

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

ROGER SANTOS DE CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA UTILIZANDO PLANEJAMENTO MULTIVARIADO**

Porto Alegre, junho 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

ROGER SANTOS DE CASTRO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA UTILIZANDO PLANEJAMENTO MULTIVARIADO**

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso - QUI” do Curso de Química, com requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Carla Sirtori

Co-Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Andreia Neves Fernandes

Porto Alegre

2018

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais e minha esposa Bruna, agradeço pelo imenso apoio em todos estes anos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha orientadora Carla pelo imenso apoio e ensinamentos neste último ano. Um agradecimento aos gerentes do DEQUIM da “extinta” CIENTEC pelo suporte para a concretização desse trabalho.

RESUMO

Atualmente, o consumo e comercialização de fármacos no mundo são cada vez mais difundidos. Como grande parte dos fármacos consumidos é metabolizada para aumentar a hidrofília, esses acabam sendo descartados nos esgotos domésticos, favorecendo a contaminação das águas (superficiais e subterrâneas). Nesse contexto, há muitos estudos que indicam possíveis consequências adversas que são geradas pela presença de fármacos nas águas, em especial nas águas indicadas para consumo humano. Assim, a quantificação de fármacos mediante diferentes técnicas instrumentais tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pode permitir o adequado controle de qualidade de tais substâncias. Além disso, se associada a técnicas potentes de extração e pré-concentração, permite a detecção e quantificação destes compostos em matrizes ambientais. Diante destes aspectos, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver e otimizar uma técnica de separação mediante o uso de CLAE com detector de arranjo de diodos para a quantificação de fármacos em matrizes aquosas. O uso de planejamento multivariado, como a matriz Doehlert, foi empregado para otimizar os parâmetros de análise cromatográfica. Os resultados de todos os planejamentos demonstraram que a variável do fluxo de fase móvel foi mais influente para a otimização de uma maior área que as demais variáveis. Em um segundo momento o método de separação foi validado com o uso de planilhas eletrônicas de validação. As figuras de mérito avaliadas foram: linearidade e faixa linear, limites de detecção e quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e robustez. Os resultados relacionados com a validação demonstraram uma faixa linear de trabalho entre 0,75 a 20,0 mg L⁻¹ para todos os fármacos em estudo e coeficiente de correlação acima de 0,99, além de resíduos homocedásticos, e desvio padrões relativos abaixo de 10% para a repetibilidade, precisão intermediária e robustez.

Palavras-chave: Cromatografia líquida de alta eficiência, fármacos, matriz Doehlert, validação de método.

ABSTRACT

Currently, the consumption and commercialization of drugs in the world are increasingly widespread. As most of the drugs consumed are metabolized to increase hydrophilicity, they end up being disposed of in the domestic sewage, favoring the contamination of water (surface and groundwater). In this context, there are many studies that indicate possible adverse consequences that are generated by the presence of drugs in waters, especially in the waters indicated for human consumption. Thus, the quantification of drugs by different instrumental techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC), can allow the adequate quality control of such substances. In addition, if associated with powerful extraction and preconcentration techniques, it allows the detection and quantification of these compounds in environmental matrices. In view of these aspects, the present work had the objective of developing and optimizing a separation technique by using HPLC with diode arrangement detector for the quantification of drugs in aqueous matrices. The use of multivariate planning, such as the Doehlert matrix, was employed to optimize the chromatographic analysis parameters. The results of all the schedules showed that the mobile phase flow variable was more influential for the optimization of a larger area than the other variables. In a second moment the separation method was validated with the use of validation spreadsheets. The merit figures evaluated were: linearity and linear range, limits of detection and quantification, repeatability, intermediate precision and robustness. The results related to the validation showed a linear range of 0.75 to 20.0 mg L⁻¹ for all drugs under study and correlation coefficient above 0.99, in addition to homocedastic residues, and deviation relative standards below of 10% for repeatability, intermediate accuracy and robustness.

Keywords: Liquid Chromatography, Doehlert matrix, validation, pharmaceuticals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráficos comparativos utilizando o algoritmo de busca do site Web of Science para os termos (Chromatography, pharmaceuticals and Doehlert) de 2007 a 2017.....	14
Figura 2. Partes importantes de um cromatógrafo líquido.....	17
Figura 3. Esquema de espectrofotômetros convencional com rede de difração móvel (a) e multicanal com arranjo de fotodiodos (b).....	19
Figura 4. Estrutura do acetaminofeno (ACT).....	20
Figura 5. Estrutura do sulfametoxazol (SMX).....	21
Figura 6. Estrutura da cafeína (CAF).....	21
Figura 7. Estrutura do diclofenaco (DCF).....	22
Figura 8. Planejamento Doehlert com duas variáveis (linha preta) com a adição de novos experimentos (linha cinza).....	23
Figura 9. Curva de calibração mostrando a estimativa do resíduo no sinal analítico.....	26
Figura 10. Curva de calibração com alto resíduo no sinal analítico (a) e níveis de calibração mal distribuídos ao longo da faixa de calibração (b).....	27
Figura 11. Espectro de varredura do ACT (a), SMX (b), CAF (c) e DCF (d).....	35
Figura 12. Cromatogramas do primeiro teste preliminar (situação A, B e C).....	37
Figura 13. Cromatogramas do segundo teste preliminar (situação D e E).....	38
Figura 14. Cromatogramas do terceiro teste preliminar (situação F e G).....	38
Figura 15. Parâmetros da composição da matriz Doehlert, modelo quadrático, com três variáveis para os fármacos deste estudo.....	39
Figura 16. Tabela de planejamento da matriz Doehlert contendo os ensaios a serem otimizados.....	40
Figura 17. Cálculo da ANOVA da Matriz Doehlert para o ACT.....	40
Figura 18. Gráfico de probabilidade normal para o ACT.....	41
Figura 19. Superfícies do ACT: fluxo x pH (a); fluxo x [% aquoso FM] (b) e pH x [% aquoso FM] (c).....	42
Figura 20. Cromatograma dos fármacos em estudo com o PI de TBN, no comprimento de onda de 254nm, utilizando uma solução do ponto 2 (1 mgL ⁻¹) (a) e no cromatograma de injeção do solvente de diluição (b).....	44
Figura 21. Gráfico de resíduos das regressões dos fármacos estudados ACT (a), CAF(b),	

SMX (c), DCF (d).....	45
Figura 22. Cromatogramas dos fármacos estudados com solução de 0,5 mg L ⁻¹ em três comprimentos de onda diferentes.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações das soluções-mãe de cada fármaco e o solvente utilizado.....	33
Tabela 2. Concentração final dos fármacos utilizados em cada ponto da curva analítica.....	34
Tabela 3. Comprimentos de onda utilizados no detector DAD.....	36
Tabela 4. Condições cromatográficas a serem validadas após otimização com a matriz Doehlert.....	43
Tabela 5. Coeficientes da regressão linear das curvas de calibração para os fármacos.....	45
Tabela 6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados para o método com 95, 99 e 99,9% de confiança.....	46
Tabela 7. Resultados da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método.....	47
Tabela 8. Resultados da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método.....	49
Tabela 9. Formulação do efluente simulado utilizado na robustez (volume de 1L).....	51
Tabela 10. Resultados da robustez do método.....	52
Tabela 11. Resultados do efeito de matriz do método	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT – Acetaminofeno

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAF – Cafeína

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

DCF – Diclofenaco

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

PI – Padrão Interno

SMX – Sulfametoxazol

TBN – Teobronina

TR – Tempo de retenção

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	16
3.2 FÁRMACOS.....	19
3.2.1 Acetaminofeno (ACT).....	20
3.2.2 Sulfametoxazol (SMX).....	20
3.2.3 Cafeína (CAF).....	21
3.2.4 Diclofenaco (DCF).....	21
3.3 PLANEJAMENTO MULTIVARIADO.....	22
3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO.....	24
3.4.1 Seletividade.....	25
3.4.2 Linearidade.....	26
3.4.3 Limite de Detecção.....	28
3.4.4 Limite de Quantificação.....	29
3.4.5 Precisão.....	30
3.4.6 Exatidão.....	30
3.4.7 Robustez.....	31
3.4.8 Efeito de Matriz.....	31
4. METODOLOGIA	33
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	33
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO.....	33
4.3 INSTRUMENTAÇÃO.....	34
5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	35
5.1 DEFINIÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS UV.....	35
5.2 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CROMATOGRÁFICAS.....	36
5.2.1 Estudo Preliminar.....	36
5.2.2 Matriz Doehlert.....	39

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	43
5.3.1 Seletividade.....	44
5.3.2 Linearidade.....	44
5.3.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	45
5.3.4 Precisão.....	48
5.3.5 Robustez.....	50
5.3.6 Efeito de Matriz.....	52
6 CONCLUSÃO.....	55
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
APÊNDICE 1.....	57
APÊNDICE 2.....	60
APÊNDICE 3.....	61
APÊNDICE 4.....	65

1. INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes são compostos que são, frequentemente, detectados em diferentes matrizes aquosas de relevância ambiental em baixas concentrações ($\text{ng-}\mu\text{g L}^{-1}$) (DAUGHTON, 1999). Dentre os contaminantes emergentes, encontram-se os fármacos, especialmente os que são usados como medicação contínua. Dentre os fármacos identificados, pode-se citar: analgésicos, anti-inflamatórios, antibióticos, antidepressivos, antiepiléticos, beta bloqueadores, reguladores lipídicos, meios de contraste radiológicos, contraceptivos orais, broncodilatadores, citotóxicos e medicamentos de uso veterinário (BIAŁK-BIELINSKA *et al.*, 2009; LOCATELLI *et al.*, 2011). Tais compostos, em geral, apresentam uma ocorrência e persistência relevante em sistemas aquáticos como águas superficiais, efluente doméstico, efluente hospitalar, dentre outras (BILA *et al.*, 2003).

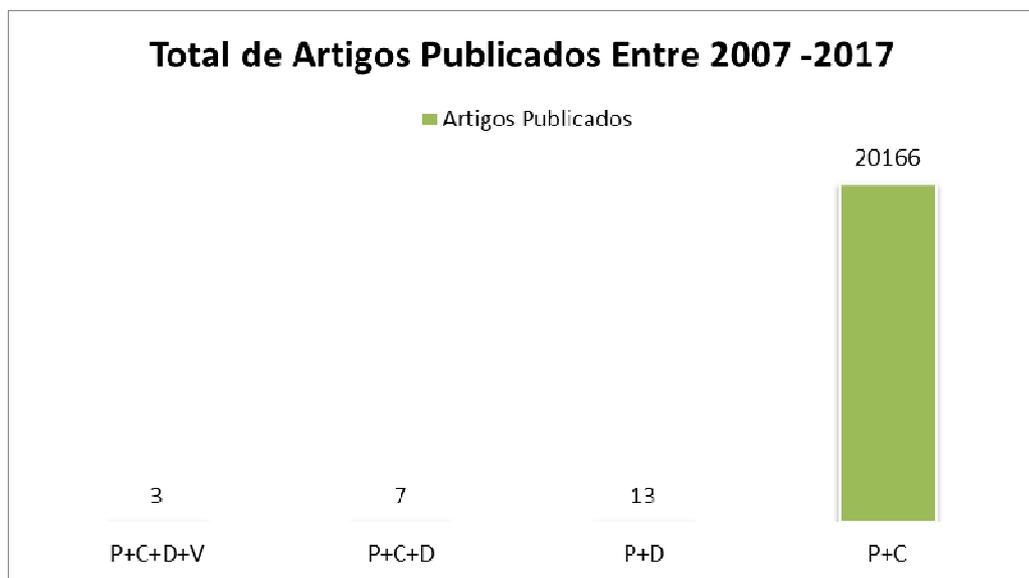
Nos últimos anos, o interesse em investigar os aspectos fundamentais e aplicados em química analítica ambiental tem se destacado no contexto científico. Neste sentido, o desenvolvimento de novas tecnologias para avaliação e quantificação de espécies de importância ambiental vem despertando interesse. Diversos compostos químicos são produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. Portanto, existe um aumento significativo na quantidade de resíduos gerados, sejam eles derivados das atividades industriais ou após consumo humano, que podem chegar até os corpos d'água (PETROVIC *et al.*, 2005; WELLS *et al.*, 2007; KUSTER *et al.*, 2014).

Até o presente momento, o monitoramento de tais compostos não está previsto nas legislações e normativas vigentes na maioria dos países do mundo. Além disso, pouco se sabe sobre seu efeito nocivo em longo prazo, mesmo que já existam muitos estudos indicando que a presença frequente de fármacos, em especial em águas destinadas ao consumo humano, pode favorecer o desenvolvimento de disfunções endócrinas, abortos espontâneos, distúrbios metabólicos, incidência de neoplasias malignas e desenvolvimento de bactérias mais resistentes (SODRÉ *et al.*, 2010). Pelo contexto exposto, é importante desenvolver e utilizar metodologias analíticas que permitam determinar a presença e monitorar antes e após diferentes processos de tratamento a remoção de fármacos em matrizes aquosas. Nesse sentido, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) é utilizada para separar, identificar e quantificar fármacos (JARDIM *et al.*, 2006; FEKETE *et al.*, 2014; OMAR *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a otimização multivariada vêm surgindo como uma boa alternativa para ganho considerável de tempo e simplificar possíveis variáveis durante o desenvolvimento

da metodologia (NETO *et al.*, 2003). A matriz Doehlert é um exemplo desse tipo de ferramentas e a otimização através da Análise de Variância (ANOVA) e metodologia de superfície de respostas (FERREIRA *et al.*, 2006). Nesse contexto, em uma breve busca na literatura atual entre os anos de 2007-2017 na base de dados *Web of Science*, observa-se que a mesma apresenta poucos trabalhos publicados utilizando as palavras-chaves (em inglês): *chromatography, pharmaceuticals AND Doehlert*. Nesse caso, foram encontrados nos últimos 10 anos apenas 8 citações com essas três palavras-chaves. Por outro lado, quando a busca foi realizada com as palavras (em inglês): *chromatography and pharmaceuticals*, o número de artigos publicados sobe para mais de 20000. Isto demonstra que a matriz Doehlert ainda é pouco empregada pela comunidade científica da área. A **Figura 1** mostra alguns comparativos realizados a partir das buscas por palavras-chaves no *Web of Science*.

Figura 1. Gráficos comparativos utilizando o algoritmo de busca do site Web of Science para os termos: *chromatography (C)*, *pharmaceuticals (P)*, *validartion (V)* and *Doehlert (D)* entre os anos de 2007 a 2017.



Fonte: adaptado de *Web of Science*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral desenvolver metodologia analítica para determinação de fármacos utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) empregando planejamento multivariado. Por sua vez, os objetivos específicos propostos nesse estudo são:

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a característica de cada fármaco, verificando suas bandas de absorção na região do ultravioleta-visível(UV-Vis), para futuro uso no detector DAD;
- Realizar estudos preliminares a fim de minimizar o número de variáveis e os limites das condições cromatográficas a serem otimizadas no planejamento multivariado;
- Utilizar ferramentas estatísticas de planejamento de otimização multivariada (fatorial com ponto central e Doehlert), para otimização das variáveis experimentais mais relevantes da técnica analítica selecionada;
- Determinar as figuras de mérito como linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e robustez fazendo uso de planilhas eletrônicas de validação.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia é um método de separação de componentes presentes numa amostra por meio de interações desta com duas fases, uma estacionária, que é representada pela coluna, e uma fase móvel, os solventes, sendo as duas fases imiscíveis. As polaridades da fase móvel e da fase estacionária sempre serão opostas para haver a separação dos compostos (SKOOG *et al.*, 2006).

