



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO MESTRADO

Química analítica verde em CLAE, controle de qualidade de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em medicamentos

Paulo Roberto Laranjeira dos Santos Claudino

Orientador: Carlos Martin Infante Córdova

Brasília, DF

(2025)

Paulo Roberto Laranjeira dos Santos Claudino

Orientador: Carlos Martin Infante Córdova

Brasília, DF

(2025)

COMUNICADO

Trabalho submetido à avaliação como parte da Defesa de mestrado

Banca examinadora

Prof. Dr. Carlos Infante Martin Córdova

Presidente (IQ – UnB)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu avô, Paulo Roberto dos Santos, que infelizmente não poderá estar presente fisicamente no dia da minha defesa, mas de quem espero ter herdado, além do nome, um décimo de seu caráter, força e dedicação à família e sua comunidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, especialmente, a minha família: Cláudia Roberta (mãe), Epaminondas Joaquim (pai), Paulo Roberto (avô), Sonia Maria (avó) e Paula Laranjeira (tia), pois sem o apoio deles essa jornada jamais seria trilhada e esse trabalho não existiria. A minha namorada, Bruna Moreira, por ser a melhor companheira possível e estar ao meu lado em todos os altos e baixos desse caminho, e aos seus pais Karla Figueiredo e Robson Anacleto que me tornaram parte de sua família e me acolheram muito bem.

Agradeço também ao professor Dr. Carlos Infante Martin Córdova, pela excelente orientação durante a execução do trabalho e por sua compreensão durante períodos difíceis da minha vida. Agradeço aos técnicos Diego Coelho Barroso dos Santos e Gabriel Ferreira da Silva Brito pelo extremo auxílio no manuseio e operação dos equipamentos envolvidos no trabalho, e a Central Analítica do Instituto de Química (CAIQ) representada na figura do técnico Alan Ribeiro Mól que emprestou colunas para auxílio da construção do trabalho.

Agradeço aos meus amigos: Larissa, Pedro, Marcelo, Daniele, Thiago, Gabriela e Marcus por aguentar as reclamações de um pesquisador em seus momentos mais complicados e pelo companheirismo que já apresentam há anos.

Além disso, agradeço ao Estado Brasileiro, na figura do Instituto de Química da Universidade de Brasília, por me fornecer acesso à educação pública e de qualidade e a todos indivíduos e organizações que se dedicam, em tempos de negacionismo científico e austeridade pública, a luta por uma Universidade pública realmente universal e bem estruturada.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CAIQ	Central Analítica do Instituto de Química
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCV	Doença Cardiovascular
ENL	Maleato de enalapril
EPA	<i>Environment Protection Agency</i>
FB	Farmacopeia Brasileira
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCT	Hidroclorotiazida
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
mmHg	Milímetros de mercúrio
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
UnB	Universidade de Brasília
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência, incidência e mortalidade relacionadas a CVD nas américas.....	13
Figura 2: Distribuição de pessoas com hipertensão por sexo em todas as capitais em 2023.....	14
Figura 3: Molécula Maleato de Enalapril.....	15
Figura 4: Molécula de Hidroclorotiazida.....	17
Figura 5: fator caudal e fator de assimetria.....	22
Figura 6: Parâmetros usados para o cálculo da resolução.....	23
Figura 7: Cromatograma da reprodução do método da FB para ENL.....	37
Figura 8: Cromatograma da reprodução do método da FB para HCT.....	38
Figura 9: Cromatograma da reprodução do método da USP para ENL.....	38
Figura 10: Cromatograma da reprodução do método da USP para HCT.....	39
Figura 11: Cromatograma da reprodução método USP- ENL utilizando os dois fármacos.....	40
Figura 12: Cromatograma da reprodução método FB- ENL utilizando os dois fármacos.....	40
Figura 13: Cromatograma da reprodução do método Uslu, Özden, 2013 com a coluna de 25 cm.....	41
Figura 14: Cromatograma da reprodução do método da literatura com a coluna de 15 cm.....	42
Figura 15: Cromatograma da reprodução do método da literatura utilizando EtOH como solvente B.....	43
Figura 16: Cromatogramas resultantes dos testes para estabilização da linha de base.....	44
Figura 17: Cromatogramas do teste 3 com a vazão de 1mLmin^{-1}	45
Figura 18: Cromatograma resultante do método otimizado no novo equipamento.....	46
Figura 19: Cromatogramas dos ensaios de seletividade.....	47
Figura 20: Curva analítica para o ENL e seu fator de correlação.....	48
Figura 21: Curva analítica para a HCT e seu fator de correlação.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparativo de métodos usando CLAE com detector UV para determinação de enalapril.....	16
Tabela 2: Comparativo de métodos usando CLAE para determinação de enalapril e hidroclorotiazida.....	18
Tabela 3 : Os 12 Princípios da Química Verde.....	28
Tabela 4: Os 12 Princípios da Química Analítica Verde.....	29
Tabela 5: Pontos de penalidade (PP) da Eco-Scale analítica em relação aos reagentes.....	30
Tabela 6: Pontos de penalidade (PP) da Eco-Scale analítica em relação a instrumentação.....	30
Tabela 7 : Esquema de gradiente método da literatura.....	33
Tabela 8 : Esquema de gradiente do método otimizado.....	33
Tabela 9 : Esquema de gradiente do método otimizado no novo equipamento.....	34
Tabela 10 : Esquema de gradiente do teste 1.....	43
Tabela 11 : Esquema de gradiente do teste 2.....	44
Tabela 12 : Esquema de gradiente do teste 3.....	44
Tabela 13 : Dados das injeções em triplicata para o ENL.....	47
Tabela 14 : Dados das injeções em triplicata para a HCT.....	48
Tabela 15 : Dados dos ensaios de repetibilidade para a HCT.....	50
Tabela 16 : Dados dos ensaios de repetibilidade para o ENL.....	50
Tabela 17: Dados dos ensaios de precisão para a HCT.....	51
Tabela 18: Dados dos ensaios de precisão para o ENL.....	51
Tabela 19: Resíduos da linha de regressão da HCT.....	52
Tabela 20: Resíduos da linha de regressão do ENL.....	52
Tabela 21: Dados do ensaio de recuperação para o ENL.....	53
Tabela 22: Dados do ensaio de recuperação para a HCT.....	54
Tabela 23: Dados das análises de amostras.....	54
Tabela 24: Pontuações do método da literatura estudado.....	55
Tabela 25: Pontuações do método otimizado.....	55
Tabela 26: Pontuações referente à instrumentação do método estudado.....	56
Tabela 27: Pontuações referente à instrumentação do método otimizado.....	56

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Fator k de retenção.....	21
Equação 2: Número de pratos teóricos.....	21
Equação 3: Altura de prato teórico.....	22
Equação 4: Fator caudal.....	22
Equação 5: Fator de assimetria.....	23
Equação 6: Resolução.....	23
Equação 7: Limite de detecção (LOD).....	26
Equação 8: Limite de quantificação (LOQ).....	26
Equação 9: $mAU = a[ENL] + b$	49
Equação 10: $mAU = a[HCT] + b$	49

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição que afeta grande parte da população adulta brasileira, e na maioria dos casos requer intervenção medicamentosa contínua. O controle de qualidade de medicamentos é uma etapa essencial no seu ciclo de produção, pois garante a segurança da população que o consome, portanto surge a necessidade de criar métodos para análise de medicamentos como hidroclorotiazida (HCT) e maleato de enalapril (ENL), uns dos mais utilizados no território urbano nacional, que sejam mais sustentáveis e em acordo com os princípios da química analítica verde. Nesse trabalho é realizada a substituição do solvente acetonitrila (ACN), embora muito tóxico, um dos mais comuns em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por etanol (EtOH), de baixa toxicidade, para realizar a separação e quantificação dos medicamentos citados em composições associadas. O método utiliza um gradiente de solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) e solvente EtOH (que varia de 7 a 60%), vazão da fase móvel a 1 mLmin^{-1} , temperatura do forno $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e coluna phenomenex®, 120A, $5 \mu\text{m}$, 4,6 mm de diâmetro, 150 mm, C18. O método exibe boa linearidade na faixa de $75 - 525 \mu\text{g mL}^{-1}$ para HCT e $360 - 840 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ENL com o R^2 acima de 0,99 para a HCT e de 0,98 para ENL, e os limites de detecção e quantificação são, respectivamente, para HCT $42,51 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $128,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para ENL $58,64 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $177,71 \mu\text{g mL}^{-1}$. A vazão menor que a sugerida por farmacopeias como a brasileira e a estado-unidense implica menor geração e resíduos, e a análise conjunta dos medicamentos, que não se faz presente nas literaturas citadas, permite ampliar a possibilidade de aplicações.

Palavras-Chave: Cromatografia; hidroclorotiazida; maleato de enalapril; química verde; química analítica

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension (SAH) is a condition that affects a large portion of the Brazilian adult population and, in most cases, requires continuous pharmacological intervention. Quality control of medicines is an essential step in their production cycle, as it ensures the safety of the population that consumes them. Therefore, there is a need to develop methods for the analysis of drugs such as hydrochlorothiazide (HCT) and enalapril maleate (ENL), among the most widely used in urban areas nationwide, that are more sustainable and aligned with the principles of green analytical chemistry. In this work, acetonitrile (ACN)—although highly toxic and one of the most used solvents in high-performance liquid chromatography (HPLC)—is replaced by ethanol (EtOH), a low-toxicity solvent, to perform the separation and quantification of the drugs in combined formulations. The method employs a gradient of phosphoric acid (H_3PO_4) solution and EtOH solvent (ranging from 7 to 60%), a mobile phase flow rate of $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, an oven temperature of $60 \text{ }^\circ\text{C}$, and a Phenomenex® C18 column (120 \AA , $5 \text{ }\mu\text{m}$, 4.6 mm diameter, 150 mm length). The method shows good linearity in the range of $75\text{--}525 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for HCT and $360\text{--}840 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for ENL, with R^2 values above 0.99 for HCT and 0.98 for ENL. The limits of detection and quantification are, respectively, $42.51 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $128.81 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for HCT, and $58.64 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $177.71 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for ENL. The flow rate, lower than that suggested by pharmacopoeias such as the Brazilian and United States Pharmacopoeias, results in reduced waste generation, and the simultaneous analysis of the drugs—absent from the cited literature—allows for expanded application possibilities.

Keywords: Chromatography; hydrochlorothiazide; enalapril maleate; green chemistry; analytical chemistry

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS	11
2.1.	OBJETIVOS GERAIS.....	11
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1.	HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	12
3.2.	MEDICAMENTOS	13
3.2.1	MALEATO DE ENALAPRIL	14
3.2.2	HIDROCLOROTIAZIDA	16
3.3.	CROMATOGRAFIA	18
3.3.1	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	20
3.3.1.1	RETENÇÃO	20
3.3.1.2	LARGURA DOS PICOS E NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS.....	21
3.3.1.3	FORMATO DO PICO	22
3.3.1.4	RESOLUÇÃO	23
3.4.	VALIDAÇÃO	23
3.4.1	SELETIVIDADE	24
3.4.2	LINEARIDADE.....	24
3.4.3	PRECISÃO	24
3.4.3.1	REPRODUTIBILIDADE	25
3.4.3.2	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA.....	25
3.4.3.3	REPETIBILIDADE	25
3.4.4	EXATIDÃO.....	25
3.4.5	LIMITE DE DETECÇÃO	25
3.4.6	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	26
3.4.7	ROBUSTEZ	26
3.4	QUÍMICA VERDE	27
3.4.1	HISTORICO E PRINCIPIOS GERAIS	27
3.4.2	QUÍMICA ANALÍTICA VERDE.....	28
3.4.2	MÉTRICAS EM QUÍMICA ANALÍTICA VERDE	29
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1.	PADRÕES E AMOSTRAS.....	30
4.2.	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	31

4.3.	MÉTODOS.....	31
4.3.1.	ESTUDOS DE METODOS SELECIONADOS	31
4.3.2.	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO.....	32
4.3.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	34
4.3.3.1	LINEARIDADE.....	34
4.3.3.2	REPETIBILIDADE	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.3.3.3	LIMITE DE DETECÇÃO (LOD).....	34
4.3.3.4	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	35
4.3.3.5	CURVA ANALÍTICA.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Estudos de métodos selecionados	37
5.2	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO	43
5.3	ESTUDOS DE VALIDAÇÃO	48
5.3.1	LINEARIDADE.....	48
5.3.2	REPETIBILIDADE	50
5.3.3	LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)	51
5.3.4	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)	54
6	CONCLUSÕES PARCIAIS	55
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	59
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	60

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) como a principal causa de morte prematura no mundo e estima que 1,28 bilhões de adultos entre as idades de 30 e 79 anos sofram da condição (*World Health Organization (WHO)*, 2023). Mesmo sendo perigosa a hipertensão, ou pressão alta, é comum, e constitui um dos principais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (Ministério da Saúde, 2001), e em 2018, no SUS (Sistema Único de Saúde), foram gastos mais de dois bilhões de reais em hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos em adultos acometidos pela doença (NILSON *et al.*, 2018).

Entre os muitos medicamentos mais utilizados para tratar a HAS se encontram o maleato de enalapril e hidroclorotiazida, das classes terapêuticas, anti-hipertensivo e diurético, respectivamente. Esses medicamentos podem ser encontrados no mercado nacional em associação ou separadamente, e em versão genérica (ANVISA, 2019). Para serem comercializados em território nacional, os medicamentos precisam fazer o registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), utilizando como base a Farmacopeia Brasileira (FB) (ANVISA, 2022), que segundo menciona o próprio site da ANVISA, é o código oficial farmacêutico do país, onde se estabelecem os requisitos mínimos de qualidade para insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos para a saúde, mesmo assim na FB e na farmacopeia europeia (*European Pharmacopoeia, EP*, 2023) não existe um método descrito para determinação desses fármacos em associação, apenas separados. Na farmacopeia estadunidense, USP (*United States Pharmacopeia*, 2023), existem métodos descritos para o controle de qualidade de medicamentos contendo associação dos dois fármacos, em ambas a técnica utilizada é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ou em inglês: *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), e mesmo em suas versões mais recentes, esses métodos ainda utilizam solventes tóxicos e substâncias perigosas.

A cromatografia líquida é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na atualidade, por apresentar boa precisão e exatidão, aplicabilidade a diversos tipos de amostras e por possuir uma vasta gama de equipamentos e acessórios disponíveis comercialmente. Essa técnica permite uma separação eficiente de diversas substâncias e uma posterior análise qualitativa e quantitativa, sendo amplamente utilizada na análise de medicamentos, fluidos biológicos, amostras ambientais (águas, sedimentos etc.). A avaliação de picos obtidos empregando padrões e amostras faz da técnica uma excelente opção analítica (SNYDER *et al.*, 2009).

O maleato de enalapril (ENL) e a hidroclorotiazida (HCTZ) eram, respectivamente, o quarto e o primeiro medicamentos para hipertensão mais utilizados em todo o território urbano brasileiro em 2016 (independentemente de estarem ou não em associação medicamentosa) (MENGUE *et al.*, 2016). Logo urge a necessidade do desenvolvimento de métodos que sigam os princípios da Química Analítica Verde para o controle de qualidade desses medicamentos vastamente utilizados pela população brasileira.

O termo Química Verde surgiu no início dos anos 1990, a partir do interesse pela preservação do meio ambiente, sendo um importante evento a criação da lei de prevenção à poluição pela EPA (*Environment Protection Agency*), nos EUA em 1990 (EPA, 2023), e desde então foi introduzido em diversas atividades, mas em 1998, Paul Anastas e John Warner definiram Química Verde e formularam seus 12 princípios (ANASTAS; EGHBALI, 2009). Porém, no geral, esses princípios se aplicam mais na indústria química a processos de síntese orgânica e tem pouca aplicação em laboratórios de Química Analítica.

