

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIENCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Matheus Miranda Fracetti

Otimização do método analítico para a separação simultânea do maleato de enalapril e impurezas orgânicas, em formulações farmacêuticas, por HPLC-UV

Juiz de Fora

2023

Matheus Miranda Fracetti

Otimização do método analítico para a separação simultânea do maleato de enalapril e impurezas orgânicas, em formulações farmacêuticas, por HPLC-UV

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.
Área de concentração: Química.

Orientador: Dr Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientador: Dr^a Paula Rocha Chellini

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fracetti, Matheus Miranda.

Otimização do método analítico para a separação simultânea do maleato de enalapril e impurezas orgânicas, em formulações farmacêuticas, por HPLC-UV / Matheus Miranda Fracetti. -- 2023.
95 f.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Paula Rocha Chellini

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2023.

1. Maleato de enalapril. 2. Cromatografia líquida. 3. Química verde. I. Oliveira, Marcone Augusto Leal de, orient. II. Chellini, Paula Rocha, coorient. III. Título.

Matheus Miranda Fracetti

Otimização do método analítico para a separação simultânea do maleato de enalapril e impurezas orgânicas, em formulações farmacêuticas, por HPLC-UV

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
Graduação em Química
da Universidade Federal
de Juiz de Fora como
requisito parcial à
obtenção do título de
Mestre em Química. Área
de concentração:
Química.

Aprovada em 28 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Paula Rocha Chellini - Coorientadora Universidade
Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho
Universidade Federal de Santa Maria

Juiz de Fora, 13/09/2023.



Documento assinado eletronicamente por Ana Valéria Colnaghi Simionato, Usuário Externo, em 29/09/2023, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcone Augusto Leal de Oliveira, Professor(a), em 29/09/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Paula Rocha Chellini, Professor(a), em 02/10/2023, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Leandro Machado de Carvalho, Usuário Externo, em 05/10/2023, às 14:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1466864 e o código CRC CD8992C1.

Dedico este trabalho aos meus pais,
que sempre me incentivaram a estudar e me
deram todo apoio para concluir esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder sabedoria e resiliência durante esse período.

Aos meus familiares, pelo apoio, incentivo e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Um agradecimento especial aos meus pais, pela compreensão nas horas que precisei faltar ao trabalho para realizar as atividades do mestrado.

Ao meu orientador, Professor Dr Marcone Augusto Leal de Oliveira, por aceitar trabalhar comigo neste projeto, por todos ensinamentos e suporte para o meu crescimento científico.

À minha coorientadora, Professora Dr^a Paula Rocha Chellini, pela parceria, dedicação e por todas as contribuições que me ajudaram no desenvolvimento do trabalho.

A todos os colaboradores do Grupo de Química Analítica e Quimiometria da UFJF, pelo ótimo ambiente no qual convivemos e que foi fundamental na elaboração deste trabalho. Um agradecimento especial à Olívia e ao João Marcos, por me ajudarem na execução de parte deste trabalho.

À Lorena Rodrigues Riani, colaboradora da Faculdade de Farmácia da UFJF, pela contribuição no ensaio de reprodutibilidade.

Ao Programa de Pós Graduação em Química da UFJF, por me dar todo suporte necessário para realização do curso.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, por contribuir no meu processo de formação acadêmica e me proporcionar crescer profissionalmente.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir.”

Albert Einstein (MILLER, 1955, p. 62-64).

RESUMO

Comprimidos de maleato de enalapril são comumente usados no tratamento da hipertensão, pois diminuem a pressão arterial ao inibir reversivelmente a enzima conversora de angiotensina (ECA). No processo de fabricação dos comprimidos, estes são submetidos a análises físico-químicas que atestam a qualidade dos medicamentos. Os procedimentos e as especificações das análises de maleato de enalapril estão presentes na Farmacopeia Brasileira 6ª edição e, dentre as análises, está a quantificação de teor e impurezas. Para esta análise, a Farmacopeia traz um método por HPLC-UV, utilizando uma coluna cromatográfica em fase estacionária C8 de 250 x 4,6 mm e fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 25:75. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo a otimização do método analítico farmacopeico com o intuito de diminuir o tempo de análise e o impacto ambiental gerado, principalmente pelo gasto de solvente orgânico e geração de resíduos analíticos. A partir disso, substituiu-se a coluna cromatográfica para uma C18 de 100 x 4,6 mm e foram testadas algumas composições de fase móvel, substituindo a acetonitrila pelo etanol e modificando a proporção solvente orgânico e tampão. Por fim, concluiu-se que a composição que gerou melhores resultados foi a de etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70. O método otimizado foi comparado com o Farmacopeico em relação aos impactos ambientais e de segurança para o analista utilizando as ferramentas NEMI, *Eco-Scale* e GAPI, obtendo resultados favoráveis ao método otimizado nas três comparações. Em seguida, foi demonstrada a capacidade do método otimizado de quantificar o teor de enalapril e de suas impurezas de forma precisa em comprimidos de 5 e 10 mg. Na validação analítica, o método demonstrou ser seletivo, preciso, exato e robusto, de acordo com as especificações contidas na RDC Nº 166/17.

Palavras-chave: Maleato de enalapril. Cromatografia líquida. Química verde. Validação analítica.

ABSTRACT

Enalapril maleate tablets are commonly used in the treatment of hypertension because they reduce blood pressure by reversibly inhibiting angiotensin-converting enzyme. During the manufacturing process of the tablets, they are tested for physicochemical analyzes that attest to the quality of them. The procedures and specifications for the analysis of enalapril maleate are present in the 6th edition Brazilian Pharmacopoeia and, within the analyses, is the quantification of assay and impurities. For this analysis, the Pharmacopoeia provides a method by HPLC-UV, using a C8 column of 250 x 4,6 mm and mobile phase composed of acetonitrile and phosphate buffer pH 2,2 25:75. In this sense, the present work aims at optimizing the pharmacopeic analytical method in order to reduce the analysis time and the environmental generated impact, mainly by the use of organic solvent and generation of analytical residues. For this purpose, the chromatographic column was replaced by a C18 column of 100 x 4,6 mm and some mobile phase compositions were tested, replacing acetonitrile by ethanol and modifying the proportion of organic solvent and buffer. Finally, it was concluded that the composition that generated the best result was ethanol and phosphate buffer pH 2,2 in the proportion 30:70. The optimized method was compared with the Pharmacopoeia in relation to the environmental and safety impacts for the analyst using the NEMI, Eco-Scale and GAPI tools, obtaining favorable results for the optimized method in the three comparisons. Next, the ability of the optimized method to accurately quantify the enalapril content and its impurities in 5 and 10 mg tablets was demonstrated. The analytical validation proved to be selective, precise, accurate and robust, in accordance with the specifications contained in RDC N° 166/17.

Keywords: Enalapril maleate. Liquid chromatography. Green chemistry. Analytical validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Rota de síntese do enalapril.....	19
Figura 2	– Resolução entre picos em função da seletividade, eficiência (N) e retenção (k).....	24
Figura 3	– Efeito da eficiência da coluna na largura do pico.....	25
Figura 4	– Esquema de instrumentação para HPLC.....	28
Figura 5	– Estrutura do enalaprilato.....	29
Figura 6	– Estrutura da dicetopiperazina.....	30
Figura 7	– Modelo de pictograma NEMI.....	34
Quadro 1	– Modelo de classificação da ferramenta GAPI.....	36
Quadro 2	– Descrição das amostras comerciais.....	39
Quadro 3	– Planejamento dos ensaios.....	41
Quadro 4	– Ensaio de robustez.....	45
Figura 7	– Cromatograma da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min ⁻¹	48
Figura 8	– Cromatograma da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 2,0 mL min ⁻¹	49
Figura 9	– Cromatograma da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min ⁻¹	50
Figura 10	– Cromatograma da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 1,8 mL min ⁻¹	51
Figura 11	– Cromatograma da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 2,0 mL min ⁻¹	52
Figura 12	– Estrutura química do ácido maleico, enalaprilato, enalapril e dicetopirazina de enalapril.....	53
Figura 13	– Pictogramas NEMI.....	55
Figura 14	– Pictograma GAPI para o Método 2.....	58
Figura 15	– Pictograma GAPI para o Método 4.....	58
Quadro 5	– Subcategorias de avaliação da ferramenta GAPI.....	59
Figura 16	– Sobreposição dos cromatogramas da solução diluente, mistura de padrões e amostra.....	63

Figura 17	– Espectro de absorção UV do enalapril na solução padrão sobreposto na solução amostra.....	65
Figura 18	– Espectros de absorção UV do enalapril na solução padrão.....	66
Figura 19	– Espectros de absorção UV do enalapril na solução amostra.....	66
Figura 20	– Espectro de absorção UV do enalaprilato na solução padrão sobreposto na solução amostra.....	67
Figura 21	– Sinal analítico do enalaprilato na solução amostra.....	68
Figura 22	– Sinal analítico do enalaprilato na solução amostra fortificada com padrão de enalaprilato.....	68
Figura 23	– Espectro de absorção UV do enalaprilato na solução padrão.....	69
Figura 24	– Espectro de absorção UV do enalaprilato na solução amostra.....	69
Figura 25	– Espectro de absorção UV da dicetopiperazina na solução padrão sobreposto na solução amostra.....	70
Figura 26	– Espectro de absorção UV da dicetopiperazina na solução padrão.....	71
Figura 27	– Espectro de absorção UV da dicetopiperazina na solução amostra.....	71
Figura 28	– Linearidade para o padrão de enalapril.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min ⁻¹	48
Tabela 2	– Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 2,0 mL min ⁻¹	49
Tabela 3	– Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min ⁻¹	50
Tabela 4	– Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 1,8 mL min ⁻¹	51
Tabela 5	– Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 2,0 mL min ⁻¹	52
Tabela 6	– Relação da composição e do fluxo da fase móvel com o tempo de análise o gasto de solvente orgânico.....	55
Tabela 7	– Comparativo dos Métodos 2 e 4 pela <i>Eco-Scale</i>	57
Tabela 8	– Comparativo do método farmacopeico com o método otimizado.....	60
Tabela 9	– Ensaio de doseamento e substâncias relacionadas em comprimidos de enalapril 5 mg.....	62
Tabela 10	– Ensaio de doseamento e substâncias relacionadas em comprimidos de enalapril 10 mg.....	62
Tabela 11	– Tempos de retenção dos analitos no padrão e na amostra.....	64
Tabela 12	– Resultados de seletividade para o enalapril.....	66
Tabela 13	– Resultados de seletividade para o enalaprilato.....	70
Tabela 14	– Resultados de seletividade para a dicetopiperazina.....	72
Tabela 15	– Resultados do teste de linearidade para o enalapril.....	73
Tabela 16	– Testes estatísticos.....	73
Tabela 17	– Linearidade do enalaprilato e da dicetopiperazina.....	74
Tabela 18	– Resultados de limite de detecção e quantificação.....	74
Tabela 19	– Desvio Padrão dos Tempos de Retenção nos ensaios de precisão.....	75
Tabela 20	– Resultados de precisão para o enalapril.....	76
Tabela 21	– Resultados de precisão para o enalaprilato.....	77
Tabela 22	– Resultados de precisão para a dicetopiperazina.....	78
Tabela 23	– Teste t de <i>Student</i> para Precisão Intermediária.....	79

Tabela 24	– Teste t de <i>Student</i> para Reprodutibilidade.....	79
Tabela 25	– Resultados de exatidão para o enalapril.....	80
Tabela 26	– Resultados de exatidão para o enalaprilato.....	80
Tabela 27	– Resultados de robustez em relação ao preparo e conservação da amostra para o enalapril.....	82
Tabela 28	– Resultados de robustez em relação ao preparo da amostra para a dicetopiperazina.....	83
Tabela 29	– Teste t de Student para os resultados de robustez – Preparo da amostra.....	83
Tabela 30	– Resultados de robustez em relação à instrumentação analítica para o enalapril.....	85
Tabela 31	– Resultados de robustez em relação à instrumentação analítica para a dicetopiperazina.....	86
Tabela 32	– Teste t de Student para os resultados de robustez – Instrumentação analítica...	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP	<i>British Pharmacopoeia</i>
DPR	Desvio padrão relativo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
EtOH	Etanol
GAPI	<i>Green Analytical Procedure Index</i>
HÁ	Hipertensão arterial
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
NEMI	<i>National Environmental Methods Index</i>
PBT	Persistente, bioacumulativo e tóxico
QAV	Química Analítica Verde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rs	Resolução
Tr	Tempo de retenção
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV-vis	Ultravioleta – visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	17
2.2	MALEATO DE ENALAPRIL.....	18
2.3	CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA.....	21
2.4	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	21
2.4.1	Método de quantificação de teor e impurezas em comprimidos de enalapril....	29
2.5	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA HPLC-UV.....	30
2.6	QUÍMICA VERDE.....	32
3	OBJETIVOS.....	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1	MATERIAIS.....	39
4.1.1	Padrões analíticos e amostras comerciais.....	39
4.1.2	Solventes e reagentes.....	39
4.1.3	Equipamentos e consumíveis.....	39
4.2	MÉTODOS.....	40
4.2.1	Preparo de soluções.....	40
4.2.1.1	Tampão fosfato de sódio pH 2,2.....	40
4.2.1.2	Solução padrão de enalapril.....	40
4.2.1.3	Solução padrão de dicetopiperazina.....	40
4.2.1.4	Solução padrão de enalaprilato.....	40
4.2.1.5	Solução resolução.....	40
4.2.1.6	Solução amostra.....	41
4.2.2	Otimização do método analítico.....	41
4.2.3	Quantificação de teor e impurezas.....	41
4.2.4	Validação analítica.....	42
4.2.4.1	Seletividade.....	42
4.2.4.2	Linearidade.....	43
4.2.4.3	Limite de detecção e quantificação.....	43

4.2.4.4	Precisão.....	44
4.2.4.5	Exatidão.....	44
4.2.4.6	Robustez.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	46
5.2	DOSEAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE IMPUREZAS EM COMPRIMIDOS DE MALEATO DE ENALAPRIL.....	61
5.3	VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	63
5.3.1	Seletividade.....	63
5.3.1.1	Enalapril.....	64
5.3.1.2	Enalaprilato.....	67
5.3.1.3	Dicetopiperazina.....	70
5.3.2	Linearidade e faixa de trabalho.....	72
5.3.3	Limite de detecção e quantificação.....	74
5.3.4	Precisão.....	74
5.3.5	Exatidão.....	79
5.3.6	Robustez.....	81
6	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

Análises de teor e impurezas em comprimidos são comumente realizadas em Laboratórios de Controle de Qualidade nas Indústrias Farmacêuticas. Para realizar essas análises simultaneamente, é necessária existência de um método analítico capaz de separar e quantificar o princípio ativo e as impurezas presentes na formulação. Dessa forma, uma das principais fontes bibliográficas de métodos analíticos utilizada pelas indústrias nacionais é a Farmacopeia Brasileira.

No volume 2 da Farmacopeia Brasileira 6ª edição está contida a monografia do comprimido de maleato de enalapril com todos os ensaios que devem ser realizados para atestar a qualidade do produto final. Dentre eles, o ensaio de Doseamento e Substâncias Relacionadas, no qual quantifica-se o enalapril e as impurezas de forma simultânea, sendo realizado por HPLC-UV.

O HPLC é uma técnica cromatográfica conhecida por ser versátil, de alta resolução e que pode ser automatizada. Entretanto, possui algumas desvantagens, como alto custo de operação e manutenção e necessidade de experiência no manuseio. Além disso, análises por cromatografia líquida podem gerar resíduos, oriundos principalmente do preparo da amostra e da fase móvel, que são tóxicos aos seres humanos e ao meio ambiente.

Com o surgimento da Química Analítica Verde, critérios como: segurança do analista; gastos de energia; utilização de reagentes tóxicos; geração de resíduos não recicláveis, entre outros, são utilizados na comparação de métodos analíticos. Com isso, é possível escolher o método que seria mais indicado para determinada análise, levando em consideração os impactos gerados ao meio ambiente (LA GUARDIA; ARMENTA, 2011).

Neste sentido, este trabalho visa otimizar o método analítico de Doseamento e Substâncias Relacionadas para os comprimidos de maleato de enalapril, presente na Farmacopeia Brasileira 6ª edição, a fim de que este se torne mais rápido e menos nocivo ao meio ambiente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial é uma patologia caracterizada por níveis elevados da pressão arterial, em que a pressão sistólica se encontra acima de 140 mmHg e a pressão diastólica acima de 90 mmHg. É uma das patologias mais prevalentes tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento (CALZERRA *et al.*, 2018).

Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2019, no Brasil cerca de 24% da população com mais de 18 anos possui hipertensão arterial, sendo que entre 2010 e 2020 foram registradas 551.262 mortes causadas por doenças relacionadas à hipertensão. Além disso, a prevalência é mais alta em mulheres, idosos com 60 anos ou mais e pessoas de baixa escolaridade (BRASIL, 2020).

A hipertensão possui uma grande importância nas questões de saúde pública por ser um fator de risco para doenças cardiovasculares, apresentando custos ao Sistema Único de Saúde Brasileiro maiores que a obesidade e a diabetes. Em 2018, foram estimados gastos de US\$ 523,7 milhões com hospitalizações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos em casos relacionados com hipertensão arterial (VIII Diretriz Brasileira de Hipertensão, 2020).

Apesar de possuir fácil diagnóstico e um grande número de fármacos para o tratamento, o controle da HA é um desafio para as gestões de saúde pública no Brasil. Por isso, a prevenção tem se apresentado uma forma mais eficiente de combate. Para isso, faz-se necessário campanhas de conscientização da população quanto aos métodos de prevenção mais comuns: dieta saudável, atividade física, evitar o consumo excessivo de bebidas alcoólicas e não fumar. Uma vez diagnosticada hipertensão, os mesmos métodos de prevenção são indicados para o controle da pressão, além da adesão ao tratamento farmacológico.

São muitos os medicamentos registrados para o tratamento da HA. Eles são divididos em cinco classes principais: betabloqueadores, diuréticos tiazídicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores de receptores de angiotensina II e bloqueadores de canais de cálcio (NOCITE, 1988).

Podem ser encontrados em formulações isoladas ou em associação. Associações fixas de medicamentos são compostas por dois ou mais fármacos utilizados em uma mesma forma farmacêutica. Exemplos comuns de associação de dois fármacos no tratamento de HA são a losartana com a hidroclorotiazida, o atenolol com a clortalidona, a losartana com o anlodipino,

entre outros. Um dos motivos principais para as associações fixas é somar os efeitos de duas classes de anti-hipertensivos, na qual haverá uma resposta mais efetiva na diminuição da pressão arterial. Além disso, a associação ajuda na adesão ao tratamento, uma vez que diminui o número de doses diárias (GOMES, 2011).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é responsável por regular funções no organismo, como a pressão arterial, o balanço hídrico e o balanço de íons sódio. Uma vez que os barorreceptores detectam hipotensão arterial, o sistema é ativado fazendo com que haja secreção de renina no aparelho justaglomerular dos rins. Em seguida, a renina cliva o angiotensinogênio sintetizado pelo fígado, formando a angiotensina I. Esta é clivada pela enzima conversora de angiotensina, dando origem a angiotensina II. A angiotensina II apresenta dois mecanismos distintos de atuação: um direto e um indireto. O mecanismo direto é através da ligação com o receptor de angiotensina tipo 1, levando à vasoconstrição. Já o mecanismo indireto se dá pela indução da liberação do hormônio aldosterona pelas glândulas adrenais e da vasopressina pela hipófise. A aldosterona e a vasopressina induzem um aumento na retenção de sódio pelos rins e a aldosterona induz um aumento na excreção de potássio. Esse mecanismo leva a um aumento no volume sanguíneo e, conseqüentemente, na pressão arterial. Dentre os medicamentos que representam a classe dos inibidores da enzima conversora de angiotensina estão o captopril e o enalapril (GONSALEZ *et al.*, 2018); (SPINOSA, 2006).