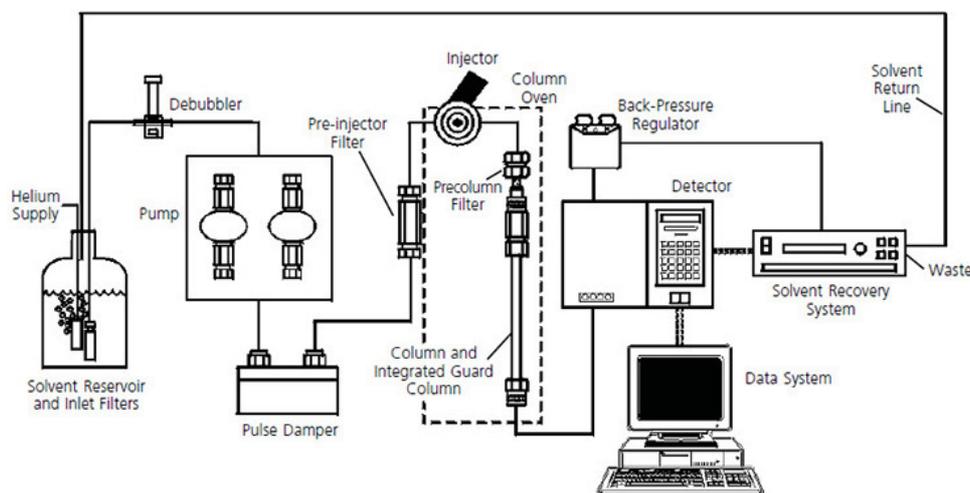
A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais importantes técnicas de separação de analitos, uma vez que consegue separar diversos compostos similares. Atualmente, o seu emprego em muitos laboratórios é considerado indispensável. A CLAE utiliza instrumentos que podem ser totalmente automatizados ou não. Ela emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel eluída a altas pressões (COLLINS *et al.*, 2006).

As principais vantagens do uso da CLAE são a sua versatilidade, mecanização, boa detectabilidade, alta resolução, tempo reduzido de análise e boa análise qualitativa e quantitativa (COLLINS *et al.*, 2006). As desvantagens são os altos custos de operação e de instrumentação, a falta de um bom detector universal e tempo de experiência do operador. O equipamento de CLAE consiste em algumas partes importantes como suporte para fases móveis, desgaseificador (não presente em todos os aparelhos), bomba de alta pressão mecânica ou pneumática (pode ser binária ou quartenária), injetor (manual ou automático), forno com suporte para coluna e detector (COLLINS *et al.*, 2006). As partes citadas estão representadas na **Figura 2**.

Na CLAE, a fase móvel (FM) desempenha um papel muito importante, pois sua composição é fundamental para o processo de separação dos analitos analisados. A FM precisa atender alguns critérios para ser utilizado na CLAE como: ter alto grau de pureza; dissolver a amostra sem decompor seus componentes; ter baixa viscosidade e ponto de ebulição, ser compatível com o detector e não interagir com a fase estacionária. Todos estes critérios são levados em conta na escolha dos solventes a serem empregados na FM, porém o seu custo e a sua toxicidade são também fatores decisivos na escolha. Nas análises em CLAE de fase reversa, os solventes mais utilizados são água ultrapura, metanol e acetonitrila, ambos em grau ultrapuro. O uso de

solventes impuros pode acarretar danos ao equipamento e na fase estacionária, além de aumento do sinal-ruído no detector (COLLINS *et al.*, 2006; SKOOG *et al.*, 2006).

Figura 2. Partes importantes de um equipamento de CLAE.



Fonte: Adaptado de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/hplc-troubleshooting-guide.html>

O tempo de retenção dos compostos presentes na amostra varia conforme maior ou menor interação com uma das fases, móvel ou estacionária. Por isso a força do solvente utilizado pode aumentar ou diminuir o tempo de retenção. Na fase reversa, a água tem força peso (S) zero em relação à acetonitrila que tem peso 2,6. Portanto, o uso de solventes com peso força maior do que zero, diminuem a retenção com a coluna. (COLLINS *et al.*, 2006).

A fase estacionária, assim como a FM, tem uma grande importância na separação dos analitos. Geralmente, as fases estacionárias em CLAE em fase reversa são compostas por partículas de silicatos, mais precisamente micropartículas porosas formadas à base de silanóis quimicamente ligadas a sílica. (COLLINS *et al.*, 2006). Nas sílicas quimicamente modificadas, os grupos funcionais são os que determinam a polaridade da coluna, sendo o octadecilssilano (C₁₈) o mais utilizado, por sua característica apolar e ser excelente em fase reversa. Na escolha da metodologia ideal para a separação, leva-se se em conta a polaridade dos analitos na escolha da fase estacionária, devido ao alto custo das colunas cromatográficas. Por exemplo, um composto apolar terá uma interação maior com a coluna, sendo esta apolar, o composto

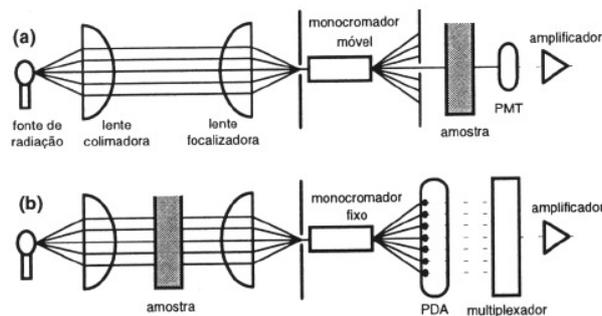
será mais retido que outro composto polar que terá maior interação com a fase móvel polar, saindo mais rápido da coluna.

A importância das bombas de alta pressão é impulsionar a FM do reservatório até a coluna. Para atravessar a coluna empacotada com eficiência, é necessária uma grande pressão para vencer a resistência à passagem da FM. Os sistemas de CLAE atuais trabalham com pressões de até 400 bar (35 MPa) e suas vazões devem ser contínuas, sem oscilações ou pulsos. Os fluxos variam de 0,1 a 5,0 mL min⁻¹ e os modelos de bombas podem ser mecânicas ou pneumáticas. Os reservatórios de FM geralmente ficam acima do aparelho e consistem em garrafas de vidro de grande volume (1,0 L ou mais) e são captadas por um filtro de aço inox que remove partículas de até 40 µm de partícula. No preparo da FM deve-se sempre filtrar com membrana de 0,22 µm antes de colocar no equipamento. Também, deve-se degaseificar com gás Hélio ou ultrassom ou a vácuo a FM, caso o equipamento não possua um acoplado na saída dos reservatórios. A presença de oxigênio dissolvido provoca a formação de bolhas, que atrapalham o sistema cromatográfico, gerando ruídos e diminuindo a eficiência da coluna (COLLINS *et al.*, 2006).

Tão importante quanto a separação, a detecção serve para identificar e quantificar os analitos separados pela coluna cromatográfica. É o componente mais caro e sofisticado da CLAE e possuem diversos tipos, de acordo com a característica de cada analito. Na CLAE existem poucos detectores universais, sendo o de índice de refração o mais conhecido. No entanto, o detector ultravioleta (UV) é o mais utilizado, sendo que este é seletivo em relação aos analitos que absorvem na faixa do UV-Vis (800 a 200 nm).

Um detector de arranjo de diodos (DAD) consiste em um circuito integrado único que possui dividido em 3 partes: um elemento de armazenamento de carga, um sensor de radiação e um elemento de leitura. O arranjo de diodos é produzido em um único cristal de silício, onde cada diodo age como transdutor de intensidade luminosa/carga elétrica e como elemento de armazenamento de carga. Atualmente, os detectores de arranjo de diodos disponíveis comercialmente são, geralmente, de custo elevado e, algumas vezes, têm a característica peculiar de incorporarem aplicações desnecessárias e, ao mesmo tempo, não poderem ser aplicados em sistemas mais simples de interesse do usuário (RAIMUNDO Jr. *et al.*, 1997).

Figura 3.Esquema de espectrofotômetros convencional com rede de difração móvel (a) e multicanal com arranjo de fotodiodos (b).



Fonte: RAIMUNDO JR. *et al.* 1997.

A grande vantagem do uso do DAD em relação ao detector UV-Vis convencional, é apresentar espectros tridimensionais, mostrando comprimento de onda, absorvância e tempo de retenção. Assim, é possível selecionar o comprimento de onda de máxima absorvância, melhorando a sua detectabilidade (COLLINS *et al.*, 2006). Além disso, a possibilidade de trabalhar com multicanais auxilia na detecção e quantificação de compostos com comprimento de ondas diferentes de forma simultânea, economizando tempo e FM, que resulta em redução de custos a laboratórios.

Existem outros tipos de detectores seletivos, porém mais específicos a um grupo de compostos, como o detector de fluorescência, que trabalha com compostos que emitem fluorescência, isto é, a luz excita o analito contendo a amostra, e a molécula excitada emite uma luz com comprimento de onda maior, detectada perpendicularmente a luz incidente. Este aspecto faz o detector de fluorescência ser o mais sensível de todos, podendo quantificar analitos na faixa de picograma (10^{-12} g). Detectores eletroquímicos também são utilizados, mas hoje em dia os espectrômetros de massas estão em alta. Trabalhando acoplado ao CLAE, o espectrômetro de massas possui um potencial de fornecer informações como estrutura e amassa molar do analito, assim como um processo de identificação e quantificação altamente eficientes (SKOOG *et al.*, 2006).

3.2 FÁRMACOS

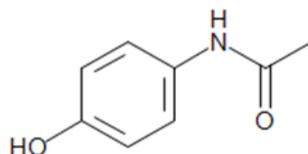
Os fármacos, grupo que abrange quantidade representativa de contaminantes emergentes, estão presentes em uma grande variedade de produtos comerciais como,

cosméticos, produtos de uso veterinário e medicamentos. Somente na União Europeia, há indicações de que cerca de 3000 fármacos diferentes são consumidos regularmente (TAMBOSI, 2008). Assim, nesse trabalho optou-se trabalhar com quatro fármacos: acetaminofeno (ACT), cafeína (CAF), sulfametoxazol (SFX) e diclofenaco (DCF). Tais fármacos representam um grupo de medicamentos de amplo uso (caso do acetaminofeno, cafeína e diclofenaco), dado que não necessitam prescrição médica e o sulfametoxazol que é um antibiótico e por essa razão tem o seu uso mais limitado, porém é dentre os antibióticos um dos mais empregados. As suas características físico-químicas estão no **apêndice 4**.

3.2.1 Acetaminofeno (ACT)

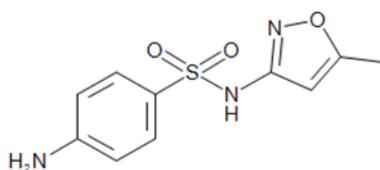
O N-(4-hidroxifenil)acetamida ou acetaminofeno (**Figura 4**), também conhecido comercialmente como paracetamol, é um dos medicamentos mais vendidos em todo mundo, indicado para tratamento de dores e resfriados por possuir propriedades antipiréticas e analgésicas (JAMES, 2003). Possui pKa igual a 9,38.

Figura 4. Estrutura do acetaminofeno (ACT).



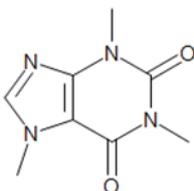
3.2.2 Sulfametoxazol (SMX)

O 4-amino-N-(5-metil-1,2-oxazol-3-il)benzeno-1-sulfonamida ou sulfametoxazol (**Figura 5**) é um antibiótico pertencente ao grupo das sulfonamidas, ácidos fracos e bastante solúveis. Essa classe de antibióticos foram as primeiras drogas antimicrobianas mundialmente comercializadas (YANG *et al*, 2011), tanto para uso humano quanto animal (BAI e ACHARYA, 2016). Possui pKa igual a 1,60.

Figura 5. Estrutura do sulfametoxazol (SMX).

3.2.3 Cafeína (CAF)

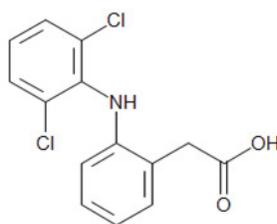
A cafeína (1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona), **Figura 6**, é um alcaloide natural encontrado em diversas plantas, tais como café, cacau, chás, entre outras, no entanto também pode ser sintetizado para uso como aditivo em alimentos e suplementos dietéticos (TURNBULL *et al.*, 2017). Atua como estimulante do sistema nervoso central, retardando os efeitos do sono e aumentando o estado de alerta (INDERMUHLE *et al.*, 2013; LORIST e TOPS, 2003). Possui pKa igual a 10,40.

Figura 6. Estrutura da cafeína (CAF).

3.2.4 Diclofenaco (DCF)

O diclofenaco ou ácido 2-[2-(2,6-dicloroanilino)fenil]acético, **Figura 7**, é uma fármaco anti-inflamatório não esteroidal arilacético (AINE) com ação analgésica, bastante prescrito para doenças reumáticas, tanto em humanos quanto em animais. (GÓMEZ-LECHÓNA *et al.*, 2003). Está entre os medicamentos mais consumidos no mundo (VIENO e SILLANPÄÄ, 2014). Possui pKa igual a 4,15.

Figura 7. Estrutura do diclofenaco (DCF).



3.3 PLANEJAMENTO MULTIVARIADO

Segundo Neto *et al.* (2010), em um planejamento experimental “um dos problemas mais comuns para quem faz experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre outra variável de interesse”. Conforme Peralta-Zamora *et al.* (2005), “a otimização de parâmetros experimentais de relevância seja uma das etapas mais críticas do trabalho científico, principalmente daqueles que objetivam o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em grande escala”.

O planejamento multivariado de experimentos vem sendo uma ótima ferramenta, que possui um grande potencial de aplicação em muitas etapas do processo de desenvolvimento de metodologias e processos. Atualmente já existem ferramentas e aplicativos e *softwares* (alguns gratuitos) baseados em planejamento multivariado de experimentos que são amplamente utilizados para o desenvolvimento dos parâmetros em diversas áreas. Ao iniciar o planejamento experimental, os fatores devem estar definidos previamente junto com as respostas de interesse, ambos podem ser qualitativos ou quantitativos, porém as respostas são as variáveis de saída do sistema, que é o mais interessante pois estes podem ou não serem afetadas pelas modificações provocadas pelos fatores. Assim que definir os fatores e suas respectivas respostas, é definido o objetivo que queremos alcançar ao escolher o planejamento mais adequado (NETO *et al.*, 2010).

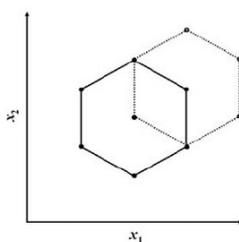
Segundo Taguchi (1993), os experimentos podem ser realizados para se encontrar os níveis dos fatores do sistema que minimizam os desvios das características funcionais em relação aos valores nominais do projeto. São estabelecidos, desta forma, os níveis ótimos dos fatores e as tolerâncias aceitáveis. Segundo Galdamez (2002), “o planejamento de experimentos tem como principal função melhorar a qualidade dos

produtos e ou processos, avaliando um maior número de variáveis e mesmo assim reduzindo o número de testes e otimizando o uso de recursos” (GALDAMEZ, 2002).

Existem diversos tipos de planejamentos multivariados. Neste trabalho foi utilizada a matriz Doehlert quadrática com três variáveis, empregando uma planilha eletrônica desenvolvida por Ferreira e Teófilo (2005). A matriz Doehlert foi desenvolvida por David H. Doehlert em 1970 e essa possibilita o estudo de diversas variáveis simultaneamente, reduzindo o número de experimentos a serem testados e pode ser utilizados juntos com a metodologia de superfícies de resposta, a fim de otimizar condições do experimento (RUSCHEL, 2016). Os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular e o cálculo do número total de planejamentos é realizada pela fórmula $k^2 + k + pc$, no qual k é o número de fatores e pc é o número de experimentos do ponto central. Uma grande propriedade desta matriz é o número de níveis que cada variável possui (TEÓFILO *et al.*, 2006).

