetraborato de sódio, pH 9.3. Capilar de sílica fundida $30,2 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ i.d; injeção hidrodinâmica por pressão $0,5 \text{ psi}$ por 6 s ; voltagem aplicada: $+15 \text{ kV}$; temperatura: 25°C . Detecção UV em 225 nm . (M) tartarato de metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (S) sulfametoxazol.

5.3 Desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC)

As condições de análise por UHPLC, sobretudo no que diz respeito a escolha da fase estacionária e fase móvel utilizadas, foram testadas inicialmente com base no estudo que objetivou a determinação simultânea do losartana potássico, atenolol e hidroclorotiazida, utilizando coluna *ZORBAX® SB C18* ($50 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm} \times 1,8 \mu\text{m}$). E a fase móvel constituída da mistura de água:acetonitrila, trietilamina; ácido ortofosfórico ($60:40:0,1:0,1$, v/v) pH 3.0, vazão $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, 25°C . Os fármacos foram determinados em 2.3, 0.6 e 0.9 minutos²³.

A coluna ZORBAX® StableBond (SB) é preparada a partir de silanos monofuncionais com cadeia C18, grupos volumosos que protegem esfericamente as ligações siloxano (**Figura 29**), para as FE do tipo C18 os grupos protetores podem ser diisobutl ou diisopropil. Estas FE estericamente protegidas fornecem maior estabilidade e aumentam o tempo de vida e a reprodutibilidade quando são usadas FM ácidas, apresentam resistência a uma faixa de pH de 1 a 6 e são compatíveis com FM com elevada quantidade de água.

Figura 27. Estrutura da fase estacionária Zorbax StableBond. R= Isopropil (C18, C8, CN, C3, fenil) e Isopropil (C18), R1= C8,C18,CN,C3, fenil⁶²

Na realização dos testes preliminares optou-se por trabalhar com fase móvel contendo água:acetonitrila (70:30 v/v) em pH 3 ajustado com ácido ortofosfórico, sem a adição do trietilamina, a velocidade do fluxo foi de 0,7ml min⁻¹ (**Figura 28**).

Figura 28. Cromatograma da solução padrão de tartarato de metoprolol $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e hidroclorotiazida $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ coluna ZORBAX[®] SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm) $\lambda = 225 \text{ nm}$, fase móvel: acetonitrila/ água (70/30, v/v) pH=3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, volume de injeção: 2,0 μL , temperatura da coluna: 25°C. (H) hidroclorotiazida, (M) metoprolol

Na **Figura 28** é possível observar que houve separação dos componentes, porém os picos estão deformados apresentando alargamento do pico próximo a linha de base, e praticamente não há retenção do metoprolol. Com a diminuição da proporção de solvente orgânico, ocorreu maior retenção do tartarato de metoprolol, porém ainda há deformações do pico (**Figura 29**).

Figura 29. Cromatograma da solução padrão de tartarato de metoprolol $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e hidroclorotiazida $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ coluna ZORBAX[®] SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm) $\lambda = 225 \text{ nm}$, fase móvel: acetonitrila/ água (80/20, v/v) pH=3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, volume de injeção: 2,0 μL , temperatura da coluna: 25°C. (H) hidroclorotiazida, (M) metoprolol

Em todos os testes realizados é possível observar que os picos obtidos do metoprolol são largos e assimétricos. Isso ocorre pois, em meio ácido a molécula assume uma carga positiva devido a protonação da amina, para que a molécula não se ionize, seria necessário trabalhar em pH acima de 12 (**Figura 8**) e como mencionado a FE apresenta resistência na faixa de pH de 1 a 6. Para suprimir a ionização do tartarato de metoprolol, foi adicionado a FM a trietilamina (TEA).

Na **Figura 32** é possível observar que com a adição de 0,2 % de TEA a FM, houve uma melhoria na simetria dos picos, porém a resolução foi comprometida.