Tendo isso em vista, alguns esforços foram feitos para adaptar esses princípios às práticas de um laboratório de Química Analítica, propondo-se os 12 princípios da Química Analítica Verde (GALUSKA *et al.*, 2013), dois quais podem ser destacados: redução ou eliminação de substâncias tóxicas (como solventes, reagentes etc.); minimização do uso de energia; gerenciamento adequado dos resíduos; e aumento da segurança do operador.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do trabalho é o desenvolvimento e validação de um método de HPLC com detector de UV para a determinação de maleato de enalapril e hidroclorotiazida (isoladamente ou em associação), em medicamentos (de referência, similares e genéricos), baseado nas recomendações da FB e seguindo princípios da química analítica verde, como a substituição de reagentes e solventes tóxicos, diminuição do consumo das amostras e geração de resíduos, e aumento da segurança do operador, e posteriormente realizar a avaliação dos métodos desenvolvidos com auxílio da métrica *Eco-Scale* ou outros métodos descritos na literatura.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Mostrar que é possível alterar o solvente de eluição ACN (acetonitrila) por EtOH (etanol) no método existente nas farmacopeias USP e FB e desenvolver um método viável para o controle de qualidade de medicamentos contendo ENL e HCT;
- ii. Comparar a metodologia já existente na farmacopeia USP com o método desenvolvido para determinação de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em medicamentos;
- iii. Realizar a validação do método desenvolvido e verificar a aplicação em amostras reais de medicamentos;
- iv. Avaliação dos métodos propostos utilizando a métrica *EcoScale* proposta por GALUSKA *et al.*, em 2012.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

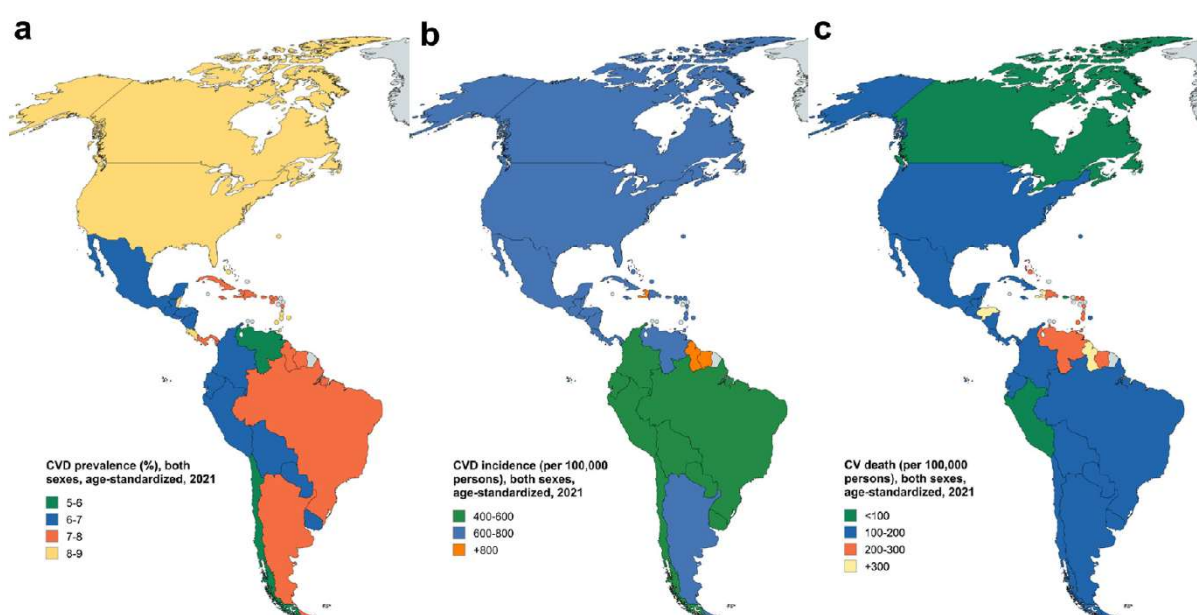
3.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

Existem diversas diretrizes de saúde em todo o mundo (BROUWERS *et al.*, 2021), cada uma com sua definição da HAS, no Brasil, por exemplo, o Ministério da Saúde (MS), define a condição como caracterizada pelos níveis de pressão arterial superiores a 140/90 mmHg (milímetros de mercúrio) (MINSAÚDE, 2024).

Em 2023 *World Health Organization* (WHO), ou OMS em português, elaborou um relatório geral sobre a hipertensão no mundo (*Global report on hypertension The race against a silent killer*, WHO, 2023), onde estima-se que 1,3 bilhões de pessoas possuem a doença em todo o mundo. Além de potencialmente fatal, estudos recentes mostram a correlação com o risco de doenças cardiovasculares (DCV) (LEWINGTON *et al.*, 2001; RAPSOMANIKI *et al.*, 2014; WHELTON *et al.*, 2020), como a HAS pode não apresentar sintomas específicos, muitos pacientes só descobrem dessa condição após sofrerem de alguma DCV relacionada.

Um estudo de Joseph *et al.*, 2025 oferece uma perspectiva de DCV nas américas (Fig.1)

Figura 1: Prevalência, incidência e mortalidade relacionadas a CVD nas américas

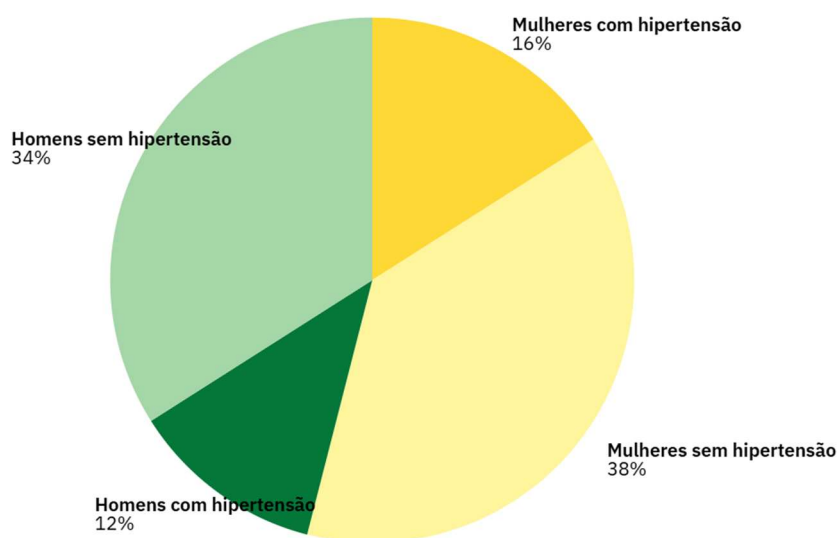


Fonte: JOSEPH, *et al.*, p. 3, 2025

Na figura 1 são apresentadas a prevalência de DCV, incidência de DCV e mortalidade cardiovascular, todos os dados padronizados por idade. Um dos motivos sugeridos pelo autor para o aumento desse tipo de doenças nas américas (especialmente a latina) é o envelhecimento da população.

O Observatório de Atenção Primária à Saúde da Umane (sociedade civil sem fins lucrativos) é uma plataforma que reúne mais de 16 diferentes bases de dados sobre hipertensão, sendo possível classificar as informações por estado, município, data e outros filtros, no site constam dados até 2023 (Fig. 2).

Figura 2: Distribuição de pessoas com hipertensão por sexo em todas as capitais em 2023



FONTE: Disponível em < <https://observatoriodaaps.com.br/tema/hipertensao>>

É preocupante observar que no 2023, 28.1% da população adulta das capitais brasileiras (considerando homens e mulheres), possuía hipertensão.

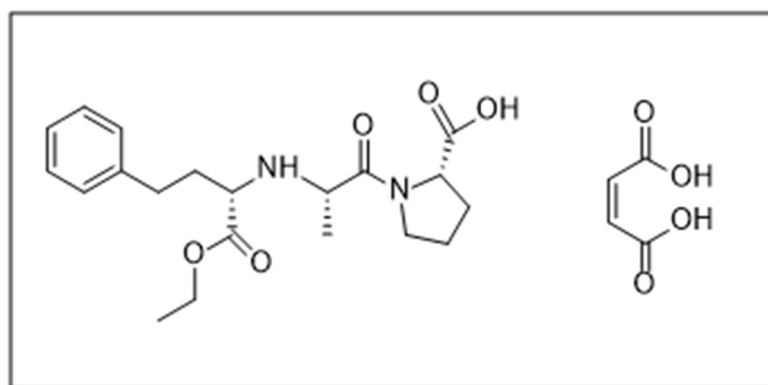
3.2. MEDICAMENTOS

3.2.1 MALEATO DE ENALAPRIL

Maleato de enalapril (Figura 3) é um medicamento da classe terapêutica dos anti-hipertensivos e é um inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina (ou na sigla em inglês, *ACE inhibitor*), após absorvido é hidrolisado e forma o enalaprilato, que é o inibidor (TODD; HEEL, 1986). Sua síntese foi publicada pela primeira vez em 1980 por Patchett *et al.*, e surgiu a partir de modelagem molecular com a intenção de melhorar a absorção oral do enalaprilato que era em torno de 3% (DAVIES *et al.*, 1984; ULM, 1983).

O medicamento se popularizou bastante por sua eficiência e atualmente é usado também para tratar doença renal crônica e falência cardíaca (HUSSAIN *et al.*, 2024), e no território urbano brasileiro era o quarto medicamento mais utilizado para hipertensão (independentemente de estar ou não em associação medicamentosa) (MENGUE *et al.*, 2016).

Figura 3: Molécula Maleato de Enalapril



FONTE: O autor.

Na literatura é possível encontrar diversas técnicas sendo empregadas em métodos para determinação de maleato de enalapril: espectrofotometria (BONAZZI *et al.*, 1997; BLAIH *et al.*, 2000; RAZAK *et al.*, 2002; AYAD *et al.*, 2003; RAHMAN N., HAQUE S., 2008; SHAMA

et al., 2011; GHERMAN *et al.*, 2013; GHERMAN *et al.*, 2015; ROSHNARA *et al.*, 2019), potenciometria (ABOUL-ENEIN *et al.*, 1999), polarografia e polarografia de pulso diferencial (RAZAK *et al.*, 2002; ELMALI *et al.*, 2003), eletroforese capilar (QIN *et al.*, 1992; HILLAERT S., VAN DEN BOSSCHE, 2001; GHERMAN *et al.*, 2015), espectrometria de absorção atômica (AYAD *et al.*, 2002; BARAKA *et al.*, 2008), análise por injeção em fluxo (FIA: *Flow Injection Analysis*) (AL-ARFAJ, 2003; EMARA *et al.*, 2003; AL-ARFAJ *et al.*, 2009), espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H (ZOPPI *et al.*, 2004; SHEN *et al.*, 2015), entre outros, porém a técnica mais utilizada é a CLAE, com quase 50% dos artigos encontrados na base de dados *Web of Science* empregando ela.

O fármaco é utilizado mundialmente e diversas farmacopeias importantes do mundo possuem ensaios descritos para o controle de qualidade do medicamento. Nas FB, USP e EP a técnica empregada para doseamento de comprimidos é a CLAE, utilizando uma mistura de ACN e uma solução tampão como fase móvel e variando a coluna em cada um dos casos. Também se encontram diversos métodos que empregam a CLAE para determinação quantitativa de maleato de enalapril na literatura, variando detectores e outras associações de equipamentos, por exemplo: CLAE com detector UV (Tabela 1) e CLAE acoplada ao espectrômetro de massas, porém nenhuma delas utilizando o etanol como eluente. (GU *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2009; GHOSH *et al.*, 2011; RAMUSOVIC *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2013).

Tabela 1: Comparativo de métodos usando CLAE com detector UV para determinação de enalapril

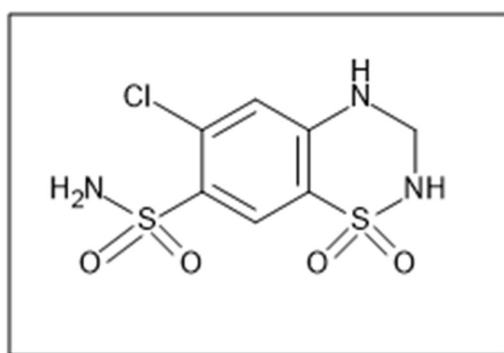
Autor	Coluna	Faixa de concentração	λ	(r2)	RSD (%)	LOD (μgml^{-1})	Recuperação (%)
BONAZZI <i>et al.</i> , 1997	5 μm Hypersil ODS (250mm \times 4.5 mm i.d.)	0.021–0.071 mg ml^{-1}	215 nm	0.9992	0.61	-	100.14
MILENKOVIĆ <i>et al.</i> , 2013	5 μm Hypersil ODS (250mm \times 4.5 mm i.d.)	0.6 - 3.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$	215 nm	0.999	0,55 - 3,52	0.181	90,42 - 101,44
BOUABDALLAH <i>et al.</i> , 2016	Supelco LC 18 (5 μm) (250 \times 4.6 mm i.d.)	20 – 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	215 nm	1	0,23 - 0,97	0,5	100,09 - 100,65
KOPALLA <i>et al.</i> , 2017	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150mm \times 4.6 mm, 5 μm),	25 - 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$	215 nm	0.9996	0,8 - 3,5	0.0045	98 - 102
GHERMAN <i>et al.</i> , 2021	Zorbax SB-C 18 (150 \times 4.6 mm, 5 μm)	10 – 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$	210 nm	0.9998	0,81 - 1,48	0.31	97,53 - 102,53

Fonte: o autor

3.2.2 HIDROCLOROTIAZIDA

A classe das tiazidas, o primeiro grupo de diuréticos oralmente efetivos e bem tolerados, surgiu na década de 1950 (ERNST; FRAVEL, 2022). A HCT (Figura 4), age nos rins, bloqueando o mecanismo de cotransporte de cloreto de sódio, e o efeito de abaixar a pressão arterial dos pacientes foi ligada a perda de sódio e outros metais via urina (BAINS; SMITH, 2011).

Figura 4: Molécula de Hidroclorotiazida



Fonte: o autor

Atualmente, as tiazidas continuam amplamente utilizadas no combate à hipertensão, mesmo tendo sido criadas há mais de 60 anos. Em 2008, a hidroclorotiazida foi a segunda medicação anti-hipertensiva mais prescrita nos Estados Unidos, com mais de 47 milhões de receitas prescritas, e em 2014, no Brasil, ela foi o medicamento mais utilizado no território urbano, com 23,9% dos pacientes fazendo utilização dela (DUARTE; COOPER-DEHOFF, 2010; MENGUE *et al.*, 2016). Devido sua ampla utilização por décadas, existem diversos métodos descritos na literatura para determinação de hidroclorotiazida, tanto individualmente quanto associada a outras substâncias em formulações farmacêuticas. Algumas das técnicas mais comumente utilizadas são: diferentes métodos utilizando eletrodos de pasta de carbono modificados (KARIMI-MALEH *et al.*, 2009; SALAMANCA-NETO *et al.*, 2014; BEITOLLAHI *et al.*, 2015; RUY *et al.*, 2015; MOHAMMADNAVAZ; GARKANI-NEJAD, 2023), métodos espectrofotométricos (REHM; SMITH, 1960; STOLARCZYK *et al.*, 2008; ALI *et al.*, 2024), fluorimétricos (XI *et al.*, 2005; ALI GHAFARLOO *et al.*, 2022; DENA *et al.*, 2023), em fluxo (OUYANG *et al.*, 1998; IDRIS *et al.*, 2012; LOURENCAO *et al.*, 2015; CALEGARI *et al.*, 2019; HANOOAN; QASSIM, 2024).

A técnica mais utilizada é a CLAE. Ao pesquisar na base de dados *Web of Science* os termos “*hydrochlorothiazide determination*” são obtidas 1050 publicações, ao adicionar o termo “*HPLC*” na busca, os resultados diminuem para 410 (40% das publicações da primeira busca). Quando adicionamos “*ethanol*” apenas 8 resultados retornam, desses 8, apenas 2 são métodos empregando CLAE e etanol como eluente, que é o escopo deste trabalho. Um trata da separação e determinação de atenolol e hidroclorotiazida por CLAE com detector de fluorescência (HEMDAN *et al.*, 2021), outro da separação e determinação de hidroclorotiazida, besilato de amlodipina e de losartana potássica (KANNAIAH *et al.*, 2023).

Na busca com os termos “*hydrochlorothiazide and enalapril maleate hplc determination*” na mesma base de dados, obtivemos 23 registros, com apenas 10 onde realmente separam as substâncias envolvidas no escopo deste trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Comparativo de métodos usando CLAE para determinação de enalapril e hidroclorotiazida

Autor	Faixa de linearidade	λ	r2	RSD (%)	LOD	Recuperação (%)
CARLUCCI <i>et al.</i> , 1993	0,5 - 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$	220 nm	0,9995	1,5	50 - 100 ng mL^{-1}	-
SHEKAR; SHINDE, 1997	40 - 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ENL) 50 - 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HCTZ)	226 nm	0,999	-	0,4 - 0,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$	99,69 - 99,74
AL-MOMANI, 2001	1 - 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ENL) 0,8 - 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HCTZ)	220 nm	0,999	2	24 - 36 ng mL^{-1}	97,2 - 101,5
DINÇ <i>et al.</i> , 2005	15 - 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ENL) 2,5 - 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HCTZ)	230 - 270 nm	0,99	1,78	-	100,5 - 105,4
ELSEBAEI; ZHU, 2011	0,14 - 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ENL) 0,60 - 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HCTZ)	215 nm	0,9997	1,32	17 - 42 ng mL^{-1}	97,2 - 97,52
DUBEY <i>et al.</i> , 2012	10 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ENL) 5 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HCTZ)	215 - 270 nm	-	0,29	0,23 - 0,71 $\mu\text{g mL}^{-1}$	98,76 - 100,37
USLU; ÖZDEN, 2013	0,27 - 399 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ENL) 0,26 - 399 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HCTZ)	210 nm	0,998	0,16	1,84 - 31,47 ng mL^{-1}	99,95 - 100,4
VISHNUVARDHAN <i>et al.</i> , 2013	-	210 nm	0,9995	0,2	-	99,85 - 100,84
HAMMOUDA <i>et al.</i> , 2014	1 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ENL) 0,05 - 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (HCTZ)	210 nm	0,9999	0,65	0,02 - 0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$	99,68 - 99,97
MOHAMMAD <i>et al.</i> , 2020	1 - 200 ng mL^{-1} (ENL) 5 - 200 ng mL^{-1} (HCTZ)	MS	0,9917	-	1 - 5 ng mL^{-1}	100,96 - 103,24

Fonte: o autor

Ao adicionar o termo “*ethanol*”, como foi feito anteriormente, nenhum resultado é exibido. É importante destacar que nenhum deles usa etanol como eluente.

3.3. CROMATOGRAFIA

A invenção da técnica cromatográfica é creditada ao russo M. S. Twsett (1872-1919), em seu trabalho de 1903 onde utilizou a técnica para separar pigmentos de plantas, mas desde a antiguidade existem relatos de técnicas similares sendo utilizadas em diversas aplicações (ETTRE; SAKODYNSKII, 1993). A primeira descrição de um fenômeno similar ao que hoje chamamos de cromatografia foi feita por um historiador romano, conhecido como Plínio, O Velho. Ele descreveu um método para averiguar a autenticidade de um sal que era utilizado como pigmento e fungicida que podia ser adulterado com pó de mármore. O sal era aplicado

em um papiro embebido de extrato vegetal, e se fosse autêntico o papiro se tornaria preto (PACHECO *et al.*, 2015).