2.2 MALEATO DE ENALAPRIL

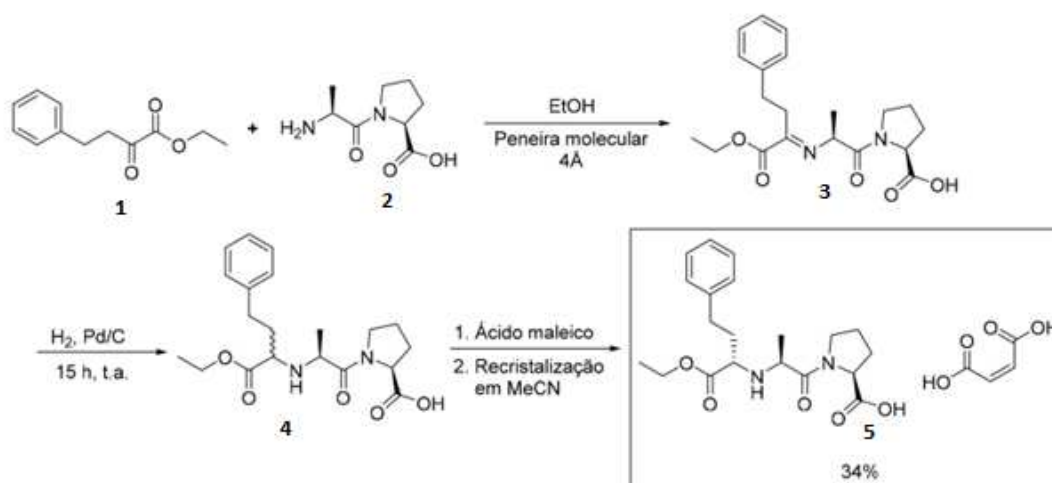
O maleato de enalapril é um princípio ativo presente na terapêutica humana na forma de comprimidos orais em três concentrações: 5, 10 e 20 mg por comprimido. O enalapril é utilizado no controle da hipertensão leve, moderada e grave, em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, nefropatia, retinopatia, artrite reumatoide, eritrocitose e hiperaldosteronismo. Pode ser administrado como droga isolada ou em associação com outras classes de anti-hipertensivos¹.

De acordo com a sua estrutura química, pertence ao grupo dos iECAS (inibidores da enzima conversora de angiotensina) carboxílicos, uma vez que apresenta duas carboxilas em sua estrutura. Na Figura 1 está representada a rota de síntese, na qual possui como materiais de partida os aminoácidos L-alanina e L-prolina. Na rota descrita por Wyvratt *et al.* (1984) o

¹ MALEATO DE ENALAPRIL: comprimidos. Responsável técnico Ricardo Jonsson. Campinas: Sanofi Medley Farmacêutica Ltda., 2022. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/maleato-de-enalapril-medley/bula>. Acesso em: 20 nov. 2022.

enalapril foi obtido em três etapas: 1- condensação do etil-2-oxo-4-fenilbutanoato (1) com o L-alanil-L-prolina (2) e formação da Base de Schiff (3); 2- redução da base imina e formação da mistura diastereoisomérica RSS e SSS (4); 3- formação do sal de maleato e recristalização em acetonitrila (5). Neste o processo, o enalapril foi obtido com rendimento de 34% e com pureza do diastereoisômero SSS de 99%. (SANTOS, et al., 2021).

Figura 1 – Rota de síntese do enalapril



Fonte: adaptado de Santos, *et al.* (2021)

O enalapril é um pró-fármaco que ao ser ingerido via oral sofre metabolização hepática através de reações de desesterificação até a formação do enalaprilato. Este processo de inativação do fármaco, seguida de ativação ao ser ingerido, é chamada de latenciação de fármacos. A latenciação de fármacos é a modificação molecular da substância química ativa através de ligações com grupos reversíveis como, por exemplo, ésteres, amidas, carbamatos, fosfatos, entre outros. É justificada quando há problemas farmacocinéticos, elevada toxicidade do ativo, baixa estabilidade química, odor e paladar inconvenientes, dor no local da administração e formulação farmacêutica de difícil preparo. Em relação ao enalapril, a latenciação é usada devido à baixa biodisponibilidade do enalaprilato na corrente sanguínea ao ser administrado via oral. A formação de um éster dá a estrutura maior caráter lipofílico, fazendo com que tenha maior interação com as membranas do trato gastrointestinal, levando a uma melhor absorção (CHUNG, *et al.*, 2005).

O enalapril apresenta como dados farmacocinéticos taxa de absorção entre 55 e 75%, tempo para concentração plasmática máxima de 1 hora e tempo de meia-vida de 1,3 horas.

Apresenta comportamento farmacocinético linear, variando a concentração sérica de acordo com a dose administrada. A concentração máxima encontrada no plasma varia de acordo com a dose de enalapril, estando na faixa de 110 a 315 ng mL⁻¹. Enquanto isso, o enalaprilato, forma ativa do enalapril, apresenta taxa entre 3 a 12% de absorção oral, tempo para concentração plasmática máxima de 3 a 4 horas e tempo de meia-vida de 11 horas. Comparando a taxa de absorção oral de ambas substâncias, é justificada a necessidade da administração do fármaco na forma de maleato de enalapril (GOMES, 2011).

Além disso, o enalapril possui excreção renal, sendo 40% da dose recuperada como enalaprilato na urina e o restante como enalapril. Não apresenta interação fármaco-alimento, portanto pode ser administrado antes ou depois das refeições. Pode apresentar as seguintes interações medicamentosas: efeito aditivo quando utilizado juntamente com outro anti-hipertensivo; hipercalemia se associado a fármacos que aumentam o potássio sérico, como diuréticos poupadores de potássio e suplementos alimentares que contenham potássio; efeito hipoglicemiante quando usado concomitantemente com medicamentos antidiabéticos e a diminuição do efeito anti-hipertensivo do enalapril causada pela administração conjunta com anti-inflamatórios não esteroides².

Em relação à estrutura-atividade do fármaco, a porção do enalapril que é originada do aminoácido L-prolina, contém uma carboxila que, após a ingestão, na forma de carboxilato, liga-se aos sítios catiônicos da ECA. Além disso, pode ser observada na cadeia N-substituída da L-prolina grupos importantes na atuação do fármaco: a metila e a amina secundária (-NH) são sítios de ligação do íon Zn²⁺ na ECA (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

Estudos realizados em humanos saudáveis, hipertensos e em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva demonstraram que o efeito farmacodinâmico da administração oral de enalapril se dá pela diminuição da atividade da enzima conversora de angiotensina presente no plasma e em outros tecidos. A inibição da atividade da ECA faz com que a concentração de angiotensina II no plasma diminua e, conseqüentemente, a concentração de renina, através do *feedback* negativo, aumente. Ademais, com a inibição da ECA, os níveis de aldosterona no plasma também irão diminuir (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

² MALEATO DE ENALAPRIL: comprimidos. Responsável técnico Ricardo Jonsson. Campinas: Sanofi Medley Farmacêutica Ltda., 2022. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/maleato-de-enalapril-medley/bula>. Acesso em: 20 nov. 2022.

2.3 CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

O controle de qualidade é o setor da indústria que visa atestar que os produtos fabricados possuem qualidade, segurança e eficácia. Na indústria farmacêutica, faz parte das Boas Práticas de Fabricação, no qual é responsável por coletar as amostras, executar os testes e dar prosseguimento na liberação de matérias-primas e produtos acabados (BRASIL, 2022).

O controle de qualidade na indústria farmacêutica tem o objetivo de garantir que todas as características dos medicamentos estejam dentro das especificações presentes na metodologia do produto, podendo ser dividido em controle de qualidade físico-químico, microbiológico e material de embalagem (BRASIL, 2022).

Os ensaios físico-químicos a serem realizados irão depender se a formulação farmacêutica é líquida, sólida ou semissólida. Para as formulações sólidas, as quais compreendem os comprimidos, comumente são exigidos ensaios de peso médio, dureza, friabilidade, desintegração, identificação e teor do princípio ativo, quantificação de impurezas, uniformidade de conteúdo e dissolução (BRASIL, 2019).

Os ensaios de peso médio, dureza, friabilidade e desintegração atestam a qualidade física do comprimido. O teste de peso médio tem por finalidade determinar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso; a dureza e a friabilidade visam avaliar a resistência mecânica dos comprimidos e a desintegração permite verificar se os comprimidos se desintegram dentro de um tempo especificado (BRASIL, 2019).

Os ensaios de teor do princípio ativo, quantificação de impurezas e dissolução avaliam a qualidade química do comprimido e demandam de metodologias analíticas validadas para sua determinação. Os métodos cromatográficos são os mais prevalentes na Farmacopeia Brasileira 6ª edição, sendo que a cromatografia líquida de alta eficiência sobrepõe perante as demais (BRASIL, 2019).

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A separação de dois componentes em uma mistura é fundamentada, principalmente, na diferença de propriedades entre eles, podendo ser tamanho de partícula, ponto de ebulição, constante de partição, dentre outras. Dependendo da propriedade, determinado processo de separação é mais indicado, por exemplo: se for tamanho de partícula, poderá ser usada a filtração; para ponto de ebulição, indica-se a destilação; para constante de partição, a extração

líquido-líquido. Neste sentido, a separação por cromatografia líquida é baseada na distribuição dos analitos em duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; PERES, 2002).

Em cromatografia líquida, a fase móvel é constituída de solventes polares, apolares ou mistura de solventes de diferentes polaridades, e tem esse nome porque ela irá fluir continuamente na coluna cromatográfica. A composição da fase móvel irá depender dos analitos que se deseja separar e da fase estacionária utilizada, sendo obtida, principalmente, de forma empírica. Algumas características são importantes para a escolha da fase móvel, como miscibilidade com a solução da amostra, compatibilidade com o sistema cromatográfico, baixa toxicidade e grau de pureza dos solventes utilizados (AMORIM, 2019).

A cromatografia líquida pode ser dividida em planar ou em coluna. Na cromatografia em coluna, a fase estacionária é composta por um material sólido ou líquido que está contido em um tubo onde é bombeada a fase móvel. Com o avanço tecnológico, foram desenvolvidas fases estacionárias com tamanho de partícula reduzido, na ordem de 3 a 5 micrometros, o que gerou um aumento na eficiência das separações. Contudo, foi necessário aprimorar o equipamento para que suportasse altas pressões, levando ao surgimento da cromatografia líquida de alta eficiência (SKOOG; NIEMAN, 2002; MEYER, 2004).

Em HPLC, o principal material que constitui as fases estacionárias é a sílica-gel. A sílica-gel é uma forma de sílica parcialmente hidratada e altamente porosa, feita de silício e oxigênio. Apresentam grupos silanóis livres em sua superfície, o que possibilita a adsorção de moléculas de água e a formação do grupo siloxano. Para utilização em cromatografia, é desejável que a sílica-gel apresente homogeneidade no tamanho das partículas e no tamanho dos poros, pois esses são fatores que interferem no desempenho da separação. Apesar disso, a sílica apresenta algumas desvantagens, como a faixa limitada de pH em que pode ser empregada (3 a 8) e a pouca capacidade de separação de compostos de baixa polaridade (AQUINO NETO; NUNES, 2003; LANÇAS, 2016).

Com a necessidade de separar compostos de baixa polaridade, foram desenvolvidas fases estacionárias quimicamente ligadas. Para sintetizar este tipo de fase, são realizadas reações químicas para substituição dos grupos silanóis por diferentes grupos funcionais, como octil, octadecil, fenil, ciano, amino, entre outros. As fases estacionárias octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18) são amplamente empregadas na análise de substâncias hidrofóbicas, como alguns fármacos, produtos naturais e pesticidas, por apresentarem boa capacidade de interação com esses analitos (AMORIM, 2019).

A cromatografia líquida de alta eficiência é hoje a principal técnica utilizada em laboratórios de desenvolvimento analítico e controle de qualidade na indústria farmacêutica para quantificação de fármacos e impurezas. É uma técnica capaz de separar, quantificar e purificar analitos em diversos tipos de amostras, como medicamentos, alimentos, produtos naturais, fluidos biológicos, entre outras. Possui como vantagens: ser uma técnica analítica de alta resolução, possibilidade de análises qualitativas e quantitativas e possibilidade de mecanização (SWADESH, 2000; MEYER, 2004).

No desenvolvimento de métodos analíticos por HPLC, alguns parâmetros de separação devem ser compreendidos: tempo de retenção, tempo de eluição do composto não retido, tempo de retenção ajustado, fator de retenção, fator de separação, resolução e número de pratos. O tempo de retenção de um analito é o tempo gasto desde a injeção até a detecção do mesmo. O tempo de eluição do composto não retido é o tempo gasto do momento da injeção até a detecção por um soluto que não interaja com a fase estacionária. Já o tempo de retenção ajustado é obtido através da subtração do tempo de retenção do analito pelo tempo de eluição do composto não retido, compreendendo, portanto, como o tempo que o analito passa em equilíbrio fase estacionária-fase móvel (HARRIS, 2005).

O fator de retenção (k) é uma constante que mede o período que o analito permaneceu adsorvido à fase estacionária em relação com o período que ele ficou dissolvido na fase móvel. Sendo assim, o valor de k indica a afinidade do analito pela fase estacionária em relação à fase móvel e, conseqüentemente, influenciará no tempo de retenção do analito. Os parâmetros que interferem no fator de retenção são a composição da fase móvel e da fase estacionária. Além disso, em eluições por gradiente, a inclinação do gradiente também irá influenciá-lo (HARRIS, 2005).

O fator de separação (α) entre dois picos é obtido através da razão dos tempos de retenção ajustado dos mesmos (equação 1). Sua finalidade é mensurar a seletividade do sistema cromatográfico com relação a dois analitos.

$$\alpha = \frac{t'_{r(B)}}{t'_{r(A)}} \quad (1)$$

no qual: α = fator de separação; $t'_{r(A)}$ e $t'_{r(B)}$ = tempo de retenção ajustado do pico A e do pico B, respectivamente.

A resolução expressa a separação efetiva entre dois picos adjacentes e pode ser descrita através da equação 2. A separação de dois picos cromatográficos dependem do fator de separação, da eficiência cromatográfica (determinada pelo número de pratos) e do fator de retenção. O fator de separação indica a seletividade do método cromatográfico através da

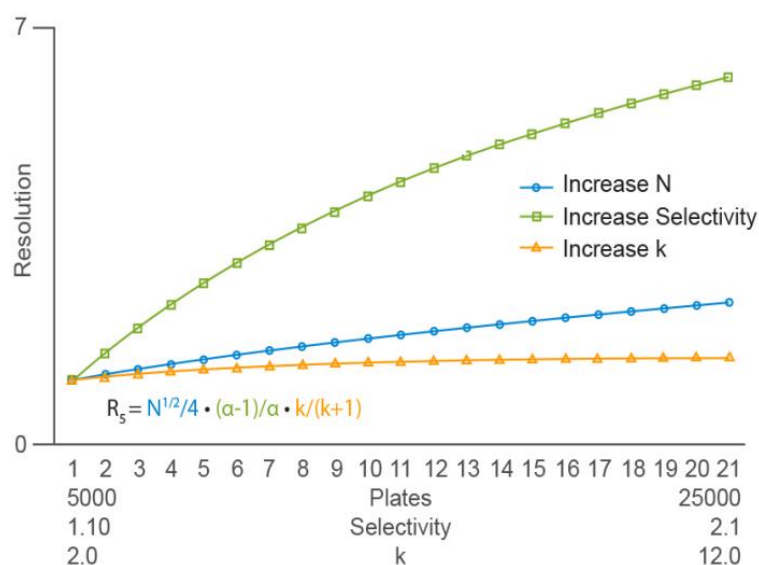
diferença entre os tempos de retenção dos dois picos e é o que apresenta a maior influência no valor da resolução. Além disso, a resolução está diretamente relacionada com a eficiência da coluna, uma vez que a baixa eficiência provoca alargamento dos picos e, conseqüentemente, prejuízo na separação. O fator de retenção tem maior influência quando a retenção dos dois picos é baixa ($k < 2$). Para análises quantitativas é desejável um valor mínimo de resolução de 1,5 (LANÇAS, 2016).

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \times \frac{k}{k+1} \quad (2)$$

no qual: R_s = Resolução; N = Número de pratos; α = fator de separação; k = fator de retenção.

Na Figura 2, está indicada a influência da seletividade, do número de pratos por metro e do fator de retenção na resolução dos picos cromatográficos. É possível observar que a seletividade é o parâmetro que mais influencia na resolução, sendo determinante na boa capacidade de separação dos analitos.

Figura 2 – Resolução entre picos em função da seletividade, eficiência (N) e retenção (k)



Legenda: N = número de pratos por metro; k = fator de retenção.

Fonte: adaptado de Bortalieiro (2016)

O número de pratos é o parâmetro utilizado para determinar a eficiência da coluna cromatográfica. Para picos gaussianos, o número de pratos pode ser calculado pela equação 3:

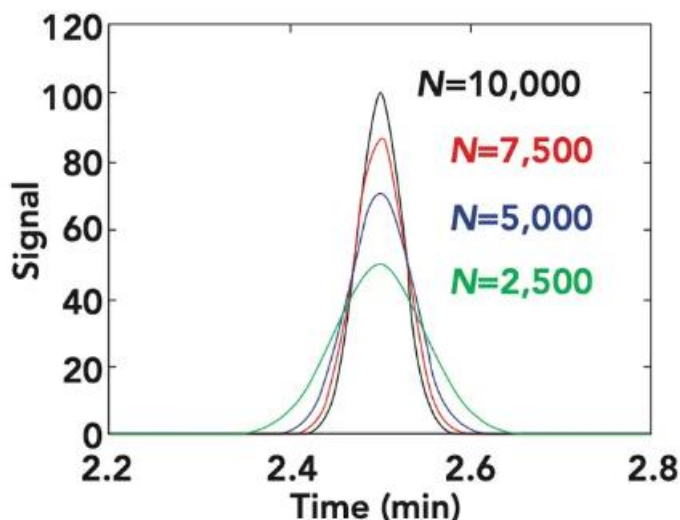
$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad (3)$$

no qual, N = número de pratos; t_r = tempo de retenção e w_b = largura do pico na sua base.

A teoria dos pratos em cromatografia se dá através de uma analogia com o processo de destilação e extração fracionada. Na destilação, um prato é definido como o tamanho da seção de uma coluna, na qual a porção no estado de vapor esteja em equilíbrio com a porção no estado líquido. De forma semelhante, supondo que a coluna cromatográfica fosse como uma série de estágios separados onde ocorre o equilíbrio entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, cada estágio é considerado como um prato. Além do número de pratos, outro fator determinante para a eficiência da coluna é a altura do prato, que pode ser definida como o comprimento da coluna que contém um prato teórico. Dessa maneira, para uma coluna de comprimento L , quanto menor a altura do prato, maior será o número de pratos e, conseqüentemente, maior a eficiência cromatográfica (CIOLA, 1998; HARRIS, 2005).

Em HPLC, um parâmetro que é diretamente influenciado pela eficiência da coluna cromatográfica é a largura do pico. Como pode ser observado na Figura 3, a largura do pico é inversamente proporcional à eficiência da coluna. Conseqüentemente, com o estreitamento do pico, tem-se um sinal analítico mais intenso.

Figura 3 – Efeito da eficiência da coluna na largura do pico



Legenda: N = número de pratos por metro.