Figura 30. Cromatograma da solução padrão de tartarato de metoprolol $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e hidroclorotiazida $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x $1,8 \mu\text{m}$) $\lambda = 225 \text{ nm}$, fase móvel: acetonitrila/ água/trietilamina (80/20/0,1, v/v/v) pH=3,0 ajustado com ácido orto-fosfórico, volume de injeção: $2,0 \mu\text{L}$, temperatura da coluna: 25°C . (H) hidroclorotiazida, (M) metoprolol

5.3.1 Otimização do método

Para a determinação das condições mais adequadas para a determinação do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida por UHPLC, foi realizada a otimização do método com intuito de verificar em que condições seria possível obter uma melhor resolução. A avaliação foi através de um desenho experimental por DCC.

Os níveis de variáveis otimizados e os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Nível das variáveis otimizadas e resultados obtidos utilizando DCC

pH	%ACN	R.H	R.M
2,3	17	4,82	7,14
2,5	12	1,6	14,19
2,5	22	0	1,6
3,0	10	0	20,9
3,0	17	4,75	6,64
3,0	24	0,86	1,08
3,5	12	0	16,32
3,5	22	1,42	0,92
3,7	17	4,75	7,6

R.H=resolução da hidroclorotiazida

R.M=resolução do metoprolol

O modelo reduzido expresso nas equações 7 e 8, avaliado através da análise de variância (ANOVA), apresentou adequação de ajuste significativo e falta de ajuste não significativo. O cálculo das condições operacionais otimizadas são expressos nas equações a seguir:

$$RM = 6,6824 + (0,3694 \times pH) - (9,8527 \times ACN) + (0,2026 \times pH^2) + (3,8259 \times ACN^2)$$

equação 7

$$RH = 4,8522 - (0,0492 \times pH) + (0,1784 \times ACN) - (0,9676 \times pH^2) - (5,3270 \times ACN^2)$$

equação 8

O resultado da análise de variância (ANOVA) são expressos na **Tabela 16**. As razões entre o quadrado médio da regressão pelo quadrado médio do resíduo $F_{cal} = (QM_{regressão} / QM_{resíduo})$, variaram de 18,25 a 246,96 os valores obtidos foram superiores ao valor tabelado de $F = 5,05$ para o nível de 95% de confiança.

Em nível de 95% de confiança, todos os parâmetros do modelo (**Tabela 17**), para tempo de resolução do tartarato de metoprolol e resolução da hidroclorotiazida, foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para a resolução do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida

Variável dependente	Fonte de variação	Soma quadrática	Grau de liberdade	Quadrado médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
RH	Regressão	91,2771	5	18,2554	19,2	F= 4,39
	Resíduo	19,9695	21	0,9509		
	Falta de Ajuste	19,951	3			
	Erro puro	0,0187	16			
	Total	111,247	26			
RM	Regressão	1234,83	5	246,966	862,51	F= 4,39
	Resíduo	6,01	21	0,286		
	Falta de Ajuste	5,87	3			
	Erro puro	0,14	16			
	Total	1240,84	26			

Tabela 17. Valores dos coeficientes para a correlação das variáveis respostas

Variável dependente	Termos	Estimativa do coeficiente	Erro puro	P
RH	Constante	4,8522	0,5628	0,000
	pH	-0,0493	0,2801	0,042
	%ACN	0,1784	0,2801	0,031
	pH ²	-0,9670	0,6545	0,031
	%ACN ²	-5,3270	0,6545	0,000
RM	Constante	6,6824	0,3088	0,000
	pH	0,3694	0,1537	0,026
	%ACN	-9,8527	0,1537	0,000
	pH ²	0,2026	0,3591	0,039
	%ACN ²	3,8259	0,3591	0,000

R.H=resolução da hidroclorotiazida

As **Figuras 31 e 32** representam tridimensionalmente a superfície e resposta gerada pela relação entre as variáveis independentes e dependentes.

Figura 31. Superfície de resposta representando a variação na resolução da hidroclorotiazida em função da concentração da acetoneitrila e do pH

O gráfico de superfície e resposta representado pela **Figura 31** demonstra que a resolução da hidroclorotiazida sofre maior interferência com a variação da concentração de acetonitrila, o gráfico evidencia que a concentração ideal de acetonitril seria de 17%, valor onde foi possível obter uma maior resolução.