Esta matriz descreve um domínio circular para duas variáveis, esférico para três e hiperesférico para quatro ou mais variáveis. Para duas variáveis, a matriz é representada por um hexágono com ponto central representada na **Figura 8** (TEÓFILO *et al.*, 2006).

Figura 8. Planejamento Doehlert com duas variáveis (linha preta) com a adição de novos experimentos (linha cinza).



Fonte: Adaptada de TEOFILLO e FERREIRA, 2006.

Para avaliar o modelo, o modo mais confiável é a ANOVA. Nela, a variação total da resposta é definida como a soma quadrática de dois componentes: a soma quadrática da regressão (SQ_{regr}), corrigida pela média e a soma quadrática dos resíduos (SQ_{res}). A soma quadrática da variação total, corrigida para a média (SQ_{total}) é descrita pela equação 1 e o detalhamento nas equações 2 e 3.

$$SQ_{\text{total}} = SQ_{\text{regr}} + SQ_{\text{res}} \quad (1)$$

$$SQ_{\text{regr}} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (2)$$

$$SQ_{\text{res}} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 \quad (3)$$

Onde: m = número total de níveis do planejamento; \hat{y}_i = valor estimado pelo modelo para o nível i; r_i = valor médio das replicatas.

As replicatas do ponto central deixarão um resíduo para cada observação e a soma quadrática destes resíduos resulta na soma quadrática residual somente do nível zero. Para obtermos um bom modelo, necessita-se ter uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa. Isto quer dizer que a maior parte da variação total das observações em volta da média é mostrada pela regressão e o restante são os resíduos. Da variação que permanece com os resíduos, espera-se que a maior parte fique o com o erro experimental (erro puro) e não com a falta de ajuste que está relacionada com o modelo. O valor do R^2 demonstra a fração da variação que é explicada pela falta de ajuste do modelo, portanto, será melhor o ajuste quanto mais próximo de um (1) estiver a razão do SQ_{res} pelo SQ_{total} (TEÓFILO *et al.*, 2006).

Uma boa prática é examinar a distribuição dos resíduos, pois ajuda a verificar se não há nada de errado com o modelo. Neste caso, pode-se fazer um gráfico dos valores estimados pelo modelo (\hat{y}_i) com os valores da diferença entre os valores observados experimentalmente (y_i) e seus respectivos valores estimados, isto é, (\hat{y}_i) *versus* ($y_i - \hat{y}_i$). Se os resíduos não estiverem aleatoriamente distribuídos, pode-se desconfiar do modelo e investir em outros recursos para sua melhoria.

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Para que um método analítico seja confiável, este deve passar por várias etapas de avaliação que comprovem a sua qualidade e a sua capacidade em fornecer resultados legítimos, porque dados analíticos duvidosos podem levar a conclusões errôneas. Algumas instituições fornecem materiais indicando o procedimento de realização da validação, mas não há um procedimento unificado estabelecido (RIBANI *et al.*, 2004).

No Brasil, o órgão que regulamenta a competência de laboratórios e ensaios é o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização, e Qualidade Industrial (INMETRO).

O INMETRO (2011) define a validação como comprovação, através do fornecimento de evidencia objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico foram atendidos. De acordo com Ribani e colaboradores (2004) torna-se essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação na faixa de concentração e o tipo de amostra sejam adequados, baseados nos parâmetros analíticos utilizados no método.

Segundo Ribeiro (2008), para obtermos um bom desempenho da técnica analítica precisamos de dois pontos cruciais: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos do processamento realizado. A validação é uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de uma metodologia, estabelecendo os limites destes parâmetros através da estimativa das figuras de mérito.

As figuras de mérito são os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas de análise e são descritas como: seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão, exatidão e robustez. Estes parâmetros são estimados de acordo com a metodologia analítica aplicada ou o protocolo de validação a ser seguido (RIBEIRO, 2008). O tempo relativo para um analista ou uma equipe efetuarem uma validação é bastante alto. Por isso, tem se aplicado novas técnicas e ferramentas para diminuir esse tempo sem afetar a precisão dos resultados. Por isso Ribeiro *et al.* (2008), desenvolveram uma planilha objetiva e confiável, utilizando o programa *Microsoft Excel*® para executar os resultados da validação. Nesta planilha estão presente a maioria das figuras de mérito com exceção da seletividade, por se tratar um parâmetro específico de algumas técnicas analíticas.

3.4.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade de uma metodologia em determinar o composto de maneira inequívoca na presença de outras substâncias que podem interferir na medição. (LANÇAS, 2009). Portanto, a seletividade tende a garantir que resposta obtida seja do analito desejado, assegurando os resultados das outras figuras de mérito estimadas (RIBANI *et al.*, 2004).

3.4.2 Linearidade

A linearidade de um método é a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do composto na amostra, em uma dada faixa de concentração (INMETRO, 2011). Ela expressa a faixa na qual o sinal analítico, a variável dependente y_i , é linearmente proporcional a à sua concentração, a variável independente x_i , descrevendo uma equação conhecida como curva de calibração (RIBEIRO, 2008). De acordo com o INMETRO (2011), a equação da reta que relaciona duas variáveis é mostrada na equação 4:

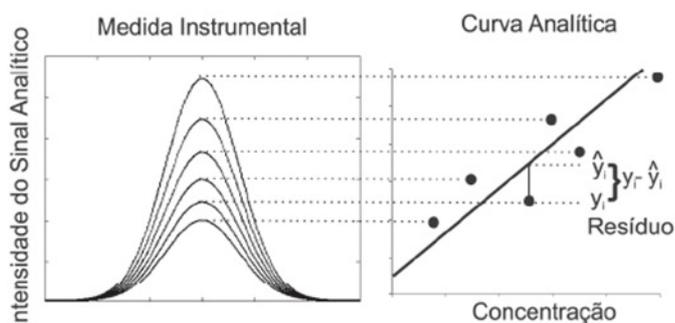
$$y_i = a_0 + a_1 x_i \quad (4)$$

Onde: y_i = variável dependente (área do pico); x_i = variável independente (concentração); a_0 = coeficiente linear; a_1 = coeficiente angular;

O ajuste de qualquer equação matemática é feita pelo ajuste pelo método dos quadrados mínimos, no qual a melhor curva vai ser a que fornecer o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q) obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais, demonstrado na **Figura 9** e na equação 5, abaixo (RIBEIRO, 2008).

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (5)$$

Figura 9. Curva de calibração mostrando a estimativa do resíduo no sinal analítico.



Fonte: Adaptada de RIBEIRO *et al.*, 2008

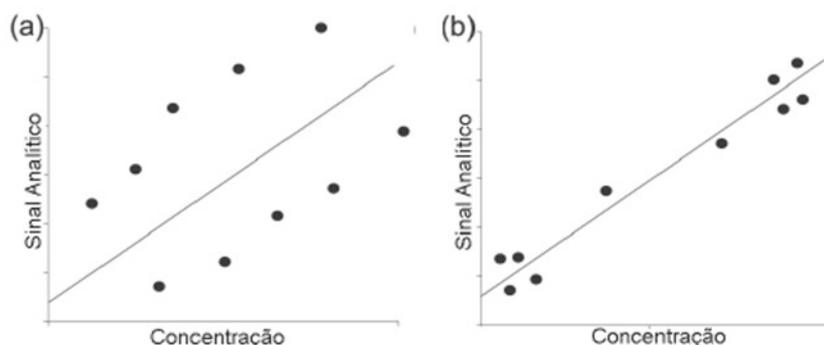
Conhecidos os coeficientes da curva analítica, estes poderão ser utilizados para conhecer a concentração da espécie de interesse de novas amostras, a partir do seu sinal analítico. Para adequar o ajuste da curva, é calculado o coeficiente de correlação, r , que é a razão da covariância entre concentração, x , e os sinal analítico (área do pico), y , descrita na equação 6. O coeficiente de correlação tem magnitude $-1 < r < 1$ sendo mais próximo de 1 ou -1, menor será o erro em y .

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2) (\sum (y_i - \bar{y})^2)}} \quad (6)$$

Onde: y_i = variável dependente (área do pico); x_i = variável independente (concentração); a_0 = coeficiente linear; a_1 = coeficiente angular;

Segundo Ribeiro, (2008), modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos na curva podem fornecer um bom coeficiente de correlação. Na **Figura 10 (b)**, por exemplo, uma equação polinomial passando pelos dois pontos do meio da curva poderia apresentar valores menores para a soma dos quadrados dos resíduos, resultando um melhor ajuste, caso fosse numa equação linear. Por estes motivos, tem se a importância da faixa linear ou “*range*”, que faz necessária uma análise minuciosa dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes para determinar esta faixa (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Figura 10. Curva de calibração com alto resíduo no sinal analítico (a) e níveis de calibração mal distribuídos ao longo da faixa de calibração (b).



Fonte: adaptada de RIBEIRO *et al.*, 2008

A análise do gráfico dos resíduos ajuda a perceber possíveis problemas no ajuste da curva como, desvios de linearidade, amostras atípicas, heterocedasticidade e homocedasticidade (RIBEIRO, 2008). Segundo Ribeiro (2008), um gráfico de erros é

homocedástico quando há uma variância constante ou homogeneidade de variâncias, contendo distribuições uniformes e média zero.

3.4.3 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) apresenta a menor concentração da substância na amostra analisada, que pode ser detectada, mas não necessita ser quantificada quando utilizada em um procedimento experimental. Segundo a ANVISA (2003) o LD pode ser determinado pelos parâmetros da curva analítica, demonstrada na equação 7.

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad (7)$$

Onde:DPa = Desvio padrão das replicatas; IC = Coeficiente angular da curva analítica

Segundo Ribeiro (2008), há mais três formas de determinar o LD: método visual, método baseado em parâmetros da curva analítica e o método do sinal-ruído (SR). No método visual, analisa-se no cromatograma contendo a análise de baixas concentrações, considerando o LD como sendo a menor concentração detectada, sendo distinta do SR. O método do SR, é uma estimativa entre a menor concentração obtida em baixas concentrações em comparação ao SR de uma amostra do branco. Geralmente é o método mais usado e considera-se aceitável uma relação 3:1 ou 2:1 do SR.

O método baseado em parâmetros da curva analítica, leva em consideração o intervalo de confiança da regressão e é definido como a concentração mínima do analito que é medida com o intervalo de confiança de 99% ou 95%. Este método é bastante robusto, porém complexo, tanto que é pouco utilizado por laboratórios de qualidade. As equações 8 e 9 descrevem o cálculo do LD utilizado na planilha *Microsoft Excel*® utilizada por Ribeiro (2008).

$$y_c = a_0 + s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8)$$

$$LD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

Onde: y_i = variável dependente (área do pico); x_i = variável independente (concentração); a_0 = coeficiente linear; a_1 = coeficiente angular; s_y = desvio padrão; N = graus de liberdade; t = valor apropriado da distribuição Student.

3.4.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) apresenta a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão, da substância na amostra analisada, quando utilizada em um procedimento experimental. Segundo a ANVISA (2003) o LQ pode ser determinado pelos parâmetros da curva analítica, demonstrada na equação 10.

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (10)$$

Onde: DPa = Desvio padrão das replicatas; IC = Coeficiente angular da curva analítica

Segundo Ribeiro (2008), há mais três formas de determinar o LQ: método visual, método baseado em parâmetros da curva analítica e o método do SR. No método visual, observa-se no cromatograma contendo a análise do ponto de menor concentração utilizada nos parâmetros de linearidade, exatidão e precisão. Já o método do SR, é uma estimativa entre a menor concentração obtida no ponto de menor concentração obtida nas figuras de mérito em comparação ao SR de uma amostra do branco. Geralmente é o método mais usado e considera-se aceitável uma relação 10:1 do SR.

No método baseado em parâmetros da curva analítica, é baseado em parâmetro quantitativo, semelhante ao LD, mostrado no item 3.3.3. As equações 11, 12 e 13 descrevem o cálculo do LQ utilizado na planilha Microsoft Excel® utilizada por Ribeiro (2008).

$$y_h = a_0 + 2 \cdot s_y \cdot t \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

$$x_c = \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (12)$$

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

Onde: y_i = variável dependente (área do pico); x_i = variável independente (concentração); a_0 = coeficiente linear; a_1 = coeficiente angular; s_y = desvio padrão; N = graus de liberdade; t = valor apropriado da distribuição student

3.4.5 Precisão

Segundo a ANVISA, (2003), a precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Este parâmetro é dividido em três partes: a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade.

O termo repetibilidade é a precisão intra-corridas, quer dizer, é a precisão dos resultados da análise referida ao mesmo analista e a mesma instrumentação. Já o termo precisão intermediária, que é a precisão inter-corridas refere-se a precisão dentro do mesmo laboratório, podendo-se variar a instrumentação, ou alterar os analistas ou analisar em diferentes dias (RIBEIRO, 2008). O termo reprodutibilidade define-se para determinar a precisão dos resultados de diferentes laboratórios, com a mesma metodologia, que não será aplicada neste estudo.

Os resultados da precisão são estimados pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) como também é denominado. É expresso pela equação 14.

$$DPR = 100 \times \frac{s}{x} \quad (14)$$

Onde: DPR = Desvio padrão relativo (%); s = desvio padrão; x = média dos resultados obtidos.

Segundo Huber (1998) afirma que em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20% dependendo da complexidade da amostra. Conforme a resolução 899 da ANVISA (2003) determina-se que sejam realizadas no mínimo nove (9) determinações sendo contemplada toda a faixa de trabalho. Já o INMETRO (2011) sugere que seja determinado de sete (7) a nove (9) replicatas para o cálculo do DPR.

3.4.6 Exatidão

Segundo Lanças (2004), a exatidão é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Ela condiz com a

recuperação, em %, de uma concentração conhecida em adição a uma amostra antes da submissão do método. Portanto, o cálculo da exatidão é dado pela equação 15.

$$R(\%) = \frac{(C_2 - C_1)}{C_2} \times 100 \quad (15)$$

Onde: C1 = Concentração da amostra pura; C2 = concentração da amostra fortificada; C3 = concentração do padrão adicionado.

Segundo Ribeiro (2008), a exatidão pode ser determinada de duas formas: usando a metodologia em uma substância pura conhecida (padrões primários de referência) ou na comparação de resultados obtidos usando outra metodologia. A ANVISA (2003) estabelece que a exatidão deva ser estabelecida em três níveis diferentes de concentração, semelhante a precisão e com análises em triplicata, no mínimo.

3.4.7 Robustez

A definição de robustez, segundo Ribeiro (2008), é a capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos utilizados na metodologia aplicada nas demais estimativas das figuras de mérito, sem alterar significativamente os parâmetros de exatidão e precisão. Nas técnicas analíticas, como na CLAE, a robustez é estimada alterando parâmetros cromatográficos, como fluxo, temperatura de forno ou composição da FM. Geralmente os cálculos são determinados avaliando o DPR, em %, conforme a equação 14 no item 3.4.5.

3.4.8 Efeito de Matriz

De acordo com Pinho *et al.* (2009), o efeito matriz é importante, porque pode causar alterações durante a análise cromatográfica como alteração significativa das áreas devido ao aumento sinal do detector DAD, superestimando os resultados; possíveis erros na identificação dos analitos, porque na matriz podem surgir impurezas que podem coeluir ao mesmo tempo que o analito estudado e também um possível mascaramento do pico do analito. Resumindo, o efeito de matriz também pode ser

definido como o aumento ou diminuição da resposta cromatográfica provocada pela matriz (GARCIA-REYES *et al.*, 2009).