Fonte: Stoll (2022)

Apesar da teoria dos pratos ser utilizada para descrever a eficiência de separação em cromatografia como uma analogia ao processo de destilação fracionada, a não existência de pratos nas colunas cromatográficas fez com que este termo fosse criticado por pesquisadores

da área. Além disso, o fato de o processo cromatográfico ocorrer em um fluxo de fase móvel traz uma situação de “não equilíbrio” entre as fases móvel e estacionária que não é abordada na teoria dos pratos. Sendo assim, foi desenvolvida uma teoria que levasse em consideração essa situação de “não equilíbrio”, chamada de Teoria da Velocidade em Cromatografia, e a equação que a define é a Equação de van Deemter, um dos autores do modelo. A equação 4 tenta definir a dispersão do analito entre as fases estacionária e móvel e utiliza três termos para equacionar a altura dos pratos:

$$H \approx A + \frac{B}{u_x} + (C_{fm} + C_{fe}) \times u_x \quad (4)$$

no qual: H = altura do prato; termo A, B, C_{fm} e C_{fe} = constantes que dependem da fase móvel e estacionária; u_x = fluxo de fase móvel (LANÇAS, 2016).

O termo A da equação de Van Deemter é denominado difusão turbulenta e está relacionado com os múltiplos percursos que os analitos podem ter durante a eluição nos canais irregulares da fase estacionária, ou seja, o comprimento do percurso de um mesmo analito pode diferir consideravelmente, gerando um alargamento no pico de detecção (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

O termo B é denominado difusão longitudinal e pode ser compreendido pela difusão das moléculas da amostra de uma região de maior concentração para uma de menor concentração. Para este termo, quanto maior for a taxa de vazão de fase móvel, menor será o tempo gasto para o analito percorrer a coluna e, conseqüentemente, ocorre menos alargamento difusivo (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2009).

Por último, os termos C_{fm} e C_{fe} determinam a transferência de massa, processo no qual ocorre a difusão das moléculas da fase móvel para a fase estacionária e vice-versa. Sendo assim, haverá um equilíbrio entre a quantidade de soluto presente na fase estacionária e na fase móvel que dependerá da constante de partição do soluto entre as fases. Com o fluxo cromatográfico, o equilíbrio do sistema tende a ser perturbado, uma vez que o movimento da fase móvel carrega parte da amostra. Este desequilíbrio faz com que haja transferência de massas entre as fases para que o equilíbrio seja retomado (LANÇAS, 2016).

A equação desenvolvida por van Deemter, por se tratar de cromatografia gasosa, não diferencia os termos C em transferência de massa na fase móvel e na fase estacionária. Entretanto, sabe-se que em cromatografia líquida estas velocidades podem não ser iguais e, portanto, é necessário desmembrá-las (LANÇAS, 2016).

Diferentemente do que acontece com o termo B, para o termo C o aumento da taxa de vazão da fase móvel contribui para o não equilíbrio do soluto entre as fases, prejudicando a

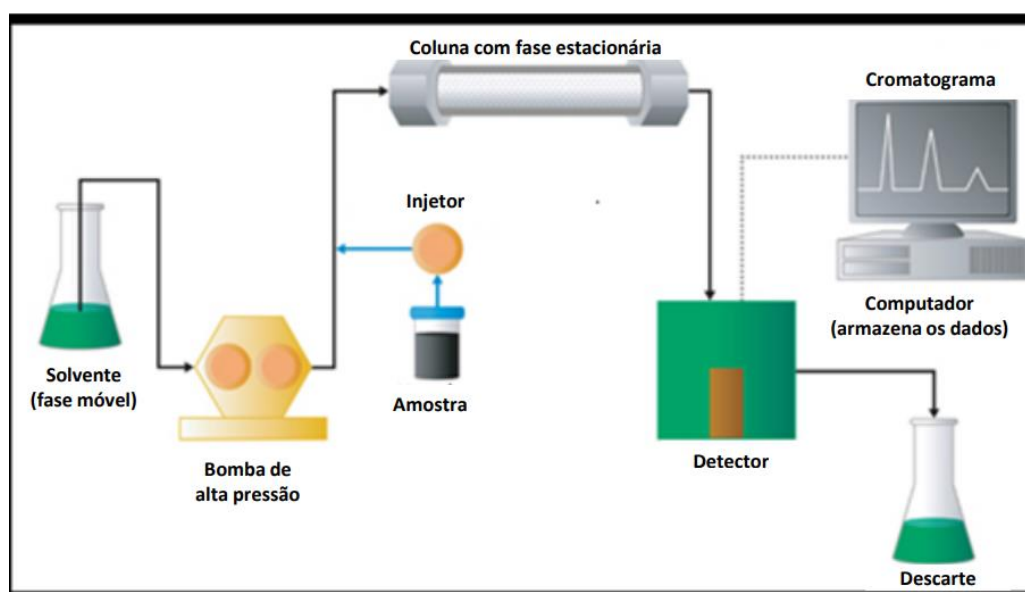
uniformidade da eluição. Percebe-se, então, a importância de se determinar a taxa ótima de fluxo da fase móvel para o método de análise, pois ela influencia diretamente na eficiência da separação (MALDANER; JARDIM, 2009).

Em relação à instrumentação, o HPLC possui alguns componentes que são comuns a todos os cromatógrafos:

- a) reservatório de fase móvel: local onde é armazenada a fase móvel. É importante que o recipiente seja constituído de material inerte para que seja assegurada a integridade da fase móvel;
- b) degaseificador: acoplado ao sistema, tem a função de retirar os gases dissolvidos na fase móvel que podem formar bolhas, atrapalhando a separação e a detecção dos componentes presentes na amostra;
- c) bomba de alta pressão: deve proporcionar uma vazão de fase móvel constante e reprodutível e ser inerte aos solventes utilizados. O HPLC possui dois modelos de eluição: o isocrático e o em gradiente. No modelo isocrático a composição da fase móvel permanece constante durante toda separação, enquanto que em gradiente a composição da fase móvel é alterada com o tempo. O modo em gradiente dá a possibilidade de modificar a força da fase móvel ao longo do tempo, permitindo uma melhor separação dos componentes. Em contrapartida, metodologias de análise em gradiente possuem a desvantagem de necessitar de recondicionamento da coluna ao final de cada corrida cromatográfica;
- d) injetor: a injeção em HPLC pode ser automática ou manual. Na injeção automática, as amostras são acondicionadas em *vials* e o processo de injeção da amostra não possui interferência do analista. Diferentemente, na injeção manual, o analista é quem injeta a amostra, sendo mais propensa a variação nos resultados. Em ambos os casos, é necessário para reprodutibilidade do método que o volume de injeção seja o mais preciso possível;
- e) coluna de guarda ou pré-coluna: colocada antes da coluna de separação, possui a finalidade de reter impurezas que possam estar presentes na amostra, protegendo a coluna de separação e dando a ela maior vida útil;
- f) coluna de separação: constituída de material inerte e resistente, é o local onde a fase estacionária permanece fixada. A coluna de separação pode ser analítica, semi-preparativa, preparativa e industrial. O que difere cada uma delas é a quantidade de amostra que elas suportam a cada injeção e, conseqüentemente o seu tamanho. Nas

- colunas analíticas são injetadas amostras na ordem de nanogramas, semi-preparativas na ordem de miligramas, preparativa na ordem de gramas e as industriais na ordem de quilogramas;
- g) detector: equipamento capaz de registrar um sinal no momento que um componente da amostra passar por ele. Utiliza de propriedades físicas ou físico-químicas destes componentes para registrar o sinal que deve ser proporcional à concentração do analito. Pode ser universal ou seletivo. São exemplos de detectores utilizados: detector UV-vis, detector de fluorescência, detector de índice de refração, espectrômetro de massas, entre outros;
- h) software: programa capaz de controlar as condições de corrida, como temperatura da coluna, fluxo de fase móvel, volume de injeção de amostra, entre outros, e capaz de armazenar os dados gerados pelo detector.

Figura 4 – Esquema de instrumentação para HPLC



Fonte: Waters (2022)³

A detecção por espectrofotometria no UV-Vis é uma das mais utilizadas em HPLC. Seu princípio está fundamentado na Lei de Lambert-Beer, na qual diz que há uma relação exponencial entre a transmissão de luz através de uma substância e a concentração desta substância. Neste sentido, o parâmetro que irá determinar a intensidade de luz transmitida pela

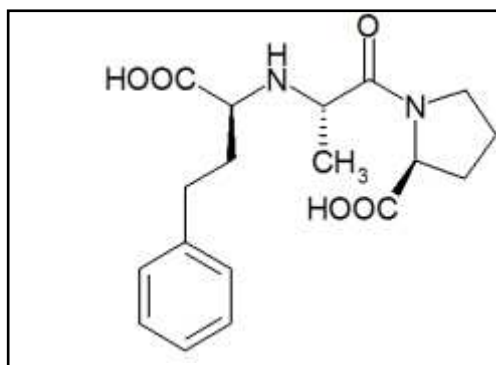
³Disponível em: <https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/beginner-s-guide-to-hplc/bands-peaks-and-band-spreading.html>

amostra será a absorvidade molar. Cada substância apresenta uma absorvidade molar em um dado comprimento de onda. É importante destacar que, para seja possível identificação e quantificação de um analito, a sua absorvidade molar precisa ser maior que zero no comprimento de onda escolhido. Portanto, o espectrofotômetro UV-Vis é classificado como detector seletivo, pois detecta apenas componentes que absorvem luz no comprimento de onda selecionado. Apesar disso, o HPLC acoplado ao espectrofotômetro UV-Vis não é utilizado na caracterização molecular, pois substâncias diferentes podem eluir no mesmo tempo de retenção e absorver luz no mesmo comprimento de onda (SWADESH, 2000).

2.4.1 Método de quantificação de teor e impurezas em comprimidos de enalapril

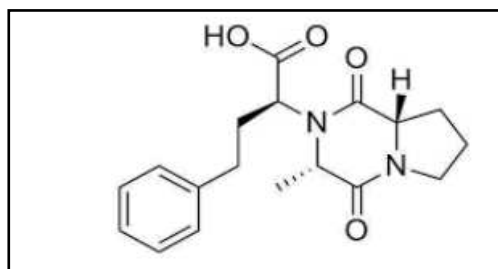
O método de quantificação de teor e impurezas em comprimidos de maleato de enalapril descrito na Farmacopeia Brasileira e utilizado nos laboratórios de controle de qualidade das indústrias farmacêuticas no Brasil é realizado por cromatografia líquida de alta eficiência. Esta metodologia, utilizando os mesmos parâmetros cromatográficos, também está presente nas monografias da Farmacopeia Britânica (*British Pharmacopoeia*) e da Farmacopeia Americana (*United States Pharmacopeia*). No ensaio de teor, a concentração de enalapril é calculada através da relação da área do pico do enalapril na amostra e na solução padrão. No ensaio de substâncias relacionadas são quantificados na amostra, os picos referentes à dicetopiperazina de enalapril e ao enalaprilato, que são compostos de degradação do enalapril de estrutura conhecida. Além disso, também são quantificados os picos que corresponderem a pelo menos 0,1% do pico referente ao enalapril no cromatograma do padrão e que não estiverem presentes na solução tampão, com exceção do próprio enalapril e do ácido maleico (BRASIL, 2019).

Figura 5 – Estrutura do enalaprilato



Fonte: Pereira (2007)

Figura 6 – Estrutura da dicetopiperazina



Fonte: Pereira (2007)

É possível encontrar na literatura, trabalhos que apresentam métodos analíticos alternativos, por espectrofotometria UV-vis e quimioluminescência, que quantificam o teor de enalapril em comprimidos, porém não são capazes de quantificar as suas impurezas. Isso porque, na maioria dos casos, é necessária uma técnica cromatográfica para separação do princípio ativo de suas impurezas para que se possa quantificá-las. Por isso, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica importantíssima em laboratórios de Controle de Qualidade, sendo muito utilizada nas análises de fármacos (AL-ARFAJ; AL-ABDULKAREEM; ALY, 2009; STOLARCZYK *et al.*, 2008).

2.5 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA HPLC-UV

Segundo a RDC Nº 166 de 24 de julho de 2017 da ANVISA, a validação de métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos deve “demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos”.

Um método analítico precisa ser validado sempre que não estiver presente em compêndios oficiais ou quando se desenvolve ou efetue adaptações em metodologias validadas, inclusão de novas técnicas e equipamentos (BRASIL, 2017).

Ao desenvolver um novo método analítico de quantificação de teor e impurezas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência os seguintes parâmetros devem ser testados no processo de validação: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (BRASIL, 2017).

A seletividade é o parâmetro da validação analítica no qual deve ser comprovado que o sinal analítico de interesse reflete apenas ao analito que se deseja identificar ou quantificar, mesmo que na presença de diluente, matriz e impurezas (BRITO *et al.*, 2003).

A linearidade de um método analítico deve ser comprovada através da relação diretamente proporcional entre a resposta analítica e a concentração de um analito em uma amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

Após a realização dos ensaios de linearidade, deve-se construir uma curva analítica para apresentação da correlação concentração versus resposta, na qual pode ser representada através da função $y = ax + b$, em que y é a resposta analítica, x é a concentração do analito, a é o coeficiente angular e b o coeficiente linear da reta. É importante destacar que, para avaliação da linearidade, o coeficiente de correlação (r^2) deve ser no mínimo 0,990 (BRASIL, 2017).

O limite de detecção de um método analítico pode ser compreendido como a menor concentração de um analito na qual pode-se detectá-lo, porém, não obrigatoriamente quantificá-lo. Já o limite de quantificação é a menor quantidade que um analito pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis (RIBANI *et al.*, 2004).

Os ensaios de precisão tem por objetivo avaliar o quão próximo estão os resultados das replicatas obtidas através de amostras preparadas de acordo com o método analítico que está sendo validado. Esta avaliação se dá através do cálculo do desvio padrão relativo, utilizando a equação 5:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (5)$$

no qual: DPR é o desvio padrão relativo, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada (BRITO *et al.*, 2003).

A precisão pode ser expressa através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. Para a repetibilidade, as amostras são submetidas ao mesmo procedimento descrito no método analítico, em um mesmo dia, por um mesmo analista. Na precisão intermediária, deve-se comparar os resultados obtidos entre análises de pelo menos dois dias diferentes e realizadas por analistas distintos. Na reprodutibilidade, o objetivo é avaliar os resultados obtidos em laboratórios diferentes (BRITO *et al.*, 2003).

A exatidão indica o grau de concordância do resultado obtido através da execução da metodologia em validação com àquele que é tido como verdadeiro. Pode ser determinada através do ensaio de recuperação, no qual é adicionada à matriz, uma quantidade de solução padrão de concentração conhecida e calculada através da equação 6:

$$Recuperação (\%) = \frac{Conc_{amostra\ com\ adição\ de\ padrão} - Conc_{amostra}}{Conc_{teórica\ do\ analito\ adicionado}} \times 100 \quad (6)$$

no qual: Conc = concentração (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

A robustez é o parâmetro que avalia se o método analítico mantém a precisão dos resultados perante a pequenas variações das condições de análise. Em análises quantitativas,

deve-se avaliar os impactos das variações utilizando os mesmo critérios que na exatidão (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

2.6 QUÍMICA VERDE

A indústria química é uma das mais importantes no mercado econômico mundial, visto que contempla diversos setores, como farmacêutico, fertilizantes, cosméticos, alimentos, defensivos agrícolas, tintas, entre outros. Um ponto em comum entre todos os setores da indústria química é a geração de resíduos. Os resíduos de solventes orgânicos vindos de atividades laboratoriais produzem impactos para o meio ambiente, poluindo os solos e a água (GOMES *et al.*, 2018; KANNIAIAH *et al.*, 2021). Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias analíticas que reduzam o consumo de solventes vai ao encontro do que hoje é chamado de Química Verde.

A Química verde foi definida por Lenardão *et al* (2003), como: “o desenho, desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente.” A aplicação da Química verde tem sido tratada como essencial, por governantes e pesquisadores, no desenvolvimento de uma economia sustentável e na preservação dos recursos ambientais (SOUZA-AGUIAR *et al*, 2014).

Com o passar do tempo, foi surgindo uma nova vertente da Química verde, a Química analítica verde (QAV). A QAV tem como princípios: a redução e/ou eliminação da utilização de reagentes e solventes tóxicos, diminuição do gasto de energia, simplificação do preparo de amostra, gerenciamento de resíduos, utilização de métodos analíticos que combinam a quantificação de mais de um analito, número e tamanho de amostras minimizados e garantia da segurança do analista. Ainda assim, é importante destacar que a implementação destes princípios citados anteriormente deve ser realizada racionalmente, uma vez o objetivo é aliar a garantia da qualidade dos resultados analíticos com a redução do impacto ambiental (GAJUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013).

Quando se deseja substituir um método analítico já existente por um outro, os critérios de validação, como, sensibilidade, exatidão, precisão e limites de detecção e quantificação são usualmente utilizados para comparação dos métodos. Com o desenvolvimento da Química Analítica Verde, questões relacionadas à sustentabilidade da metodologia analítica vem ganhando importância. Com isso, além dos critérios de validação analítica, parâmetros como

toxicidade dos reagentes utilizados, consumo de energia na instrumentação, gastos com transporte, armazenamento e preparo de amostras, geração de resíduos de solventes e segurança do analista também são levados em consideração na escolha do método (LA GUARDIA; ARMENTA, 2011).

Neste sentido, um dos princípios elementares da Química verde é a redução na produção de resíduos químicos potencialmente tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente. Estes resíduos são comumente gerados na indústria farmacêutica no processo de fabricação de medicamentos e nas análises laboratoriais. O principal ensaio analítico realizado no Controle de Qualidade e na Pesquisa e Desenvolvimento que consomem solventes orgânicos e geram resíduos é a cromatografia líquida de alta eficiência.

No intuito de diminuir o impacto ambiental das análises por HPLC, é sugerido utilizar solventes orgânicos mais “verdes”, ou seja, menos nocivos ao ser humano e ao meio ambiente. Pensando nisso, Prat, Hayler e Wells (2014) dividiram os solventes orgânicos em seis categorias, indo do recomendável até o altamente perigoso. Nesta divisão, a acetonitrila, que é um solvente muito utilizado em HPLC, é categorizado como problemático. A acetonitrila apresenta em sua estrutura um grupamento nitrila, que quando incinerado gera gás cianídrico, um gás altamente tóxico e que pode ser letal ao ser humano. Entretanto, o etanol e o metanol são classificados como recomendáveis, ou seja, são menos nocivos ao ser humano e ao meio ambiente, e possuem características que dão a possibilidade de substituírem a acetonitrila na composição de fases móveis em cromatografia líquida (AMORIM, 2018).

Capello, Fischer e Hungerbühler (2007) desenvolveram uma metodologia quantitativa para classificar os solventes orgânicos de acordo com os princípios da Química Verde, chamada *Environmental, health and safety method*. Além disso, foi avaliado o ciclo de vida do solvente, através de uma segunda ferramenta chamada *Life-cycle assessment*, em que àquele que é recuperado via destilação é melhor pontuado do que àquele que é descartado via incineração, por exemplo. Desta forma, 26 solventes orgânicos foram avaliados, dos quais os álcoois simples, como etanol e metanol, e os alcanos, como heptano e hexano, tiveram melhores resultados que ácidos, acetonitrila e formaldeído.

Com isso, faz-se necessário a revisão de métodos de análises farmacopeicos que usam esses solventes em grande quantidade, com o objetivo de trabalhar na substituição ou redução do consumo de solventes orgânicos de alta toxicidade.

Algumas ferramentas são utilizadas para classificar um método analítico em relação aos princípios da Química Analítica Verde. O *National Environmental Methods Index* (NEMI) é

uma das ferramentas mais antigas de avaliação de metodologias. Neste procedimento, os métodos analíticos são avaliados levando em consideração os reagentes utilizados, através de quatro critérios: persistência no meio ambiente, bioacumulatividade e toxicidade; periculosidade dos resíduos; corrosão ($\text{pH} < 2$ ou $\text{pH} > 12$) e quantidade de resíduos que são gerados. Esta metodologia usa um círculo dividido em quatro partes, em que cada quadrante representa um critério a ser avaliado (KANNIAIAH *et al.*, 2021).