Outra pessoa a utilizar técnicas similares antes de Twsett foi Jöhn Jacob Berzelius (1779-1848) utilizando um tubo com areia que funcionava como um filtro para a água que era adicionada no topo e saía embaixo após atravessar a areia. Porém foi mesmo o russo quem criou a técnica que hoje chamamos de cromatografia de coluna, que ele utilizou em seus estudos sobre a clorofila (PACHECO *et al.*, 2015). Richard Willstätter, professor de química orgânica em Munique e grande competidor de Twsett nos estudos sobre clorofila, contestou muitos dos resultados do russo, e suas afirmações junto com outras condições como idioma da publicação e contexto geopolítico mundial fizeram com que a técnica fosse pouco utilizada durante os próximos 25 anos (ENGELHARDT, 2004).

No final da década de 20 e início da de 30, com um grande interesse por parte dos pesquisadores nos compostos orgânicos presentes em produtos naturais aumentou o interesse na técnica desenvolvida por Twsett, e em 1941 Archer J.E Martin e Richard L.M. Synge, na Universidade de Cambridge, publicaram um trabalho propondo a cromatografia de partição, o que viria a ser um ponto de virada na história da técnica (WIXOM, 2001). Esse trabalho previu até mesmo a possibilidade do advento do que hoje conhecemos como cromatografia gasosa (CG). Além disso, em 1944, Consden *et al.*, desenvolveram a cromatografia em papel, que evoluiu para o que conhecemos hoje como cromatografia em camada delgada (CCD) ou em inglês *thin layer chromatography (TLC)*.

Atualmente, existem distintas maneiras de classificar uma técnica cromatográfica: ela pode ser planar (de camada delgada ou papel) ou em coluna, classificação referente ao meio físico onde vai acontecer a interação entre as fases móvel e estacionária. A classificação também pode ser feita pelo estado físico da FM (líquida, gasosa ou fluido supercrítico) e FE

(sólida, líquida ou fase ligada) e pelo princípio envolvido na separação dos analitos (POOLE, 2000).

3.3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Neste trabalho, a técnica empregada é a CLAE, que pode ser classificada como cromatografia de coluna, líquido-fase ligada (FM é um líquido enquanto a FE é um líquido imobilizado na superfície de um sólido inerte), de partição, onde os componentes da amostra estão distribuídos entre estar dissolvido na FM ou absorvido na FE, e de fase reversa, o que significa que a FM é mais polar do que a FE, logo, componentes mais apolares tendem a ficar retidos mais tempo do que componentes mais polares (POOLE, 2000).

Os primeiros aparelhos similares aos cromatógrafos modernos começaram a surgir no início da década de 1960, com os trabalhos de Csaba Horváth nos Estados Unidos e de Josef Huber na Europa, no final da década já existiam aparelhos comerciais (sobretudo sistemas da Water Associates e da Dupont), e então outros competidores começaram a produzir seus sistemas e as pesquisas envolvendo a CLAE começaram a ganhar força (SNYDER *et al.*, 2010).

Com o passar dos anos a técnica amadureceu cada vez mais, e hoje em dia os tempos de retenção podem ser cada vez menores, e as possibilidades de separação são muito diversas. Para o desenvolvimento de um bom método analítico utilizando essa técnica, é necessário entender como os parâmetros experimentais (temperatura, coluna, vazão, solvente), afetam a separação, e para auxiliar nisso existem alguns parâmetros teóricos explicados a seguir (SNYDER *et al.*, 2010).

3.3.1.1 RETENÇÃO

A retenção, mais comumente referida como tempo de retenção (t_r), é definida como o tempo entre a injeção da amostra e o aparecimento do topo do pico no cromatograma, significando que cada soluto vai ter seu tempo de retenção. Além disso, existe também o tempo (ou volume)

morto (t_0), que é o tempo entre a injeção e o aparecimento do pico de solvente, que não interage com a coluna. (SNYDER *et al.*, 2010).

O fator k de retenção, também chamado de fator capacidade por alguns autores, é a quantidade de soluto presente na FE dividida pela quantidade presente na FM, e pode ser matematicamente obtida como:

$$\text{Equação 1:} \quad k = \frac{t_r - t_0}{t_r}$$

Todos os parâmetros passíveis de ajuste durante um experimento utilizando CLAE podem afetar a retenção de um dado soluto: fluxo e composição da FM, temperatura e composição da coluna, e até mesmo a natureza do próprio soluto analisado.

3.3.1.2 LARGURA DOS PICOS E NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS

A largura dos picos é dada por W , e pode ser encontrada subtraindo o tempo em que o pico começa do tempo em que o pico termina. Essa largura é utilizada para obter o número de pratos teóricos (N), uma medida que informa a capacidade da coluna de fornecer picos estreitos, que também pode ser chamada de eficiência da coluna:

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

A altura do prato teórico é dada por H , e é uma medida de eficiência da coluna por unidade de comprimento dela (L). Logo, uma maneira de se aumentar o N é aumentando o tamanho da coluna.

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

Outras maneiras de afetar o N é fazendo mudanças em parâmetros que geram mudanças na largura das bandas, como: fluxo e viscosidade da FM, temperatura e o peso molecular da substância alvo.

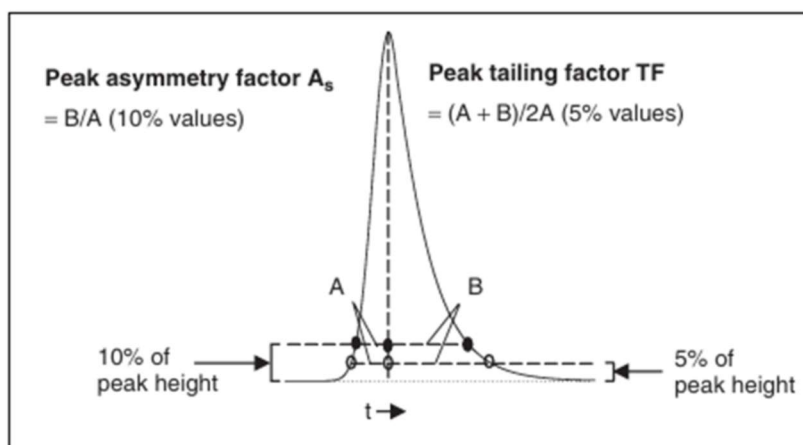
3.3.1.3 FORMATO DO PICO

Uma forma diferente de avaliar um pico de um cromatograma é por seu formato, um pico ideal se assemelha a uma curva gaussiana, e a presença de assimetrias como picos de cauda, de frente ou divididos indicam problemas na separação. Uma maneira de quantificar isso é o fator caudal (TF, do inglês *tailing factor*) que é dado por:

Equação 4:
$$TF = \frac{A+B}{2A}$$

Onde A e B são as distâncias, em 5% da altura do pico, das laterais do pico até o centro (representado pelo topo), como demonstrado na figura 5.

Figura 5: fator caudal e fator de assimetria



Fonte : SNYDER, *et al.*, 2010, p. 51

Outra forma é o fator de assimetria (a_s) mostrado na Equação 5:

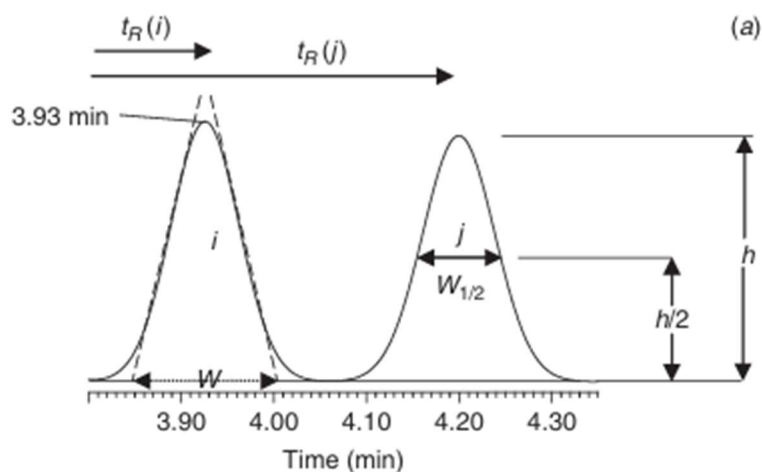
Equação 5:
$$a_s = \frac{B}{A}$$

Onde A e B são as distâncias, em 10% da altura do pico, das laterais do pico até o centro. Em ambos os casos, picos perfeitamente simétricos tem o valor de seus fatores igual a 1 e quanto maior o desvio desse valor, mais assimétrico o pico é.

3.3.1.4 RESOLUÇÃO

A resolução é uma medida relativa entre dois picos (Figura 6), que avalia o grau de separação deles. Quanto maior, melhor é a separação, mas valores altos demais geram tempos de retenção maiores do que o necessário, consumindo fase móvel e energia desnecessariamente. A retenção pode ser alterada mudando a FM, a temperatura, tamanho e tamanho de partícula da coluna. Seu cálculo é dado pela equação 6.

Figura 6: Parâmetros usados para o cálculo da resolução



Fonte : Fonte : SNYDER, *et al.*, 2010, p. 36

Equação 6:

$$R = \frac{2(t_{Rj} - t_{Ri})}{W_j + W_i}$$

3.4. VALIDAÇÃO

Para garantir a confiabilidade de um método analítico desenvolvido, é necessária a realização de diversos ensaios a fim de se garantir que o método é adequado ao que se propõe. Esse processo é chamado de validação, e diversas instituições e órgãos ao redor do mundo estabelecem seus critérios para a validação de métodos, como: ICH (*International Conference on Harmonization*), FDA (*US Food and Drug Association*), e farmacopeias, como a USP e a EP (SHABBIR *et al.*, 2007).

No Brasil, a adição de um novo método na FB, requer que a validação seja feita de acordo a RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) 166 de 2017 da ANVISA, e os parâmetros necessários para a realização da validação estão definidos de acordo com ela, como mostrado nos itens seguintes.

3.4.1 SELETIVIDADE

A seletividade é a demonstração da capacidade do método analítico de identificar e/ou quantificar o analito, inequivocamente, na presença de impurezas, diluentes e outros componentes da matriz. Para ensaios cromatográficos quantitativos, é necessário provar a pureza do sinal cromatográfico do analito através do método de adição de padrão, sem interferência de impurezas, diluentes, componentes da matriz ou produtos de degradação.

3.4.2 LINEARIDADE

Linearidade é a capacidade de um método analítico de apresentar resultados proporcionais à concentração do analito, essa linearidade deve ser observada em toda a faixa de concentração estabelecida pelo método. Para demonstrar a linearidade de um método é necessária a construção de uma curva analítica com no mínimo 5 concentrações diferentes, com soluções preparadas em triplicata e utilizando o padrão da substância analisada. Os dados que devem ser apresentados são: equação de regressão da reta, coeficientes de correlação e determinação, a investigação da homoscedasticidade dos dados e o gráfico de dispersão de resíduos. Os testes estatísticos devem ser realizados utilizando um nível de significância de 5%.

3.4.3 PRECISÃO

A avaliação da proximidade entre os resultados obtidos através de um determinado método é chamada de precisão, e ela é expressa em três fatores: reprodutibilidade, precisão intermediária e repetibilidade. Ela deve também ser demonstrada através do estudo da dispersão dos resultados, com o cálculo do desvio padrão relativo.

3.4.3.1 REPRODUTIBILIDADE

É a demonstração da proximidade de resultados obtidos em laboratórios diferentes utilizando o método em questão.

3.4.3.2 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

É a expressão da proximidade dos resultados de uma mesma amostra, num mesmo laboratório, com os ensaios sendo realizados em pelo menos dois dias diferentes e por dois analistas diferentes.

3.4.3.3 REPETIBILIDADE

É a avaliação de amostras que contemplem toda a faixa de trabalho estudada, sob a mesma condição de operação (mesma instrumentação e analista) em uma única corrida analítica. Devem ser utilizadas, pelo menos, 9 determinações, sendo uma triplicata em cada nível de concentração (baixo, médio e alto).

3.4.4 EXATIDÃO

O grau de concordância entre os resultados individuais de um método e um valor aceito como verdadeiro é chamado de exatidão, e deve ser demonstrada também com no mínimo 9 determinações, uma triplicata para nível de concentração. O estudo é feito através da análise de soluções padrão conhecidas, utilizando o método em questão.

3.4.5 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito presente em uma amostra, que possa ser detectada, mas não quantificada, e em métodos instrumentais pode ser dado pela razão sinal-ruído que deve ser maior ou igual a 2. O cálculo do LOD pode ser feito de acordo com a fórmula a seguir:

Equação 7:
$$LOD = \frac{3,3s}{a}$$

Onde a é o coeficiente angular da curva de analítica e s é o desvio padrão, que pode ser obtido de 3 diferentes maneiras: o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas onde foram utilizadas concentrações próximas do suposto LOD; o desvio padrão residual da linha de regressão; ou a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de uma determinada quantidade de amostras do branco,

3.4.6 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis. Para o caso de determinação via razão sinal-ruído, ela deve ser no mínimo de 10. O cálculo pode ser feito da seguinte forma:

Equação 8:
$$LOQ = \frac{10s}{a}$$

Onde os parâmetros são os mesmos utilizados para o cálculo do LOD.

3.4.7 ROBUSTEZ

A robustez é a medida de quanto um método pode resistir a pequenas mudanças intencionais de alguns parâmetros do método estudado. Nos métodos quantitativos, a robustez é calculada através dos mesmos critérios usados na exatidão. Para métodos utilizando a CLAE como técnica, podem ser estudados os seguintes parâmetros: variação do pH da FM; variação na composição da FM; diferentes colunas; temperatura do forno; e fluxo da FM.

3.5 QUÍMICA VERDE

3.5.1 HISTÓRICO E PRINCÍPIOS GERAIS

Na conferência Científica da Organização das Nações Unidas sobre Conservação e Utilização de Recursos (UNSCCUR – 1949), observou-se preocupação com a questão ambiental, repercutindo em 1968 com a publicação do Relatório Meadows (Relatório do Clube de Roma), mas só em 1980 o termo desenvolvimento sustentável é adotado como oficial pela Organização das Nações Unidas (ONU)(FARIAS, L. A.; FÁVARO, D.; 2011).

Em 1998, Paul Anastas e John Warner definem Química Verde como “design de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias perigosas” (ANASTAS; EGHBALI, 2009), apresentando os princípios (Tabela 3)

Tabela 3: Os 12 Princípios da Química Verde.

Nº	Princípio
1	Prevenção: é melhor evitar criar o resíduo, do que tratar ou limpar resíduos uma vez que foram produzidos
2	Economia atômica: processos sintéticos devem ser planejados a fim de maximizar a incorporação de todos os materiais usados no produto
3	Sínteses limpas: sempre que possível, processos sintéticos devem ser planejados para usar e gerar substâncias de baixa toxicidade para os humanos e o meio ambiente
4	Planejamento de substâncias mais seguras: produtos químicos devem ser elaborados de forma que maximizem seu efeito e minimizem sua toxicidade
5	Uso seguro de solventes e auxiliares: o uso de solventes e substâncias auxiliares (como agentes de separação, por exemplo) deve ser evitado, e inofensivo quando feito
6	Planejamento de eficiência de energia: os requerimentos energéticos de um processo químico devem ser avaliados em seus impactos econômicos e sociais, e os mesmos devem ser minimizados. Se possível, conduzir sínteses em temperatura e pressão ambiente
7	Uso de fontes renováveis: a matéria-prima utilizada nos processos deve ser renovável sempre que tecnicamente e economicamente possível
8	Redução de derivações: o uso de derivações (uso de grupos bloqueadores, proteção/desproteção, modificação temporária de processos químicos ou físicos) deve ser evitado quando possível, pois tais etapas requerem reagentes adicionais e podem gerar mais resíduo
9	Catálise: o uso de reagentes catalíticos (o mais seletivo possível) deve ser priorizado em relação ao uso de reagentes estequiométricos
10	Planejamento de degradação: produtos químicos devem ser feitos de maneira que após cumprirem sua função, seus produtos de degradação sejam o mais inofensivos possível e que não persistam no meio-ambiente
11	Análise em tempo real para prevenção de poluição: desenvolver melhores métodos analíticos que permitam monitoramento e controle em tempo real do processo antes da formação de substâncias nocivas
12	Química inerentemente mais segura para a prevenção de acidentes: as substâncias e a forma das substâncias presentes em um processo químico devem ser escolhidas a fim de minimizar o risco de acidentes químicos como liberações de gás, explosões e incêndios

FONTE: Traduzido e adaptado de ANASTAS; BEACH; MULVIHILL; ZIMMERMAN (2011, p. 273).

Esses 12 princípios são como um guia para cientistas aplicarem em seus projetos, e passam por todo o processo de uma síntese ou processo químico industrial, desde a escolha dos reagentes à disposição de resíduos.

3.5.2 QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

Como os princípios da Química Verde se aplicavam mais aos processos envolvidos na síntese de um composto, muitos deles não se implementavam diretamente na Química Analítica, mesmo com esses também podendo apresentar problemas ao meio ambiente e à saúde das pessoas. Com o intuito de atacar diretamente os problemas ambientais e toxicológicos relacionados às análises químicas, GALUSKA *et al.*, propuseram os 12 princípios da Química Analítica Verde em 2013 (Tabela 4).

Tabela 4: Os 12 Princípios da Química Analítica Verde.