Figura 32. Superfície de resposta representando a variação na resolução do tartarato de metoprolol em função do pH e da concentração de acetonitrila

O gráfico de superfície e resposta representado pela **Figura 32** mostra que a resolução do tartarato de metoprolol sofre maior interferência com a variação da concentração de acetonitrila, e que praticamente não houve alteração com a variação do pH.

A **Figura 33** mostra de forma global o gráfico da otimização do método, nele podemos observar que tanto a resolução da hidroclorotiazida quanto a resolução do tartarato de metoprolol foram maximizadas quando utilizou-se 17% de acetonitrila em pH 3, nas condições mencionadas obteve-se 4,85 de resolução para a hidroclorotiazida e 6,68 para o tartarato de metoprolol.

Figura 33. Gráfico global do resultado da otimização do método por UHPLC

Assim a metodologia para a determinação simultânea dos fármacos em estudo, ficou definida como sendo:

- Coluna ZORBAX[®] SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m).
- Fase móvel constituída por água:acetornitrila:triethylamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico.
- Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 0.2 μ l de injeção de amostra.
- Comprimento de onda em 225 nm.

A **Figura 35** representa o cromatograma do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em associação, nas condições otimizadas.

Figura 34. Cromatograma da determinação simultânea do tartarato de metoprolol (M) e da hidroclorotiazida (H). Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetonitrila:triethylamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µl de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.

5.3.2 Validação do método por cromatografia líquida de ultra eficiência

5.3.2.1 Linearidade

Os resultados obtidos da linearidade nas faixas de concentração trabalhadas indicaram coeficiente de correlação acima de 0,99 e mostram uma relação linear de x a y nas curvas analíticas (**Figuras 36 e 37**), indicando uma dispersão pequena do conjunto de pontos experimentais (**Tabelas 18 e 19**).

Figura 35. Curva analítica resultante da análise da solução padrão do tartarato de metoprolol utilizando UHPLC

Tabela 18. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por UHPLC para o tartarato de metoprolol

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico*
80,0	179,066
90,0	198,566
100,0	221,733
110,0	241,899
120,0	266,800
Intercepto(A)	2,893
Inclinação (B)	2,187
Desvio-padrão	1,607
Coeficiente de determinação[r^2]	0,9991

*Média de três leituras

Figura 36. Curva analítica resultante da análise da solução padrão da hidroclorotiazida utilizando UHPLC

Tabela 19. Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do método específico por UHPLC para a hidroclorotiazida

Concentração de leitura ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área do pico*
10,0	89,533
11,25	100,466
12,5	120,833
13,75	128,7667
15,0	140,266
Intercepto(A)	-13,794
Inclinação (B)	10,381
Desvio-padrão	3,318
Coeficiente de determinação[r ²]	0,9903

*Média de três leituras

5.3.2.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação encontrados para o tartarato de metoprolol foi de 2,42 e 7,34 para a hidroclorotiazida foi de 1,05 e 3,19 os parâmetros avaliados estão de acordo com os critérios de aceitação⁵¹.

5.3.2.3 Repetibilidade (intra-dia)

O desvio-padrão relativo (% DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2% (**Tabela 19**). Portanto a precisão de injeção foi considerada satisfatória segundo os critérios de aceitação⁵¹.

5.3.2.4 Precisão intermediária (inter-dia)

A **Tabela 23** apresenta os resultados obtidos na determinação da precisão intermediária. Observa-se que o desvio-padrão relativo (%DPR) para a razão das áreas dos picos foi menor que 2%, portanto a precisão de injeção foi considerada satisfatória, segundo os critérios de aceitação⁵¹.

Tabela 20. Resultados obtidos nas determinações da repetibilidade e da precisão intermediária do método específico por UHPLC

	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Repetibilidade do Método (%DPR)	Precisão intermediária do método (%DPR)
	80,0	-----	0,79
Tartarato de	100,0	1,196	0,79
Metoprolol	120,0	-----	0,27
	10,0		0,21
Hidroclorotiazida	12,5	0,719	0,65
	15,0	-----	0,32

5.3.2.5 Exatidão

A exatidão do método por UHPLC foi determinada pelo teste de recuperação, em três níveis de concentração. A recuperação média encontrada para o tartarato de metoprolol foi de 101,1 % e para a hidroclorotiazida foi de 100,6 %, indicando assim boa concordância entre as quantidades adicionadas de solução padrão e as quantidades recuperadas. A **Tabela 20** mostra os resultados para o teste de recuperação para os fármacos em estudo.