Figura 7 – Modelo de pictograma NEMI



Legenda: *PBT*: reagentes persistentes, bioacumulativos ou tóxicos; *Hazardous*: reagentes perigosos; *Corrosive*: reagentes com pH abaixo de 2 ou acima de 12; *Waste*: geração de mais de 50 mL de resíduo por análise.

Fonte: Pereira (2007)

O primeiro quadrante é baseado na *Toxic Release Inventory*, lista de reagentes PBT (persistente, bioacumulativo e tóxico) criada pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos. Para que seja pintado de verde no primeiro quadrante, o método não pode apresentar nenhum reagente presente nesta lista. O segundo quadrante diz respeito à produção de resíduos perigosos que são gerados durante a execução do método. Para definição de periculosidade, é utilizada uma lista criada pela EPA, na qual são informados os reagentes que irão gerar resíduos perigosos. Da mesma forma que o primeiro quadrante, o segundo será pintado de verde se não apresentar nenhum reagente na respectiva lista. O terceiro quadrante representa o pH dos reagentes utilizados, que devem estar entre 2 e 12 para que o quadrante seja pintado de verde. E por último, o quarto quadrante será verde se o método não gerar mais de 50 gramas ou mililitros de resíduos por análise. A NEMI apresenta a vantagem de ser simples e de fácil interpretação, porém não atinge os doze princípios da química verde, não abrangendo

as questões de gastos de energia e segurança do analista (A EMAM *et al.*, 2020; KANNAIAH *et al.*, 2021).

Outra ferramenta de classificação de métodos analíticos é a *Eco-Scale*. Foi proposta por Van Aken, Streckowski e Patiny (2006) com intuito de classificar reações de sínteses orgânicas e, posteriormente, foi adaptada para a Química Analítica. É baseada na penalização por critérios, em que para cada parâmetro que estiver fora do especificado, serão somadas penalidades que serão descontados de um total de 100 pontos ao final do processo. Neste sentido, os métodos que obtiverem maior pontuação serão considerados mais sustentáveis. Os critérios utilizados nesta ferramenta são:

- a) reagentes: quantidade e periculosidade dos reagentes utilizados;
- b) instrumentação: consumo de energia, segurança na operação e geração de resíduos.

A NEMI e a *Eco-Scale* podem ser utilizadas concomitantemente, pois geram resultados complementares, uma vez que, a primeira traz dados qualitativos através de pictogramas que podem ser interpretados mais rapidamente; e a segunda é uma ferramenta quantitativa que leva em consideração um maior número de aspectos do método e é capaz de classificar dois métodos com maior objetividade.

O GAPI (*Green Analytical Procedure Index*) é uma ferramenta qualitativa que avalia o método analítico dividindo-o em três categorias: preparo da amostra, reagentes e solventes e instrumentação. Essas três categorias são subdivididas em 15 subcategorias com o objetivo de analisar cada etapa do processo analítico. Para cada subcategoria tem-se um pictograma que é pintado de verde, amarelo ou vermelho, indo do mais para o menos sustentável de acordo com os princípios da QAV. Além disso, métodos quantitativos são representados com um círculo no pictograma central, diferenciando-os dos qualitativos. O Quadro 1 traz as categorias de avaliação da ferramenta GAPI com a sua respectiva classificação em verde, amarelo ou vermelho (PIOTKA-WASYLKA, 2018; KANNAIAH *et al.*, 2021).

Quadro 1 – Modelo de classificação da ferramenta GAPI

		Subcategoria	Verde	Amarelo	Vermelho
Preparo da amostra	1	Coleta	In-line	On-line ou at-line	Off-line
	2	Preservação	Não necessária	Química ou física	Química ou física
	3	Transporte	Não necessário	Necessário	————
	4	Armazenamento	Não necessário	Sob condições normais	Sob condições especiais
	5	Tipo de método: direto ou indireto	Sem preparação de amostra	Procedimentos simples (filtração, centrifugação)	Procedimentos mais complexos, como extração
	6	Escala da extração	Nano-extração	Micro-extração	Macro-extração
	7	Solventes e reagentes utilizados	Sem uso de solventes e reagentes	Uso de solventes e reagentes “verdes”	Uso de solventes e reagentes “não-verdes”
	8	Tratamentos adicionais	Sem necessidade	Tratamentos simples (remoção de solventes, purificação, etc)	Tratamentos adicionais (derivatização)
Reagentes e solventes	9	Quantidade de reagentes e solventes	< 10 mL ou g	10 – 100 mL ou g	> 100 mL ou g
	10	Perigo à saúde	Substâncias levemente tóxicas, listadas na lista NFPA com pontuação 0 ou 1	Substâncias de toxicidade moderada, listadas na lista NFPA com pontuação 2 ou 3	Substâncias altamente tóxicas, listadas na lista NFPA com pontuação 4
	11	Riscos à segurança	Pontuação de 0 ou 1 na NFPA em relação a substâncias inflamáveis	Pontuação de 2 ou 3 na NFPA em relação a substâncias inflamáveis	Pontuação de 4 na NFPA em relação a substâncias inflamáveis
Instrume	12	Gasto de energia	≤ 0,1 kWh por amostra	≤ 1,5 kWh por amostra	≥ 1,5 kWh por amostra

13	Perigo ocupacional	Vedação hermética do processo analítico	—————	Emissão de vapores na atmosfera
14	Quantidade de resíduos	< 1 mL ou g	1-10 mL ou g	> 10 mL ou g
15	Tratamento de resíduos	Reciclagem	Degradação, passivação	Sem tratamento

Fonte: Płotka-Wasyłka (2018)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar o método analítico de quantificação de teor e impurezas de maleato de enalapril em comprimidos, proposto pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição, de tal forma que o novo método tenha maior eficiência analítica, menor impacto ao meio ambiente, além de ser capaz de cumprir com as especificações descritas na Farmacopeia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) transferir a metodologia de quantificação de teor e impurezas de maleato de enalapril para coluna cromatográfica de 100 mm de comprimento;
- b) estudar o fluxo e a composição da fase móvel com o intuito de encontrar aqueles que apresentem melhor eficiência de separação, aliando tempo de análise e impacto ao meio ambiente;
- c) comparar o método analítico otimizado com o Farmacopeico a partir das ferramentas NEMI, *Eco-Scale* e GAPI;
- d) validar o método analítico otimizado seguindo os parâmetros de validação descritos na RDC N° 166/17 da ANVISA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Padrões analíticos e amostras comerciais

Foram utilizados padrão de maleato de enalapril da Sigma, lote LRAC3898 e validade agosto/2023 e padrão de enalaprilato da Farmacopeia Europeia de lote 1.1. Foi utilizada matéria-prima de maleato de enalapril adquirida em farmácia de manipulação de Juiz de Fora-MG, marca Florian, lote 20A25B032060701 e validade 01/04/2024.

As amostras de comprimidos de maleato de enalapril foram adquiridas em drogarias de Juiz de Fora-MG. Seus dados estão descritos no quadro a seguir.

Quadro 2 – Descrição das amostras comerciais

Princípio ativo	Teor declarado	Fabricante	Lote	Data de validade
Maleato de enalapril	5 mg	Fabricante A	1L8456	11/2023
	10 mg	Fabricante B	26223660	08/2023
	10 mg	Fabricante C	3M0688	04/2025

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.1.2 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados neste trabalho foram acetonitrila grau HPLC-UV (Dinâmica) etanol grau HPLC-UV (Dinâmica) e água purificada obtida através do sistema osmose reversa (Quimis). Os reagentes utilizados foram fosfato de sódio (Vetec) e ácido fosfórico PA (Dinâmica).

4.1.3 Equipamentos e consumíveis

HPLC Agilent Technologies 1260 Infnit II; Detector UV-vis – modelo G7117C; Software Agilent Masshunter Workstation Data Acquisition; Software Agilent Masshunter Qualitative Analysis Navigator; HPLC Waters; Coluna cromatográfica Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 4,6 mm; 3,5 µm); Balança analítica Shimadzu – modelo AUY220; Chapa aquecedora Quimis – modelo Q310-22B; Banho de ultrassom Ultrasonique – modelo Q30/40; Medidor de pH Digimed; Purificador de água Quimis – modelo Q842U210;

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das soluções

4.2.1.1 Tampão fosfato de sódio pH 2,2

Foi dissolvido 1,38 gramas de fosfato de sódio monobásico anidro em 800 mL de água purificada. Em seguida, foi acertado o pH para 2,2 com ácido fosfórico PA e o volume foi completado para 1000 mL com água purificada. Por fim, a solução foi filtrada em papel de filtro com auxílio de bomba a vácuo e deixada no ultrassom por 15 minutos.

4.2.1.2 Solução padrão de enalapril

Foi pesado, em balança analítica, cerca de 10 miligramas do padrão primário de maleato de enalapril, transferido para balão de 5 mL e completado com água purificada. Em seguida, foi pipetado 1 mL dessa solução e diluído em quantidade suficiente para 10 mL de tampão fosfato. Concentração final: $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.1.3 Solução de dicetopiperazina

Pesou-se, em balança analítica, cerca de 20 mg da matéria-prima de maleato de enalapril e transferiu-se para o centro de um béquer de 100 mL, deixando a amostra concentrada em um único ponto. A amostra foi fundida sobre placa aquecedora a 100°C . A amostra foi retirada imediatamente após a fusão e deixou-se esfriar a temperatura ambiente. Foi adicionado 25 mL de acetonitrila ao resíduo e colocado no ultrassom por 5 minutos para que houvesse a dissolução.

4.2.1.4 Solução padrão de enalaprilato

Foi pesado, em balança analítica, cerca de 10 mg de padrão primário de enalaprilato e transferido para balão volumétrico de 25 mL. Foi dissolvido em 20 mL de água purificada, agitado em banho ultrassônico por 5 minutos e completado o volume com água purificada.

4.2.1.5 Solução resolução

Foram pipetados 400 μL da solução padrão de enalapril, 100 μL da solução padrão de enalaprilato, 800 μL da solução padrão de dicetopiperazina e 700 μL da solução tampão fosfato de sódio pH 2,2.

4.2.1.6 Solução amostra

Foram pesados e pulverizados 20 comprimidos de maleato de enalapril. Em seguida, pesou-se, em balança analítica, quantidade equivalente a 20 mg de maleato de enalapril e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL. Foi adicionado cerca de 70 mL de tampão fosfato de sódio pH 2,2 e deixado em banho ultrassônico por 15 minutos. Em seguida, o balão foi agitado manualmente por 5 minutos, completado o volume com tampão fosfato pH 2,2 e homogeneizado. Por fim, filtrou-se a solução em papel de filtro, desprezando os primeiros 5 mL. Este mesmo procedimento foi seguido para os comprimidos de 5 e 10 mg. Concentração teórica final: 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de maleato de enalapril.

4.2.2 Otimização do método analítico

A otimização do método analítico foi conduzida utilizando a coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus de fase estacionária de octilsilano, dimensões de 100 x 4,6 mm e tamanho de partícula 3,5 μm . A temperatura do forno da coluna foi mantida a 50°C, o volume de injeção foi de 20 μL e a detecção no UV em comprimento de onda de 215 nm. Para o parâmetro de fluxo de fase móvel foram testados os valores de 1,8 e 2,0 mL min^{-1} e para composição da fase móvel foram testados a acetonitrila e o etanol como solvente orgânico. Os ensaios foram realizados de acordo com o Quadro 3. Os cromatogramas foram obtidos utilizando a solução resolução, na qual contém o enalapril e seus compostos de degradação, o enalaprilato e a dicetopiperazina.

Quadro 3 – Planejamento dos ensaios

Ensaio	Composição da fase móvel	Fluxo (mL min^{-1})
1	Acetonitrila + tampão 25:75	1,8
2	Acetonitrila + tampão 25:75	2,0
3	Etanol + tampão 25:75	1,8
4	Etanol + tampão 30:70	1,8
5	Etanol + tampão 30:70	2,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.3 Quantificação de teor e impurezas

Foram realizadas corridas cromatográficas para os testes de quantificação de teor e impurezas nos comprimidos de maleato de enalapril de 5 e 10 mg, sendo que a ordem de injeção foi a seguinte: solução tampão, solução resolução, solução padrão e solução amostra. A solução

padrão foi injetada em triplicata. As soluções amostra foram preparadas em triplicata, a partir de pesagens independentes, seguindo o preparo de amostras descrito no item 4.2.1.6.

Para o ensaio de teor, foram comparadas a média das áreas correspondentes ao enalapril na solução padrão e a área do enalapril obtida na amostra. Já para a quantificação de impurezas, foram somadas as áreas correspondentes ao enalaprilato, à dicetopiperazina de enalapril e qualquer outro pico que não for observado na solução tampão e obtiver área superior a 0,1% da área do enalapril na solução padrão. O valor deste somatório será comparado com a área do enalapril na solução padrão. As equações 7 e 8 são utilizadas nos cálculos de teor e impurezas em comprimidos de enalapril.

$$\text{Teor de enalapril (\% por comprimido)} = \frac{AE_{AM} \times C_P \times 100}{AE_P \times C_{AM}} \quad (7)$$

no qual: AE_{AM} = área correspondente ao pico do enalapril na amostra;

AE_P = médias das áreas correspondentes ao pico do enalapril no padrão;

C_P = concentração de enalapril no padrão em $\mu\text{g mL}^{-1}$;

C_{AM} = concentração teórica de enalapril na amostra em $\mu\text{g mL}^{-1}$;

$$\text{Teor de impurezas (\% por comprimido)} = \frac{AI_{AM} \times C_P \times 100}{AE_P \times C_{AM}} \quad (8)$$

no qual: AI_{AM} = somatório das áreas correspondentes a todos os picos, exceto do ácido maleico e do enalapril, obtidos no cromatograma da amostra;

AE_P = média das áreas correspondentes ao pico do enalapril no padrão;

C_P = concentração de enalapril no padrão em $\mu\text{g mL}^{-1}$;

C_{AM} = concentração teórica de enalapril na amostra em $\mu\text{g mL}^{-1}$;

4.2.4 Validação analítica

4.2.4.1 Seletividade

A seletividade foi demonstrada através da comparação dos tempos de retenção, dos espectros UV das soluções padrão e amostra de enalapril, enalaprilato e dicetopiperazina e calculada a pureza dos picos dos analitos citados através do cálculo de semelhança, utilizando a equação 9:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - x_{av}) \cdot (y_i - y_{av})]}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (x_i - x_{av})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - y_{av})^2]}} \quad (9)$$

no qual, r = correlação; x_i e y_i = absorvâncias medidas no mesmo comprimento de onda do ponto de dados e do ápice do pico, respectivamente; n = número de comprimentos de onda

adquiridos por ponto de dados; x_{av} e y_{av} = absorvâncias médias do ponto de dados e do espectro no ápice do pico, respectivamente.

Posteriormente, é calculado o fator de correspondência a partir da equação 10:

$$Fc = r^2 \times 1000 \quad (10)$$

no qual, Fc é o fator de correspondência e r é a correlação. O valor do fator de correspondência varia de 0 (espectros sem nenhuma similaridade) a 1000 (espectros idênticos).

4.2.4.2 Linearidade

A linearidade foi determinada através de sete níveis, em triplicata, utilizando o padrão de maleato de enalapril nas concentrações de 140 a 260 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a uma variação de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por nível. Para cada replicata, foi gerada uma curva analítica na forma área do pico *versus* concentração do analito por meio do método dos mínimos quadrados. Em seguida, foram calculados os parâmetros de regressão: coeficiente angular, intersecção com o eixo y e coeficiente de correlação. Por fim, foram realizados cálculos estatísticos de análise de variância para determinação da significância da regressão e verificar se houve falta de ajuste. Além disso, foi utilizado o teste de Cochran para avaliação da homocedasticidade dos dados (BRASIL, 2017).

4.2.4.3 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do enalaprilato foram realizados através da construção da curva analítica em 5 níveis, na qual a concentração de enalaprilato variou de 2 a 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, somando 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por nível. A partir dos valores de área de enalaprilato em cada nível é gerada a curva área do pico *versus* concentração e obtida a equação da reta. Com os valores da equação, obtém-se os limites usando as equações 11 e 12.

$$\text{para o limite de detecção: } LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (11)$$

$$\text{para o limite de quantificação: } LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (12)$$

em que: IC é a inclinação da reta e σ é o desvio padrão obtido do intercepto com o eixo Y de três curvas analíticas construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de detecção.

Da mesma forma, os limites de detecção e quantificação da dicetopiperazina de enalapril foram obtidos a partir da construção da curva analítica em 5 níveis, na qual a solução de menor concentração tem de 4 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a maior concentração tem de 8 a 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de

dicetopiperazina de enalapril. Os mesmos cálculos usados para calcular os limites do enalaprilato são válidos para a dicetopiperazina.

4.2.4.4 Precisão

Para avaliação da precisão da metodologia foram estudadas a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade. O processo de preparo das amostras, configuração das condições cromatográficas e quantificação foram realizados da mesma forma que na Quantificação de teor e impurezas presente no item 4.2.3.

Desta maneira, a repetibilidade do método foi estudada nas apresentações de comprimidos de 5 e 10 mg de maleato de enalapril, na qual a análise de quantificação de teor e impurezas foi realizada em quadruplicata. Na precisão intermediária, o método foi testado utilizando comprimidos na apresentação de 10 mg, em quadruplicata, em um dia diferente da repetibilidade e um outro analista. Para a reprodutibilidade, a análise foi realizada em comprimidos de 10 mg, quadruplicata, em um laboratório diferente, utilizando um cromatógrafo de outro fabricante.

Para quantificar a precisão, foram calculados os desvio padrão relativo dos resultados de teor de enalapril, enalaprilato e dicetopiperazina.

4.2.4.5 Exatidão

Para avaliação da exatidão do princípio ativo, foram preparadas, em triplicata, amostras a partir de comprimidos de maleato de enalapril 10 mg, de acordo com o item 4.2.1.6. Para cada replicata, foram injetadas as soluções nas seguintes concentrações:

- a) solução amostra $200 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- b) solução amostra $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ + padrão enalapril $160 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração baixa);
- c) solução amostra $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ + padrão enalapril $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração média);
- d) solução amostra $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ + padrão enalapril $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração alta);

Para a exatidão do enalaprilato, foi seguido o mesmo procedimento realizado para o enalapril, e foram injetadas as soluções nas seguintes concentrações:

- e) solução amostra $200 \mu\text{g mL}^{-1}$;

- f) solução amostra 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + padrão enalaprilato 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração baixa);
- g) solução amostra 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + padrão enalaprilato 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração média);
- h) solução amostra 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + padrão enalaprilato 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração alta);

Foi calculada, para cada nível de concentração de padrão, a recuperação e o desvio padrão.

Não foi testada exatidão para a dicetopiperazina devido à ausência de padrão primário ou secundário.

4.2.4.6 Robustez

Na avaliação da robustez, é testada a capacidade do método analítico em se manter preciso quando submetido a pequenas variações nas condições analíticas. Conforme preconizado na RDC N° 166 de 2017, para análises em HPLC, deve ser avaliado o preparo e conservação da amostra e os parâmetros cromatográficos.

Neste sentido, foram realizadas pequenas variações no método analítico, as quais estão indicadas no Quadro 4. Não foi testada a variação inferior do pH da fase móvel porque foi preferido não submeter a coluna a um pH no limite mínimo de sua especificação, que é de 2,0.

Quadro 4 – Ensaio de Robustez

Parâmetros analíticos	Variação inferior	Condição normal	Variação superior
Tempo de solubilização no ultrassom	12 minutos	15 minutos	18 minutos
Estabilidade da amostra	————	Injeção após o preparo	Injeção após 24 horas
pH da fase móvel	————	2,2	2,4
Composição da fase móvel	28:72	30:70	32:68
Fluxo da fase móvel	1,7 mL min ⁻¹	1,8 mL min ⁻¹	1,9 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	48°C	50°C	52°C

Fonte: Brasil (2017); Elaborado pelo autor (2023).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Para a proposta de otimização do método analítico de teor e impurezas orgânicas em comprimidos de maleato de enalapril foi tomada como base a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6^a edição volume 2, e que apresenta as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica octilsilano de dimensões 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm; temperatura do forno da coluna de 50°C; fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato de sódio pH 2,2 25:75; fluxo da fase móvel de 2,0 mL min⁻¹; volume de injeção de amostra de 50 µL e detecção UV a 215 nm.