Nº	Princípio
1	Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o tratamento de amostras.
2	Um pequeno número de amostras também pequenas é o ideal.
3	Medidas em situ devem ser realizadas
4	A integração de processos químicos e métodos analíticos economiza energia e reduz a geração de resíduos.
5	Métodos automatizados e miniaturizados devem ser escolhidos
6	Derivação deve ser evitada sempre que possível.
7	Deve ser evitada a formação de grandes quantidades de resíduos provenientes das análises, e esses resíduos devem ser gerenciados devidamente.
8	Métodos analíticos devem usar várias amostras e parâmetros de uma vez ao invés de um por vez, sempre que possível.
9	Eficiência energética também é um objetivo.
10	O uso de reagentes vindos de fontes renováveis deve ser priorizado.
11	Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou reduzidos.
12	A segurança do operador deve ser melhorada.

FONTE: Traduzido e adaptado de GALUSKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK (2013, p. 79).

3.5.3 MÉTRICAS EM QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

Existem algumas métricas relacionadas à Química Verde, como: economia atômica, eficiência de massa da reação, Fator E e produtividade de massa, porém a aplicação dessas métricas a processos analíticos é limitada pois foram planejadas com foco na síntese orgânica. Em 2006 VAN-AKEN *et al.*, propuseram uma métrica para sínteses orgânicas chamada *Eco-Scale*, nela uma reação dita ideal tem uma pontuação de 100 e usa compostos baratos, produz um rendimento de 100% em temperatura ambiente com risco mínimo para o ambiente e para o operador, e para cada parâmetro em que sua reação difere do ideal, uma penalidade é aplicada diminuindo a pontuação da reação.

Com base no modelo proposto por VAN-AKEN *et al.*, em 2012, GALUSKA *et al.*, propuseram uma versão da *Eco-Scale* que estude métodos analíticos, onde a análise ideal é tida como: uma análise onde os reagentes não ofereçam nenhum risco (físico, ambiental ou de saúde); onde a energia consumida por amostra é menor que 0.1 kWh e onde não sejam produzidos resíduos. E da mesma forma como na *Eco-Scale*, os pontos serão deduzidos de um total de 100, uma pontuação > 75 representa um excelente nível de “verde” na análise, > 50 representa um nível aceitável e < 50 um nível inadequado. Os pontos de penalidades (PP) estão relacionados a: quantidade e periculosidade dos reagentes envolvidos na análise; energia gasta por amostra, existência ou não de perigos ocupacionais e quantidade e forma de tratamento dos resíduos, como mostram as Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Pontos de penalidade (PP) da *Eco-Scale* analítica em relação aos reagentes

Parâmetro		Sub PP
Quantidade	< 10 ml (g)	1
	10 – 100 ml (g)	2
	> 100 ml (g)	3
Periculosidade	Nenhuma	0
	Periculosidade razoável	1
	Periculosidade alta	2
Total de PP = PP Quantidade x PP Periculosidade		

FONTE: Traduzido e adaptado de GALUSKA; KONIECZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK (2012, p. 65).

Tabela 6: Pontos de penalidade (PP) da Eco-Scale analítica em relação à instrumentação

Parâmetro		Total de PP
Energia consumida	≤ 0.1 kWh por amostra	0
	≤ 1.5 kWh por amostra	1
	> 1.5 kWh por amostra	2
Perigo ocupacional	Hermetização do processo analítico	0
	Emissão de vapores e gases	3
Resíduos (quantidade)	Nenhum	0
	< 1 mL	1
	1 – 10 mL	3
Resíduos (tratamento)	> 10 mL	5
	Reciclagem	0
	Degradação	1
	Passivação	2
	Ausência de tratamento	3

FONTE: Traduzido e adaptado de GALUSKA; KONIECZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK (2012, p. 65).

Cada reagente, pode ter mais de um perigo associado, e cada um desses deve contar, então o Sub PP de um reagente em relação a sua periculosidade pode ser maior do que 2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PADRÕES E AMOSTRAS

As soluções padrão foram preparadas a partir de padrões de referência certificados e adquiridos através da Sigma-Aldrich®. Foram preparadas soluções de concentração 1 mg mL⁻¹, com tampão fosfato e metanol 75%/25%, a partir dessas soluções foram preparadas as amostras diretamente nos vials para injeção, avolumando com o mesmo solvente.

O medicamento foi obtido em farmácias, em versão genérica, do Laboratório Biolab por se tratar da versão menos custosa contendo os dois fármacos em uma só formulação (existem duas, a outra sendo 10 mg de ENL e e 25mg de HCT) sendo maleato de enalapril 20 mg por comprimido e hidroclorotiazida 12,5 mg. Eram pesados 20 comprimidos e a massa média obtida, então era pesada a massa equivalente a 1,25 comprimidos, e uma solução de aproximadamente 1 mg mL⁻¹ de ENL era preparada, também com tampão fosfato e metanol

75%/25%, resultando numa concentração de 0,625 mg mL⁻¹ de HCT, mantendo a proporção presente no comprimido, assim, essa solução era então filtrada e a partir dela eram feitas as amostras. Esse processo foi repetido em todos os diferentes dias de análise, devido a impossibilidade de usar uma solução depois de um dia de armazenamento em consequência da degradação do ENL.

4.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

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

As colunas cromatográficas empregadas foram:

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

Coluna cromatográfica empacotada 2, Brownlee Analytical®, 5μm, 4,6 mm de diâmetro, 150 mm, C8.

Coluna cromatográfica empacotada 3, Brownlee Analytical®, 5μm, 4,6 mm de diâmetro, 250 mm, C18

Para o preparo das amostras, padrões, soluções e outros, foram utilizados equipamentos e vidrarias comuns de laboratório: balança analítica, ultrassom, pipetas automáticas, balões volumétricos, béqueres, espátulas, bastões de vidro, provetas etc.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 ESTUDOS DE MÉTODOS SELECIONADOS

O primeiro passo a ser realizado foi a reprodução dos métodos para maleato de enalapril e hidroclorotiazida presentes na FB e USP, totalizando 4 métodos diferentes (1 para cada

substância em cada farmacopeia). Cada método foi então repetido, mas ao invés de submeter amostras com os fármacos isolados, foram preparadas amostras contendo os dois fármacos, a fim de avaliar se algum dos métodos já apresentaria um nível razoável de separação das substâncias estudadas que pudesse ser apenas otimizada sem a utilização de gradientes, uma vez que os métodos das farmacopeias são todos isocráticos.

Outra reprodução executada foi do método de Uslu e Özden, 2013, que utiliza a coluna C18 (mesma FE disponível para a realização deste trabalho, porém com o dobro do tamanho), mantém a vazão da FM a 2 mL min⁻¹ e a temperatura do forno a 60°C. O método utiliza um gradiente dos solventes A (tampão fosfato pH 2,5) e B (ACN) com as seguintes proporções: em 0 minutos 95% A e 05% B; em 2 minutos 80% A e 20% B; em 4 minutos 40% A e 60% B mantendo até 5 minutos e por fim em 6 minutos retorna à condição inicial (Tabela 7).

Tabela 7: Esquema de gradiente método da literatura.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	95	5
2	80	20
4	40	60
5	40	60
6	95	5

FONTE : Valores retirados de Uslu, B.; Özden, T.; p. 1488, 2013

4.3.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO

O método de Uslu, B.; Özden, T., foi realizado novamente, mas substituindo ACN por EtOH. A partir desse método então foram realizadas as otimizações a fim de adaptar o novo método para a coluna mais curta e o novo solvente. O método otimizado então utiliza a Coluna cromatográfica empacotada C18 de 15 cm, vazão da FM a 1 mL min⁻¹ e a temperatura do forno a 60°C, porém o solvente B foi mudado para EtOH, além disso, as condições do gradiente são: em 0 minutos 93% A e 07% B; entre 1 minuto e 30 segundos e 1 minuto e 42 segundos ela muda para 50% A e 50% B, proporção na qual permanece até 4 minutos e 54 segundos; então

começa a descer até que em 5 minutos e 6 segundos esteja novamente na condição inicial, que é mantida até 10 minutos para estabilização da linha base para a próxima injeção (Tabela 8).

Tabela 8 : Esquema de gradiente do método otimizado

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	93	7
1.5	93	7
1.7	50	50
4.9	50	50
5.1	93	7

Porém após esse estágio do desenvolvimento do método, foi necessário realizar a troca do equipamento que estava sendo utilizado para a pesquisa, uma vez no novo equipamento, mais moderno e de construção única e não modular como o anterior, foram necessários alguns pequenos ajustes no esquema de gradiente final para se obter resultado similar aos obtidos anteriormente, esse esquema está descrito na tabela 9.

Tabela 9 : Esquema de gradiente do método otimizado no novo equipamento

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	93	7
1.5	93	7
2.1	40	60
4.2	40	60
4.8	93	7

4.3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Além dos ensaios de otimização a serem apresentados, foram feitos também os ensaios para validar o método, ou seja, atestar, através de uma série de experimentos e cálculos estatísticos, a confiabilidade do método apresentado, em separar e quantificar, com utilização do solvente EtOH, tanto o ENL como o HCT presentes em uma mesma formulação.

4.3.3.1 SELETIVIDADE

Foi preparada uma solução mãe tanto de amostra e quanto de padrão, e a partir delas preparadas dois *vials* para injeção, um contendo apenas a solução de amostra do medicamento e o outro com o dobro de concentração, porém feito a partir do padrão e das amostras.

4.3.3.2 LINEARIDADE

Foi realizada uma curva analítica exploratória para definir a melhor faixa de linearidade do método, e a partir dela foi definida a faixa a ser testada e validada. Foram preparadas as soluções estoque do padrão de ambos os fármacos de concentração 1 mg L^{-1} e a partir delas feitas soluções contendo ambos para análise. As concentrações estudadas variaram de $30 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a $1000 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ para determinação da faixa de linearidade.

4.3.3.3 PRECISÃO

4.3.3.3.1 REPETIBILIDADE

Foram realizadas nove determinações, três em cada nível de concentração abrangidos na faixa de linearidade (baixo, médio e alto), sob as mesmas condições de operação, mesmo equipamento e mesmo analista para avaliar a repetibilidade do método. Além disso foi realizado o teste t para averiguar se há diferença estatística entre os resultados encontrados e os valores presentes no rótulo do medicamento.

4.3.3.3.2 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Foram realizadas análises em triplicata de uma mesma amostra no nível de concentração médio da curva analítica em 3 dias seguidos, pelo mesmo analista, em uma mesma corrida e com o mesmo equipamento. Foram calculados os valores de desvio padrão relativo (DPR) intra e inter-dia para verificar se há diferença significativa no resultado obtido em dias diferentes a fim de determinar a possibilidade ou não do armazenamento da amostra para análise em outros dias.

4.3.3.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

O limite de detecção foi obtido de acordo com a equação 7, utilizando como “s” o desvio padrão residual das linhas de regressão de cada fármaco.

$$\text{Equação 7:} \quad LD = \frac{3,3s}{a}$$

4.3.3.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

O limite de quantificação foi calculado com a equação 8, também utilizando com o desvio padrão residual das linhas de regressão de cada fármaco.

$$\text{Equação 8:} \quad LQ = \frac{10s}{a}$$

4.3.3.6 CURVA ANALÍTICA

Após a realização de uma curva exploratória para determinar a linearidade, foi então construída uma curva analítica usando os padrões dos dois fármacos, com triplicatas em cada ponto. A partir dos dados obtidos com a curva, foram calculados os valores de concentração das amostras analisadas.

4.3.3.7 EXATIDÃO

Para determinar a exatidão, foram preparados padrões em 3 níveis de concentração diferentes, foi calculada a quantidade de analito adicionada e então foram feitos os ensaios de

recuperação para determinar a quantidade recuperada de analito, foram calculados média e DPR para cada nível de concentração

4.3.4 AVALIAÇÃO DO MÉTODO UTILIZANDO A ECO-SCALE

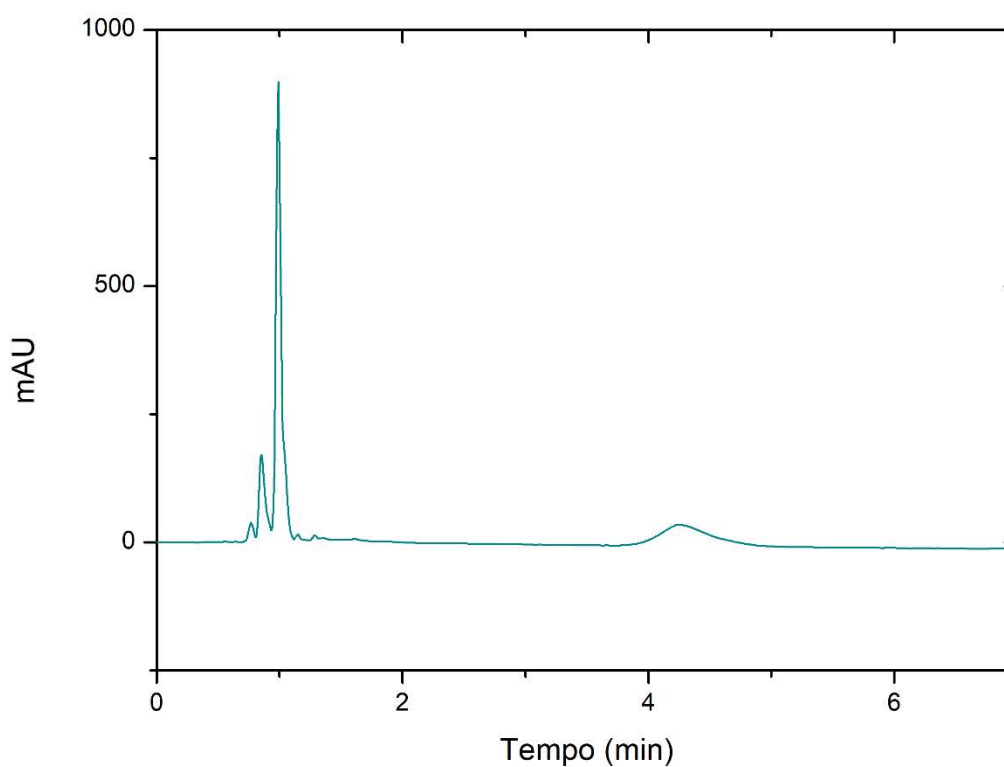
Com o intuito de metrificar as mudanças feitas que resultaram no método otimizado final, foi feita a avaliação dele e do método da literatura utilizado como referência utilizando a *Analytical Eco-Scale* proposta por GALUSZKA et. Al em 2012. Foram utilizadas as Tabelas 5 e 6 para determinar as pontuações referentes aos reagentes e à instrumentação, os perigos associados aos solventes e aos fármacos analisados foram consultados nas folhas de segurança das respectivas substâncias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS DE MÉTODOS SELECIONADOS

Foi realizada a reprodução do método para ENL presente na FB, o cromatograma resultante é apresentado na figura 7. Coluna C8 de 15 cm, detector em 215 nm, temperatura do forno mantida em 50 °C e vazão da FM a 2 mL min⁻¹.

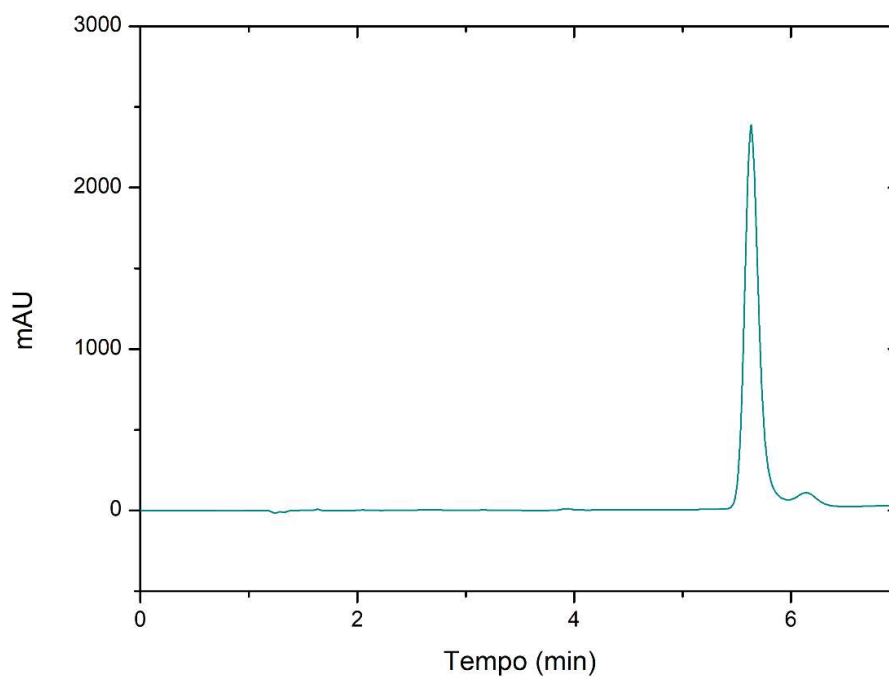
Figura 7: Cromatograma da reprodução do método da FB para ENL



FONTE: o autor.

Reprodução do método para HCT presente na FB. Coluna C18 de 25 cm, detector em 254 nm, temperatura ambiente do forno e vazão da FM a 2 mL min⁻¹ (Figura 8).