Tabela 21. Resultados obtidos na determinação da recuperação do método específico por UHPLC

	Quantidade de Padrão adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Quantidade de Padrão recuperado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação* %
	80	81,12	101,4
Tartarato de	100	100,4	100,4
Metoprolol	120	121,9	101,6
	10	10,05	100,5
Hidroclorotiazida	12,5	12,55	100,4
	15	15,13	100,9

*Média de três determinações

5.3.2.6 Especificidade/seletividade

A especificidade do método foi avaliada através de testes de estresse do tartarato de metoprolol em associação com a hidroclorotiazida após aquecimento em meio neutro, básico, ácido e em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio por 2 horas e por 24 horas, e estresse por fotólise (**Tabela 4**). O objetivo foi verificar se os produtos de degradação interferem na determinação e quantificação do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.

Tabela 22. Resultados obtidos empregando UHPLC após condições de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida

		% de resposta em relação a condição não estressada	
Condição		Tartarato de metoprolol ¹	hidroclorotiazida ¹
Hidrólise oxidativa	(2h)	23,80	49,63
	(24h)	30,65	53,49
Hidrólise neutra	(2h)	27,59	37,31
	(24h)	29,75	65,62
Hidrólise ácida	(2h)	20,73	30,33
	(24h)	24,07	80,33
Hidrólise básica	(2h)	13,26	16,72
	(24h)	13,80	37,31
Fotólise		6,13	11,10

Nota: ¹ Neste caso corresponde à porcentagem da área de tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida formado no estudo de estresse, em relação à resposta da solução não estressada do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida.

Na **Tabela 22** pode-se observar uma degradação significativa da hidroclorotiazida com a formação de um produto de degradação, e degradação em menor intensidade do tartarato de metoprolol, quando comparado a hidroclorotiazida. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados nas análises feitas por CE, onde também foi possível verificar a degradação significativa da hidroclorotiazida.

Nas **Figuras 37, 38, 39, 40 e 41**, podem ser observados os cromatogramas referente ao estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise neutra, oxidativa, ácida básica e estresse por fotólise, onde a presença dos produtos de degradação formados não interferem com os picos de interesse.

Figura 37. Cromatogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise neutra. 1) 0 hora, 2) 2 horas a 80°C, 2) 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50,0 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água: acetornitrila: trietilamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹ 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.

Figura 38. Cromatogramas da análise de estresse oxidativo do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise. 1) 0 hora, 2) 2 horas a 80°C, 3) 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila:triethylamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.

Figura 39. Cromatogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise básica. 1) 0 hora, 2) 2 horas a 80°C, 3) 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila:triethylamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.

Figura 40. Cromatogramas da análise de estresse do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida em hidrólise ácida. **1)** 0 hora, **2)** 2 horas a 80°C, **3)** 24 horas a 80°C; (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida, (D) produto de degradação. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila:triethylamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.

Figura 41. Cromatogramas da análise de estresse por fotólise do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida 1) sem estresse, 2) após estresse, (M) metoprolol, (H) hidroclorotiazida. Condições: Coluna ZORBAX® SB C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), fase móvel constituída por água:acetornitrila:triethylamina (83:17:0,2 v/v/v), pH 3 ajustado com ácido fosfórico. Velocidade do fluxo de 0,9 mL.min⁻¹, 2,0 µL de injeção de amostra, comprimento de onda em 225 nm.

5.4 Comparação entre técnicas de CE e UHPLC para a determinação e quantificação do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida

Os resultados obtidos na determinação do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida podem ser observados na **Tabela 23**.