Neste sentido, foram elencados os parâmetros de otimização, sendo eles: coluna cromatográfica, temperatura da coluna, composição da fase móvel e fluxo da fase móvel.

Como um dos objetivos do trabalho é a redução do tempo de análise, foi escolhida a coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus (100 x 4,6 mm; 3,5 µm). Em comparação com a coluna especificada no método farmacopeico, a coluna escolhida para otimização tem comprimento menor e é do tipo octadecilsilano (C18). A escolha por uma coluna C18 deve-se a esta reter mais os compostos hidrofóbicos, compensando a redução no comprimento da coluna.

A influência da temperatura da coluna já foi estudada no trabalho de Salamoun e Slais (1991), no qual obtiveram resultados que vão ao encontro do especificado no método farmacopeico. Neste trabalho, os autores concluíram que a temperatura não influenciaria nos tempos de retenção dos compostos e que uma diminuição desta provocaria mudança na forma do pico do enalapril.

Posteriormente, Bhardwaj e Singh (2007), também em um trabalho de otimização do método de análise por HPLC de doseamento de enalapril em comprimidos, concluíram que em temperaturas abaixo de 60°C e pH acima de 3,0 não houve boa separação entre o pico do enalapril e os seus produtos de degradação. Além disso, o meio ácido da fase móvel proporciona ao sistema maior capacidade de separação, sendo que a coluna Zorbax apresenta boa performance em pH baixo. Neste sentido, foi decidido não alterar a temperatura e o pH da fase móvel no processo de otimização (KOPPALA; REDDY; ANIREDDY, 2017).

Para o estudo da composição da fase móvel, inicialmente foram escolhidos o metanol e o etanol como alternativa à acetonitrila pela semelhança na força de eluição e seletividade de ambos, de acordo com o nomógrafo de fase móvel e triângulo de Snyder, respectivamente.

Entretanto, foi descartada a utilização do metanol durante o estudo devido a sua absorção no comprimento de onda de 210 a 215 nm (BHARDWAJ; SINGH, 2008).

Apesar do etanol não ser um solvente comumente utilizado em HPLC devido a sua alta viscosidade, há alguns trabalhos científicos que estudaram a sua viabilidade, uma vez que é um solvente biorrenovável. Enquanto isso, a acetonitrila e o metanol, que são solventes mais utilizados, são caros e altamente tóxicos. O problema da alta viscosidade do etanol é a elevada pressão que ele gera no sistema cromatográfico. Entretanto, quando operado em colunas com temperatura mais elevada, ocorre a diminuição da pressão do sistema, fazendo com que o etanol possa se tornar uma alternativa para otimização de métodos cromatográficos que utilizam solventes tóxicos e não renováveis (MOHAMED; LAMIE, 2016; SHAABAN, 2016; SHAABAN; MOSTAFA, 2018; LOPES; PINTO, 2023).

Com isso, o processo de otimização do método foi realizado comparando a acetonitrila e o etanol como componentes orgânicos da fase móvel e variando o fluxo entre 1,8 e 2,0 mL min⁻¹. Sendo assim, foram testadas as seguintes composições de fase móvel:

- a) composição acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 25:75 (Farmacopeica);
- b) composição etanol e tampão fosfato pH 2,2 25:75;
- c) composição etanol e tampão fosfato pH 2,2 30:70.

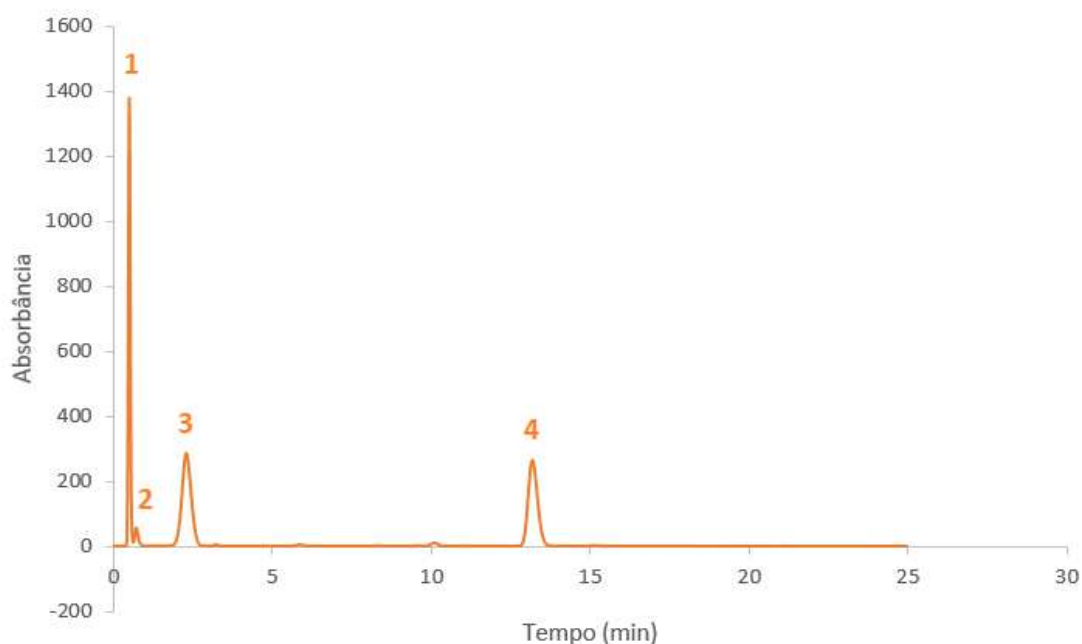
A composição III foi baseada na correção da polaridade da fase móvel da acetonitrila para o etanol, através da equação 13:

$$S_T = \sum_i S_i \phi_i, \quad (13)$$

no qual, S_T corresponde a força total do solvente de uma mistura; S_i são os fatores força peso dos solventes individuais e ϕ é a fração volumétrica do solvente. Em fase reversa, a força peso da acetonitrila é de 3,2, a do etanol é de 4,3 e da água é de 0; portanto, para que tenhamos a mesma força de eluição da mistura de acetonitrila e tampão fosfato de sódio 25:75, é necessária a proporção de 30:70 de etanol e tampão fosfato de sódio (LANÇAS, 2016).

Nas Figuras 7, 8, 9, 10 e 11 estão inseridos os cromatogramas obtidos no processo de otimização do método. Nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 estão apresentados os resultados dos parâmetros cromatográficos de cada cromatograma.

Figura 7 – Cromatograma da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹



Legenda: Pico 1: ácido maleico; Pico 2: enalaprilato; Pico 3: enalapril; Pico 4: dicetopiperazina. Condições cromatográficas: temperatura do forno da coluna: 50°C; volume de injeção de amostra: 20 µL e detecção UV a 215 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

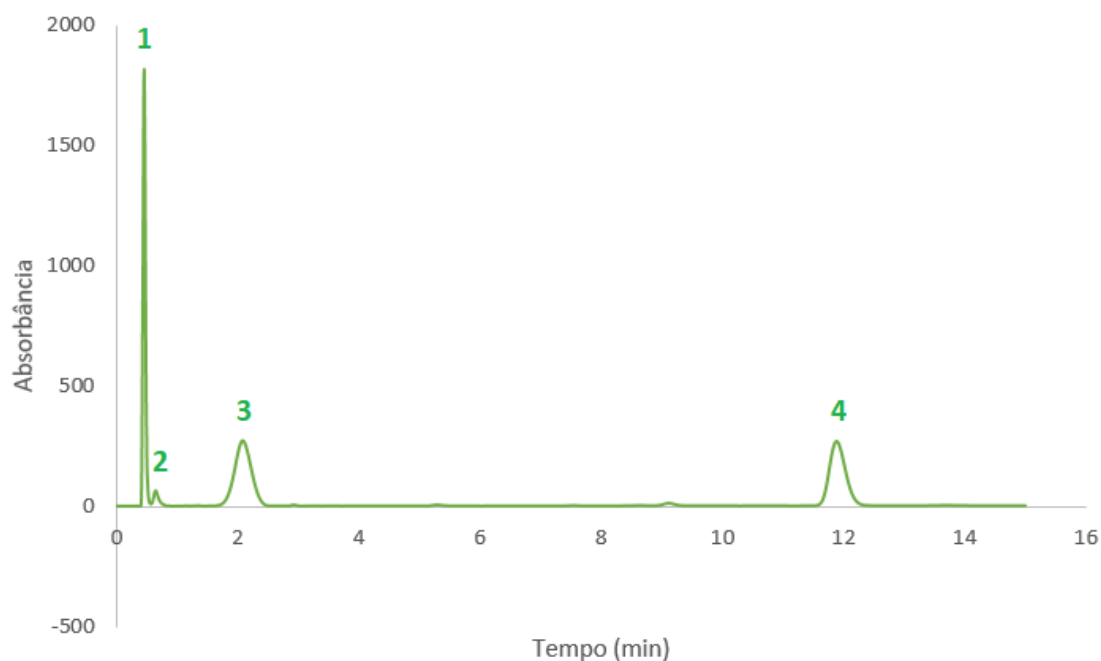
Tabela 1 – Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹

Analito	Área do pico	t _r (min)	k'	Nº de pratos/metro	Rs	FC
Ácido maleico	6067,06	0,513	0,03	3490		1,1
Enalaprilato	420,57	0,733	0,47	2500	1,5	1,4
Enalapril	5813,27	2,307	3,61	2940	4,3	1,1
Dicetopiperazina	5434,61	13,200	25,40	94440	6,7	1,2

Legenda: t_r: tempo de retenção; k': fator de retenção; Rs: resolução; FC: fator caudal.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 8 – Cromatograma da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 2,0 mL min⁻¹



Legenda: Pico 1: ácido maleico; Pico 2: enalaprilato; Pico 3: enalapril; Pico 4: dicetopiperazina. Condições cromatográficas: temperatura do forno da coluna: 50°C; volume de injeção de amostra: 20 µL e detecção UV a 215 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

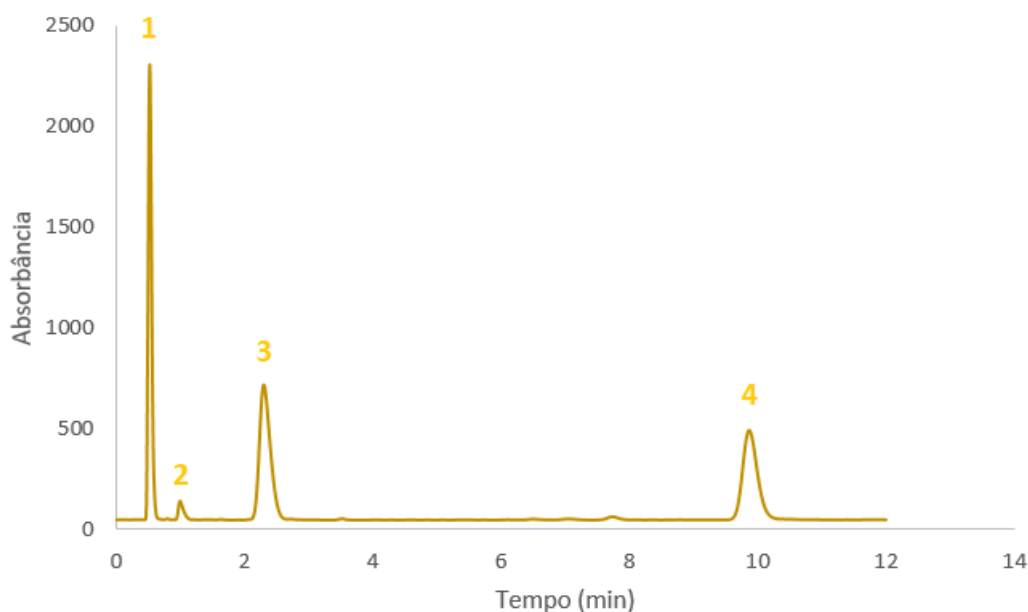
Tabela 2 – Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 2,0 mL min⁻¹

Analito	Área do pico	t _r (min)	k'	Nº de pratos/metro	Rs	FC
Ácido maleico	5461,83	0,467	0,00	5740		1,1
Enalaprilato	383,18	0,653	0,31	3440	1,7	1,5
Enalapril	5272,21	2,087	3,17	2640	4,4	1,0
Dicetopiperazina	4958,57	11,880	22,76	96120	6,6	1,2

Legenda: t_r: tempo de retenção; k': fator de retenção; Rs: resolução; FC: fator caudal.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 9 – Cromatograma da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹



Legenda: Pico 1: ácido maleico; Pico 2: enalaprilato; Pico 3: enalapril; Pico 4: dicetopiperazina. Condições cromatográficas: temperatura do forno da coluna: 50°C; volume de injeção de amostra: 20 µL e detecção UV a 215 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

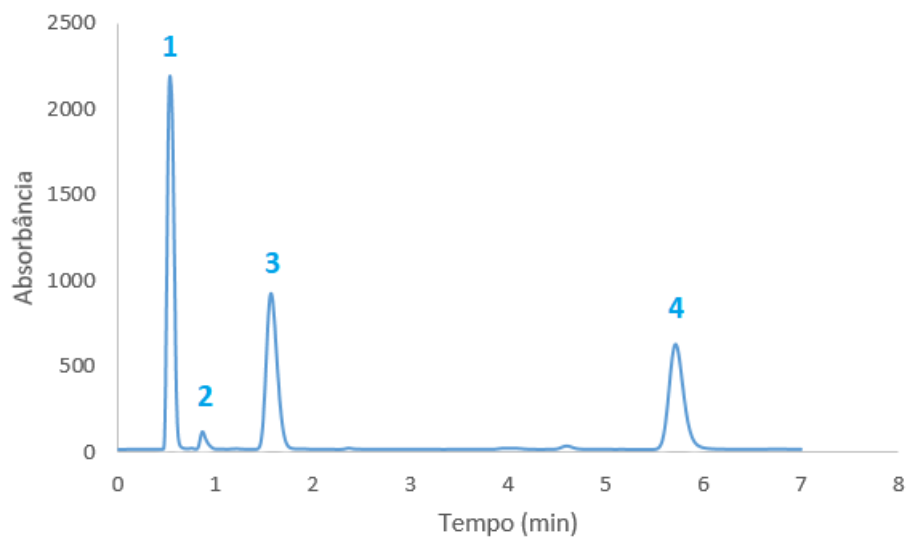
Tabela 3 – Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 25:75 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹

Analito	Área do pico	t _r (min)	k'	Nº de pratos/metro	Rs	FC
Ácido maleico	8707,00	0,533	0,07	5000		1,2
Enalaprilato	510,23	1,007	1,01	7740	3,9	1,6
Enalapril	7846,90	2,307	3,61	9010	5,8	1,3
Dicetopiperazina	7140,30	9,860	18,72	90610	5,8	1,2

Legenda: t_r: tempo de retenção; k': fator de retenção; Rs: resolução; FC: fator caudal.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 10 – Cromatograma da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹



Legenda: Pico 1: ácido maleico; Pico 2: enalaprilato; Pico 3: enalapril; Pico 4: dicetopiperazina.

Condições cromatográficas: temperatura do forno da coluna: 50°C; volume de injeção de amostra: 20 µL e detecção UV a 215 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

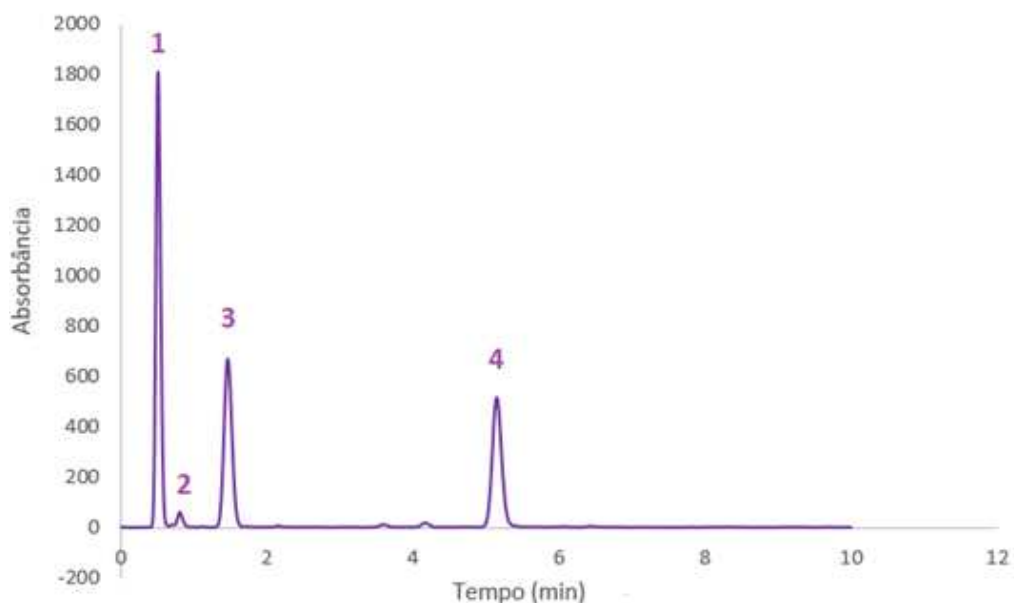
Tabela 4 – Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹

Analito	Área do pico	t _r (min)	k'	Nº de pratos/metro	Rs	FC
Ácido maleico	10315,80	0,533	0,07	3130		1,3
Enalaprilato	455,80	0,867	0,73	9480	2,9	1,5
Enalapril	7100,80	1,567	2,13	9380	4,4	1,2
Dicetopiperazina	6521,09	5,707	10,41	72350	4,6	1,2

Legenda: t_r: tempo de retenção; k': fator de retenção; Rs: resolução FC: fator caudal.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 11 – Cromatograma da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 2,0 mL min⁻¹



Legenda: Pico 1: ácido maleico; Pico 2: enalaprilato; Pico 3: enalapril; Pico 4: dicetopiperazina. Condições cromatográficas: temperatura do forno da coluna: 50°C; volume de injeção de amostra: 20 µL e detecção UV a 215 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 5 – Resultados cromatográficos da corrida analítica com fase móvel etanol e tampão fosfato pH 2,2 na proporção 30:70 e fluxo de 2,0 mL min⁻¹

Analito	Área do pico	t _r (min)	k'	Nº de pratos/metro	Rs	FC
Ácido maleico	8239,66	0,520	0,04	3040		1,1
Enalaprilato	352,55	0,813	0,63	6390	2,4	0,9
Enalapril	5116,54	1,473	1,95	8620	4,0	1,1
Dicetopiperazina	4691,84	5,147	9,29	79440	4,6	1,1

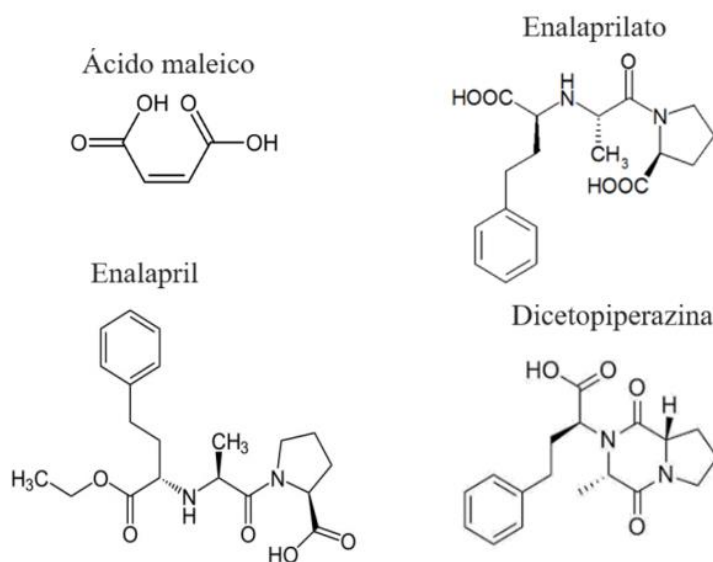
Legenda: t_r: tempo de retenção; k': fator de retenção; Rs: resolução; FC: fator caudal.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Como apresentado nos cromatogramas, a ordem de eluição dos analitos foi a seguinte: 1 - ácido maleico, 2 - enalaprilato, 3 - enalapril e 4 – dicetopiperazina. O processo de separação dos analitos é baseado na capacidade de interação com a fase estacionária e a fase móvel. Uma

vez que foi utilizado fase estacionária C18, compostos ionizados são menos retidos que compostos não ionizados neste tipo de fase e, conseqüentemente, eluem primeiro. Na Figura 12 temos as estruturas dos quatro analitos em questão.