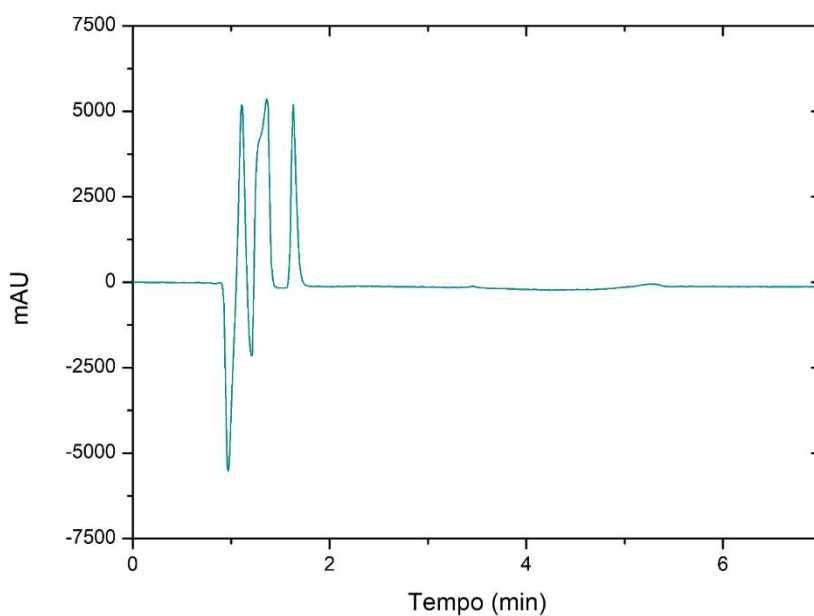
Figura 8: Cromatograma da reprodução do método da FB para HCT



FONTE: o autor.

Reprodução do método para ENL presente na USP. Coluna C8 de 25 cm, detector em 215 nm, temperatura do forno em 65 °C (e vazão da FM a 1,5 mL min⁻¹ (Figura 9).

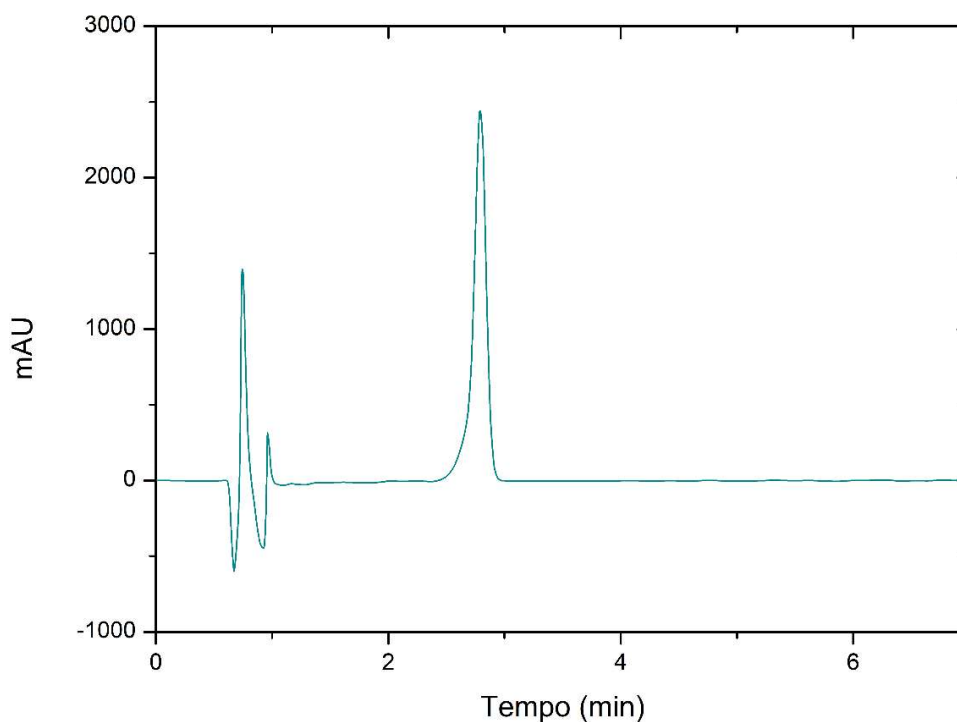
Figura 9: Cromatograma da reprodução do método da USP para ENL



FONTE: o autor.

Reprodução do método para HCT presente na USP. Coluna C8 de 25 cm, detector em 254 nm, temperatura do forno em 30 °C e vazão da FM a 2,5 mL min⁻¹ (Figura 10).

Figura 10: Cromatograma da reprodução do método da USP para HCT

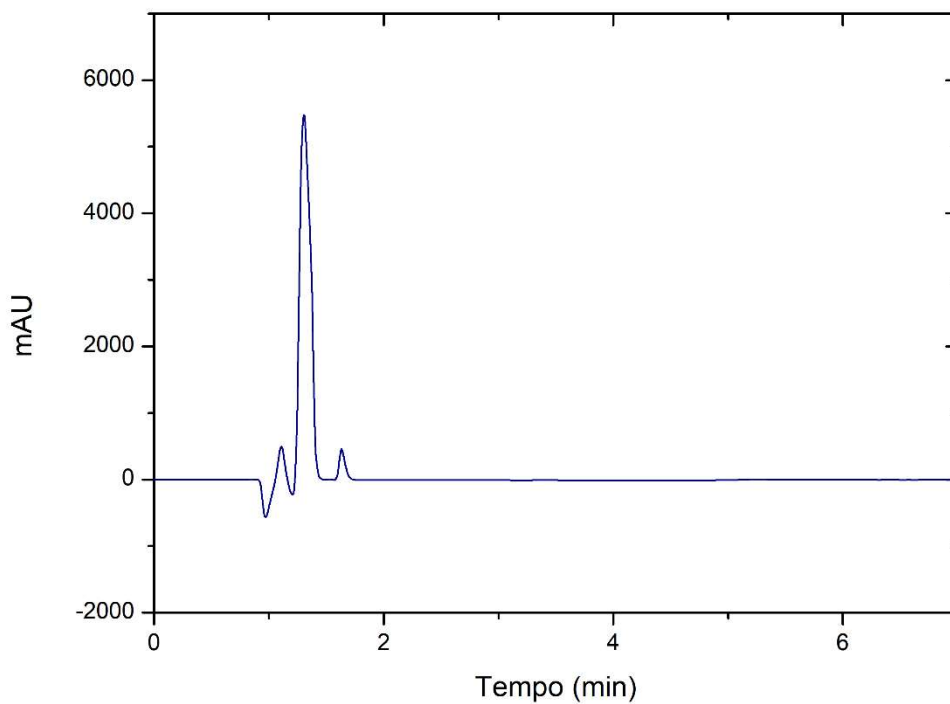


FONTE: o autor.

A partir dos quatro cromatogramas é possível OBSERVAR que apesar dos quatro métodos apresentarem bom funcionamento, e com, fases móveis similares, (tampão fosfato e acetonitrila), o preparo de amostra difere em ambos os casos, com a USP empregando maior porcentagem de solvente orgânico para ambos os fármacos, resulta em uma melhor definição e resolução dos picos, o que justificou a escolha desse preparo de amostra para o método final. O maior impacto no preparo pode ser observado no caso do ENL, com o pico com formato mais fino com a metodologia da USP.

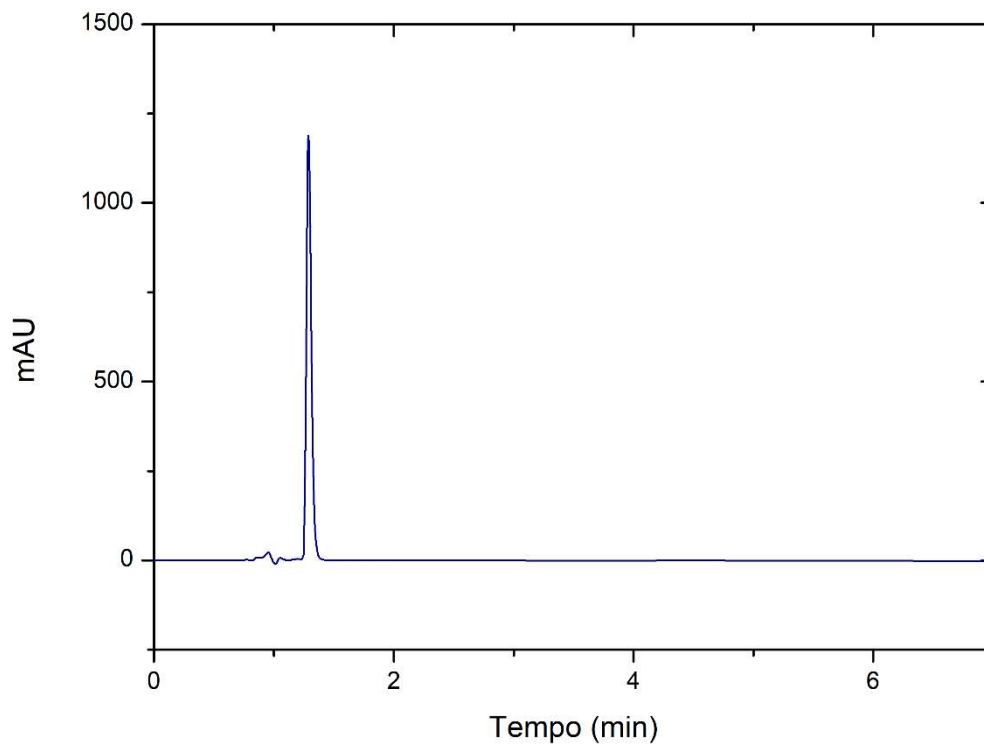
Foram testados então os métodos para ENL da USP (Figura 11) e FB (Figura 12) utilizando um mix dos dois fármacos, com intuito de avaliar a possibilidade de separá-los utilizando um método isocrático pré-estabelecido.

Figura 11: Cromatograma da reprodução método USP- ENL utilizando os dois fármacos



FONTE: o autor.

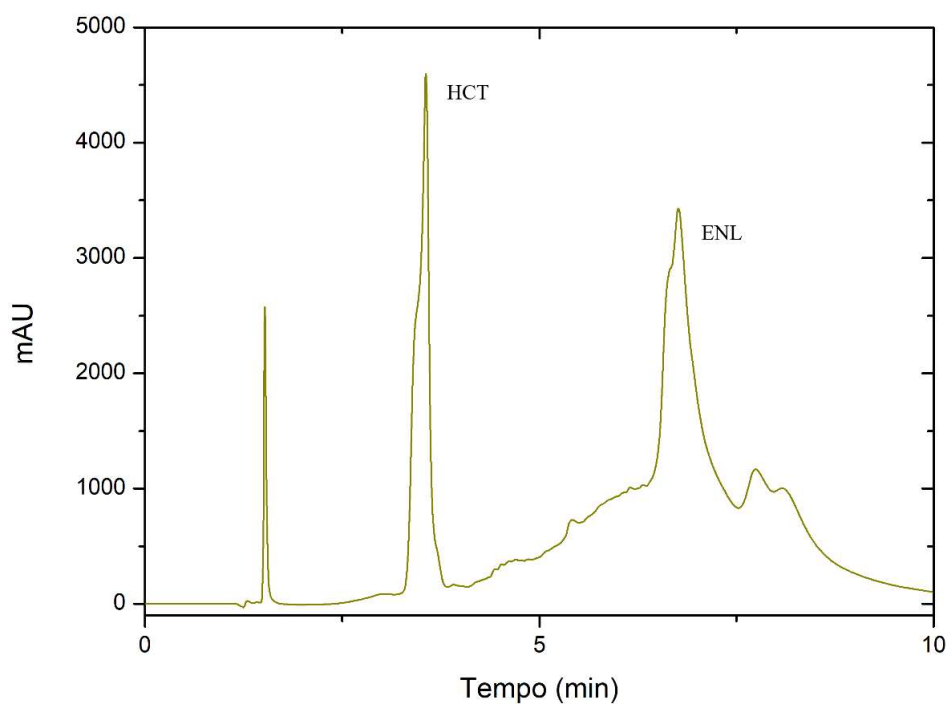
Figura 12: Cromatograma da reprodução do método FB-ENL utilizando os dois fármacos



FONTE: o autor.

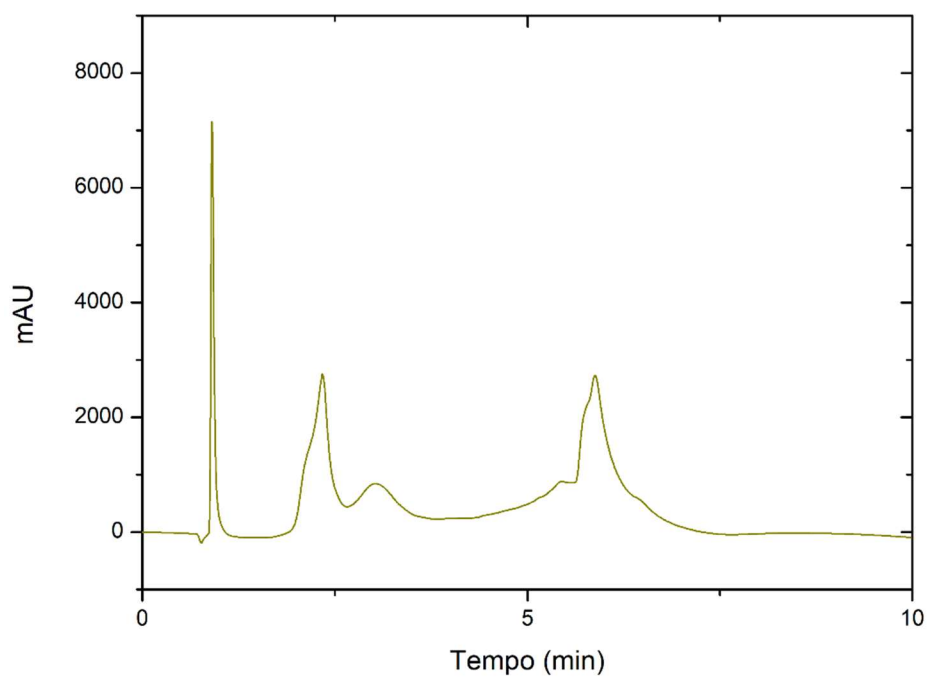
A separação por método isocrático não foi possível, foi feita, então, a opção por um método com gradiente de solventes, e foi reproduzido o trabalho de Uslu, B. e Özden, T. de 2013, primeiro com uma coluna C-18 de 25 centímetros fornecida pela Central Analítica do Instituto de Química (CAIQ-UnB) (Figura 13) e posteriormente com a que foi utilizada para o desenvolvimento do método, uma C-18 de 15 centímetros (Figura 14).

Figura 13: Cromatograma da reprodução do método Uslu, Özden, 2013 com a coluna de 25 cm



FONTE: o autor.

Figura 14: Cromatograma da reprodução do método Uslu, Özden, 2013 com a coluna de 15 cm



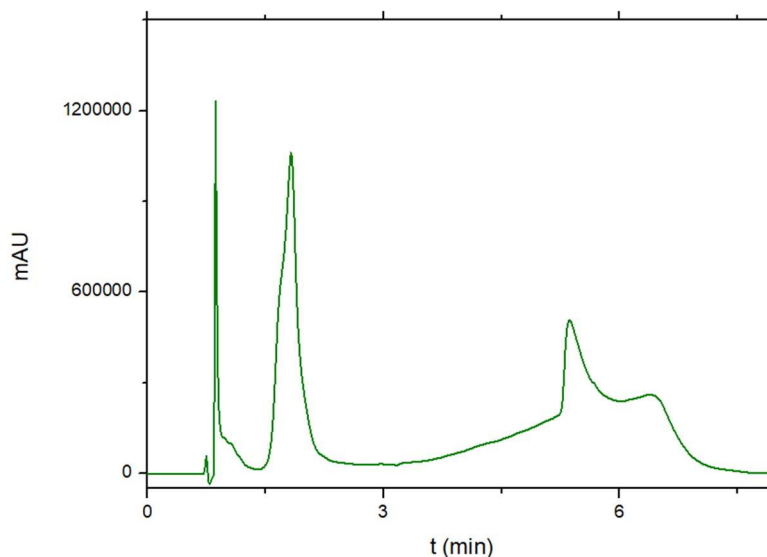
FONTE: o autor.

Mesmo apresentando alguns problemas devido a alteração de coluna, a separação foi atingida, o ponto de partida tomado para a adaptação do método seria desde estes últimos testes.

5.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO

O método foi repetido substituindo o solvente B por etanol (Figura 15).

Figura 15: Cromatograma da reprodução método Uslu e Özden de 2013 utilizando EtOH como solvente B



FONTE: o autor.

A separação foi alcançada, mas para tentar melhorar a linha base, três diferentes composições e tempos de gradiente foram testados a fim de aumentar a inclinação do aumento de solvente para estabilização mais rápida da linha de base (Figuras 16). As condições do gradiente desses testes estão descritas nas tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10 : Esquema de gradiente do teste 1

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	90	10
1,3	90	10
2	50	50
4	50	50
4,5	90	10
6	90	10

FONTE: o autor.