Tabela 23. Parâmetros estatístico e estudo comparativo entre CE e UHPLC, para a determinação quantitativa do tartarato de metoprolol e a hidroclorotiazida, sendo a concentração do tartarato de metoprolol igual a 100,0 mg/comprimido e hidroclorotiazida igual a 12,5 mg/comprimido, respectivamente

Parâmetros	Hidroclorotiazida		T. metoprolol	
	UHPLC	CE	UHPLC	CE
Média n = 6	12,94	12,39	99,94	100,06
DPR (%)	0,53	0,95	0,08	0,25
Teste F ^a	3,16		8,52	
Teste t ^b	0,146		0,506	

$\bar{X}$ n=6

^a valor crítico F com P = 95% , de significância P= 95% e F_{crit} = 5,05

^b valor crítico t studan't com P=95% de significância P=95 e t_{crit} = 2,57

DPR= Desvio padrão relativo

T=tartarato

Grau de liberdade= 5

Para cada método 6 determinações foram realizadas, portanto o número de grau de liberdade (n-1) em cada caso é cinco. Para o teste t, o valor crítico de t(P=0,05) é 2,57 para 95% de certeza. Como o valor experimental é menor que esse valor, não existe diferença significativa entre os dois métodos. Porém o teste F indica que há diferença entre as duas técnicas, pois o valor de f calculado foi maior que f tabelado.

6. CONCLUSÕES

A partir das condições experimentais nas quais foi realizado o presente trabalho pode-se concluir:

- ✓ Os métodos de eletroforese capilar de zona e a cromatografia líquida de ultra eficiência podem ser utilizadas para a quantificação do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida quando estes se encontram em associação ou isoladamente. As condições ótimas para separação eletroforética e cromatográfica foram obtidas utilizando um delineamento experimental de superfície e resposta.
- ✓ O método desenvolvido por CE e por UHPLC apresentaram boa especificidade, sendo esta determinada através do estresse dos analito em estudo, linearidade com $r^2 > 0,99$, exatidão entre 98 e 101% e precisão com valores de DPR menores que 2%. Assim, os métodos desenvolvidos atendem os limites pré-estabelecidos para os parâmetros de validação de métodos analíticos quantitativos conforme normas nacionais e internacionais.
- ✓ A comparação das técnicas de CE E UHPLC para a determinação e quantificação do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida, determinadas através dos testes t e f mostraram que existem diferença significativa, quanto à determinação de teor entre os dois métodos propostos.

7. REFERÊNCIAS

- [1] HARMAN, J.R. **Diseases and Patient Advance**. *The Pharmaceutical Press*, 1. ed. Handbook of Pharmacy Health-Care. 1990, p 34-35.
- [2] CIPULLO, J.P.; MARTIN, J.F.V.; CIORLIA, L.A.S.; GODOY, M. R.P.; CAÇÃO, J. C.C.; LOUREIRO, A.A.C.; CESARINO, C.B.; CARVALHO, A.C; CORDEIRO, J.A.; BURDMANN, E.A. *Prevalência e Fatores de Risco para a Hipertensão em uma População Urbana Brasileira*. **Revista Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v.94, n.4, p.1-8,2009.
- [3] SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. Disponível em: <http://www.sbh.org.br/geral/oque-e-hipertensao.asp>. Acesso em: 18 maio 2014.
- [4] ORTEGA, K.C.; SILVA, G.V.; MION, D. **Hipertensão Arterial Sistêmica: Como Diagnosticar e Tratar**. *Revista Brasileira de Medicina*. Vol.63, p.1-10, 2006.
- [5] GAO, F.; ZHANG, M.; CUI, X.; WANG, Z.; SUN, Y.; GU, J. *Simultaneous quantitation of hydrochlorothiazide and metoprolol in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.52, p.149-154. 2010.
- [6] DOGRE, V.G.; SHAH, S.B.; KARMUSE, P.P; PHADKE, M.; JADHAV, V.K. *Simultaneous determination of metoprolol succinate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage form by HPLC*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.46, p.583-586, 2008.
- [7] SANTOS, J. *Desenvolvimento de Metodologia Espectroscópicos Multivariados para quantificação de Captopril e Hidroclorotiazida em associação*. Curitiba, 2009. 1p. Tese de Mestrado – Faculdade de Química – Universidade Federal do Paraná.
- [8] UNITED STATES *Pharmacopeia*, 33.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2010.
- [9] RIBEIRO, A.B.; PLAVNIK, F.L. **Atualização em hipertensão arterial: Clínica, diagnóstica e terapêutica**. 2.ed. São Paulo. 2007. p.273-275, 285-288.
- [10] PRADO, M.S.A. *Determinação de fármacos em formulações farmacêuticas empregando a eletroforese capilar como alternativa à cromatografia líquida de alta eficiência*. São Paulo, 2002. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- [11] SWALES, J.D. *Text Book of Hypertension*. 1.ed. 1994, p.1046-1048.
- [12] ZANINI, A.C.; BASILE, A.C.; FOLLADOR, W.; OGA, S. **Guia de Medicamentos**, 2.ed.1997/1998 p.782, 902-903.