Figura 12 – Estrutura química do ácido maleico, enalaprilato, enalapril e dicetopirazina de enalapril



Fonte: adaptado de Pereira (2007).

O ácido maleico, um ácido orgânico dicarboxílico, possui dois pK_a 's: 1,92 e 6,27. Desta forma, o grupamento carboxílico de pK_a 1,92 estará na forma ionizada em pH 2,2, fazendo com que o ácido maleico tenha muito pouca interação com a fase estacionária. O enalaprilato e o enalapril são os que possuem maior semelhança estrutural, com o pH da fase móvel tendo um papel fundamental na separação de ambos. O enalaprilato possui três grupos ionizáveis de pK_a 2,03, 4,03 e 7,29, enquanto o enalapril possui dois grupos ionizáveis de pK_a 3,74 e 5,15. Dessa forma, o grupamento carboxílico de pK_a 2,03 do enalaprilato estará na forma ionizada em pH 2,2, assim como o grupamento amino de pK_a 7,29. Em contrapartida, o enalapril estará na forma ionizada apenas no grupamento amino de pK_a 5,15, explicando, assim, o fato do enalapril apresentar maior retenção que o enalaprilato. Por último, a dicetopiperazina possui apenas um grupo carboxílico ionizável de pK_a 5,43, não apresentando grupo ionizável em pH 2,2. Com isso, é o analito que apresenta maior afinidade pela fase estacionária e, conseqüentemente, maior retenção (REMKO, 2007; ESTADOS UNIDOS, 2023).

Além disso, pode-se observar através dos cromatogramas (Figuras 7 a 11) e das Tabelas 1 a 5 que o fator de retenção do ácido maleico permaneceu praticamente inalterado em todas as

condições testadas, ao contrário do restante dos analitos. Isso porque não há interação do ácido maleico com a fase estacionária, uma vez que ele possui fator de retenção (k') de aproximadamente zero.

Comparando os resultados obtidos, a substituição da acetonitrila pelo etanol como componente orgânico na fase móvel acarretou em uma diminuição no t_r da dicetopiperazina, aumento no t_r do enalaprilato, enquanto o ácido maleico e o enalapril apresentaram t_r praticamente inalterados.

A simples substituição do solvente orgânico na fase móvel levou ao aumento da resolução do pico referente ao enalaprilato. O aumento da resolução do pico pode ser explicado pelo fato de, com a troca da acetonitrila para o etanol, a retenção do enalaprilato ter aumentado e a do ácido maleico permaneceu inalterada, fazendo com que a distância entre os dois picos aumentasse. Além disso, o método com o etanol apresentou picos mais intensos para todos os analitos, fazendo com que haja um ganho de sensibilidade no método.

Quando a proporção de etanol foi alterada de 25 para 30% v/v, pôde-se observar, com exceção do ácido maleico, uma diminuição no fator de retenção de todos os analitos, principalmente na dicetopiperazina (18,72 para 10,41). Este resultado deve-se ao fato de que o aumento na proporção de etanol potencializa a força de eluição da fase móvel, fazendo com que o tempo de retenção dos analitos diminua.

Na comparação dos métodos utilizando etanol na proporção de 30% v/v, com o aumento do fluxo de 1,8 para 2,0 mL min⁻¹ não obteve-se uma redução considerável nos tempos de retenção dos analitos, entretanto houve uma diminuição na resolução do enalaprilato. Somando-se a isso, o fluxo de eluição de 2,0 mL min⁻¹ acarretou no aumento da pressão do sistema cromatográfico, parâmetro que implica na diminuição da vida útil do equipamento. Com isso, o método utilizando etanol e tampão fosfato pH 2,2 30:70 e fluxo de 1,8 mL min⁻¹ foi o que apresentou os melhores parâmetros cromatográficos.

Na Tabela 6 estão relacionadas as composições e os fluxos de fase móvel dos cinco métodos de otimização, com os resultados de tempo de retenção do último analito e volume de solvente orgânico gasto até a eluição deste último analito. Como o objetivo do trabalho é aliar o tempo de corrida e os resultados de separação cromatográfica, com o menor impacto ambiental, traduzido neste momento em gasto de solvente orgânico, os métodos 4 e 5 são os que apresentaram melhores resultados. Uma vez que o método 4 foi o que obteve melhor resultado de separação dos analitos, este é o que seguirá para validação.

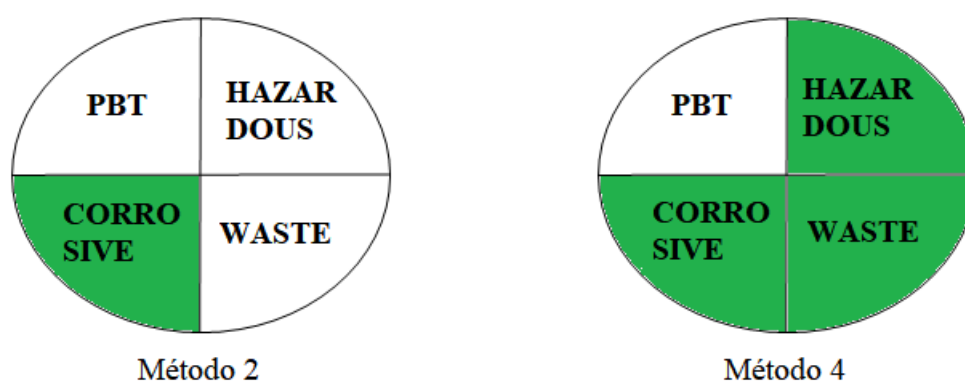
Tabela 6 – Relação da composição e do fluxo da fase móvel com o tempo de análise o gasto de solvente orgânico

Método	Composição da fase móvel	Fluxo da fase móvel (mL min ⁻¹)	t _r do último analito (min)	Volume gasto de solvente orgânico (mL)
1	ACN:tampão 25:75	1,8	13,2	5,94
2	ACN:tampão 25:75	2,0	11,88	5,94
3	EtOH:tampão 25:75	1,8	9,86	4,44
4	EtOH:tampão 30:70	1,8	5,707	3,08
5	EtOH:tampão 30:70	2,0	5,147	3,09

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Para analisar o impacto ambiental foram utilizadas três metodologias de comparação de métodos analíticos: a NEMI, a *Eco-Scale* e a GAPI. Na Figura 13 estão representados os pictogramas da metodologia NEMI para o Método 2 e o Método 4. O Método 2 foi o escolhido para comparação, pois é o que mais se aproxima do Farmacopeico.

Figura 13 – Pictogramas NEMI



Legenda: *PBT*: reagentes persistentes, bioacumulativos ou tóxicos; *Hazardous*: reagentes perigosos; *Corrosive*: reagentes com pH abaixo de 2 ou acima de 12; *Waste*: geração de mais de 50 mL de resíduo por análise.

Fonte: Kannaiah *et al.* (2021); Elaborada pelo autor (2023).

Comparando-se os dois métodos através da ferramenta NEMI, é possível afirmar que o Método 4 se adequa mais aos princípios da Química analítica verde que o Método 2, uma vez que apresenta três quadrantes verdes a um. No primeiro quadrante, ambos estão na cor branca devido ao ácido fosfórico ser considerado um solvente PBT de acordo com o *Toxic Release Inventory*. Em relação ao segundo quadrante, o Método 2 está na cor branca, pois a acetonitrila está na lista *Resource Conservation and Recovery Act* de resíduos perigosos na categoria U (resíduos perigosos de produtos químicos). Quanto ao terceiro quadrante, ambos estão verdes porque os reagentes utilizados nos métodos possuem pH entre 2 e 12. Por último, o quarto quadrante do Método 2 está branco por produzir mais de 50 mL de resíduo para cada análise (cerca de 180 mL).

Comparando-se os Métodos 2 e 4 através da metodologia *Eco-Scale* podemos observar que a diferença na pontuação dos métodos está na penalização dos resíduos. Isso porque apesar de o método 4 apresentar mais de 10 mL de resíduos gerados por amostra, estes podem ser reciclados por destilação. Em contrapartida, no método 2, o resíduo de acetonitrila gerado não é reaproveitável, sendo comumente descartado via incineração. Em relação aos reagentes, tanto a acetonitrila quanto o etanol apresentam no rótulo dois pictogramas de perigo, o que dá a eles uma pontuação de penalização 4. Ademais, para ambos são utilizados mais de 10 mL por amostra, e por isso o total de quatro é multiplicado por 2, dando pontuação 8. Já o ácido fosfórico apresenta um pictograma de perigo em seu rótulo e é utilizado menos de 10 mL por amostra, totalizando pontuação de penalização 2. No que diz respeito à instrumentação, ambos receberam pontuação 1, pois o método por HPLC gasta uma quantidade de energia $\leq 1,5$ kWh. Por fim, quando se avalia o perigo ocupacional, não houve penalização porque no processo analítico não ocorre a liberação de substâncias tóxicas ou a emissão de gases para a atmosfera.

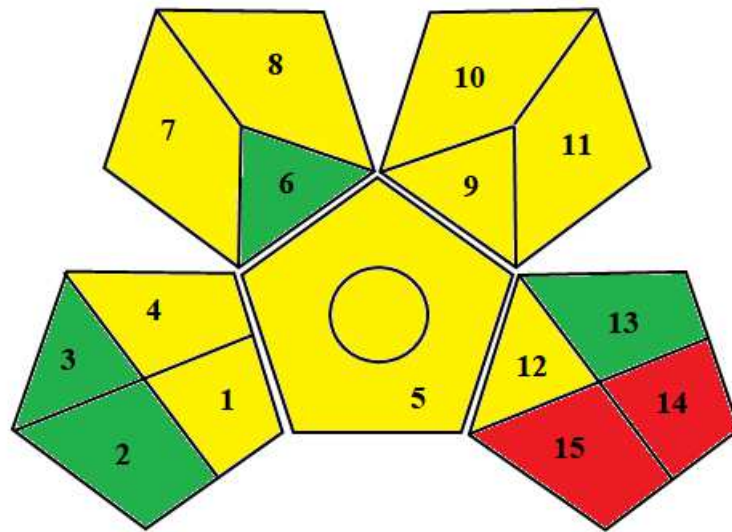
Tabela 7 – Comparativo dos Métodos 2 e 4 pela *Eco-Scale*

Categorias	Método 2	Penalização	Método 4	Penalização
Reagentes	Acetonitrila	8	Etanol	8
	Ácido Fosfórico	2	Ácido Fosfórico	2
	Fosfato de sódio	0	Fosfato de sódio	0
Instrumentação	HPLC	1	HPLC	1
Perigo ocupacional	—	0	—	0
Resíduos	> 50 mL	5	Reciclável	0
Total de pontos penalizados	—	16	—	11
Pontuação <i>Eco-Scale</i>	84	—	89	—

Fonte: Van Aken, Strekowski e Patiny (2006); Elaborada pelo autor (2023).

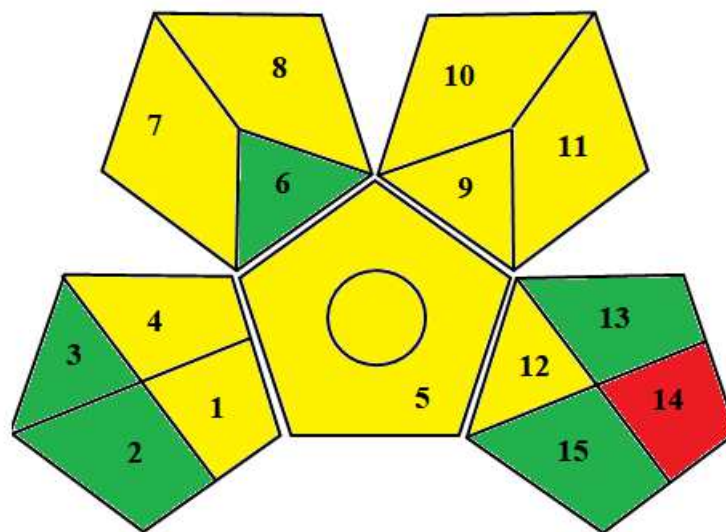
As Figuras 14 e 15 mostram os pictogramas dos Métodos 2 e 4, respectivamente, utilizando a ferramenta GAPI. Assim como na *Eco Scale*, nesta ferramenta a etapa que diferenciou os dois métodos foi a de reagentes e solventes. O quadrante 15 do GAPI diz respeito à forma como são tratados os resíduos gerados durante o processo analítico. Considerando que o principal resíduo gerado nos Métodos 2 e 4 são provenientes da fase móvel, o Método 4 utiliza etanol, que é reciclável, enquanto o Método 2 utiliza acetonitrila, solvente não reciclável. Neste sentido, o Método 2 foi classificado como vermelho e o Método 4 como verde para a etapa 15, fazendo com que o segundo método seja considerado mais adequado de acordo com os princípios da QAV.

Figura 14 – Pictograma GAPI para o Método 2



Fonte: Płotka-Wasyłka (2018); Elaborada pelo autor (2023).

Figura 15 – Pictograma GAPI para o Método 4



Fonte: Płotka-Wasyłka (2018); Elaborada pelo autor (2023).

Quadro 5 – Subcategorias de avaliação da ferramenta GAPI

Subcategoria	
Preparo da amostra	1 Coleta
	2 Preservação
	3 Transporte
	4 Armazenamento
	5 Tipo de método: direto ou indireto
	6 Escala da extração
	7 Solventes e reagentes utilizados
	8 Tratamentos adicionais
Reagentes e solventes	9 Quantidade de reagentes e solventes
	10 Perigo à saúde
	11 Riscos à segurança
Instrumentação	12 Gasto de energia
	13 Perigo ocupacional
	14 Quantidade de resíduos
	15 Tratamento de resíduos

Fonte: Plotka-Wasyłka (2018)

Após a análise dos resultados apresentados pelas três ferramentas, é possível afirmar que o Método 4 gera menos impacto ambiental quando comparado ao Método 2, pois o solvente orgânico utilizado é menos perigoso, gasta-se menor quantidade de solvente, gera-se menos resíduo, sendo que este pode ser reciclável ao final do processo. Desta forma, pode-se afirmar que a substituição da acetonitrila pelo etanol trouxe benefícios à metodologia, fazendo com que ela se torne mais segura para o analista e sustentável ao meio ambiente.

Na Tabela 8 está apresentado um comparativo das condições cromatográficas do método presente na Farmacopeia Brasileira, que é o mesmo do presente na USP e na BP, com o método proposto neste trabalho. Dentre as alterações realizadas, a diminuição no comprimento da coluna e a modificação na composição da fase móvel foram as que realmente contribuíram para a redução do tempo de análise. Isso deve-se ao fato de que quanto menor o comprimento da coluna, menor será o trajeto que o analito irá percorrer até ser detectado e menor será o tempo de interação entre o analito e a fase estacionária. Em relação à fase móvel, o etanol apresentou melhor capacidade de eluição dos analitos que a acetonitrila. Vale ressaltar que, tanto a

diminuição do comprimento da coluna quanto a modificação do solvente orgânico da fase móvel não trouxeram prejuízos à separação dos analitos.

Tabela 8 – Comparativo do método farmacopeico com o método otimizado

Parâmetros	Método Farmacopeico	Método otimizado
Coluna cromatográfica	Octilsilano (C8) 250 x 4,6 mm; 5 μ m	Octadecilsilano (C18) 100 x 4,6 mm; 3,5 μ m
Temperatura da coluna	50°C	50°C
Composição da fase móvel	Acetonitrila + tampão fosfato pH 2,2 25:75	Etanol + tampão fosfato pH 2,2 30:70
Fluxo da fase móvel	2,0 mL min ⁻¹	1,8 mL min ⁻¹
Volume de injeção de amostra	50 μ L	20 μ L
Detecção	UV 215 nm	UV 215 nm

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Com o objetivo de reproduzir o ensaio de teor e impurezas em comprimidos de enalapril, Logoyda *et al.* (2017) validaram um método de quantificação simultânea utilizando HPLC. Neste método, eles usaram uma coluna C8 de 250 mm de comprimento, acetonitrila e tampão fosfato pH 2,2 25:75 como fase móvel e fluxo de 2.0 mL min⁻¹, ou seja, as mesmas condições cromatográficas que as especificadas no método farmacopeico. Comparando-se os resultados, houve uma redução de 2,4 minutos no tempo de retenção do último analito no método proposto neste trabalho para o desenvolvido no artigo citado anteriormente. Isso significa uma redução do tempo de análise a partir das modificações realizadas, como utilização de uma coluna de menor comprimento e alteração da acetonitrila para o etanol na fase móvel.

Al-Omari *et al.* (2021) estudaram o efeito de matriz na estabilidade de comprimidos de enalapril. Para este estudo, eles utilizaram o método presente na USP para quantificação de teor e impurezas. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de potássio 0,001M pH 2 e acetonitrila na proporção 17:8 e fluxo de 1,5 mL min⁻¹ e a coluna foi uma Lichrosphere C8 de 250 mm x 4,6 mm; 5 μ m. Nessas condições, obtiveram, aproximadamente, os seguintes tempos de retenção: 3 minutos para o enalaprilato, 9 minutos para o enalapril e 11 minutos para a dicetoperazina. Comparando-se os resultados com os obtidos neste trabalho, é possível observar

novamente que a alteração na coluna cromatográfica e na composição da fase móvel acarretou na diminuição da retenção dos analitos, fazendo com que o tempo da análise seja menor.

Alguns métodos alternativos de quantificação de teor e impurezas de enalapril por HPLC podem ser encontrados na literatura. No trabalho de Bouabdallah *et al.* (2017), foi utilizada uma coluna Supelco C18 250 mm x 4,6 mm; 5 μ m e uma mistura de tampão fosfato pH 2, metanol, THF e trietanolamina na proporção de 66:25:9:0,1 v/v como fase móvel em um fluxo de 1,0 mL min⁻¹. Nessas condições, o tempo de retenção da dicetopiperazina foi de aproximadamente 20 minutos, resultando em um tempo de corrida de quase quatro vezes maior do que a obtida na Figura 9.

No trabalho de Mohan *et al.* (2011), também foi utilizada uma coluna C18 de 250 mm de comprimento, porém a fase móvel é constituída tampão fosfato de potássio pH 2,0 e acetonitrila 40:60 e fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Neste caso, o tempo de corrida foi de 25 minutos. A partir desses resultados, é possível observar que a utilização da coluna C18 de 250 mm de comprimento para análise de teor e impurezas de enalapril aumenta consideravelmente o tempo de corrida, uma vez que a fase estacionária C18 retém mais os compostos orgânicos não ionizados e quanto maior o comprimento da coluna, maior será o tempo de retenção dos analitos.