Tabela 11 : Esquema de gradiente do teste 2

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	92	8
1,3	92	8
2	50	50
4	50	50
4,5	92	8
6	92	8

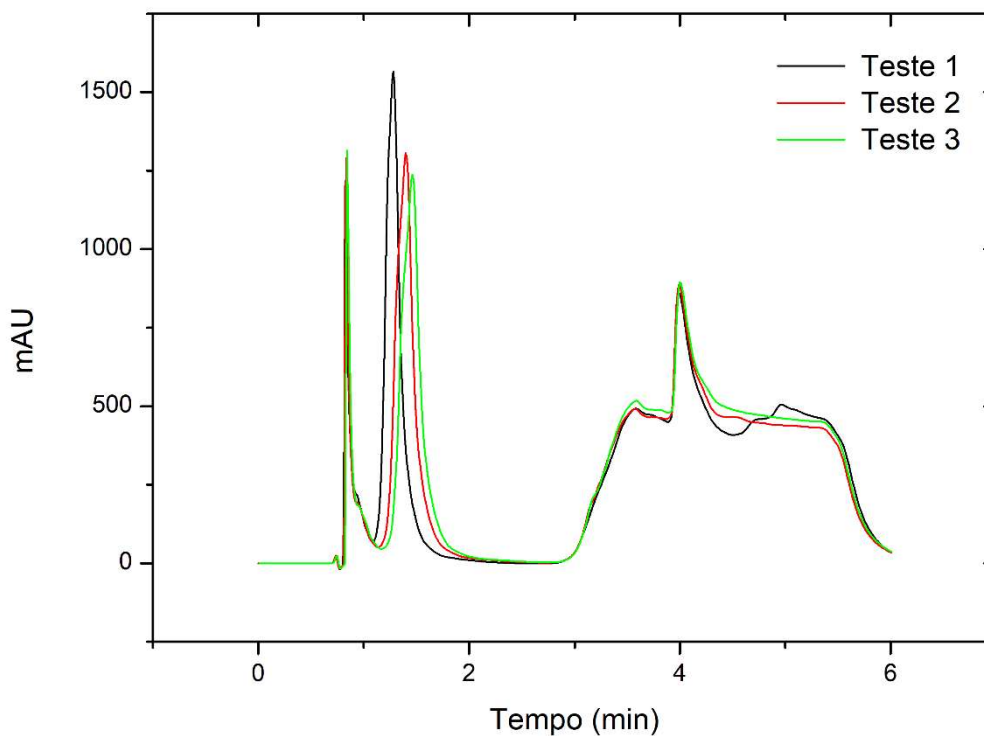
FONTE: o autor.

Tabela 12 : Esquema de gradiente do teste 3

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	93	7
1,3	93	7
2	50	50
4	50	50
4,5	93	7
6	93	7

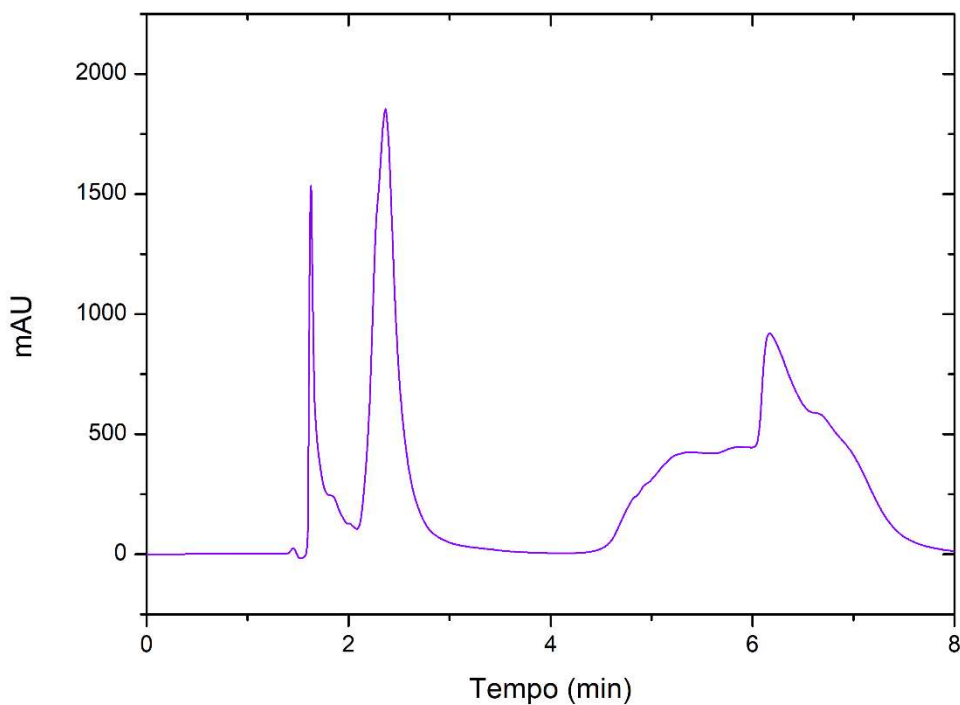
FONTE: o autor.

Figura 16: Cromatogramas resultantes dos testes para estabilização da linha de base



FONTE: o autor.

Com a obtenção desses dados, foram mantidas as condições do gradiente do teste três, por ter apresentado melhor resolução entre o pico da HCT com o pico do volume morto (que é gerado pelo ácido maleico advindo do maleato de enalapril) e realizada a mudança para a vazão da FM de 1 mL min^{-1} para tentar melhorar ainda mais essa resolução e deixar o método mais de acordo com os princípios da QAV. Isso acabou gerando outro problema, o atraso do pico do ENL, o deixando muito próximo do momento em que a linha base diminui devido o restabelecimento das condições iniciais da corrida (Figura 17), além disso a separação da HCT e do pico do volume morto ainda não estava satisfatória.

Figura 17: Cromatogramas do teste 3 com a vazão de 1mLmin^{-1} 

FONTE: o autor.

Foram feitos ajustes apenas nos tempos do gradiente, demorando um pouco mais para aumentar a concentração, para não interferir na saída da HCT e aumentando o período de concentração máxima do EtOH. Os resultados foram adequados, observado pela melhora visual no formato dos picos e uma linha de base mais horizontal. Porém após esse estágio do desenvolvimento do método, foi necessário realizar a troca do equipamento que estava sendo utilizado para a pesquisa, uma vez no novo equipamento foram feitos novos ajustes, já que o sistema total de tubos do novo equipamento é menor (por se tratar de um modelo de equipamento não modular), alguns tempos foram encurtados e o resultado obtido é mostrado na Figura 18, e foi esse o método utilizado no trabalho.

Figura 18: Cromatograma resultante do método otimizado no novo equipamento

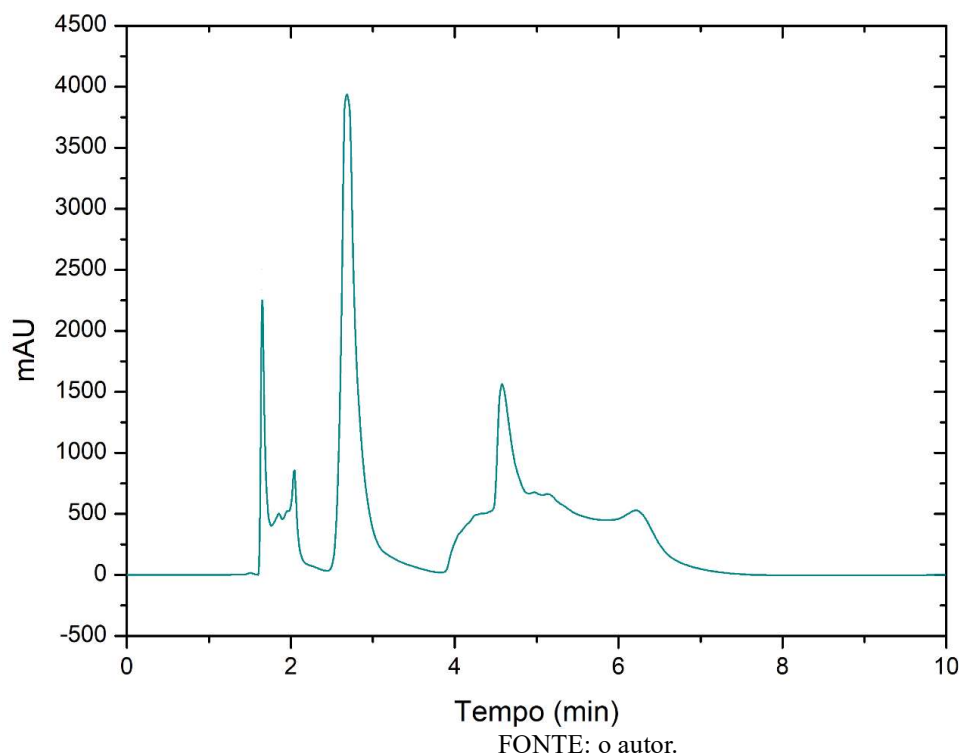


Tabela 9 : Esquema de gradiente do método otimizado no novo equipamento

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	93	7
1.5	93	7
2.1	40	60
4.2	40	60
4.8	93	7

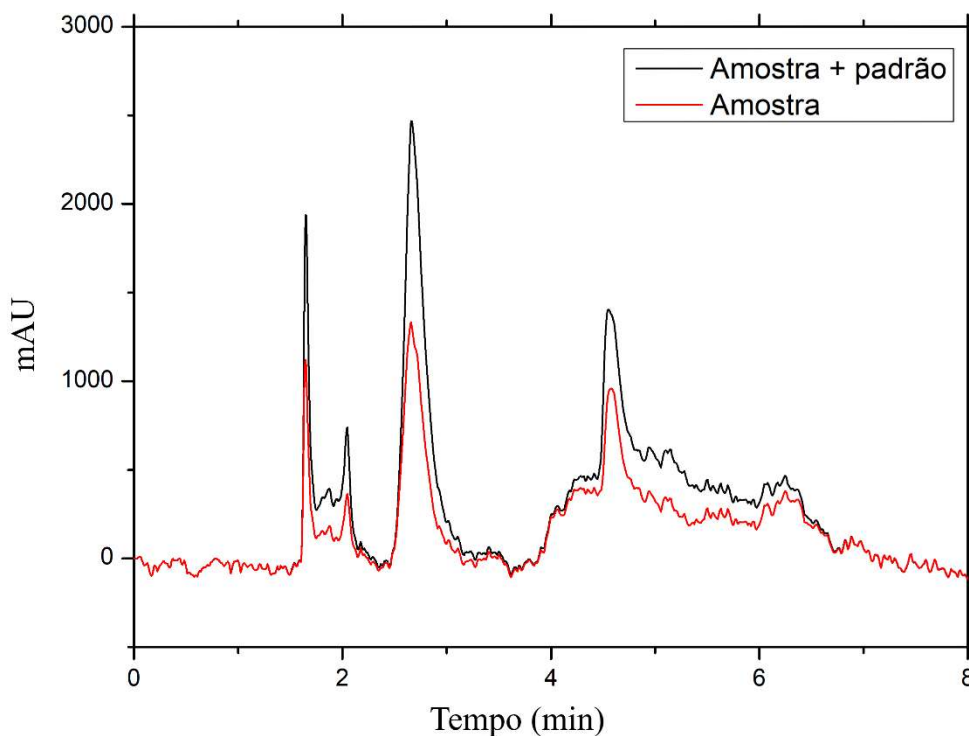
FONTE: o autor.

5.3 ESTUDOS DE VALIDAÇÃO

5.3.1 SELETIVIDADE

A figura 19 contém os dois cromatogramas oriundos da amostra pura e da amostra com padrão, mostrando a seletividade do método para os compostos estudados.

Figura 19: Cromatogramas dos ensaios de seletividade



FONTE: o autor.

5.3.2 LINEARIDADE

Os dados obtidos pelas injeções dos padrões em triplicata estão descritos nas tabelas 13 e 14, as figuras 20 e 21 mostram as curvas analíticas do ENL e da HCT respectivamente e seus fatores de correlação, além disso, as equações 9 e 10 são as utilizadas para o cálculo das concentrações dos fármacos.

Tabela 13: Dados das injeções em triplicata para o ENL

Concentração ENL ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Média da área (mAU)	Desvio padrão (mAU)	Desvio padrão relativo (%)
360	15521268	571345	3,68
480	21697757	801258	3,69
600	25973538	544817	2,10
720	29497439	391076	1,33
840	33441862	1486962	4,45

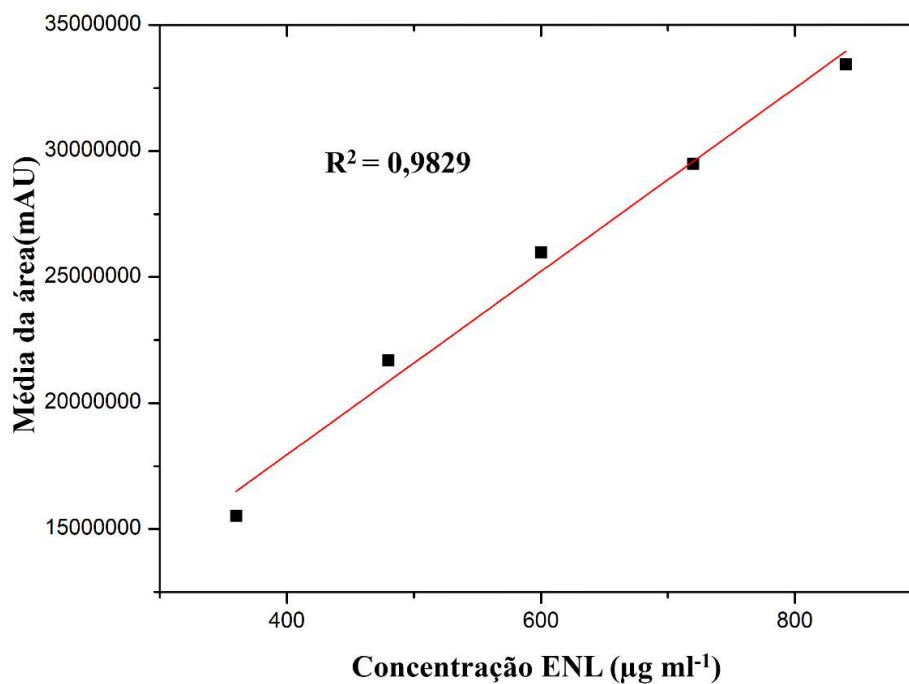
FONTE: o autor.

Tabela 14: Dados das injeções em triplicata para a HCT

Concentração HCT ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Média da área (mAU)	Desvio padrão (mAU)	Desvio padrão relativo (%)
75	7664210	153118	1,99
165	15023237	349157	2,32
255	22044234	531723	2,41
390	37698908	616830	1,64
525	51328888	1001706	1,95

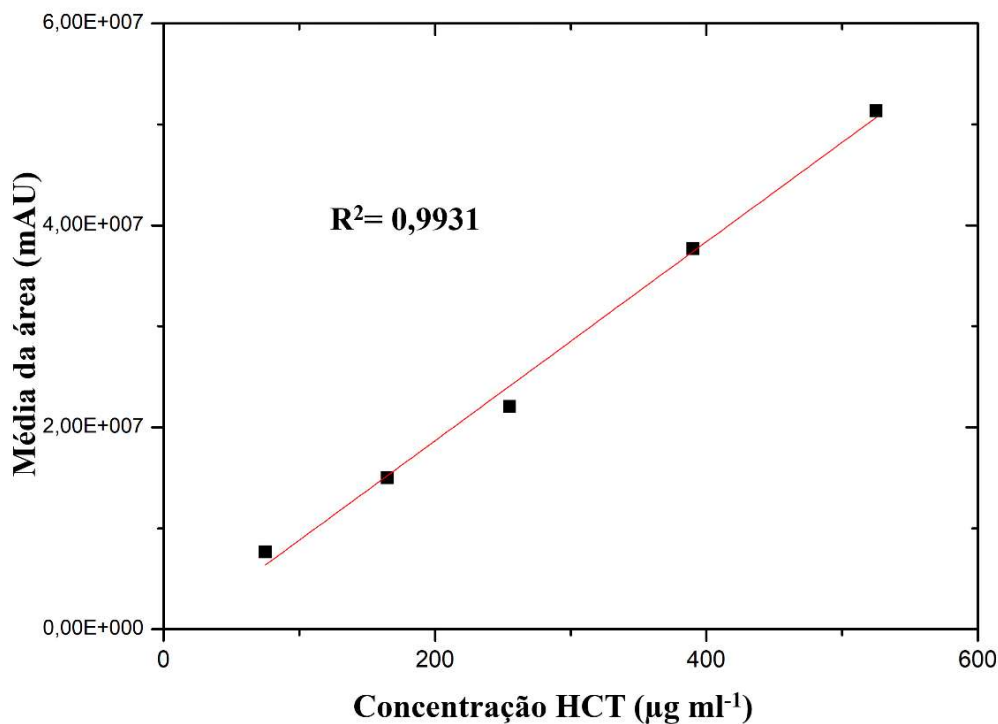
FONTE: o autor.

Figura 20: Curva analítica para o ENL e seu fator de correlação



FONTE: o autor.

Figura 21: Curva analítica para a HCT e seu fator de correlação



FONTE: o autor.

Equação 9: $Y(mAU) = 36367,39185[ENL] + 3,40594 \cdot 10^6$

Equação 10: $Y(mAU) = 98491,93145[HCT] - 1,02283 \cdot 10^6$

Ambas as curvas demonstraram linearidade razoável na faixa de concentração estudada, indicado pelos fatores de correlação acima de 0,98.

5.3.3 PRECISÃO

5.3.3.1 REPETIBILIDADE

As tabelas 15 e 16 mostram, respectivamente, os resultados para HCT e ENL, com os dados das triplicatas executadas em cada nível de concentração. Os resultados demonstraram excelente repetibilidade do método, com valores de DPR menores que 3,5% para o ENL e menor que 1% para HCT. O teste T atesta que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados e o valor descrito no rótulo do medicamento apenas no caso do

ENL, já na hidroclorotiazida o teste mostra diferença significativa e a média representa 90.87% do valor declarado no rótulo, o que não condiz com a exigência da FB, que diz que os valores devem estar entre 93% e 107% do valor declarado.