- [13] MEDICINANET. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/1572/clorana.htm>. Acesso em 15 de agosto de 2014.
- [14] *European Pharmacopoeia*. 5.ed. Strassbourg: Council of Europe, 2004. p.2409-2411.
- [15] *Farmacopeia Brasileira*. 4^a ed. Editora Atheneu. São Paulo, 1998, p 256.
- [16] *BRITISH Pharmacopoeia* 2010. London: Stationery Office, 2010. p.768.
- [17] DELUCIO, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACCI, M.; AVELAR, M.C.W. ***Farmacologia Integrada***. 3.ed.Revinter. 2007. P.396,398.
- [18] MAHAJAN, A. A.; THAKER, A. K.; MOHANRAJ, K. LC, LC-MS/MS Studies for the identification and characterization of degradation products of hydrochlorothiazide and establishment of mechanistic approach towards degradation. ***Journal of Radiation Physic and Chemistry***. v.75, p.977-989, 2006.
- [19] EI-GINDEG, A.; ASHOUR, A.; ABDEL-FAHAH, L.; SHABANA, M. M. Spectrophotometric determination of benazepril hydrochloride and hydrochlorothiazide in binary mixture using second derivative of the ratio spectra and chemometric methods. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***. v.25, p.299-307, 2001.
- [20] ERTURK, S.; ÇETIN, S. M.;ATMACA, S. Simultaneous determination of moexipril hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets by derivative spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic methods. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***. v.33, p.505-511, 2003.
- [21] ERK, N. Simultaneous determination of fosinopril and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations by spectrophotometric methods. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***. v.27, p.901-912, 2002.
- [22] SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, E.R.; ROLIN, P.J.N. Modelo de avaliação de fármacos e medicamentos para a industria farmacêutica. ***Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada***, v.30, n.2, p.129-135, 2009.
- [23] RAO, D.D.; SATYANAYANA, N.V.; SAIT, S.S.; REDDY, Y.R.; MUKKANTI, K. Simultaneous determination of losartan potassium, atenolol and hydrochlorothiazide in pharmaceutical preparations by stability-indicationd UPLC. ***Journal of Chromatographia***. v. 70,p.647-651, 2009.
- [24] RAWOOL, N.D; VANKATCHALAM, A. Analytical method for simultaneous estimation of hydrochlorothiazide and metoprolol tartrate using RP-HPLC. ***Indian Journal of Pharmaceutical***. v.73, n.2, p. 219-223, 2011.