5.2 DOSEAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DAS IMPUREZAS EM COMPRIMIDOS DE MALEATO DE ENALAPRIL

Foi realizado o doseamento e a quantificação de impurezas em comprimidos genéricos de maleato de enalapril nas concentrações de 5 e 10 mg. Os resultados de teor e impurezas em porcentagem por comprimido estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, juntamente com o desvio padrão relativo (DPR) de cada análise. Segundo a Farmacopeia Brasileira 6^a edição, a especificação para o ensaio de teor em comprimidos de maleato de enalapril é de no mínimo 90,0 e no máximo 110,0% da quantidade declarada do ativo. Com isso, em ambas as concentrações as amostras foram aprovadas no teste de teor, com média de 96,2% para os comprimidos de 5 mg e 97,4% para os comprimidos de 10 mg. Em contrapartida, nas duas concentrações as amostras foram reprovadas no ensaio de quantificação de impurezas, teste em que as médias foram de 7,8 e 5,3% para comprimidos de 5 e 10 mg, respectivamente. Para este ensaio, a Farmacopeia Brasileira 6^a edição determina que seja no máximo 5,0% de impurezas totais.

Em relação a precisão do método, é possível observar que os DPR's das análises de teor estão abaixo de 2,7%, conforme os critérios sugeridos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para analitos na ordem de 10 a 99 mg. Para análise de quantificação de impurezas, a AOAC sugere que o desvio padrão relativo não ultrapasse 11%, quando os analitos estiverem na ordem de 1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Portanto, em ambas concentrações, o método se mostrou preciso para quantificar o teor e as impurezas presentes na amostra. (AOAC, 2016).

Tabela 9 – Ensaio de doseamento e substâncias relacionadas em comprimidos de enalapril 5 mg

Amostra	Doseamento de enalapril (% por comprimido)	Doseamento de enalapril (mg por comprimido)	Quantificação de impurezas (% por comprimido)
1	95,88	4,79	7,99
2	95,89	4,79	7,59
3	96,86	4,84	7,76
Média	96,21	4,81	7,78
DPR (%)	0,59	0,59	2,57

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 10 – Ensaio de doseamento e substâncias relacionadas em comprimidos de enalapril 10 mg

Amostra	Doseamento de enalapril (% por comprimido)	Doseamento de enalapril (mg por comprimido)	Quantificação de impurezas (% por comprimido)
1	97,31	9,73	4,69
2	96,82	9,68	5,25
3	97,97	9,80	5,84
Média	97,37	9,74	5,26
DPR (%)	0,59	0,59	10,92

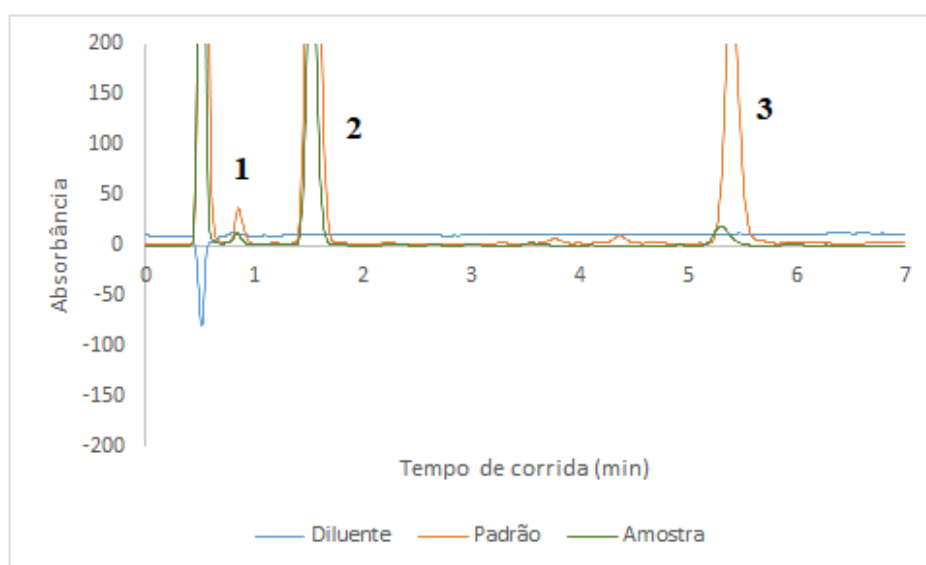
Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

5.3 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

5.3.1 Seletividade

Primeiramente, a seletividade do método foi avaliada através da sobreposição dos cromatogramas da solução diluente, solução resolução, que é composta pela mistura dos padrões de enalapril, enalaprilato e dicetopiperazina, e solução amostra. Como podemos observar na Figura 16 e na Tabela 11, os picos dos três analitos no cromatograma da amostra se sobrepuseram aos do padrão, possuindo tempos de retenção semelhantes. Isso indica que os mesmos analitos presentes na solução padrão também estão presentes na amostra. Ademais, foi demonstrado que no cromatograma da solução diluente não houve nenhum sinal analítico e, portanto, não há interferência nos sinais do padrão e da amostra.

Figura 16 – Sobreposição dos cromatogramas da solução diluente, mistura de padrões e amostra



Legenda: Pico 1: enalaprilato; Pico 2: enalapril; Pico 3: dicetopiperazina.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 11 – Tempos de retenção dos analitos no padrão e na amostra

Analito	t_r – Padrão (min)	t_r – Amostra (min)
Enalaprilato	0,847	0,860
Enalapril	1,533	1,540
Dicetopiperazina de enalapril	5,307	5,400

Legenda: t_r : tempo de retenção.

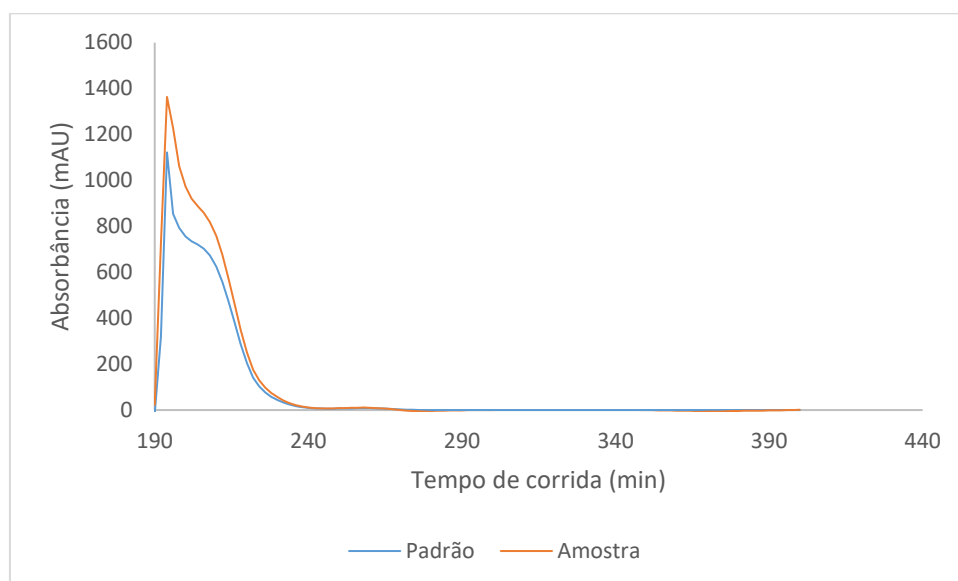
Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Em metodologias por HPLC, além da comparação dos tempos de retenção, a seletividade pode ser estudada através da pureza cromatográfica dos picos, no qual o objetivo é demonstrar que não houve co-eluição de dois analitos diferentes em um mesmo pico. Para isso, foi realizada corridas cromatográficas dos padrões e da amostra e comparado o espectro de absorção UV do enalapril, enalaprilato e da dicetopiperazina.

5.3.1.1 Enalapril

Para avaliação da seletividade do enalapril, foram exportados os espectros de absorção UV do pico referente ao enalapril no cromatograma do padrão de enalapril e da amostra. Na Figura 17 está a sobreposição dos espectros de absorção extraídos do ápice do pico de enalapril presente nas soluções amostra e padrão. Desta forma, pode-se observar a semelhança dos espectros UV, confirmando que o sinal analítico é proveniente do enalapril.

Figura 17 – Espectro de absorção UV do enalapril na solução padrão sobreposto na solução amostra

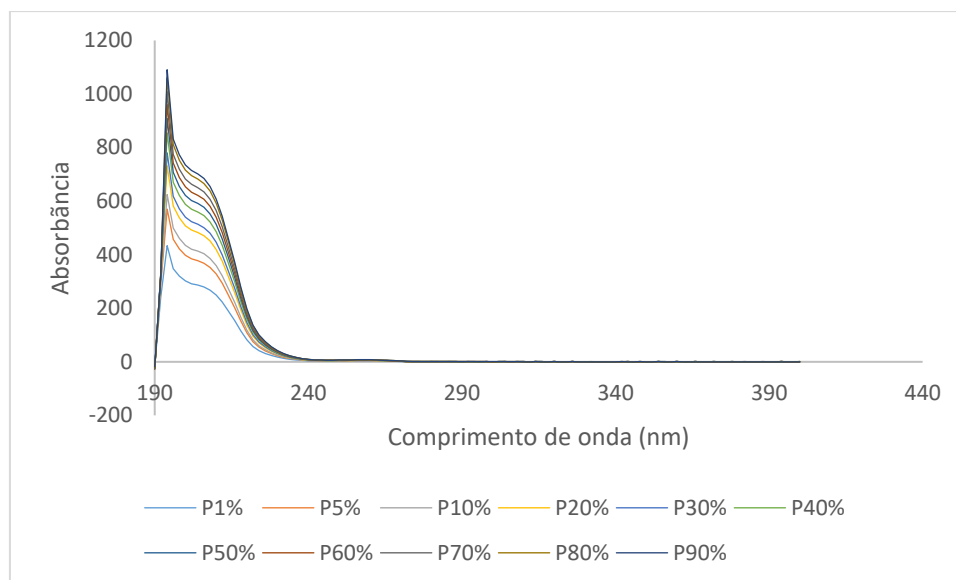


Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Além disso, foram exportados espectros UV de varredura de diferentes porções dos picos cromatográficos, abrangendo a média das absorbâncias em porções que variaram de 1 a 90% da altura do pico. Nas Figuras 18 e 19 estão representados os espectros do enalapril no padrão e na amostra, respectivamente. Com isso, foi possível avaliar que não houve variação do espectro UV nas diferentes frações do pico.

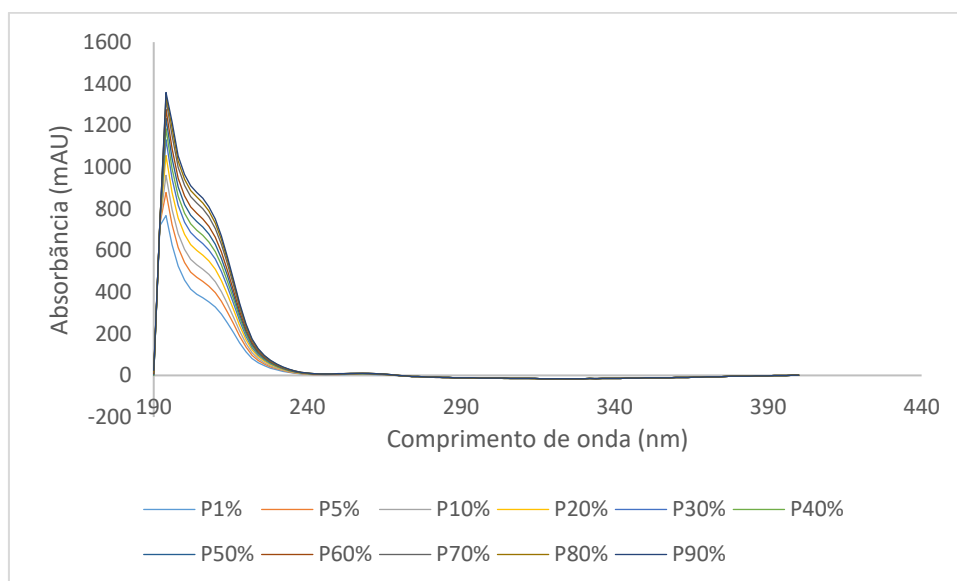
A Tabela 12 traz os resultados de pureza de pico do enalapril nas soluções padrão e amostra. Foram obtidos valores de fator de correlação dos espectros acima de 990, indicando homogeneidade espectral. Neste sentido, os resultados dos espectros UV e das purezas de pico sugerem ausência de co-eluição de outras substâncias junto com o enalapril.

Figura 18 – Espectros de absorção UV do enalapril na solução padrão



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 19 – Espectros de absorção UV do enalapril na solução amostra



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 12 – Resultados de seletividade para o enalapril

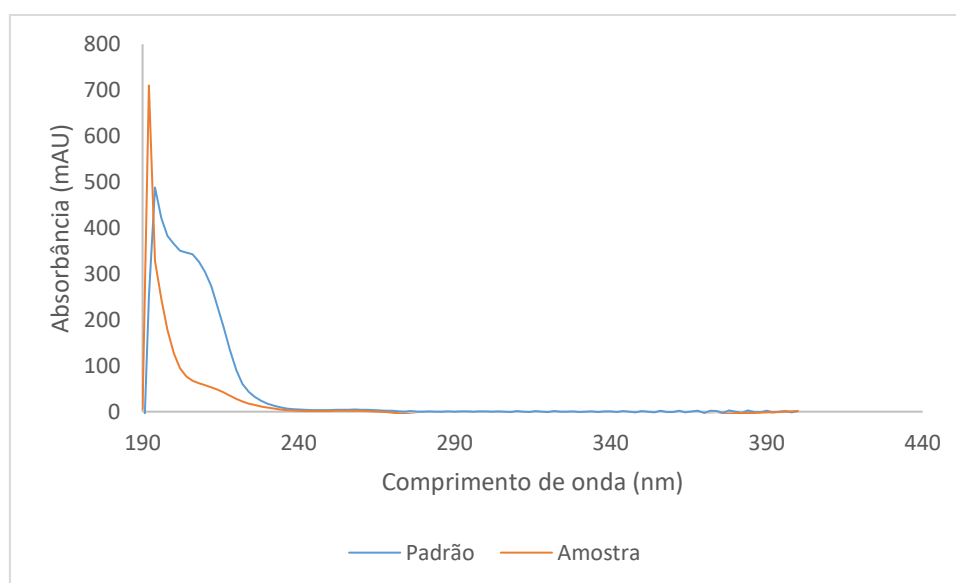
	Fator de correlação espectral
Pureza de pico do enalapril na solução padrão	999,8
Pureza de pico do enalapril na solução amostra	999,2

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

5.3.1.2 Enalaprilato

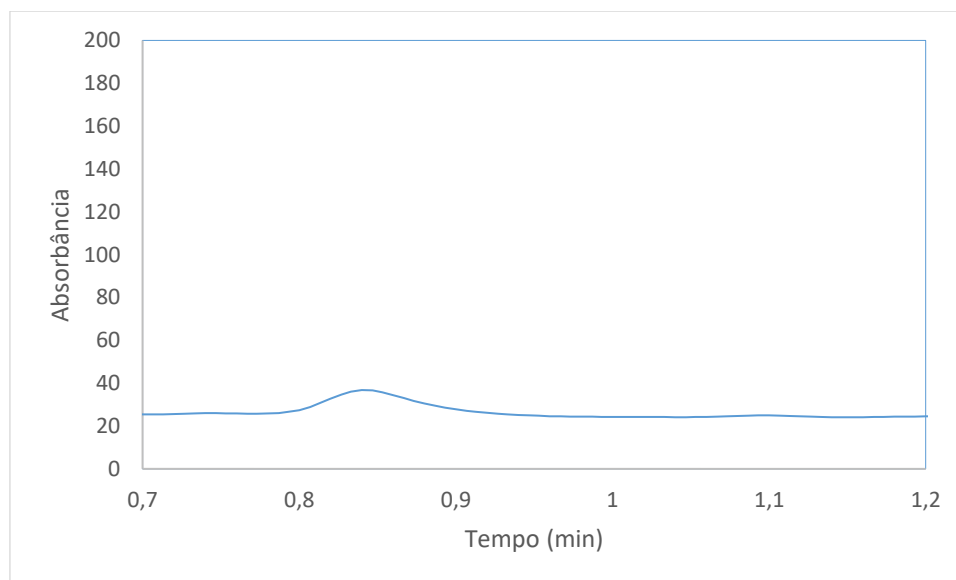
Para avaliação da seletividade do enalaprilato, primeiramente, foi sobreposto os espectros de absorção UV do pico do analito proveniente dos cromatogramas das soluções padrão de enalaprilato e amostra. Na Figura 20, podemos observar que, apesar do comprimento de onda máximo de absorção serem semelhantes, os espectros do padrão e da amostra se diferem. Isso pode ser explicado pelo baixo nível de concentração do enalaprilato presente na amostra. A fim de confirmar que o pico com tempo de retenção de 0,860 minutos presente no cromatograma da amostra é correspondente ao enalaprilato, adicionou-se à amostra, solução padrão de enalaprilato. Como exposto nas Figuras 21 e 22, houve um aumento na absorção UV do pico referente ao enalaprilato na amostra fortificada, indicando que o pico na solução amostra é referente ao enalaprilato.

Figura 20 – Espectro de absorção UV do enalaprilato na solução padrão sobreposto na solução amostra



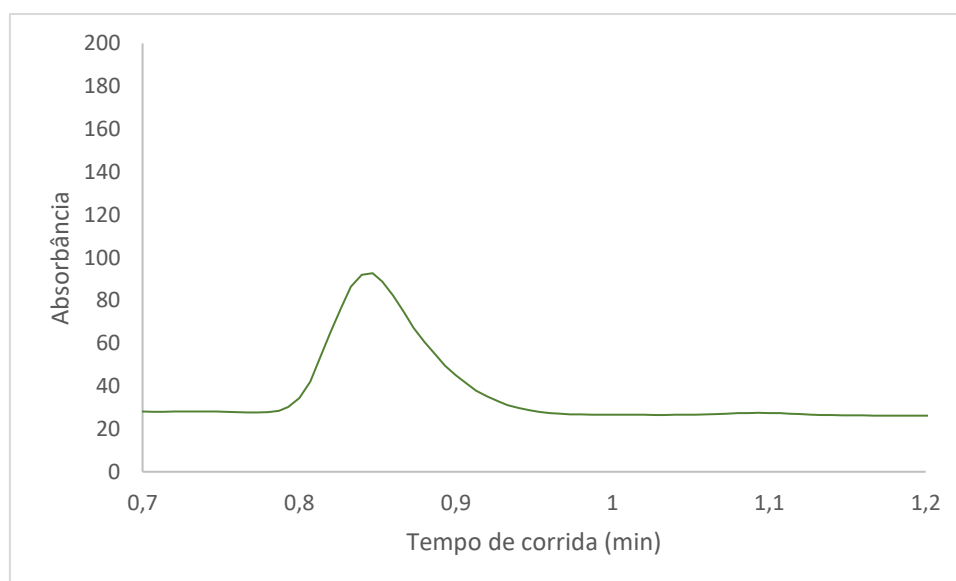
Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 21 – Sinal analítico do enalaprilato na solução amostra



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 22 – Sinal analítico do enalaprilato na solução amostra fortificada com padrão de enalaprilato