Para avaliar o efeito matriz, a equação 16 é utilizada para o cálculo comparando a variação da exatidão da solução padrão pela solução preparada com a matriz.

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{X_2} \times 100 \quad (16)$$

Onde: X_1 = Média das áreas da solução analítica preparada na matriz, para cada analito; X_2 = Média das áreas da solução analítica preparada no solvente, para cada analito.

O efeito matriz pode ser classificado em três categorias de acordo com o seu valor. Com valores entre -20% e +20% não é considerado efeito de matriz; como valores entre -50% e +20% ou -20% e +50%, ocorre um efeito de matriz médio e acima dos +50% e abaixo dos valores de -50% ocorre um efeito de matriz forte (FERRER *et al.*, 2011).

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E REAGENTES:

As informações dos reagentes, padrões, materiais e vidrarias utilizadas para a realização dos ensaios em todas as etapas estão apresentadas de forma detalhada no **apêndice 1**.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Os fármacos foram pesados e preparados individualmente em soluções-mãe (SM), em solvente específico e suas concentrações estão na **Tabela 1**.

Tabela 1. Concentrações das soluções-mãe de cada fármaco e o solvente utilizado.

Fármaco	Solvente	Concentração (mgL ⁻¹)
Acetaminofeno (ACE)	Acetonitrila	495
Cafeína (CAF)	Acetonitrila	550
Sulfametoxazol (SMX)	Acetonitrila	505
Diclofenaco de potássio (DCF)	Acetonitrila	512
Teobromina (PI)	Água Ultrapura	201

Após, com as SM, foi preparada uma solução de trabalho onde os quatro fármacos foram reunidos em água ultrapura e com concentração aproximada de 100 mg L⁻¹. A partir da solução de trabalho, foi elaborada a curva analítica com 6 (seis) pontos. Adicionalmente, foi realizada a adição do padrão interno (PI) igualmente, em cada nível que nesse caso foi a teobromina (TBN) em todos os pontos utilizados para a construção da curva de calibração. A **Tabela 2** apresenta a concentração de cada nível da curva analítica elaborada.

Tabela 2. Concentração final dos fármacos utilizados em cada ponto da curva analítica.

	PI (mg L ⁻¹)	ACE (mg L ⁻¹)	CAF (mg L ⁻¹)	SMX (mg L ⁻¹)	DCF (mg L ⁻¹)
Ponto1	20,1	0,74	0,83	0,76	0,77
Ponto2	20,1	0,99	1,10	1,01	1,03
Ponto3	20,1	1,98	2,20	2,02	2,06
Ponto4	20,1	4,95	5,50	5,05	5,15
Ponto5	20,1	9,90	11,00	10,10	10,30
Ponto6	20,1	19,98	22,00	20,20	20,60

Sendo: Conc. = concentração do fármaco

4.3 INSTRUMENTAÇÃO

A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent (ex-HP) modelo 1100, equipado com bomba quartenária, modelo 1318A, com detector DAD modelo 1315B e com injetor manual Rheodyne 8.0 com alça de 20 µL. Os dados obtidos foram analisados usando o *software* “AgilentChemstation - versão 3.2”. As FM utilizadas em todo o estudo foram preparadas com os reagentes e materiais listados no Apêndice A. Como a definição da composição da FM utilizada na validação, serão definidas de acordo com os resultados das etapas de planejamento, portanto os parâmetros cromatográficos serão descritos no item 5.2.

Para a varredura das bandas de absorção de cada fármaco em estudo e determinar o comprimento de onda a ser utilizado no detector DAD, foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 (Varian).

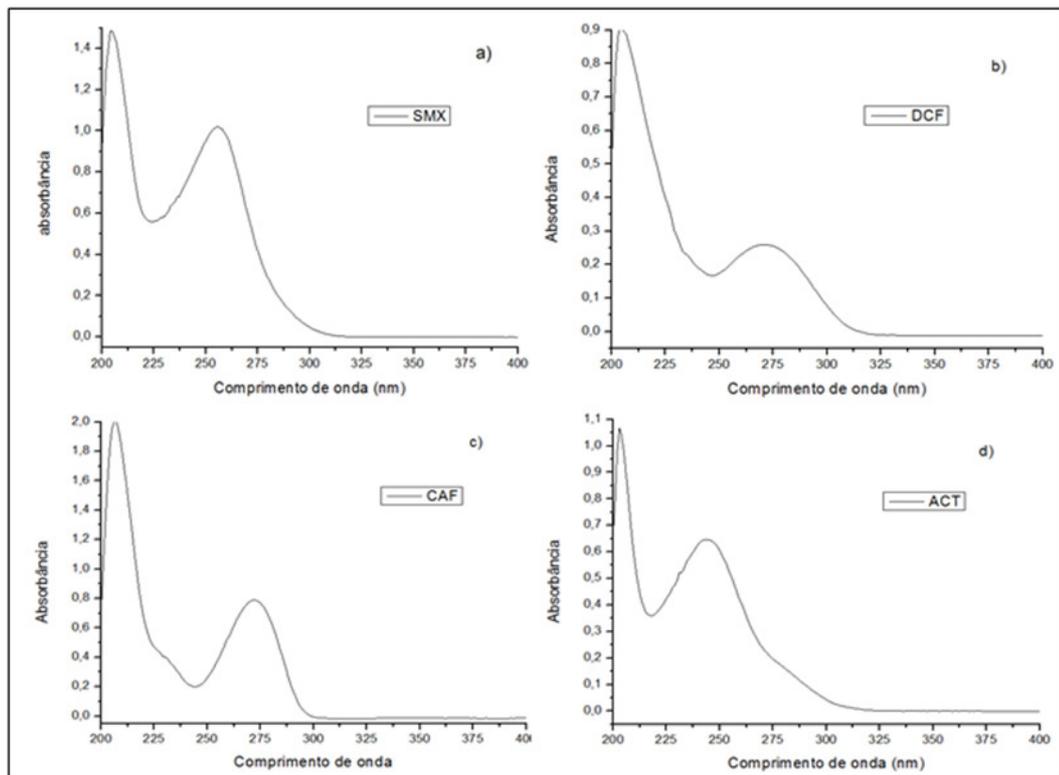
O programa *Microsoft Excel*® foi utilizado para calcular as planilhas de planejamento Doehlert e da validação de metodologia.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 DEFINIÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS UV

Inicialmente, foi necessário realizar a escolha dos comprimentos de onda que seriam utilizados no detector DAD. Para isso, foram realizados estudos preliminares onde soluções de cada um dos fármacos em estudo foram preparadas em água e, após, foi realizada a varredura (*scan*) desde 200 a 800 nm. Todos os quatro fármacos foram testados usando uma solução aquosa a 10 mg L^{-1} e uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico foi utilizada. A **Figura 11** apresenta os espectros UV-Vis dos fármacos em estudo.

Figura 11. Espectro de varredura do SMX (a), DCF (b), CAF (c) e ACT (d).



Após a varredura, os comprimentos de onda a serem monitorados no detector DAD foram definidos e estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 03 – Comprimentos de onda utilizados no detector DAD.

Fármaco	Comprimento de onda (nm)
ACT	254
CAF	272
SMX	265
DCF	272

5.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICAS

5.2.1. Estudo Preliminar

Para diminuir o número de variáveis a serem utilizadas no planejamento Doehlert, foi necessário realizar alguns testes preliminares para definir a composição da FM, coluna e o fluxo de trabalho da FM na CLAE. Foram utilizadas duas colunas, uma apolar Supelco Ascentis Express® composta por uma fase estacionária C₁₈ (100mm x 3,0mm x 2,7µm), e a outra coluna Supelco NH₂® composta por uma fase estacionária com terminação amina (250mm x 4,6mm x 5,0µm). Realizou-se uma primeira avaliação para verificar qual das duas colunas seria mais indicada para separar os analitos de interesse.

Assim, o primeiro teste foi realizado com a coluna C₁₈ em modo isocrático e com fluxo de FM de 0,5 mL min⁻¹, temperatura do forno em 25°C e volume de injeção de 20 µL. A composição da FM foi testada em três situações diferentes, descritas abaixo pelas letras A, B e C.

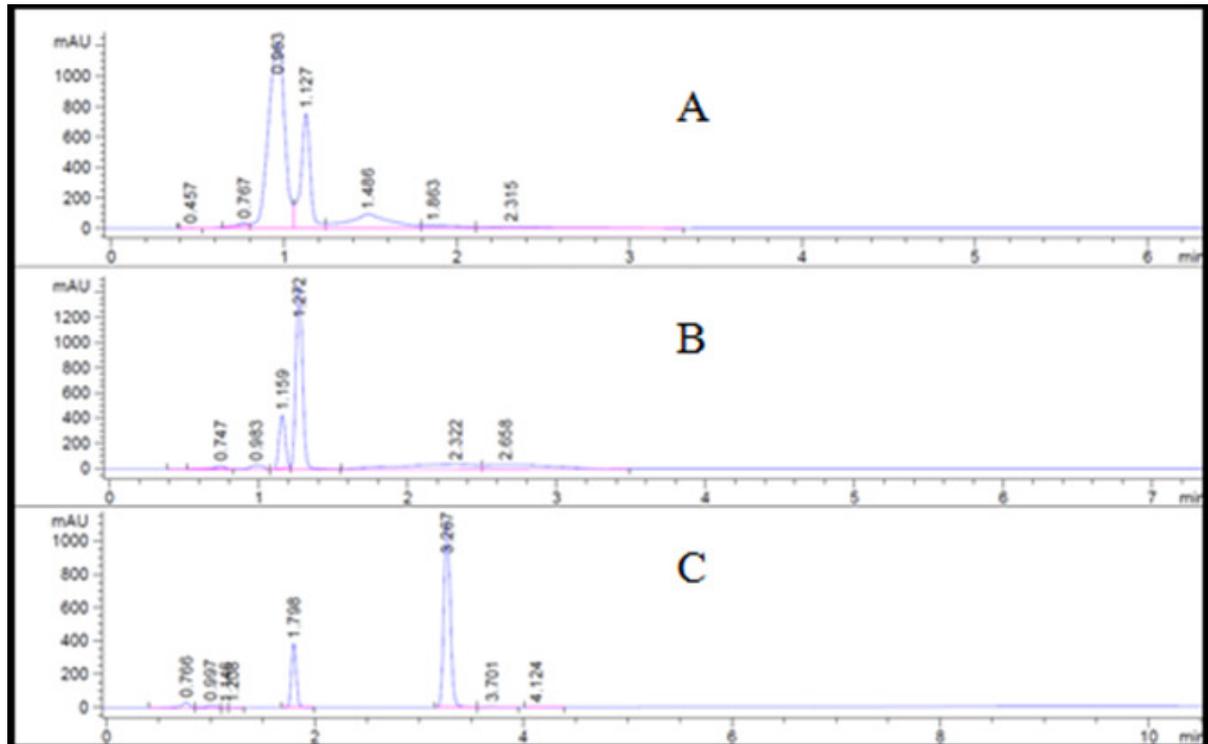
Situação A: 50% água ultrapura – 50% acetonitrila;

Situação B: 80% água ultrapura – 20% acetonitrila;

Situação C: 90% Tampão Fosfato 2 mmolL⁻¹ – 10% acetonitrila.

Nos cromatogramas obtidos para as condições A e B (**Figura 12**), pôde-se observar picos pouco resolvidos de ACT e CAF, e os picos de SMX e DCF apareceram em baixa intensidade. No cromatograma obtido a partir da condição C, o ACT e CAF apresentaram uma melhor resolução, porém os picos de SMX e DCF não apareceram no cromatograma.

Figura 12. Cromatogramas obtidos no primeiro teste preliminar (situação A, B e C).



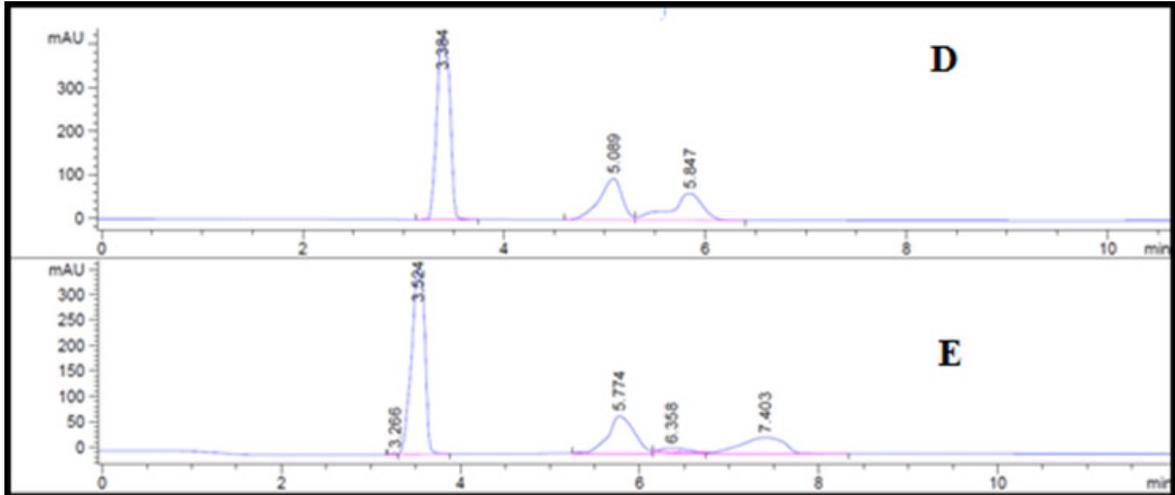
O segundo teste preliminar, foi realizado utilizando a coluna amino (NH_2), em modo isocrático, com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno a 25°C e o volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. A composição da FM foi testada em duas situações diferentes, descritas abaixo pelas letras D e E.

Situação D: 80% água ultrapura – 20% acetonitrila;

Situação E: 90% água ultrapura – 10% acetonitrila.

Comparando os cromatogramas da **Figura 12** com os cromatogramas da **Figura 13**, verifica-se que os picos cromatográficos obtidos com a coluna C_{18} apresentaram melhor definição, sendo estreitos e sem cauda. Na **Figura 13**, verifica-se que em D e E apareceram três picos (provavelmente ACT, SMX e DCF), e devido a sua semelhança de polaridade com a CAF, o primeiro pico poderia estar co-eluído com o ACT (O'NEIL, 2006). Por esses motivos, a coluna amino foi descartada e foi realizado um terceiro teste, com o uso do aditivo trietilamina (TEA) na FM. Ademais se optou por alterar o modo de eluição de isocrático para gradiente nessa nova oportunidade.

Figura 13. Cromatogramas obtidos para o segundo teste preliminar (situação D e E).

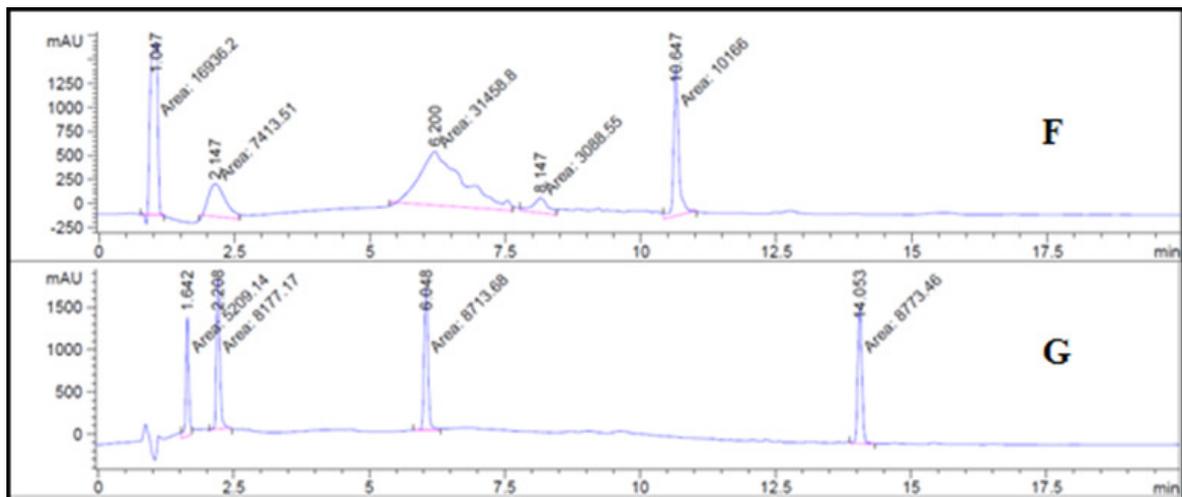


Assim, nos testes subsequentes, a coluna C_{18} foi empregada com FM em modo gradiente e com fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura do forno em 25°C e volume de injeção de $20 \mu\text{L}$. A composição da FM foi testada em duas situações diferentes, descritas abaixo pelas letras F e G.