Tabela 15: Dados dos ensaios de repetibilidade para a HCT

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (mAU)	Média da área (mAU)	Desvio padrão (mAU)	Desvio Padrão Relativo	Quantidade de fármaco (mg)
	18991009				11,29
225	19019203	18975985	52370	0,2760	11,30
	18917745				11,20
	31387007				10,97
375	31323722	31322923	64487	0,2059	10,95
	31258040				10,92
	48151448				11,83
525	48115379	48139734	21097	0,0438	11,88
	48152375				11,89
Média (mg)					11,36
Desvio padrão	-	-	-	-	0,41
Teste T					-7,95

FONTE: o autor.

Tabela 16: Dados dos ensaios de repetibilidade para o ENL

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Área (mAU)	Média da área (mAU)	Desvio padrão (mAU)	Desvio Padrão Relativo	Quantidade de fármaco (mg)
	14935040				17,78
360	14555397	14930622	373036	2,4985	17,20
	15301430				18,35
	25678758				20,41
600	25710087	25843822	259241	1,0031	20,44
	26142621				20,40
	32248491				19,07
840	32987640	33185953	1050749	3,1662	19,56
	34321728				20,44
Média (mg)					19,30
Desvio padrão	-	-	-	-	1,26
Teste T					-1,57

FONTE: o autor.

5.3.3.2 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Os dados e resultados obtidos com o ensaio de precisão intermediária para ambos os fármacos estão demonstrados nas tabelas 17 e 18:

Tabela 17: Dados dos ensaios de precisão para a HCT

Dia	Quantidade de fármaco (mg)	Média (mg)	Desvio Padrão Relativo (DPR) intra-dia
	11,32		
1	11,30	11,31	0,26
	11,32		
	11,29		
2	11,28	11,29	3,20
	11,30		
	11,28		
3	11,41	11,36	0,17
	11,39		
Média (mg)	-	11,32	-
DPR Inter-dia	-	0,31	-

FONTE: o autor.

Tabela 18: Dados dos ensaios de precisão para o ENL

Dia	Quantidade de fármaco (mg)	Média (mg)	Desvio Padrão Relativo (DPR) intra-dia
	21,28		
1	22,60	21,57	4,25
	20,83		
	20,94		
2	20,49	20,36	3,20
	19,66		
	20,54		
3	20,58	20,49	0,13
	20,33		
Média (mg)	-	20,81	-
DPR Inter-dia	-	3,88	-

FONTE: o autor.

Os resultados mostram que as amostras podem ser armazenadas sob refrigeração durante dois dias e não há grande variação nos valores obtidos. Não foi testado o efeito acima de 2 dias.

5.3.4 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

Foi utilizado o desvio padrão residual das linhas de regressão para efetuar o cálculo do LOD, utilizando a Equação 7. A tabela 19 contém os dados utilizados para o cálculo do LOD da HCT e a 20 os do ENL.

Tabela 19: Resíduos da linha de regressão da HCT

Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Resíduos
75	1300140
165	-205103
255	-2048380
390	309884
525	643453
Desvio padrão	1268695

FONTE: o autor.

$$\text{Equação 7 para HCT: } LOD = \frac{3,3 \times 1268695,424}{98491,93145} = 42,5080 \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1})$$

Tabela 20: Resíduos da linha de regressão do ENL

Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Resíduos
360	-976930
480	835471
600	747165
720	-93020
840	-512685
Desvio padrão	787743

FONTE: o autor.

$$\text{Equação 7 para ENL: } LOD = \frac{3,3 \times 36367,39185}{44328,33} = 58,6432 \text{ } (\mu\text{g mL}^{-1})$$

5.3.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Os dados usados para o cálculo do LOD são os mesmos usados para o cálculo do LOQ, porém utilizando a equação 8.

$$\text{Equação 8 para HCT: } LOQ = \frac{10 \times 1268695,424}{98491,93145} = 128,8121 (\mu\text{g mL}^{-1})$$

$$\text{Equação 8 para ENL: } LOQ = \frac{3,3 \times 36367,39185}{44328,33} = 177,7066 (\mu\text{g mL}^{-1})$$

5.3.6 EXATIDÃO

Nas tabelas 21 e 22 estão descritos os dados dos ensaios de recuperação para o ENL e para a HCT respectivamente. Os ensaios apresentaram bons resultados para o ENL e resultados abaixo do esperado para a HCT. A concentração considerada de 100% foi de $0,6 \text{ mgmL}^{-1}$ para o ENL e $0,375 \text{ mgmL}^{-1}$.

Tabela 21: Dados do ensaio de recuperação para o ENL

Adição	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade encontrada (mg)	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
		0,4939	92,3868		
60%	0,5346	0,4808	89,9364	92,2746	2,4754
		0,5052	94,5006		
		0,9268	104,0179		
100%	0,891	0,9151	102,7048	103,6663	0,8128
		0,9291	104,2761		
		1,2224	97,9958		
140%	1,2474	1,2125	97,2022	98,6238	1,8442
		1,2558	100,6734		

FONTE: o autor.

Tabela 22: Dados do ensaio de recuperação para a HCT

Adição	Quantidade adicionada (mg)	Quantidade encontrada (mg)	Recuperação (%)	Média (%)	Desvio Padrão Relativo (%)
		0,1092	90,7731		
60%	0,1203	0,1094	90,9393	90,7177	0,2799
		0,1088	90,4406		
		0,2948	88,2371		
100%	0,3341	0,2942	88,0575	88,0575	0,2040
		0,2936	87,8779		
		0,6692	102,1816		
140%	0,6549	0,6728	102,7281	102,1595	0,5799
		0,6652	101,5689		

FONTE: o autor.

5.3.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS

Foram analisadas amostras do medicamento obtido nas farmácias nas concentrações de 0,600 mgmL⁻¹ para o ENL e 0,375 mgmL⁻¹ para a HCT e os resultados obtidos estão descritos na tabela 23.

Tabela 23: Dados das análises de amostras

Fármaco	Área (mAU)	Média	Quantidade de fármaco no medicamento	Média (mg)	DPR	Teste T
ENL	27726878		22,2919			
	27811515	27810001	22,3694	22,3681	0,3376	54,3196
	27891610		22,4429			
HCT	26000570		9,1457			
	25453394	25918564	8,9605	9,1179	1,5963063	-40,2467
	26301730		9,2476			

FONTE: o autor.

Ambos os fármacos possuem valores de t maiores do que o t crítico, o que mostra que há diferença estatística significativa com o valor atestado no rótulo, além disso ambos também estão fora da faixa de 93% - 107% requerida pela FB.

5.3.8 AVALIAÇÃO COM A *ANALYTICAL ECO-SCALE*

As pontuações referentes aos perigos associados das substâncias envolvidas no método estudado e no método adaptado estão descritas nas tabelas 24 e 25.

Tabela 24: Pontuações do método da literatura estudado

Reagente	Pontuações associadas aos perigos dos reagentes	Pontuação referente à quantidade de reagente utilizada por amostra	Total
Tampão fosfato	0	2	0
Maleato de enalapril	5	1	5
Hidroclorotiazida	5	1	5
Acetonitrila	10	2	20

FONTE: o autor.

O somatório das pontuações associadas aos perigos dos reagentes é de 30 pontos, e a do método otimizado é de 32, o que mostra que a troca do solvente somente na FM acabou tendo o efeito inverso do esperado, pois no fim mais substâncias diferentes foram utilizadas e, mesmo que em pouca quantidade, acabaram aumentando a pontuação. A troca do solvente utilizado no preparo da amostra no método otimizado de metanol para etanol diminuiria essa pontuação tornando o método realmente mais sustentável de acordo com a *Eco-Scale*.

Tabela 25: Pontuações do método otimizado

Reagente	Pontuações associadas aos perigos dos reagentes	Pontuação referente à quantidade de reagente utilizada por amostra	Total
Tampão fosfato	0	1	0
Etanol	4	1	4
Maleato de enalapril	5	1	5
Hidroclorotiazida	5	1	5
Acetonitrila	10	1	10
Metanol	9	1	9

FONTE: o autor.

As Tabelas 26 e 27 contêm as pontuações relacionadas a instrumentação para ambos os métodos, sendo a única diferença nas pontuações a quantidade de resíduos gerados que é maior no método otimizado já que ele emprega uma vazão da FM de 2 mLmin⁻¹. No fim o somatório do método estudado é de 12 pontos e do método otimizado 10 pontos, dessa forma ambos os métodos somam 42 pontos a serem deduzidos da pontuação referente a um “método perfeito”, que é de 100 pontos. Ambos os métodos somam 58 pontos o que é classificado pelos autores da *Analytical Eco-Scale* como um método com nível aceitável de “verde”.

Tabela 26: Pontuações referente à instrumentação do método estudado

Parâmetro	Valores por amostra	Pontuações associadas à instrumentação
Energia	≤ 1.5 kWh	1
Perigo ocupacional	Sim	3
Quantidade de resíduos	> 10 mL	5
Tratamento	Não há	3
Total	-	10

FONTE: o autor.

Tabela 27: Pontuações referente à instrumentação do método otimizado

Parâmetro	Valores por amostra	Pontuações associadas à instrumentação
Energia	≤ 1.5 kWh	1
Perigo ocupacional	Sim	3
Quantidade de resíduos	1 - 10 mL	3
Tratamento	Não há	3
Total	-	10

FONTE: o autor.

6 CONCLUSÕES

O trabalho experimental realizado e as avaliações respectivas, atestam que é possível realizar a separação dos fármacos HCT e ENL em medicamentos com composição associada, utilizando EtOH como solvente orgânico em CLAE, operando em modo gradiente. O método apresentou linearidade razoável na faixa observada e boa repetibilidade, utilizando menos solvente do que o utilizado nas referências estudadas, especialmente os métodos farmacopeicos, porém essa mudança não foi suficiente para mudar a pontuação na *Analytical Eco-Scale* em relação ao método da literatura utilizado como base para otimização, sendo necessária a implementação de mais mudanças, como a troca do solvente usado no preparo das amostras e uma revalidação, para melhorar a pontuação do método.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

As perspectivas futuras para esse trabalho são:

- Verificar se outras mudanças poderiam melhorar a sustentabilidade do método
- Reavaliar a melhora na sustentabilidade do método, utilizando a *Eco-Scale* analítica.
- Revalidar o método com as mudanças propostas
- Publicar o trabalho em uma revista de química analítica de relevância.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABO DENA, A; DHAOUAC, M; EL-SHERBINY, I; Fluorescent molecularly imprinted polymer nanocomposite for solid-phase extraction and fluorimetric determination of hydrochlorothiazide. **Royal Society of Chemistry**. Vol. 13, p. 29051-29060, 2023.
- [2] ABOUL-ENEIN, H. Y.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. D.; Potentiometric enantioselective membrane electrode for s-enalapril assay. **Analisis**. Vol. 27, p. 53-56, 1999.
- [3] AL-ARFAJ, N. A.; Flow-Injection Chemiluminescence Determination of Enalapril Maleate in Pharmaceuticals and Biological fluids using Tris (2,2'-bipyridyl)ruthenium(II). **Analytical Sciences**. Vol. 19, p. 1145-1149, 2003.
- [4] AL-ARFAJ, N. A.; AL-ABDULKAREEM, E. A.; ALY, F. A.; Determination Of Enalapril Maleate And Atenolol In Their Pharmaceutical Products And In Biological Fluids By Flow-Injection Chemiluminescence. **Luminescence**. Vol. 24, p. 422-428, 2009.
- [5] ALI, R. J.; OMER, L. S.; HABEEB, N. N.; DAWOOD, A. G.; Utilization of Localized Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles for the Spectrophotometric Estimation of Amlodipine and Hydrochlorothiazide. **Baghdad Science Journal**. Vol. 21, n. 11, p. 3368-3378, 2024.
- [6] AL-MOMANI, I. F.; Determination of Hydrochlorothiazide and Enalapril Maleate in Tablet Formulations by Reversed-Phase HPLC. **Turkish Journal of Chemistry**. Vol. 25, n. 6, p. 49-54, 2001.
- [7] ANASTAS, PAUL; EGHBALI, NICOLAS. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**. vol. 39, p. 301-312, 2009.
- [8] AYAD, M. M.; SHALLABY, A. A.; ABDELLATEF, H. E.; HOSNY, M. M.; Spectrophotometric and AAS determination of ramipril and enalapril through ternary complex formation. Vol. 28, p. 311-321, 2002.
- [9] BAINS, J.; SMITH, W. B. Valsartan plus hydrochlorothiazide: a review of its use since its introduction. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. Vol. 12, p. 1975-1984, 2011.
- [10] BARAKA, M. M.; EL-SADEK, M.; MOHAMED, E. W.; ABD-ALATY, N. M. A.; Spectrophotometric and Atomic Absorption Determination of Ramipril, Enalapril Maleate and Fosinopril through Ternary Complex Formation with Molybdenum (V)-Thiocyanate (Mo(V)-SCN. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. Vol. 56, n. 11, p. 1521-1527, 2008.
- [11] BLAIH, S.; ABDINE, H.; EL-YAZBI, F.; SHAALAN, R.; Spectrophotometric Determination of Enalapril Maleate and Ramipril in Dosage Forms. **Spectroscopy Letters**. Vol. 33, n. 1, p. 91-102, 2000.

- [12] BEITOLLAHI, H; HAMZAVI, M; TORKZADEH-MAHANI, M; Electrochemical determination of hydrochlorothiazide and folic acid in real samples using a modified graphene oxide sheet paste electrode. **Materials Science and Engineering C**. Vol. 52, p. 297-305, 2015.
- [13] BONAZZI, D.; GOTTI, R.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V.; Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 16, n. 3, p. 431-438, 1997.
- [14] BOUABDALLAH, S.; TRABELSI, H.; DRISS, M. R.; TOUIL, S.; DETERMINATION AND DEGRADATION STUDY OF ENALAPRIL MALEATE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. Vol. 51, n. 8, p. 735-741, 2017.
- [15] CALEGARI, F.; OLIVEIRA, P. R.; MARCOLINO JUNIOR, L.H.; BERGAMINI, M. F.; A carbon black composite electrode for flow injection amperometric determination of hydrochlorothiazide. **Analytical Methods**. Vol. 11, p. 2422-2427, 2019.
- [16] CARLUCCI, G.; DI GIUSEPPE, E.; MAZZEO, P.; Simultaneous determination of enalapril maleate and hydrochlorothiazide in tablets by derivative UV spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 93, n. 1-3, p. 245-248, 1993.
- [17] CLARKE, R.; LEWINGTON, S.; DONALD, A.; JOHNSTON, C.; REFSUM; H.; STRATTON, I.; JACQUES, P.; BRETELER, M.M.B.; HOLMAN, R.; Underestimation of the importance of homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease in epidemiological studies. **Journal of Cardiovascular Risk**. Vol. 8, n. 6, p. 363-369, 2001.
- [18] CONSDEN, R.; GORDON, A. H.; MARTIN, A. J. P.; Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. **Biochemical Journal**. Vol. 38, n. 3, p. 224-232, 1944.
- [19] DAVIES, R. O.; GOMEZ, H. J.; IRVIN, J. D.; WALKER, J. F.; An overview of the clinical pharmacology of enalapril. **British Journal of Clinical Pharmacology**. Vol. 18, p. 215s-229s, 1984.
- [20] Definição hipertensão arterial sistêmica no adulto. **Ministério da Saúde**. Disponível em <[https://linhasdecuidado.saude.gov.br/portal/hipertensao-arterial-sistemica-\(HAS\)-no-adulto/definicao-hipertensao-arterial-sistemica-has-no-adulto/](https://linhasdecuidado.saude.gov.br/portal/hipertensao-arterial-sistemica-(HAS)-no-adulto/definicao-hipertensao-arterial-sistemica-has-no-adulto/)> acesso em 05 de junho de 2023.
- [21] DENA, A. S. A.; DHAOU, M.; EL-SHERBINY, I. M.; Fluorescent molecularly imprinted polymer nanocomposite for solid-phase extraction and fluorimetric determination of hydrochlorothiazide. **Royal Society of Chemistry Advances**. Vol. 13, p. 29051-29060, 2023.
- [22] DINÇ, E.; ÜSTÜNDAĞ, Ö.; ÖZDEMİR, A.; BALEANU, D.; A New Application of Chemometric Techniques to HPLC Data for the Simultaneous Analysis of a Two-Component Mixture. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. Vol. 28, n. 14, p. 2179-2194, 2005.