- [25] MODAMIO, P.; LASTRA, C.F.; MONTEJO, O.; MARINO, E.L. *Development and validation of liquid chromatography methods for the quantitation of propranolol, metoprolol, atenolol and bisoprolol: application in solution stability studies. International Journal of Pharmaceutics*. v.130, p.137-140, 1995.
- [26] MISTRY, B.; LESLIE, J.L.; EDDINGTON, N.D. *Enantiomeric separation of metoprolol and α -hydroxymetoprolol by liquid chromatography and fluorescence detection using a chiral stationary phase. Journal of Chromatography* . v.758, p.153-161, 2001.
- [27] MURRAY, G. J.; DANACEAU, J. P. *Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS. Journal of Chromatography B*. v. 877, p. 3857-3864, 2009.
- [28] LIM, H.-K.; LINH, P.T.; HONG, C.-H.; KIM, K.-H.; KANG, J.-S. *Enantioselective determination of metoprolol and major metabolites in human urine by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography B*. v.755, p. 259-264, 2001.
- [29] QUAGLIA, M.G.; DONATI, E.; CARLUCCI, G.; MAZZEO, P.; FANALI, S. *Determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by CE and CEC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.29, p. 981-987, 2002.
- [30] SANGAI, M. S; SANGAI, M. W; OLIVEIRA, P. R; ROLIM, C. M. B; STEPPE, M. *Simultaneous determination of aliskiren and hydrochlorothiazide from their pharmaceutical preparation using a validated stability-indicating MEKC method. Journal of Separation Science*. v.34, p.1859-1866, 2011.
- [31] LI, X; ZHU, D; YOU, T. *Simultaneous analysis of six cardiovascular drugs by capillary electrophoresis coupled with electrochemical and electrochemiluminescence detection, using a chemometrical optimization approach. Journal of Electrophoresis*. v.32, p.2139-2147, 2011.
- [32] COLLINS, C.H; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, p.17,273, 289,295, 2006.
- [33] DEGANI, A.L.G; CASS, Q.B; VIEIRA, P. C. *Cromatografia: um breve ensaio. Quim. Nova*. São Paulo, v7, p.21-25, 1998.
- [34] SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. Thomson. 2005. 925p.
- [35] TAVARES, M. F. M. *Mecanismo de separação em eletroforese capilar. Química Nova*. São Paulo, v27, n.5, p.493-511, 1997.
- [36] ALTRIA, K.D., ed. **Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications**. Totowa: Humana Press, 1996. 349p. (Methods in Molecular Biology Series, 52).

- [37] INTERNACIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF PHOTOSTABILITY TESTING OF NEW ACTIVE SUBSTANCES AND MEDICINAL PRODUCTS. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-photostability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>. Acesso em 26. Jul. 2014
- [38] SANTORO, M.I.R.M.; AURORA-PRADO, M.S.; STEPPE, M.; KEDOR HACKMANN, E.R.M. *Electroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos*. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.36, n.1, p.579-611, 1994.
- [39] SILVA, J.A.F.; CARRILHO, W.K.T.C.E; TAVARES, M..F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. São Paulo, v30,n.3, p.740-744, 2007.
- [40] ICH. Texto n Validation of Analytical procedures Q2(R1). Disponível em <http://www.ich.org/cache/comp/277-254-1.html> Acesso em 8 de abril de 2013.
- [41] JOSHI, S.J.; KARBHARI, P.A.; BHOIR, S.I.; BINDU, K.S.; DAS,C. RP-HPLC method for simultaneous estimation of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in tablet formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.52, p. 362-371, 2010.
- [42]SHINTANI, H.; POLONSKY, J. ed. **Handbook of capillary electrophoresis applications**.Blackie A & P. 1997. 4,5,6p.
- [43] VUJIC, Z.; MULAVDIE, S.; BRBORIC, J.; STANKOVIE, P. Simultaneous analysis of irbesartan and hydrochlorothiazide: An improved HPLC method with the aid of a chemometric protocol. **Journal of Molecules**. v.17,p 3461-3474, 2012.
- [44] COUDORE, F.; HARVARD, L.; LEFEUVRE, S.; BILLAUD, E.M.; BEAUNE, P.; BOBRIE, G.; AZIZI, M.; PROGNON, P.; LAURENT, S. HPLC-DAD Analysis of hydrochlorothiazide and ibesartan in hypertensive patients on fixed-dose combination therapy. **Journal of Chromatographia**. v.74,p559-565, 2011.
- [45] NALWADE, S.;REDDY, V.R.; RAO, D.D; RAO,I.K. Rapid simultaneous determination of telmisartan, amlodipine besylate and hydrochlorothiazide in a combined poly pill dosage form by stability-indicating ultra performance liquid chromatography. **Scientia Pharmaceutica**. v.79, p.69-88, 2011.
- [46] KUMAR,A.; VERMA, P.R.P.; MONIF, T.; KHUROO, H.; IYER, S.S; SINGH, A.K.; Challenges in bioanalytical method development for simultaneous determination os olmesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.35, p59-78, 2012.