Situação F: 85% TFOS Tampão Fosfato pH 2,5 Trietilamina 1,0% – 15% acetonitrila (0 – 3 min); 50:50 (3 – 20 min).

Situação G – 80% Tampão Fosfato pH 2,5 Trietilamina 1,0% – 20% acetonitrila (0 – 3 min); alternando até 50:50 (3 – 10 min); 50:50 (10 – 20 min).

Figura 14. Cromatogramas obtidos para o terceiro teste preliminar (situação F e G).



Como visto na **Figura 14**, o terceiro teste preliminar (cromatograma G) apresentou uma separação satisfatória dos quatro fármacos, obtendo uma boa resolução, picos estreitos e

sem cauda, que são aspectos ideais para quantificação (COLLINS *et al.*, 2006). Portanto, a composição da FM e o modo gradiente (situação G) foi à escolhida para prosseguir os testes de otimização das condições cromatográficas. Dessa forma, foi possível diminuir o número de variáveis a serem otimizadas, como coluna (fase estacionária), temperatura de forno e volume de injeção, permanecendo apenas o fluxo de FM e sua composição a serem otimizadas utilizando um planejamento multivariado (matriz Doehlert), que é o mais adequado já que permite trabalhar com diversos e diferentes níveis para cada uma das variáveis selecionadas.

5.2.2 Matriz Doehlert

O planejamento utilizando a Matriz Doehlert, foi elaborado, fazendo uso de uma planilha *Microsoft Excel*®, elaborada por Ribeiro *et al.* (2009). Assim, o modelo quadrático de três variáveis foi selecionado e, definidas as variáveis testadas conforme mostra a **Figura 15**. As variáveis escolhidas foram o Fluxo da FM (5 níveis) variando de 0,3 a 0,7 mLmin⁻¹, com intervalos de 0,1 mL min⁻¹; pH da solução de FM (7 Níveis) variando de 2,5 a 5,5, com intervalos de pH de 0,5 e porcentagem de fase aquosa na FM (3 níveis), variando de 80 a 90%, com 85% como ponto central.

Figura 15. Parâmetros da composição da matriz Doehlert, modelo quadrático, com três variáveis, para os fármacos deste estudo.



**Planejamento Doehlert - Modelo Quadrático
Três Variáveis**

Identificação		Planejamento Doehlert - Contaminantes HPLC						
Variáveis	Níveis da variável 1							
	-1	-0,5	0	0,5	1			
Fluxo FM	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7			
ph FM	Níveis da variável 2							
	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,87	
	2,5	3,00	3,50	4	4,50	4,99942	5,5	
% . FM Aq	Níveis da variável 3							
			-0,817	0	0,817			
		80	85	90				

Na **Figura 16**, são apresentadas as 17 análises (com 5 réplicas do ponto central) que foram realizadas para os testes com a matriz Doehlert. Optou-se por elaborar, a partir dessa planilha, quatro planilhas iguais para cada um dos fármacos em estudo. Os comprimentos de

onda selecionados no DAD foram de 254, 265 e 272 nm. Assim, a ordem de eluição para as condições testadas foi ACT, CAF, SMX e DCF. Depois de efetuadas as todas 17 injeções, realizadas de forma aleatória, foram obtidas as áreas para realizar os cálculos da ANOVA, gráfico de probabilidade normal e o gráfico de Superfície de Resposta. As áreas e o tempo de retenção de todos os cromatogramas estão apresentados no **Apêndice 2**.

Figura 16. Tabela de planejamento da matriz Doehlert contendo os ensaios a serem otimizados.

Planejamento			
Ensaio	Fluxo FM	ph FM	% FM Aq
1	0,7	4	85
2	0,6	5,5	85
3	0,6	4,500577	90
4	0,3	4	85
5	0,4	2,5	85
6	0,4	3,499423	80
7	0,6	2,5	85
8	0,6	3,499423	80
9	0,4	5,5	85
10	0,5	4,999423	80
11	0,4	4,500577	90
12	0,5	3,000577	90
13	0,5	4	85
14	0,5	4	85
15	0,5	4	85
16	0,5	4	85
17	0,5	4	85

A **Figura 17** mostra os resultados de ANOVA obtidos nos ensaios da matriz Doehlert do fármaco acetaminofeno, utilizando o comprimento de onda de 254 nm para cálculo da área, a qual foi utilizada como resposta analítica. Para este modelo foi considerado um nível de significância de 0,05.

Figura 17. Cálculo da ANOVA da matriz Doehlert para o ACT.

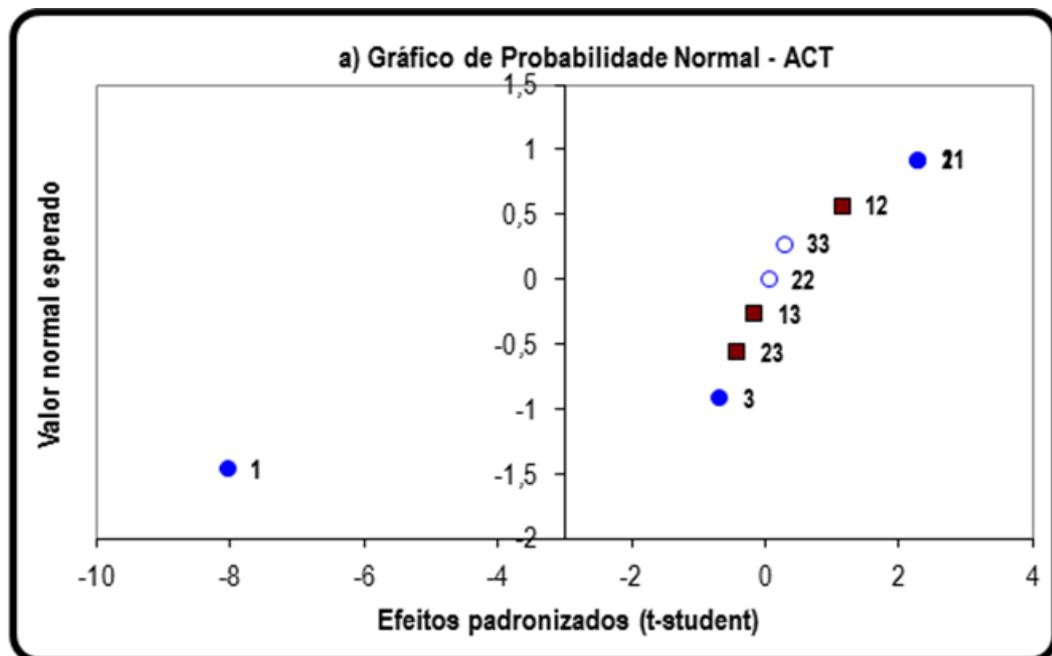
a) Análise de Variância (ANOVA) - Modelo Quadrático - ACT					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	2668784	9	296531,5538	8,0191 SG	0,00597
Resíduos	258847,99	7	36978,28372		
F. Ajuste	55288,585	3	18429,52848	0,3621	0,78484
Erro Puro	203559,4	4	50889,85015		
Total	2927632	16			
% variação explicada				91,158	
% máx. de variação explicável				93,047	

***Onde:** SG = Significativo; FV = Fonte de variação; SQ = Soma quadrática; nGL = Número de graus de liberdade; MQ = Média quadrática, Fcalc = Valor de F calculado e p = Nível de significância.

Adicionalmente, é possível observar que o modelo quadrático proposto para a variação das condições cromatográficas apresentou uma regressão SIGNIFICATIVA e o Fator de ajuste NÃO SIGNIFICATIVO. Tal condição é necessária para validar o planejamento. Nesse contexto e em todos os casos, foi observado que a maior parte da variação é descrita pela equação da regressão e os restantes pelos resíduos. Em relação à variação contida nos resíduos, a maior parte é devida ao erro puro que é relativo ao erro experimental e o restante é descrito pela falta de ajuste que está diretamente relacionado com o modelo. Isto indica, conforme descrito no cap. 3.3, que a ANOVA é um bom modelo para os parâmetros propostos.

Portanto, em base destes resultados, é possível analisar os outros parâmetros, como o gráfico de probabilidade normal que apresenta as variáveis que mais influenciam a condição cromatográfica em estudo. Na Figura 18 observa-se o caso do ACT. Para os demais fármacos um comportamento muito parecido foi identificado (ver Apêndice 3).

Figura 18. Gráfico de probabilidade normal para o ACT.

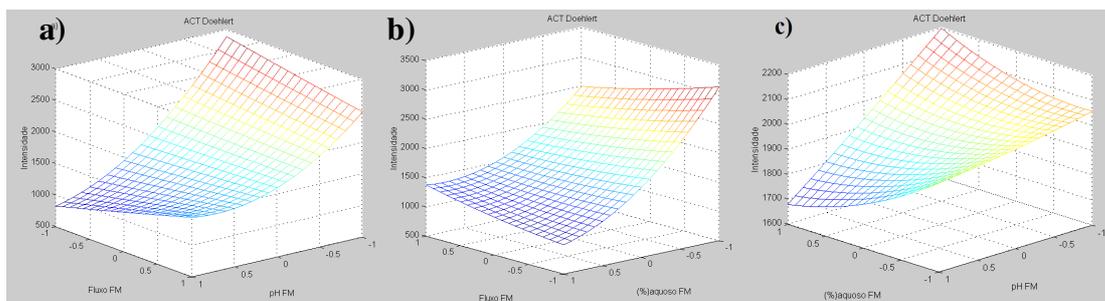


Pode-se verificar que gráfico de Probabilidade Normal indica que, em geral, a variável 1 (fluxo da FM) é a mais influente já que está mais afastada das demais variáveis e de suas interações. Também, pode-se destacar que as interações 11 e a variável 2, obtiveram influência diretamente a separação cromatográfica. Isto demonstra que um menor fluxo da

FM, favorece a obtenção de uma maior resposta analítica (maior área do pico cromatográfico). Um comportamento similar é obtido para o pH da FM (variável 2) e a combinação quadrática do fluxo da FM (variável 1).

Além do gráfico de probabilidade normal, os resultados dos experimentos utilizando o modelo quadrático possibilitam gerar superfícies de resposta. Como trabalhamos com três variáveis, as superfícies de respostas são obtidas apresentando-se duas variáveis por vez, totalizando três superfícies para cada fármaco. Na **Figura 19** estão apresentadas as superfícies de resposta para o ACT. Como os resultados obtidos foram semelhantes aos demais fármacos, as outras superfícies de respostas e suas equações estão no apêndice 3.

Figura 19. Superfícies do ACT: Fluxo x pH (a); Fluxo x [% aquoso FM](b) e pH x [% aquoso FM](c).



As equações que representam as três superfícies da **Figura 19** estão representadas nas equações 17, 18 e 19, respectivamente.

$$\text{Fluxo x pH: } y = 1534 - (774 * (x_1)) + (52,47 * (x_2)) + (252,7 * (x_1) * (x_2)) + 366,8 * (x_1^2) - 7,389 * (x_2^2) \quad (17)$$

$$\text{Fluxo x [\% aquoso FM]: } y = 1585,6 - (808 * (x_1)) + (66,2 * (x_2)) + (288,1 * (x_1) * (x_2)) + 366,8 * (x_1^2) - 41,91 * (x_2^2) \quad (18)$$

$$\text{pHx[\% aquoso FM]: } y = 2411,19 - (153,99 * (x_1)) - (33,52 * (x_2)) - (104 * (x_1) * (x_2)) + 7,389 * (x_1^2) + 41,91 * (x_2^2) \quad (19)$$

Foi observado na **Figura 19(a)** que há uma forte influência quando o fluxo e o pH são menores. Por outro lado, na **Figura 19(b)** mostra uma influência menos intensa quando o fluxo é baixo com a FM menos aquosa. Em **19(c)** mostra uma influência forte do pH com valor menor com a FM mais aquosa.

Assim, verifica-se que para o ACT e o SMX (ver apêndice 3), a forte influência do fluxo baixo resultou em maiores áreas. Para o CAF e o DCF (ver apêndice 3), o pH baixo influenciou mais do que o fluxo baixo, porém a área também sofreu influência quando havia menor porcentagem de fase aquosa na composição da FM.

Como nos quatro fármacos, a maior área obtida para todos os analitos foi a análise realizada no experimento 4, esta foi a escolhida para representar as condições cromatográficas que serão utilizadas na validação de método, conforme a **Tabela 4**.

Tabela 4. Condições cromatográficas a serem validadas após otimização com a matriz Doehlert.

Condição	Descrição da Condição
Coluna	Supelco Ascentis Express® C ₁₈ (100mm x 3,0mm x 2,7µm)
FM	Tampão Fosfato 2 mmolL ⁻¹ pH 4,0 1% trietilamina
Fluxo	0,3 mL/min
Gradiente	3 min 85:15; variando a 50:50 até 10 min;50:50 até o final
Temperatura forno	25°C
Volume de injeção	20 µL
Tempo de análise	Aproximadamente 17 min

5.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Conforme comentado na *Sessão 3.4*, a validação é a “confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” (ISO/IEC 17025). De acordo com as condições cromatográficas apresentadas na **Tabela 4**, a validação foi realizada utilizando as estimativas das figuras de método propostas por Teófilo *et al.* 2006.

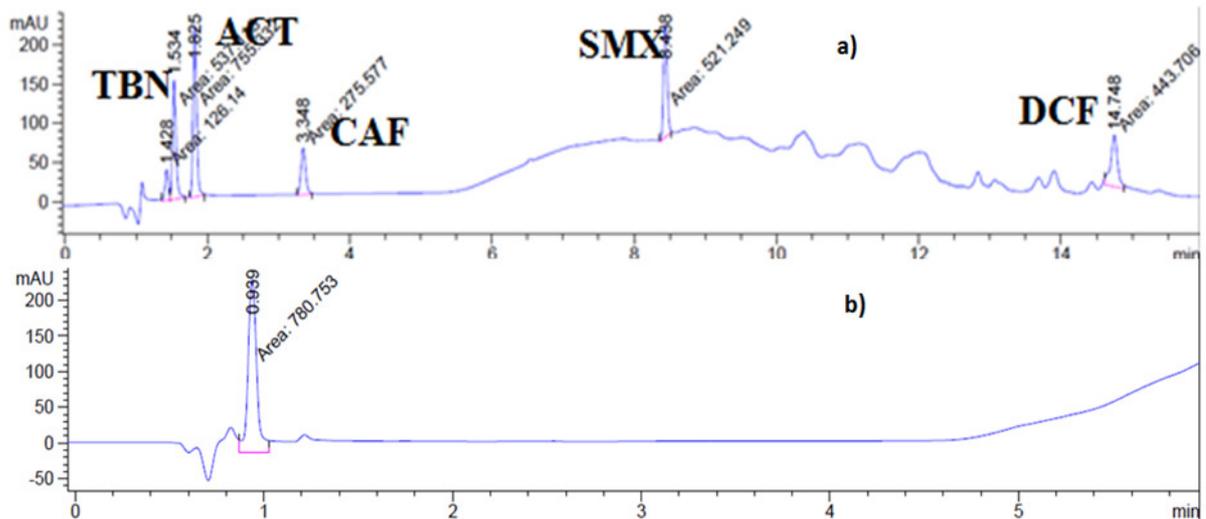
A validação foi realizada utilizando o padrão interno (PI) teobromina (TBN). Segundo Ribani (2004) o método consiste na preparação das soluções padrão às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um analito. Após, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas com a concentração da substância obtendo a concentração da substância na amostra.