- [23] Diretrizes e Recomendações para o Cuidado Integral de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis. **Ministério da Saúde**. Disponível em : <https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_recomendacoes_cuidado_doencas_cronicas.pdf> 2008
- [24] DUARTE, J. D.; COOPER-DEHOFF, R.; Mechanisms For Blood Pressure Lowering And Metabolic Effects Of Thiazide And Thiazide-Like Diuretics. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**. Vol. 8, n. 6, p. 793-802, 2010.
- [25] DUBEY, N.; JAIN, A.; SARDIYA, J.; JAIN, D. K.; Simultaneous Determination and Validation of Enalapril Maleate, Hydrochlorothiazide and Paracetamol in Combined Tablet Dosage Form Using RP-HPLC Method. **Asian Journal of Chemistry**. Vol. 24, n. 10, p. 4644-4646, 2012.
- [26] ELMALI, F.; ALPDOĞAN, G.; AYCAN, S.; SUNGUR, S.; Differential Pulse Polarographic Determination of Enalapril. **Turkish Journal of Chemistry**. Vol. 27, n. 1, p. 65-69, 2003.
- [27] ELSEBAEI, F.; ZHU, Y.; Fast gradient high performance liquid chromatography method with UV detection for simultaneous determination of seven angiotensin converting enzyme inhibitors together with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma and urine. **Talanta**. Vol. 85, n. 1, p. 123-129, 2011.
- [28] EMARA, S.; EL-GINDY, A.; EL-SHORBAGI, A.; HADAD, G.; Utility Of Copper(Ii) Oxide As A Packed Reactor In Flow Injection Assembly For Rapid Analysis Of Some Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 489, p. 115-123, 2003.
- [29] ENGELHARDT, H. One century of liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**. Vol. 800, n. 1-2, p. 3-6, 2004.
- [30] ERNST, M. E.; FRAVEL, M. A. Thiazide and the Thiazide-Like Diuretics: Review of Hydrochlorothiazide, Chlorthalidone, and Indapamide. **American Journal of Hypertension**. Vol. 35, n. 7, p. 573-586, 2022
- [31] ESERIAN, J. K.; Análises laboratoriais e garantia da qualidade de medicamentos distribuídos na rede pública de saúde de municípios paulistas: o caso do maleato de enalapril. **Vigilância Sanitária em debate**. Vol. 9, n. 1, p. 136-142, 2021.
- [32] ETTRE, L. S.; SAKODYNSKII, K. I.; M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903). **Chromatographia**. Vol. 35, p. 223-231, 1993.
- [33] FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T.; Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**. Vol. 34, n. 6, 2011.
- [34] GALUSZKA, A; KONIECZKA, P; MIGASZEWSKI, Z; NAMIEŚNIK, J; Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. Vol 37, p.61-72, 2012.

- [35] GALUSZKA, A; MIGASZEWSKI, Z; NAMIEŚNIK, J; The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. Vol 50, p.78-84, 2013.
- [36] GHAFARLOO, A; SABZI, R; SAMADIA, N; HAMISHEHKARB, H; Spectrofluorimetric Determination of Hydrochlorothiazide by a Carbon Dots-Based Probe via Inner Filtering Effect and Resonance Rayleigh Scattering. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Vol. 33, n. 4, 2022.
- [37] GHERMAN, S.; ZAVASTIN, D.; SPAC, A.; DORNEANU, V.; Spectrophotometric Determination of Enalapril Using Tropeolin 00. **Revista de Chimie**. Vol. 66, n. 10, p. 1224-1228, 2013.
- [38] GHERMAN, S.; ZAVASTIN, D.; SPAC, A.; MIRCEA, C.; STEFANACHE, A.; PASCU, L. F.; DORNEANU, V.; Development and Validation of a Capillary Electrophoretic Method for the Determination of Enalapril. **Revista de Chimie**. Vol. 64, n. 11, p. 1577-1581, 2015.
- [39] GHERMAN, S.; ZAVASTIN, D.; SPAC, A.; PANAINTE, A. D.; Determination of Enalapril maleate from tablets using a new HPLC method. **Ovidius University Annals of Chemistry**. Vol. 32, n. 1, p. 70-75, 2021.
- [40] GHOSH, C.; JAIN, I.; SHINDE, C. P. ; CHAKRABORTY, B. S. ; Rapid and sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of enalapril and its major metabolite enalaprilat, in human plasma: Application to a bioequivalence study. **Drug Testing and Analysis**. Vol. 4, p. 94-103, 2012.
- [41] Global report on hypertension: the race against a silent killer. **World Health Organization**. Disponível em <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240081062>> acesso em 05 de junho de 2023.
- [42] GU, Q.; CHEN, X.; ZHONG, D. ; WANG, Y.; Simultaneous determination of enalapril and enalaprilat in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. Vol. 813, n. 1-2, p. 337-342, 2004.
- [43] HAMMOUDA, M. E. A.; EL-ENIN, M. A. A.; EL-SHERBINY, D. T.; EL-WASSEEF, D. R.; EL-ASHRY, S. M.; Simultaneous Determination of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Preparations Using Microemulsion Liquid Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**. Vol. 53, n. 1, p. 90–96, 2015.
- [44] HANOOAN, W. A.; QASSIM, B. B.; Sensitive Determination of Hydrochlorothiazide Drug in the Various Samples Via Developed Method of CFIA System. **Baghdad Science Journal**. Vol. 21, n. 9, p. 2866, 2024.
- [45] HEMDAN, A.; AL-TANNAK, N. F.; MOHAMED, E. H.; Development of a multivariate model with desirability-based optimization for determination of atenolol and hydrochlorothiazide by eco-friendly HPLC method with fluorescence detection. **Journal of Separation Science**. Vol. 45, n. 4, p. 824, 2022.

- [46] HILLAERT, S.; VAN DEN BOSSCHE, W.; The quantitative determination of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme by CE. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 25, p. 775-783, 2001.
- [47] HUSSAIN, M; BASHEER, S.; KHALIL, A.; HAIDER, Q. U. A.; SAEED, H.; FAIZAN, M.. Pharmacogenetic study of *CES1* gene and enalapril efficacy. **J Appl Genetics**. Vol. 65, p. 463–471, 2024
- [48] Hypertension. **World Health Organization (WHO)**. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>> acesso em 05 de jun. de 2024
- [49] IDRIS, A. M.; NAHEID, S. A.; ELGORASHE, R. E. E.; ELTAYEB, M. A. H.; ALNAJJAR, A. O. Multi-response optimization of sequential injection chromatographic method for determination of lisinopril and hydrochlorothiazide. **Analytical Methods**. Vol. 4, n. 7, p. 2081-2087, 2012.
- [50] JAMEEL ALI, R; SATTAR OMER, L; NADHIM HABEEB, N; GHANIM DAWOOD, A; Utilization of Localized Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles for the Spectrophotometric Estimation of Amlodipine and Hydrochlorothiazide. **Baghdad Science Journal**. Vol. 21, n. 11, p. 3368-3378, 2024.
- [51] JOSEPH, P.; LANAS, F.; ROTH, G.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; LONN, E.; MILLER, V.; MENTE, A.; LEONG, D.; SCHWALM, J.; YUSUF, S.; Cardiovascular Disease In The Americas: The Epidemiology Of Cardiovascular Disease And Its Risk Factors. **The Lancet**. Vol. 42, 2025.
- [52] KANG, C. N.; KIM, H. J.; PARK, Y. S.; KIM, S. H.; PARK, H. K.; HWANG, H. S.; KANG, J. S.; A simple and rapid LC-MS/MS method for the determination of Enalapril in human plasma for pharmacokinetic and bioequivalence studies in korean healthy volunteers under fasting conditions. **Journal of Analytical Chemistry**. Vol. 69, p. 467-473, 2014.
- [53] KANNAIAHA, K. P.; CHANDULURU, H. K. ; LOTFY, H. M.; OBAYDO, R. H.; EL HAMD, M. A.; ALSHEHRI, S.; MAHDI, W. A., NESSIM, C. K.; Integrative AQbD, up-to-date greenness, and whiteness tools for evaluation of a sustainable RP-HPLC method used for simultaneous separation of triple antihypertensive combination therapy as a model. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. Vol. 36, 2023.
- [54] KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; ENSAFI, H. R.; Ferrocenedicarboxylic Acid Modified Carbon Paste Electrode: A Sensor For Electrocatalytic Determination Of Hydrochlorothiazide. **Journal of Brazilian Chemical Society**. Vol. 20, n. 05, p. 880-887, 2009.
- [55] KOPPALA, S.; REDDY, V. R.; ANIREDDY, J. S.; User-Friendly HPLC Method Development and Validation for Determination of Enalapril Maleate and Its Impurities in Enalapril Tablets. **Journal of Chromatographic Science**. Vol. 55, n. 10, p. 979–988, 2017.
- [56] LIMA, D. M.; MUNDIM, I. M.; JARDIM, P. C.; JARDIM, T. S. V.; DINIZ, D.; LIMA, E. M.; A High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method Using Solid Phase Extraction for the Simultaneous Determination of Plasma Concentrations of Enalapril and Enalaprilate

- in Hypertensive Patients Treated With Different Pharmaceutical Formulations. **Therapeutic Drug Monitoring**. Vol. 31, n. 6 , p. 710-716, 2009.
- [57] Lista de medicamentos genéricos registrados. **Anvisa**. Atualizada em 05 de ago. de 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/genericos/estatisticas/arquivos/6457json-file-1>> acesso em 06 de mai. de 2023.
- [58] LOURENCAO, B. C.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; Simultaneous determination of antihypertensive drugs by flow injection analysis using multiple pulse amperometric detection with a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. Vol. 754, n. 1, p. 154-159, 2015
- [59] MARTIN, A. J. P. ; SYNGE, R. L. M. ; A new form of chromatogram employing two liquid phases. **Biochemical Journal**. Vol. 35, n. 12, p. 1358-1368, 1941.
- [60] MENGUE, S; BERTOLDI, A. D; RAMOS, L. R; FARIAS, M.R; OLIVEIRA M. A; TAVARES, N. U; ARRAIS, P. S; LUIZA, V. L; PIZZOL, T.; Acesso e uso de medicamentos para hipertensão arterial no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. Vol. 50, supl. 2, 8s, 2016.
- [61] MILENKOVIC, M. Z.; SIBINOVIC, P. S.; MARINKOVIC, V. D.; PALIC, R. M.; STOJANOVIC, G. S.; MILENOVIC, D. M.; Optimization And Validation Of An Hplc Method For Determination Of Related Compounds In Enalapril Maleate Tablets. **Analytical Chemistry An Indian Journal**. Vol. 13, n. 4, p. 136-145, 2013.
- [62] MOHAMMAD, M. A. A.; MAHROUSE, M. A.; AMER, E. A. H.; ELHARATI, N. S. Validated LC-MS/MS method for the simultaneous determination of enalapril maleate, nitrendipine, hydrochlorothiazide and their major metabolites in human plasma. **Biomedical Chromatography**. 2020
- [63] MOHAMMADNAVAZ, A; GARKANI-NEJAD, F; Voltammetric determination of hydrochlorothiazide at a modified carbon paste electrode with polypyrrole nanotubes. **ADMET & DMPK**. Vol. 11, n. 2, p. 293-302, 2023.
- [64] NILSON, E. A. F.; ANDRADE, R. C. S.; BRITO, D. A.; OLIVEIRA, M. L. Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde. **Rev Panam Salud Publica**. Vol. 43, 2019
- [65] OUYANG, J.; BAEYENS, W. R. G.; DELANGHE, J. ; VAN DER WEKEN, G.; CALOKERINOS, A. C.; Cerium (IV)-based chemiluminescence analysis of hydrochlorothiazide. **Talanta**. Vol. 46, n. 5, p. 961-968, 1998.
- [66] PACHECO, S.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L.S.M.; GODOY, R. L. O.; História da Cromatografia Líquida. **Revista Virtual de Química**. Vol. 7, n. 4, p. 1225-1271, 2015.
- [67] Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes mellitus. **Ministério da Saúde**. Disponível em : <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/reorganizacao_campanha.pdf>. 2001
- [68] POOLE, C. F.; **Encyclopedia of Separation Science**. p. 40-64, 2000.

- [69] QIN, X.; IP, D. P.; TSAI, E. W.; Determination and rotamer separation of enalapril maleate by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography**. Vol. 626, p. 251-258, 1992.
- [70] RAHMAN, H.; Analytical Applications of Permanganate as an Oxidant in the Determination of Pharmaceuticals Using Chemiluminescence and Spectrophotometry: A Review. **Current Analytical Chemistry**. Vol. 16., p. 870-886, 2020.
- [71] RAHMAN, H.; HAQUE, S. M.; Optimized and Validated Spectrophotometric Methods for the Determination of Enalapril Maleate in Commercial Dosage Forms
- [72] RAMUSOVIC, G. ; THIELKING, G. ; LÄER, S. ; Determination Of Enalapril And Enalaprilat In Small Human Serum Quantities For Pediatric Trials By Hplc–Tandem Mass Spectrometry. **Biomedical Chromatography**. Vol. 26, p. 697-702, 2012.
- [73] RAPSOMANIKI, E.; TIMMIS, A.; GEORGE, J.; PUJADES-RODRIGUEZ, M.; SHAH, A.; DENAXAS, S.; WHITE, I.; CAULFIELD, M.; DEANFIELD, J.; SMEETH, L.; WILLIAMS, B.; HINGORANI, A.; HEMINGWAY, H.; Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. **The Lancet**. Vol. 383, n. 9932, p. 1899-1911, 2014.
- [74] RAZAK, O. A.; BELAL, S. F.; BEDAIR, M. M.; BARAKAT, N. S.; HAGGAG, R. S.; Spectrophotometric and polarographic determination of enalapril and lisinopril using 2,4-dinitrofluorobenzene. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 31, p. 701-711, 2003.
- [75] REHM, C. R.; SMITH, J. B. The Photometric Determination of Hydrochlorothiazide and Its Hydrolysis Product. **Journal of the American Pharmaceutical Association**. Vol. 49, n. 6, p. 386-389, 1960.
- [76] ROSHANARA, M. A.; BHAVANI, M. I.; PRABAHAR, A. E.; NADENDLA, R. R.; DEVELOPMENT AND VALIDATION OF UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR ANALYSIS OF ENALAPRIL MALEATE IN BULK AND PHARMACEUTICAL DOSAGE FORM. **Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol. 06, n. 02, p. 4049-4053, 2019.
- [77] RUY, M; FIGUEIRA, E; SOTOMAYOR, M; Biomimetic Sensor for Detection of Hydrochlorothiazide Employing Amperometric Detection and Chemometrics for Application in Doping in Sports. **Journal of Brazilian Chemical Society**. Vol. 26, n. 10, p. 2069-2076, 2015.
- [78] SALAMANCA-NETO, C. A. R.; HATUMURA, P. H.; TARLEY, C. R. T.; SARTORI, E. R.; Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes paste electrode. **Ionics**. Vol. 21, n. 6, p. 1615-1622, 2014.
- [79] SHAMA, S. A.; AMIN, A. S.; OMARA, H.; SPECTROPHOTOMETRIC MICRODETERMINATION OF SOME ANTIHYPERTENSIVE DRUGS IN PURE

- FORM AND IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS. **Journal of the Chilean Chemical Society**. Vol. 56, n. 1, p. 566-570, 2011.
- [80] SHEN, S.; YANG, X.; SHI, Y.; Application of quantitative NMR for purity determination of standard ACE inhibitors. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 114, n. 10, p. 190-199, 2015.
- [81] SHETKAR, P. B.; SHINDE, V. M.; Simultaneous Determination of Enalapril Maleate and Hydrochlorothiazide in Tablets by Reversed Phase HPLC. **Analytical Letters**. Vol. 30, n. 6, p. 1143-1152, 1997.
- [82] SNYDER, L.; KIRKLAND, J.; DOLAN, J.; Introduction to Modern Liquid Chromatography. **John Wiley & Sons, Inc.** 2009.
- [83] STOLARCZYK, M.; MASLANKA, A.; KRZEK, J.; MILCZAREK, J.; Application of Derivative Spectrophotometry for Determination of Enalapril, Hydrochlorothiazide and Walsartan in Complex Pharmaceutical Preparations. Vol. 65, n. 3, p. 275-281, 2008.
- [84] TODD, P.; HEEL, R.; Enalapril A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Hypertension and Congestive Heart Failure. **Drugs**. Vol. 31, p. 198-248, 1986.
- [85] ULM, E. H.; Enalapril Maleate (MK-421), a Potent, Nonsulfhydryl Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor: Absorption, Disposition, and Metabolism in Man. **Drug Metabolism Reviews**. Vol. 14, p. 99-110, 1983.
- [86] USLU, B.; ÖZDEN T.; HPLC and UPLC Methods for the Simultaneous Determination of Enalapril and Hydrochlorothiazide in Pharmaceuticals Dosage Forms. **Cromatographia**. Vol. 76, p. 1487-1494, 2013.
- [87] VISHNUVARDHAN, C.; RADHAKRISHNANAND, P.; NAVALGUND, S. G.; ATCHA, K. R.; SATHEESHKUMAR, N.; RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Eight Cardiovascular Drugs. **Chromatographia**. Vol. 77, n. 3-4, p. 265-275, 2013.
- [88] WANG, P.; LIANG, Z.; CHEN, B.; ZHOU, N.; YI, L.; YU, Y.; YI, Z.; Simultaneous Determination of Enalapril and Enalaprilat in Human Plasma by LC-MS: Application to a Bioequivalence Study. **Chromatographia**. Vol. 65, p. 209-215, 2007.
- [89] WHELTON, S.; MCEVOY, J.; SHAW, L. Association of Normal Systolic Blood Pressure Level with Cardiovascular Disease in the Absence of Risk Factors. **JAMA Cardiology**. Vol. 5, n. 9, p. 1011-1018, 2020.
- [90] WIXOM, R. L.; Chapter 1 The beginnings of chromatography — The pioneers (1900–1960). **Journal of Chromatography Library**. Vol 64., p. 1-38, 2001.
- [91] XI, J.; JI, X.; ZHANG, S.; AI, X.; HE, Z.; Investigation of RuBPS–Ce(IV) chemiluminescence reaction and its application in determination of two diuretics. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 541, n. 13, p. 191-196, 2005.
- [92] ZOPPI, A.; LINARES, M.; LONGHI, M.; Quantitative analysis of enalapril by ¹H NMR spectroscopy in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 37, p. 627-630, 2005.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE
DE DOUTORADO**

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

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

Brasília, 02 de fevereiro de 2026.

Assinatura do/a discente:

Programa: Programa de Pós graduação em Química

Nome completo: Paulo Roberto Laranjeira dos Santos Claudino__

Título do Trabalho: Química analítica verde em CLAE, controle de
qualidade de maleato de enalapril e hidroclorotiazida em medicamentos

Nível: (X) Mestrado () Doutorado

Orientador/a: Carlos Martin Infante Córdova