- [47] SHAALAN, R.A.; BELAL, T.S. Gradient HPLC-DAD determination of the antihypertensive mixture of amlodipine besylate, valsartan, and hydrochlorothiazide in combined pharmaceutical tablets. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v.35, p215-130, 2012.
- [48] LI, X.; ZHU, D.; YOU, T. Simultaneous analysis of six cardiovascular drugs by capillary electrophoresis coupled the electrochemical and electrochemiluminescence detection, using a chemometrical optimization approach. **Journal of Electrophoresis**. V.32, p2139-2147, 2011.
- [49] ponto de fusão do tartarato de metoprolol e da hidroclorotiazida, disponível em: <http://www.scifinder.cas.org/scifinder.acesso> em 31 de maio de 2013.
- [50] BAKER, R.D. **Capillary electrophoresis**. 1.ed. New York. John Wiley & Sons. Inc.1995.
- [51] ANVISA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e Bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE n.475, de 19 de março de 2002. Disponível em: <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word> Acesso em: 15 fevereiro de 2013.
- [52] MENON, D.; EL-RIES, M.; ALEXANDRE, K. S.; RIGA, A.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis study of the decomposition of hydrochlorothiazide. **Instrumentation Science Technology**. v.4,n.3, p.329-340, 2002.
- [53] DADARWAL, S. C.; MADAN, S.; AGRAWAL, S. S. Formulation and evaluation os delayed – onset extended releas tablets of metoprolol tartrate usin hydrophilic swellable polymers. **Acta Pharm**. V.62, p.105-114, 2012.
- [54] CIOLO, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido da alto desempenho**. Editora Edgard Blucher. 1º ed. p 77, 1998.
- [55] LANÇAS, F.M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária: até onde? **Scientia Chromatographica**. v.3, p17-23, 2011.
- [56] MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. UHPLC. Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**. v.4, p197-207, 2012.
- [57] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- [58] LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. 278 p.

- [59] FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry-review. **Talanta**, v. 63, p. 1061–1067, 2004.
- [60] RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 2, n. 5, p. 771-780, 2004.
- [61] BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. D. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 3. ed. Campinas: Unicamp, 2007. 306, 307 p.
- [62] AGILENT ZORBAX COLUMN SELECTION GUIDE FOR HPLC. Disponível em: http://www.chromtech.com/Catalog/ProductLine/brochures/Zorbax_Guide. Acesso em 15 de setembro de 2014.
- [63] ALNAJJAR, A. O., IDRIS, A. M., ATTIMARAD, M V., ALDUGHAICH, A. M., ELGORACHE, R. E. E. Capillary eledrophoresis assay method for metoprolol and hydrochlorothiazide in their combined dosage form with multivariate optimization. **Journal Chromatographic Science**, v. 51, p. 92-97, 2012.
- [64] COMPONENTES DE UM APARELHO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. Disponível em www.shodex.net/index.php. Acesso em 9 de outubro de 2014.
- [65] BORKAR, R. M., RAJU, R., SRINIVAS, R., PATEL, P., SHETTY, S. K. I dentification and characterization of stressed degradation products of metoprolol using LC/Q-TOF-ESI-MS/MS and MSN experiments. *Biomedical Chromatography*, p 1-17, 2011.
- [66] LEITE, Flávio. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. 278 p.
- [67] RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F.C. M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 2, n.5, p. 771-780, 2004.
- [68] PROPERTIES. Disponível em: <http://www.chemicalize.org/estruure>. Acesso em: 15 jun. 2014.
- [69] SEGATO, M. P.; SILVA, C. R.; JARDIM, I.C.S.F. Capillary electrochromatography, stante of the art and perspectives. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 431-440, 2009.
- [70] QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F. Eletroforese capilar. **Chemkeys**, v.1, n.1, p. 1-9, 2001.