5.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi efetuada injetando uma amostra do solvente da solução de trabalho. O resultado mostrou que não há influência de picos nos tempos de retenção dos

fármacos existentes, comprovando que o método é seletivo. Os cromatogramas estão representados na **Figura 20**.

Figura 20. Cromatograma dos fármacos em estudo com o PI de TBN, no comprimento de onda de 254nm, utilizando uma solução do ponto 2 (1 mg L^{-1}) (a) e o cromatograma do solvente (b).



5.3.2 Linearidade

A linearidade e a faixa de trabalho foram analisadas utilizando-se pontos preparados a partir da solução de trabalho conforme a **Tabela 2** da *Sessão 4.2*. Foram analisados seis pontos em quintuplicata, totalizando 30 análises. Os cromatogramas, tempos de retenção, áreas e razões estão apresentados no Apêndice C. A **Tabela 5** mostra os coeficientes da curva de regressão linear e a sua faixa linear para cada fármaco estudado, onde: a_0 = coeficiente linear; a_1 = coeficiente angular; r = coeficiente de correlação; (ii) valores em mg L^{-1} .

Utilizando o teste de significância descrito na *Sessão 3.4.2*, foi possível determinar as faixas lineares das curvas de calibração. As curvas para ACT, CAF, SMX e DCF, mostradas na **Tabela 5**, apresentaram comportamento linear para a faixa de concentração de 0,75 a 20 mg L^{-1} , apresentando os coeficientes de correlação acima de 0,99.

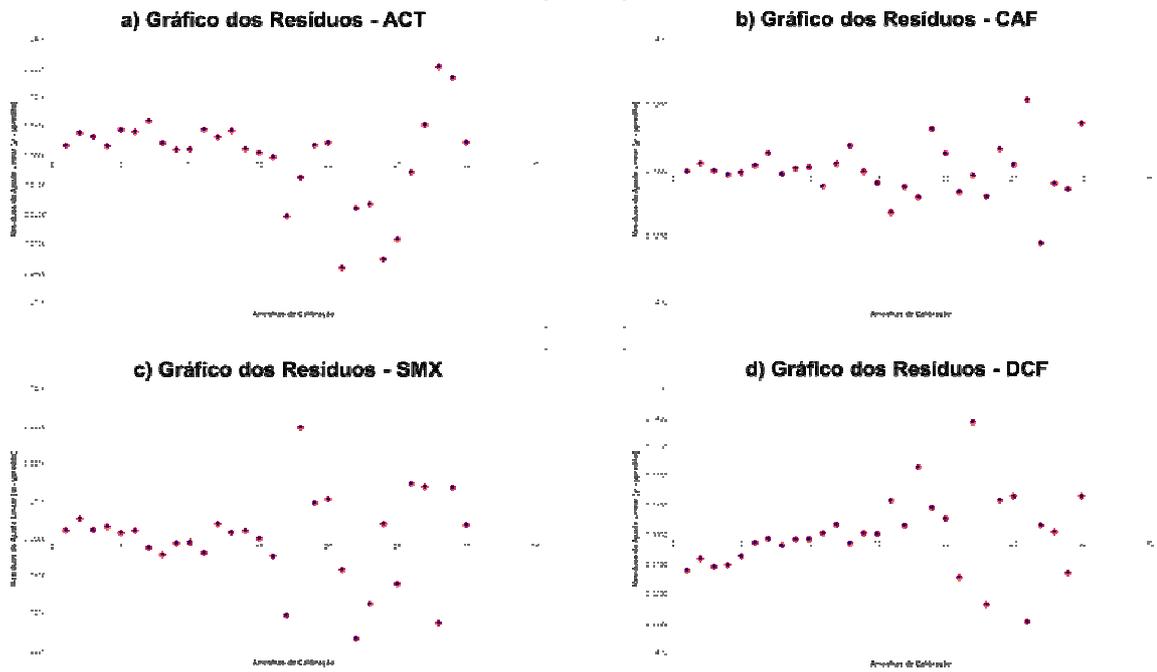
Os resíduos representam a parcela da variabilidade dos dados que não foram explicados pelo ajuste, e são interpretados com uma estimativa de erro do modelo (RIBEIRO *et al.*, 2008). Na **Figura 21**, são apresentadas as distribuições dos resíduos para os quatro

fármacos deste estudo. Tais gráficos de resíduos apresentam comportamento homoscedástico, ou seja, os pontos são distribuídos próximos a zero e a é variância constante.

Tabela 5. Coeficientes da regressão linear das curvas de calibração para os fármacos.

Compostos	Coeficientes da equação linear ⁽ⁱ⁾			Linearidade
	a_0	a_1	r	Faixa Linear ⁽ⁱⁱ⁾
Acetaminofeno	-0,0077	0,0742	0,9995	0,75-20,00
Cafeína	0,0033	0,0253	0,9991	0,75-20,00
Sulfametoxazol	0,0012	0,0384	0,9990	0,75-20,00
Diclofenaco	0,0137	0,0149	0,9922	0,75-20,00

Figura 21. Gráfico de resíduos das regressões dos fármacos estudados ACT (a), CAF (b), SMX (c) e DCF (d).



5.3.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de três formas: a) cálculo baseado em parâmetros da curva de regressão segundo Ribeiro *et al.* 2008, método

conforme a ANVISA 2003 e o método visual. A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos para LD e LQ a partir das curvas de regressão dos fármacos estudados.

Tabela 6. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados para o método com 95, 99 e 99,9% de confiança.

Compostos	LD (mg L ⁻¹)			LQ (mg L ⁻¹)		
	95%	99%	99,9%	95%	99%	99,9%
Acetaminofeno	0,91	1,22	1,62	1,34	1,50	1,70
Cafeína	1,38	1,87	2,48	2,06	2,30	2,61
Sulfametoxazol	1,31	1,77	2,36	1,95	2,18	2,48
Diclofenaco	3,83	5,16	6,86	5,71	6,39	7,25

Os valores apresentados na **Tabela 6**, para o LD foram calculados conforme as equações 05, 06 e 07, e o LQ foram calculados utilizando as equações 09, 10 e 11. Os resultados obtidos para LD e LQ foram considerados elevados para todos os fármacos, mais especialmente o DCF, utilizando estimativas de 95, 99 e 99,9%. Todos ficaram acima da menor concentração da faixa linear proposta (0,75 mg L⁻¹). Isso se deve a limitação do detector DAD e, principalmente ao DCF que apresenta uma baixa absorção na banda escolhida, comparativamente em relação aos demais fármacos. Por outro lado, o cálculo para LD e LQ, segundo o método conforme a ANVISA 2003, foi utilizado às equações 04 e 08, respectivamente. Na **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos para LD e LQ utilizando o método da ANVISA.

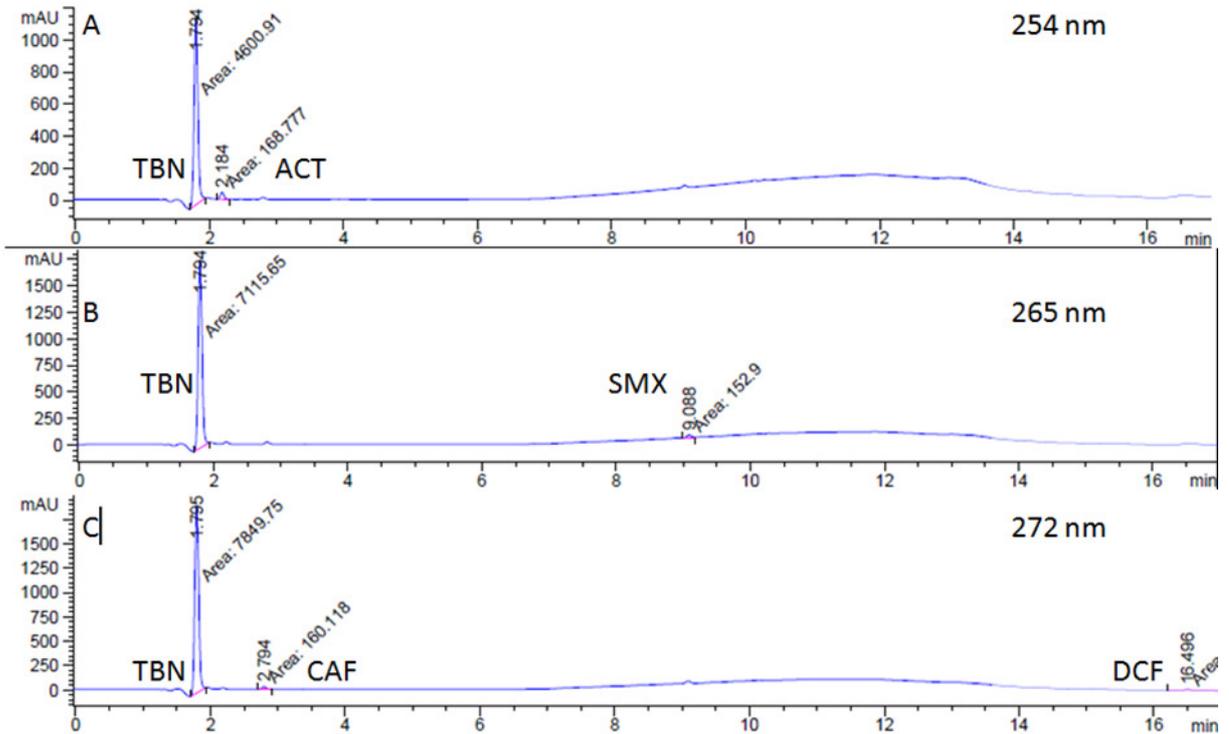
Na **Tabela 7**, verificou-se que apenas a CAF obteve valores de LD e LQ abaixo da faixa linear aplicada na curva analítica. Os outros fármacos apresentaram valores superiores a 0,75 mg L⁻¹, com destaque ao DCF que novamente apresentou valores elevados. No Método visual foi preparado uma solução diluída a partir da solução de trabalho com uma concentração de 0,5 mg L⁻¹, abaixo da faixa linear de trabalho.

Tabela 7. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados para o método conforme a ANVISA (2003).

Compostos	Desvio Padrão	Coefficiente Angular	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Acetaminofeno	0,0220	0,074	0,90	3,00
Cafeína	0,0019	0,025	0,22	0,74
Sulfametoxazol	0,0099	0,038	0,77	2,57
Diclofenaco	0,0105	0,015	2,12	7,08

A **Figura 22** mostra os cromatogramas dos fármacos estudados, em três comprimentos de onda diferentes, revelando que foi possível detectar os picos em concentrações abaixo da faixa linear.

Figura 22. Cromatogramas dos fármacos estudados com solução de 0,5 mg L⁻¹ em três comprimentos de onda diferentes.



5.3.4 Precisão

A precisão do método foi avaliada, sendo estimada por dois parâmetros: a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi analisada logo após a linearidade e a precisão intermediária 7 dias depois do preparo. Os pontos da curva analítica utilizados para estes testes foram: ponto 1 (baixa, $0,75 \text{ mg L}^{-1}$), ponto 4 (média, 5 mg L^{-1}) e ponto 6 (alta, 20 mg L^{-1}), totalizando 15 análises para cada parâmetro. Na **Tabela 8** estão os resultados obtidos na etapa de repetibilidade e precisão intermediária, onde: $C_{\text{teórica}}$ = concentração teórica do preparo da solução padrão; $C_{\text{repet.}}$ = Concentração obtida integrando os cromatogramas na repetibilidade; $C_{\text{Precisão Interm.}}$ = Concentração obtida integrando os cromatogramas na precisão intermediária; DPR = desvio padrão relativo.

Analisando os resultados obtidos na **Tabela 8**, observa-se que os valores de DPR apresentados não excederam o limite de 10%, conforme exigido pelo INMETRO (2011), para intervalos entre $1\text{-}10 \text{ mgL}^{-1}$. Portanto, os resultados da repetibilidade e precisão intermediária são precisos conforme as legislações vigentes.

Tabela 8. Resultados da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do método.

		Acetaminofeno (ACT)		
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{repet.}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Precisão\ Interm.}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,74	0,87	0,88
Baixa	DPR (%)		3,23	3,50
Nível 2	Média	4,95	4,81	4,82
Média	DPR (%)		1,26	2,15
Nível 3	Média	19,8	19,92	19,80
Alta	DPR (%)		0,79	2,62
		Cafeína (CAF)		
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{repet.}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Precisão\ Interm.}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,83	0,81	0,89
Baixa	DPR (%)		3,01	8,99
Nível 2	Média	5,5	5,45	5,46
Média	DPR (%)		4,60	4,93
Nível 3	Média	22,00	22,01	22,06
Alta	DPR (%)		1,55	1,05
		Sulfametoxazol (SMX)		
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{repet.}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Precisão\ Interm.}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,76	0,75	0,77
Baixa	DPR (%)		4,23	3,02
Nível 2	Média	5,05	5,20	5,04
Média	DPR (%)		3,00	1,13
Nível 3	Média	20,20	20,22	20,17
Alta	DPR (%)		1,31	0,73
		Diclofenaco (DCF)		
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{repet.}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Precisão\ Interm.}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,77	1,85	1,99
Baixa	DPR (%)		3,53	0,33
Nível 2	Média	5,15	5,26	5,50
Média	DPR (%)		7,18	6,62
Nível 3	Média	20,6	20,46	19,70
Alta	DPR (%)		3,96	7,82

5.3.5 Robustez

A robustez foi realizada variando uma condição, alterando a concentração de fluxo da FM de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ para $0,2 \text{ mL min}^{-1}$. Foram preparadas novas soluções de trabalho da mesma forma descrita na *Sessão 4.2* utilizando os pontos conforme a precisão (baixa, média e alta) com concentrações de 0,75; 5,0 e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente, totalizando 15 análises. Na **Tabela 9** relaciona os resultados obtidos no teste de robustez, onde: $C_{\text{teórica}}$ = concentração teórica do preparado da solução padrão; C_{Robustez} = Concentração obtida integrando os cromatogramas na robustez; DPR = desvio padrão relativo.

Na **Tabela 9**, observa-se que a condição modificada apresentou valores de DPR inferiores ao limite máximo de 10%, segundo INMETRO (2011), mostrando que a variação de fluxo mantém o método robusto.

Tabela 9. Resultados da robustez do método.

		Acetaminofeno (ACT)	
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Robustez}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,74	0,83
Baixa	DPR		1,81
Nível 2	Média	4,95	4,65
Média	DPR		3,76
Nível 3	Média	19,8	19,08
Alta	DPR		4,60
		Cafeína (CAF)	
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Robustez}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,83	0,96
Baixa	DPR		6,62
Nível 2	Média	5,5	5,79
Média	DPR		3,18
Nível 3	Média	22,0	24,89
Alta	DPR		2,75
		Sulfametoxazol (SMX)	
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Robustez}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,76	0,86
Baixa	DPR		5,58
Nível 2	Média	5,05	5,16
Média	DPR		3,57
Nível 3	Média	20,2	19,89
Alta	DPR		1,38
		Diclofenaco (DCF)	
		$C_{teórica}$ (mg L ⁻¹)	$C_{Robustez}$ (mg L ⁻¹)
Nível 1	Média	0,77	1,95
	DPR		3,44
Nível 2	Média	5,15	5,52
	DPR		7,87
Nível 3	Média	20,6	21,80
	DPR		3,59

5.3.6 Efeito de Matriz

O teste de efeito de matriz foi realizado preparando novas soluções substituindo o solvente de água ultrapura por uma solução de efluente simulado, que possui formulação descrita na **Tabela 10**. As condições cromatográficas foram iguais utilizadas na validação (ver **Tabela 4**).

Tabela 10. Formulação do efluente simulado utilizado na robustez (volume de 1L).

Composto	Massa Pesada (mg)
Peptona	160,3
Extrato de carne	111,2
Ureia	30,2
Fosfato de potássio bibásico	28,0
Sulfato de magnésio heptahidratado	2,0
Cloreto de cálcio diidratado	4,0

Foram preparadas novas soluções de trabalho utilizando como solvente o efluente simulado, conforme descrito na *Sessão 4.2* e os pontos conforme a precisão (baixa, média e alta) com concentrações de 0,75; 5,0 e 20,0 mg L⁻¹, respectivamente, totalizando 15 análises. Na **Tabela 11** relaciona os resultados obtidos no teste de efeito de matriz, onde: C_{repet} = concentração teórica do preparo da repetibilidade; C_{matriz} = Concentração obtida integrando os cromatogramas no teste de efeito de matriz; DPR = desvio padrão relativo.

Tabela 11. Resultados do efeito de matriz do método.

		Acetaminofeno (ACT)		
		$C_{\text{repet.}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	$C_{\text{matriz}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	Media _{Exatidão} (%)
Nível 1	Média	0,87	1,12	+28,74
	DPR	3,23	5,23	
Nível 2	Média	4,81	7,97	+65,70
	DPR	1,26	1,52	
Nível 3	Média	19,92	34,00	+70,68
	DPR	0,79	0,87	
		Cafeína (CAF)		
		$C_{\text{repet.}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	$C_{\text{matriz}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	Media _{Exatidão} (%)
Nível 1	Média	0,81	1,22	+50,61
	DPR	3,01	6,80	
Nível 2	Média	5,45	7,33	+34,50
	DPR	4,60	4,37	
Nível 3	Média	22,01	31,18	+41,66
	DPR	1,55	2,03	
		Sulfametoxazol (SMX)		
		$C_{\text{repet.}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	$C_{\text{matriz}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	Media _{Exatidão} (%)
Nível 1	Média	0,75	0,99	+32,00
	DPR	4,23	3,40	
Nível 2	Média	5,20	6,51	+25,19
	DPR	3,00	1,83	
Nível 3	Média	20,22	29,04	+43,62
	DPR	1,31	1,95	
		Diclofenaco (DCF)		
		$C_{\text{repet.}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	$C_{\text{matriz}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$	Media _{Exatidão} (%)
Nível 1	Média	1,85	0,74	-60,00
	DPR	3,53	17,05	
Nível 2	Média	5,26	5,14	-2,28
	DPR	7,18	6,80	
Nível 3	Média	20,46	25,77	+25,96
	DPR	3,96	8,65	

Os resultados da aplicação do efluente simulado apresentaram valores de DPR inferiores a 10%, que é o limite estabelecido conforme o INMETRO (2011), com exceção do DCF que no nível baixo apresentou 17,05%. Entretanto, os resultados de recuperação apresentaram valores elevados. Efetuando o cálculo do efeito de matriz conforme a equação 15 na *Sessão 3.4.8*, os valores obtidos para os efeitos de matriz do ACT apresentaram valores acima de 50% para as concentrações média e alta, demonstrando um forte efeito de matriz para este analito. Já o CAF e a SMX apresentaram valores entre +20% - 50% sendo considerado efeito de matriz média e o DCF que apresentou valores entre -60% e +50% observando que o efeito de matriz foi considerado forte, porém diminuiu na concentração baixa e aumentou na alta, este fenômeno é explicado devido aos valores elevados de LD e LQ do DCF, que fez aumentar o valor de DPR, conseqüentemente, afetou os valores do efeito de matriz.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, o uso da matriz Doehlert para otimizar as condições da separação cromatográfica de quatro analitos foi satisfatoriamente empregada. A otimização das condições de análise demonstrou que a melhor condição de separação foi alcançada usando uma coluna C₁₈, fluxo de fase móvel de 0,3 mL min⁻¹, com composição de fase móvel com 15% de acetonitrila como fase orgânica e 85% da fase aquosa composta por solução tampão fosfato 2,0 mmol L⁻¹, com 1% de Trietilamina e pH 4,0. A análise de ANOVA indicou que a regressão obtida foi significativa e não houve falta de ajuste significativo para todos os fármacos estudados. O emprego da metodologia de superfície de resposta possibilitou modelar o sistema em estudo e visualizar com mais clareza qual é a região onde se alcança uma separação mais adequada dos analitos. Além disso, foi possível identificar as variáveis mais influentes no processo de separação cromatográfica. O uso de planilhas eletrônicas para otimização das condições permitiu a realização dos experimentos de forma mais simples e fácil.

Em relação à validação, pode-se considerar que as curvas de regressão apresentaram linearidade e coeficientes de correlação satisfatórias na faixa de trabalho de 0,75 à 20,00 mgL⁻¹ para todos os analitos em estudo. Os resíduos apresentaram caráter homocedástico sendo de baixa variância e média próxima à zero. Porém, os valores de LD e LQ calculados ficaram acima do ponto menor da faixa de trabalho. A repetibilidade, precisão intermediária e a robustez, em ambas as condições, apresentaram valores satisfatórios para os de DPR(%) para todos dos fármacos em estudo. O efeito de matriz apresentou valores pouco satisfatórios para as recuperações que ficaram entre -20% a +50% para o CAF e SMX, acima de 50% para o ACT e abaixo de -50% para o DCF, demonstrando o forte efeito matriz na metodologia analisada. Finalmente o uso de planilhas eletrônicas de validação permitiu a validação do método com as condições otimizadas previamente via matriz Doehlert de forma fácil e simples, sendo uma ótima ferramenta para análises de rotina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE n° 899 de 29/05/2003, 2003.

BAI, X.; ACHARYA, K. Removal of trimethoprim, sulfamethoxazole, and triclosan by the green alga *Nannochlorissp.*, **Journal of Hazardous Materials**, 315, 70–75, 2016.

BARROS NETO, B. de; SCARMÍNIO, I. S., BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003. 401p. (Livro-texto).

BIAŁK-BIELINSKA, A.; KUMIRSKA, J.; PALAVINSKAS, R.; STEPNOWSKI, P. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC–MS/MS, **Talanta**, 80, 947-953, 2009.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

CARBALLA, M.; OMILA, F.; LEMAA, J.M.; LOMPARTB, M.; GARCÍA-JARESB, C.; RODRÍGUEZ, I.; GÓMEZ, M.; THOMAS TERNES. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, **Water Research**, 38, 2918-2926, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2006. p. 273-397.

CRESTANA, G.B.; SILVA, J.H. Fármacos residuais: panorama de um cenário negligenciado, **Revista Internacional de Direito e Cidadania**, 9, 55-65, 2011.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, 107, 907-938, 1999.

FEKETE, S., KOHLER, I., RUDAZ, S., GUILLARME, D. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 87, 105-119, 2014.

GARCÍA-REYES, J.F.; GILBERT-LÓPEZ, B.; MOLINA-DÍAZ, A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review, **Talanta**, v. 79, p. 109-128, 2009,

GÓMEZ-LECHÓNA, M.J.; PONSODA, X.; O'CONNOR, E.; DONATO, T.; JOVER, R.; CASTELL, J.V. Diclofenac induces apoptosis in hepatocytes, **Toxicology in Vitro**, 17, 675-680, 2003.

HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. **McGraw-Hill**, 1ª ed., 2000.

- INDERMUHLE, C.; VIDALES, M.J.M.; SÁEZ, C.; ROBLES, J.; CAÑIZARES, P.; GARCÍA-REYES, J.F.; MOLINA-DÍAZ, A.; COMNINELLIS, C.; RODRIGO, M.A. Degradation of caffeine by conductive diamond electrochemical oxidation, **Chemosphere**, 93, 1720-1725, 2013.
- INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, **DOQ-CGCRE-008**, ver.4, 2011.
- JAMES, L.P.; MAYEUX, P.R.; HINSON, J.A. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity, **Drug Metabolism and Disposition**, 31, 1499-1506, 2003.
- KUSTER, M.; AZEVEDO, D.A.; ALDA, M.J.L.; NETO, F.R.A.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental Waters from Rio de Janeiro (Brazil), **Environment International**, 35, 997-1003, 2009.
- LORIST, M.M.; TOPS, M. Caffeine, fatigue, and cognition, **Brain and Cognition**, 53, 82-94, 2003.
- LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE. São Paulo: Rima **Editora: Átomo**, 382 p., 2009.
- LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. [S.l: s.n.], 2004.
- LOCATELLI, M.A.F.; SODRÉ, F.F.; JARDIM, W.F. Determination of antibiotics in Brazilian surface water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 60, 385-393, 2011.
- O'NEIL, M.J., ed. O Índice Merck : An **Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals** . Ed 14. New Jersey: Merck, 2006.
- OMAR, T.F.T., AHMAD, A., ARIS, A. Z., YUSOFF, F.M.D. Endocrine disrupting compounds (EDCs) in environmental matrices: Review of analytical strategies for pharmaceuticals, estrogenic hormones, and alkylphenol compounds. **TrACTrends in Analytical Chemistry**, 85, 241-259, 2016.
- PINHO, G.P.; NEVES A.A.; QUEIROZ M.E.L.R.; SILVERIO F.O. Efeito da matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**. v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.
- PETROVIC, M.; HERNANDO, M.D.; DÍAZ-CRUZ, M.S.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, 1067, 1-14, 2005.
- RAIMUNDO JR., I.M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria Multicanal e arranjos de fotodiodos, **Química Nova**, 20(1), 83-88, 1997.

- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; DA SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, 31, 164-171, 2008.
- RUSCHEL, C.F.C; FERRÃO, M. F.; SANTOS, F. P. DOS; SAMIOS, D. Otimização do Processo de transesterificação em Duas Etapas Para Produção de Biodiesel Através do Planejamento Experimental Doehlert, **Química Nova**, Vol.39, Nº3, 267-272, 2016.
- SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M.A.F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue, **Water Air and Soil Pollution**, 206, 57-67, 2010.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *et al.* Fundamentos de química analítica. **São Paulo: Thomson Learning**, 2006.
- TAMBOSI, J. L. Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento. Tese (Doutorado em Engenharia Química: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos) **Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)**, Florianópolis, 141 f, 2008.
- TEOFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quím. Nova** [online]. 2006, vol.29, n.2, pp.338-350.
- TURNBULL, D.; RODRICKS, J.V.; MARIANO, G.F.; CHOWDHURY, F. Caffeine and cardiovascular health, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 89, 165-185, 2017.
- VIENO, N.; SILLANPÄÄ, M. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant - A review, **Environment International**, 69, 28-39, 2014.
- WELLS, M.J.M.; FONON, L.J.; PELLEGRIN, M.L.; MORSE, A. Emerging Pollutants. **Water Environment Research**, 79, 2192-2209, 2007.
- YANG, S-F.; LIN, C-F.; LIN, A.Y-C.; HONG, P-K.A. Sorption and biodegradation of sulfonamide antibiotics by activated sludge: Experimental assessment using batch data obtained under aerobic conditions, **Water Research**, 45, 3389-3397, 2011.
- ZHOU, B.; LI, Y.; GILLESPIE, J.; HE G.Q.; HORSLEY, R.; SCHWARZ, P. Doehlert matrix design for optimization of the determination of bound deoxynivalenol in barley grain with trifluoroacetic acid (TFA). **J. Agric. Food Chem.**;55(25):10141-9, 2007.

APÊNDICE 1

LISTA DE REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- Diclofenaco de Potássio 99,0% (Sigma-Aldrich);
- Acetaminofeno 99,5% (Sigma-Aldrich);
- Sulfametoxazol 99,0 % (Sigma-Aldrich);
- Cafeína 99,5% (Sigma-Aldrich);
- Teobromina 99,0% (Sigma-Aldrich);
- Acetonitrila HPLC (Merck);
- Água Ultrapurificada;
- Peptona (Merck);
- Extrato de Carne (Merck);
- Uréia (merck);
- Sulfato de Magnésio Heptaidratado (Nuclear);
- Cloreto de Cálcio Diidratado (Merck);
- Micropipeta (100ul-1000ul) – (Brand) – calibrada em 08/2017
- Pipeta Volumétrica de 2 ml (Brand);
- Pipeta Volumétrica de 5 ml (Brand);
- Pipeta Volumétrica de 10 ml (Brand);
- Pipeta Volumétrica de 20 ml (Brand);
- Balão Volumétrico 25 ml (Brand);
- Balão Volumétrico 50 ml (Brand);
- Balão Volumétrico 100 ml (Brand);
- Filtro para seringa 0,22 μm (Millipore);
- Membrana de filtração PTFE 0,47 μm (Millipore);
- Membrana de filtração Nylon 0,47 μm (Millipore);
- Seringa de vidro 500 μL (Hamilton);

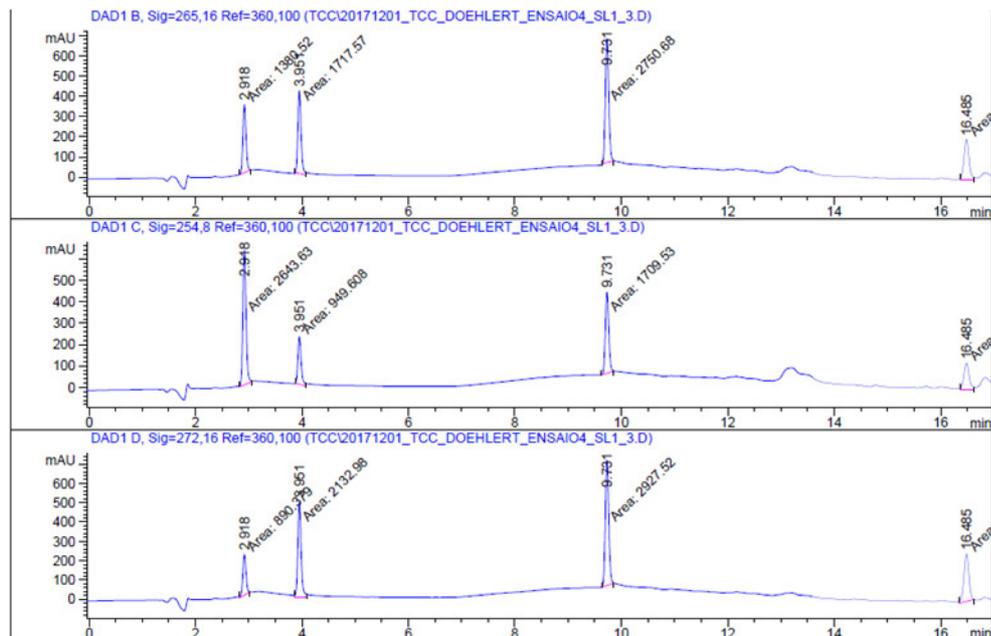
APÊNDICE 2

TABELA DE RESULTADOS E CROMATOGRAMAS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO DOEHLERT

Tabela 1. Tempo de retenção (TR) e áreas das injeções no planejamento Doehlert.

Planejamento Doehlert Ensaio (Em ordem de Injeção)	Acetaminofeno 254 nm		Cafeína 272 nm		Sulfametoxazol 254 nm		Diclofenaco 272 nm	
	TR	área	TR	área	TR	área	TR	área
17	1,334	1283,28723	1,719	941,707	6,766	1529,927	13,185	695,51678
1	0,949	1158,09827	1,229	852,0798	5,228	1329,447	11,862	562,9599
4	2,918	2643,63	3,951	2132,98	9,731	2750,676	16,485	1579,04
15	1,355	1692,92	1,744	1155,939	6,826	2000,734	13,233	906,989
12	1,782	1528,14526	3,251	1175,803	8,283	1546,4	13,43	1086,999
2	1,116	1302,56	1,446	990,772	6,041	1428,569	13,268	729,003
9	1,704	2049,62	2,174	1553,285	7,22	2077,555	11,991	1073,938
10	1,165	1699	1,243	1168,018	3,864	1651,383	11,124	702,803
13	1,336	1376,39856	1,721	1040,258	6,283	1430,268	11,466	600,24384
3	1,488	1288,55872	2,744	1054,586	7,584	1366,793	12,595	853,5025
11	2,208	1893,75	3,957	1580,995	9,181	2119,823	14,262	920,659
8	0,962	1325,04	1,068	1045,874	3,465	1505,462	11,738	676,91
6	1,451	2010,91	1,6	1526,343	5,266	2188,544	14,929	1016,16
14	1,321	1485,85	1,684	1111,788	6,74	1820,823	13,172	744,86
5	1,679	2178,6	2,151	1454,498	7,83	2254,695	14,334	962,018
7	1,101	993,91	1,426	788,88	5,925	1106,64	13,359	631,314
16	1,34	1831,14	1,72	1338,94	6,752	1658,765	14,25	780,4

Figura 1. Cromatogramas da injeção 4, do planejamento Doehlert, nos comprimentos de onda de 254, 265 e 272 nm.



APÊNDICE 3

RESULTADOS DAS ANOVAS, GRÁFICOS DE PROBABILIDADES NORMAIS E SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS DOS FÁRMACOS CAFEÍNA(CAF), SULFAMETOXAZOL (SMX) E DICLOFENACO (DCF)

Figura 1. Cálculo da ANOVA da matriz Doehlert para o CAF.

b) Análise de Variância (ANOVA) - Modelo Quadrático - CAF						
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.		p
Regressão	1693630	9	188181,1066	12,641	SG	0,00149
Resíduos	104205,68	7	14886,52576			
F. Ajuste	16790,574	3	5596,857982	0,2561		0,85394
Erro Puro	87415,106	4	21853,7766			
Total	1797835,6	16				
% variação explicada						94,204
% máx. de variação explicável						95,138

Figura 2. Gráfico de probabilidade normal para o CAF.

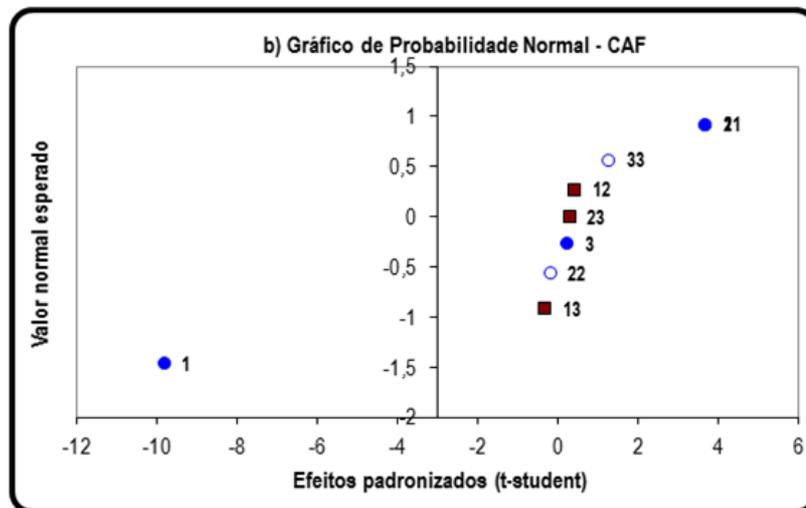
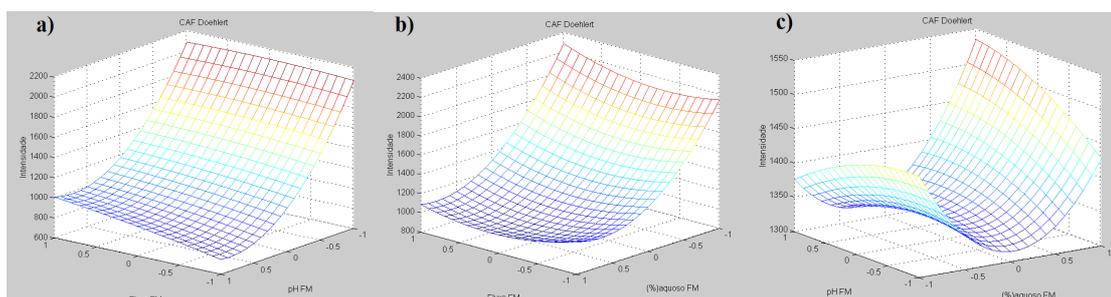


Figura 3. Superfícies do CAF: Fluxo x pH (a); Fluxo x [% aquoso FM](b) e pH x [% aquoso FM](c).



As equações que representam as três superfícies da **Figura 3**, estão representadas nas equações 1, 2 e 3, respectivamente.

$$\text{Fluxo x pH: } y = 1118 - (600 * (x_1)) + (68,55 * (x_2)) + (59,53 * (x_1) * (x_2)) + 374,8 * (x_1^2) - 19,4 * (x_2^2) \quad (1)$$

$$\text{Fluxo x [\% aquoso FM]: } y = 1688 - (759 * (x_1)) + (63,7 * (x_2)) + (288,1 * (x_1) * (x_2)) + 374,8 * (x_1^2) + 122,3 * (x_2^2) \quad (2)$$

$$\text{pH x [\% aquoso FM]: } y = 2092,8 - (9,02 * (x_1)) + (34,61 * (x_2)) + (44,51 * (x_1) * (x_2)) - 19,4 * (x_1^2) + 122,3 * (x_2^2) \quad (3)$$

Figura 4. Cálculo da ANOVA da matriz Doehlert para o SMX

c) Análise de Variância (ANOVA) - Modelo Quadrático - SMX					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	2636423,2	9	292935,9104	8,7332 SG	0,00463
Resíduos	234799,91	7	33542,8437		
F. Ajuste	27087,913	3	9029,304302	0,1739	0,90882
Erro Puro	207711,99	4	51927,99825		
Total	2871223,1	16			
% variação explicada				91,822	
% máx. de variação explicável				92,766	

Figura 5. Gráfico de probabilidade normal para o SMX.

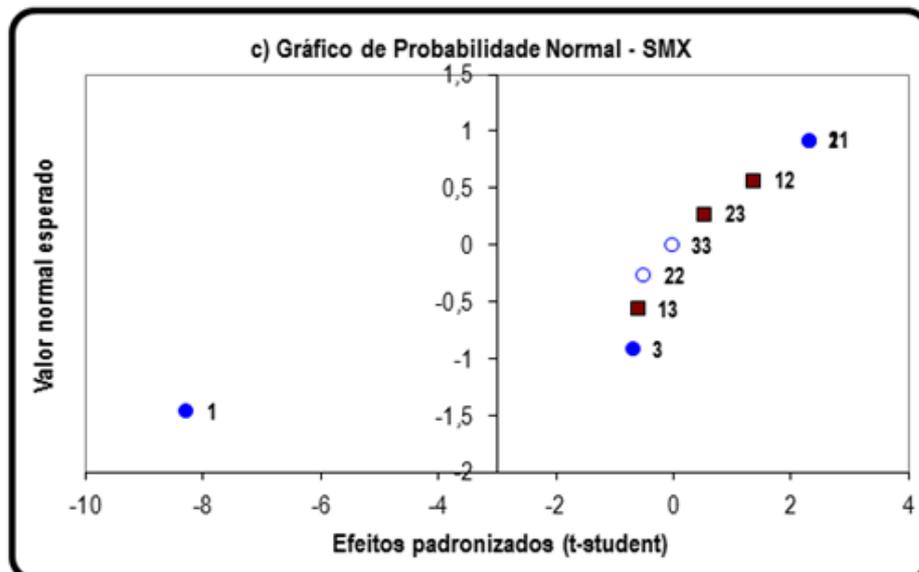
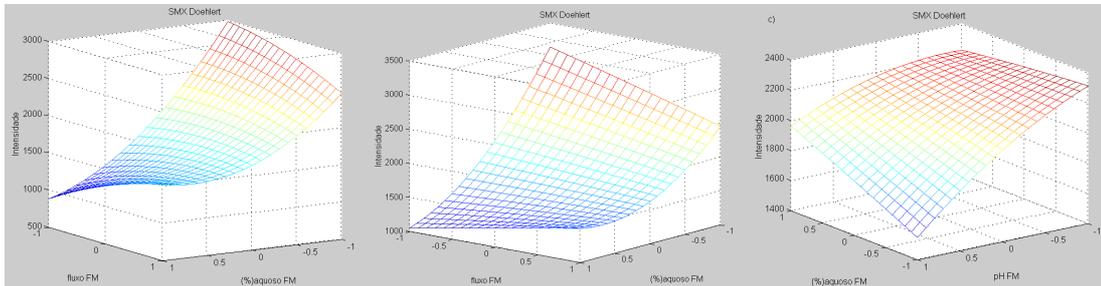


Figura 6. Superfícies do SMX: Fluxo x pH (a); Fluxo x [% aquoso FM](b) e pH x [% aquoso FM](c).



As equações que representam as três superfícies da figura 6, estão representadas nas equações 4, 5 e 6, respectivamente.

$$\text{Fluxo x pH: } y = 1688 - (759 * (x_1)) + (31,53 * (x_2)) + (288,1 * (x_1) * (x_2)) + 352 * (x_1^2) - 79 * (x_2^2) \quad (4)$$

$$\text{Fluxo x [% aquoso FM]: } y = 1688 - (759 * (x_1)) + (63,7 * (x_2)) + (288,1 * (x_1) * (x_2)) + 352 * (x_1^2) - 5,84 * (x_2^2) \quad (5)$$

$$\text{pH x [% aquoso FM]: } y = 2799 - (256,57 * (x_1)) + (81,3 * (x_2)) + (288,1 * (x_1) * (x_2)) + 79 * (x_1^2) + 5,84 * (x_2^2) \quad (6)$$

Figura 7. Cálculo da ANOVA da matriz Doehlert para o DCF.

d) Análise de Variância (ANOVA) - Modelo Quadrático - DCF					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	817881,23	9	90875,69178	3,8171 SG	0,04559
Resíduos	166653,29	7	23807,61337		
F. Ajuste	115758,55	3	38586,18484	3,0326	0,1559
Erro Puro	50894,739	4	12723,68477		
Total	984534,52	16			
% variação explicada				83,073	
% máx. de variação explicável				94,831	

Figura 8. Gráfico de probabilidade normal para o DCF

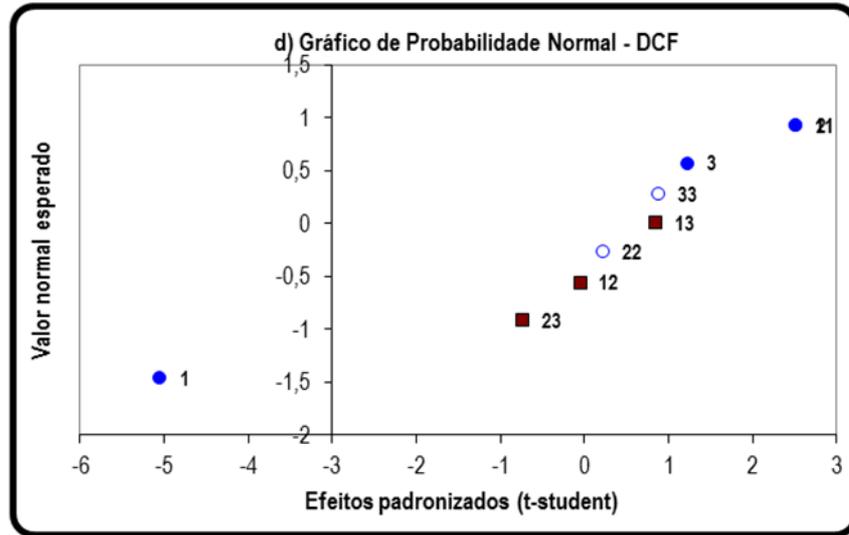
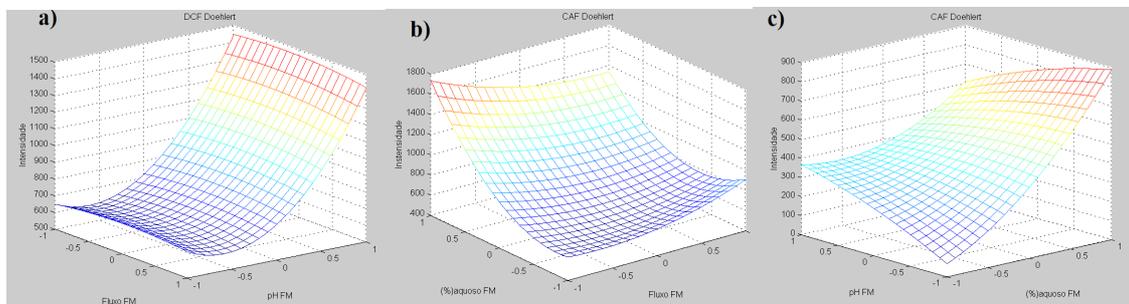


Figura 9. Superfícies do DCF: Fluxo x pH (a); Fluxo x [% aquoso FM](b) e pH x [% aquoso FM](c).



As equações que representam as três superfícies da figura 28, estão representadas nas equações 7, 8 e 9, respectivamente.

$$\text{Fluxo x pH: } y = 745,6 - (389,3 \cdot (x_1)) - (4,22 \cdot (x_2)) + (8,21 \cdot (x_1) \cdot (x_2)) + 325,4 \cdot (x_1^2) - 29,49 \cdot (x_2^2) \quad (7)$$

$$\text{Fluxo x [\% aquoso FM]: } y = 745,6 - (381,86 \cdot (x_1)) - (30,62 \cdot (x_2)) + (169,4 \cdot (x_1) \cdot (x_2)) + 325,4 \cdot (x_1^2) + 107,1 \cdot (x_2^2) \quad (8)$$

$$\text{pH x [\% aquoso FM]: } y = 1054 - (3,99 \cdot (x_1)) + (264,32 \cdot (x_2)) - (144,3 \cdot (x_1) \cdot (x_2)) - 29,49 \cdot (x_1^2) + 107,1 \cdot (x_2^2) \quad (9)$$

APÊNDICE 4

Tabela 1. Características físico-químicas dos fármacos deste estudo

Características	Acetaminofeno	Cafeína	Sulfametoxazol	Diclofenaco
Massa Molecular (Da)¹	151,163	194,191	253,276	296,149
pKa²	9,38	10,4	1. 1,60 2. 5,67	4,15
Ponto de Fusão (°C)¹	168-172	235-238	167 (dec.)	283-285
Característica²	Pó fino	Cristais	Cristais	Cristais
Cor²	branco	branco	Amarelo-branco	branco
Solubilidade em água²	14 mg/mL	21,6 mg/mL	0,61 mg/mL	2,37 mg/L
Densidade (g mL⁻¹)¹	1,3	1,23	1,5	1,4

1. Fonte adaptada de <http://www.chemspider.com>2. Fonte adaptada de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>