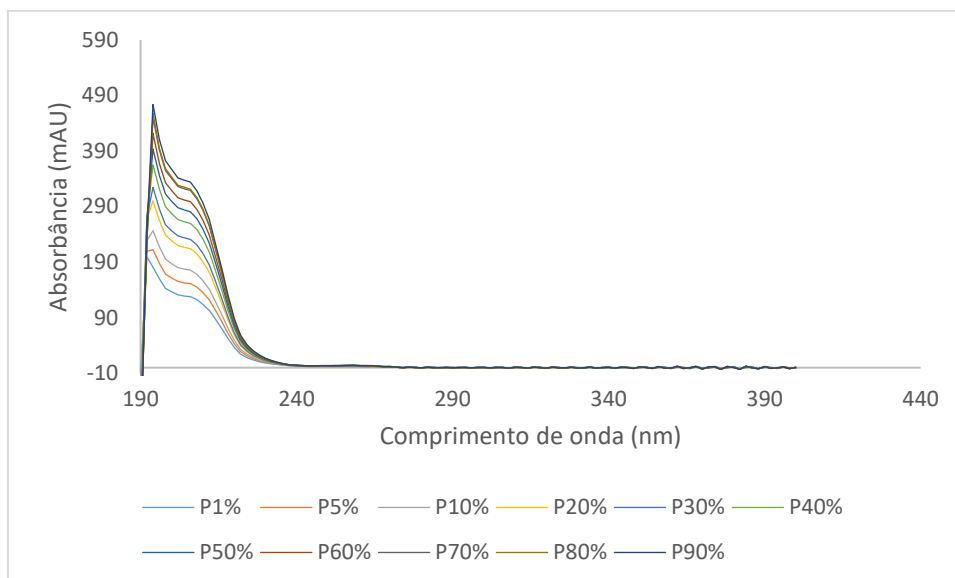


Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Para avaliação da pureza cromatográfica e, conseqüentemente, ausência de substâncias co-eluído juntamente com o enalaprilato, foram exportados espectros UV de diferentes porções do pico e calculada a pureza cromatográfica. Dessa forma, as Figuras 23 e 24 e a Tabela 13 mostram que não houve variação espectral nas diferentes frações dos picos e pureza de pico

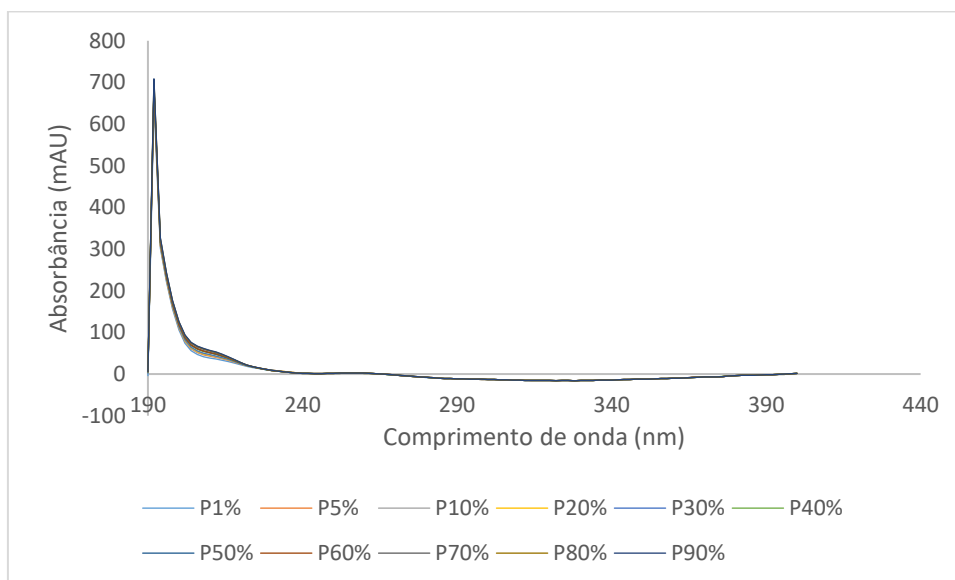
satisfatória, com resultados de fator de correlação espectral acima de 990, valor mínimo para que um pico seja considerado puro.

Figura 23 – Espectro de absorção UV do enalaprilato na solução padrão



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 24 – Espectro de absorção UV do enalaprilato na solução amostra



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 13 – Resultados de seletividade para o enalaprilato

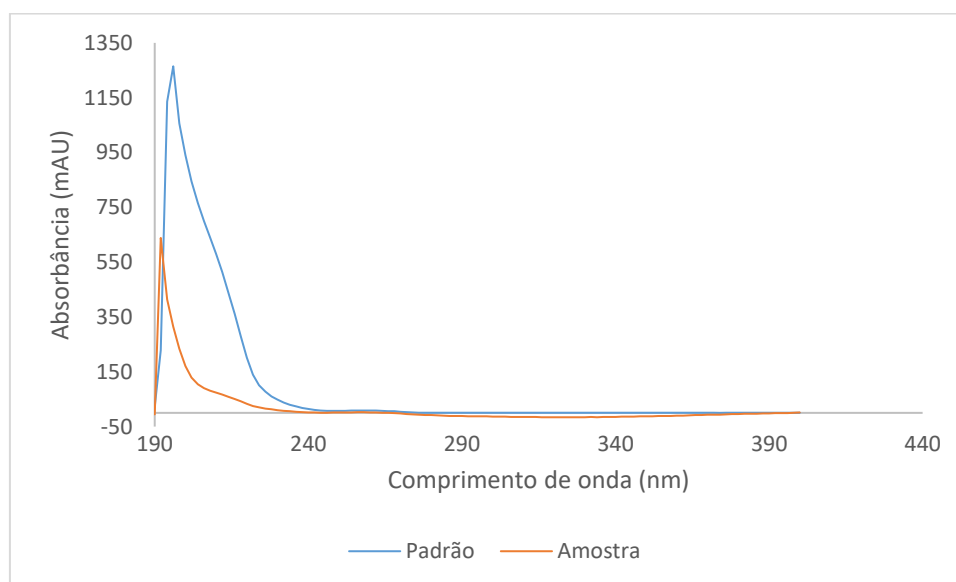
	Fator de correlação espectral
Pureza de pico do enalaprilato na solução padrão	999,2
Pureza de pico do enalaprilato na solução amostra	999,8

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

5.3.1.3 Dicetopiperazina

Para análise da seletividade da dicetopiperazina, foram sobrepostos os espectros UV oriundos do pico do analito nas soluções padrão de dicetopiperazina e amostra. A partir da Figura 25, pode-se observar a semelhança dos espectros de absorção. Uma vez que a concentração do analito na solução padrão é superior que na amostra, os valores de absorbância na amostra são inferiores. Apesar disso, é possível afirmar que o sinal analítico de tempo de retenção de 5,400 minutos vindo do cromatograma da amostra é proveniente da dicetopiperazina.

Figura 25 – Espectro de absorção UV da dicetopiperazina na solução padrão sobreposto na solução amostra

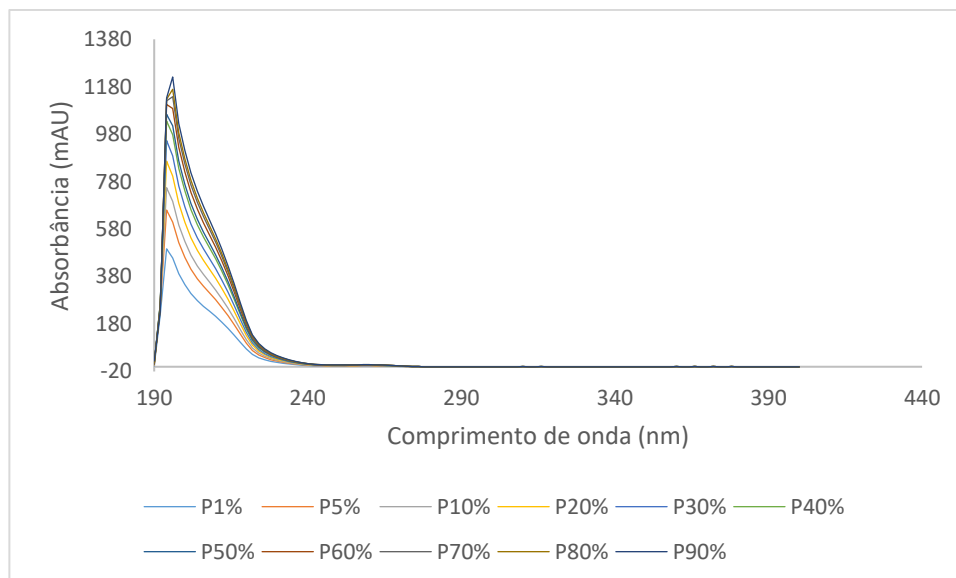


Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

A pureza cromatográfica da dicetopiperazina foi avaliada seguindo a mesma metodologia que a utilizada para os outros analitos. As Figuras 26 e 27 mostram que não houve variação espectral nas diferentes frações do pico no padrão e na amostra, respectivamente. A

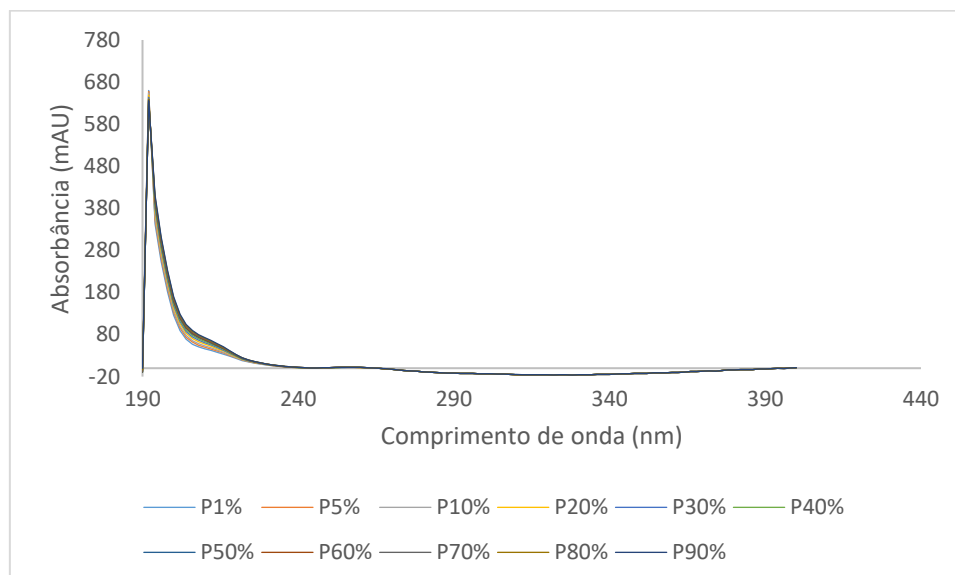
Tabela 14 traz os resultados de fator de correlação dos espectros do padrão e da amostra, nos quais foram obtidos valores acima de 990. Desta maneira, os resultados sugerem ausência de co-eluição.

Figura 26 – Espectro de absorção UV da dicetopiperazina na solução padrão



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Figura 27 – Espectro de absorção UV da dicetopiperazina na solução amostra



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 14 – Resultados de seletividade para a dicetopiperazina

	Fator de correlação espectral
Pureza de pico da dicetopiperazina na solução padrão	999,6
Pureza de pico da dicetopiperazina na solução amostra	999,6

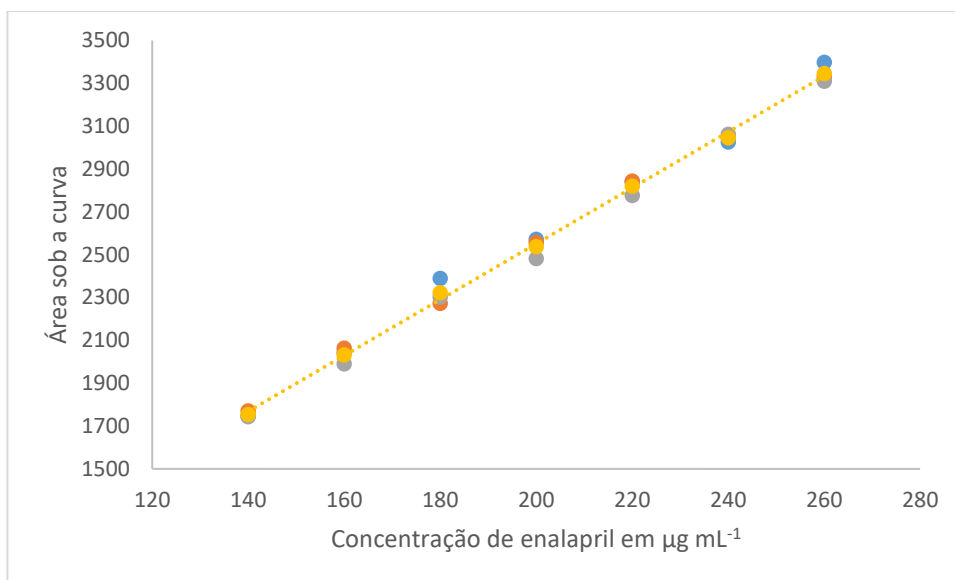
Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

5.3.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade do método foi obtida através da construção de uma curva analítica – Figura 28 – utilizando a solução padrão de enalapril em sete níveis de concentração e em triplicata a cada nível. A faixa de trabalho variou de 120 a 260 $\mu\text{g mL}^{-1}$, somando 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por nível. As equações das curvas e os coeficientes de correlação foram calculados através do método dos mínimos quadrados e estão dispostos na Tabela 15. Considerando que para linearidade o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990, o método proposto está de acordo com o especificado.

Em seguida, foram realizados os testes estatísticos de significância, falta de ajuste e homocedasticidade para comprovação da linearidade. Para análise de variância: a significância foi comprovada com o $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}(1,19)}$ e foi constatado que não houve falta de ajuste com o $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}(5,14)}$. Ademais, foi comprovada a homocedasticidade dos dados através do teste de Cochran, no qual o $C_{\text{calc}} < C_{\text{crítico}(3,7)}$. Com isso, o método foi aprovado em todos os critérios de linearidade especificados na RDC N° 166/17.

Figura 28 – Linearidade para o padrão de enalapril



Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 15 – Resultados do teste de linearidade para o enalapril

Analito	Equações de regressão	Coefficiente de correlação (r ²)
Enalapril	$y = 13,161x - 58,536$	0,9926
	$y = 12,897x - 24,197$	0,9985
	$y = 13,068x - 89,634$	0,9980
média: $y = 13,042 \pm 0,073 - 57,456 \pm 17,953$		

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 16 – Testes estatísticos

Teste de significância da regressão	F tabelado (1,19)	F calculado
	4,38	189,16
Falta de ajuste	F tabelado (5,14)	F calculado
	2,96	0,87
Homocedasticidade	C crítico (3,7)	C calculado
	0,561	0,321

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

5.3.3 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do enalaprilato e da dicetopiperazina foram obtidos através dos componentes da curva analítica, utilizando as fórmulas descritas no item 4.2.4.2. Na Tabela 17, estão representadas as equações de regressão com seus respectivos coeficientes de correlação.

Tabela 17 – Linearidade do enalaprilato e da dicetopiperazina

Analito	Equações de regressão	Coefficiente de correlação (r^2)
Enalaprilato	$y = 20,966x + 5,544$	0,940
	$y = 20,174x + 7,850$	0,941
	$y = 21,478x + 4,940$	0,948
Dicetopiperazina de enalapril	$y = 110,480x - 170,570$	0,980
	$y = 103,140x - 116,240$	0,984
	$y = 99,643x - 83,572$	0,986

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Para o enalaprilato, o LD foi de $0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o LQ de $0,74 \mu\text{g mL}^{-1}$. O LD e o LQ para a dicetopiperazina foi de 1,39 e $4,21 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Considerando que a concentração de trabalho de enalapril utilizada na solução padrão é de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, o limite de quantificação do enalaprilato e da dicetopiperazina é de 0,37 e 2,10%, respectivamente, em relação a concentração teórica de enalapril no padrão.

Tabela 18 – Resultados de limite de detecção e quantificação

Analito	Limite de Detecção ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Enalaprilato	0,24	0,74
Dicetopiperazina de enalapril	1,39	4,21

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

5.3.4 Precisão

Primeiramente, foram avaliadas as variações nos tempos de retenção dos analitos. A Tabela 19 expõe os desvios padrão relativos dos tempos de retenção do enalapril, enalaprilato

e dicetopiperazina referentes aos ensaios de precisão. Pode-se observar que não houve grandes variações, máximo de 0,43%, indicando que o método analítico é pouco susceptível a alterações nos tempos de retenção.

Tabela 19 – Desvio Padrão dos Tempos de Retenção nos ensaios de precisão

Ensaio	Desvio Padrão Relativo do t_r (%)		
	Enalapril	Enalaprilato	Dicetopiperazina
Repetibilidade – comprimidos 5mg	0,00	0,00	0,17
Repetibilidade – comprimidos 10mg	0,32	0,43	0,19
Precisão intermediária	0,20	0,43	0,33
Reprodutibilidade	0,14	0,09	0,10

Legenda: t_r : tempo de retenção.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Em seguida, as Tabelas 20, 21 e 22 apresentam as concentrações calculadas para cada analito separadamente. Para os testes de repetibilidade e precisão intermediária as especificações de limite de desvio padrão relativo seguem as mesmas que às explanadas no item 5.2 “Doseamento e Quantificação de impurezas em comprimidos de enalapril”, sendo 2,7% para o princípio ativo e de 11% para as impurezas. Em relação a reprodutibilidade, as especificações sugeridas pela AOAC são de desvio máximo de 4% para o princípio ativo, pois este está na ordem de 1% em relação à matriz e de desvio máximo de 16% para as impurezas, pois elas estão na ordem de 1 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de comprimido.

Neste caso, todos os desvios apresentados estão abaixo do especificado pela AOAC, indicando que os resultados dos ensaios possuem variações dentro do limite máximo especificado. Com isso, o método apresentou desempenho favorável na quantificação do ativo e de suas impurezas para os três ensaios de precisão.

Tabela 20 – Resultados de precisão para o enalapril

Ensaio		Conc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Especificação – DPR (%)
Repetibilidade – comprimidos 5mg	A1	175,82	177,60	0,89	$\leq 2,7$
	A2	178,53			
	A3	176,76			
	A4	179,29			
Repetibilidade – comprimidos 10mg	A1	161,60	163,35	1,35	$\leq 2,7$
	A2	162,94			
	A3	164,69			
	A4	164,15			
Precisão intermediária	A1	163,62	165,08	0,67	$\leq 2,7$
	A2	165,88			
	A3	165,75			
	A4	165,06			
Reprodutibilidade	A1	156,06	152,85	2,57	≤ 4
	A2	156,01			
	A3	151,32			
	A4	148,00			

Legenda: A1-A4: replicatas; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 21 – Resultados de precisão para o enalaprilato

Ensaio		Conc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Especificação – DPR (%)
Repetibilidade – comprimidos 5mg	A1	8,28	8,45	2,04	≤ 11
	A2	8,69			
	A3	8,40			
	A4	8,42			
Repetibilidade – comprimidos 10mg	A1	6,21	6,26	5,80	≤ 11
	A2	6,28			
	A3	6,10			
	A4	5,95			
Precisão intermediária	A1	5,47	5,77	10,51	≤ 11
	A2	5,07			
	A3	6,36			
	A4	6,19			
Reprodutibilidade	A1	4,78	5,10	6,34	≤ 16
	A2	4,94			
	A3	5,16			
	A4	5,53			

Legenda: A1-A4: replicatas; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 22 – Resultados de precisão para a dicetopiperazina

Ensaio		Conc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Especificação – DPR (%)
Repetibilidade – comprimidos 5mg	A1	8,32	8,68	3,54	≤ 11
	A2	8,55			
	A3	9,03			
	A4	8,81			
Repetibilidade – comprimidos 10mg	A1	16,20	16,56	2,41	≤ 11
	A2	16,39			
	A3	16,53			
	A4	17,13			
Precisão intermediária	A1	16,65	17,37	3,75	≤ 11
	A2	17,83			
	A3	18,01			
	A4	17,00			
Reprodutibilidade	A1	12,66	12,86	9,30	≤ 16
	A2	14,57			
	A3	12,40			
	A4	11,81			

Legenda: A1-A4: replicatas; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Após o cálculo dos desvios, foram comparadas as médias dos resultados dos testes de precisão intermediária e reprodutibilidade com o resultado de repetibilidade, através do teste *t* de *Student*. Na Tabela 23 estão dispostos os resultados para a precisão intermediária, nos quais pode-se observar que os valores de *t* calculado de todos os analitos são menores que o valor de *t* tabelado a 95% de confiança. Com isso, é possível afirmar que, com 95% de certeza, os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária são estatisticamente iguais. Em contrapartida, os resultados da comparação entre as médias da reprodutibilidade com a repetibilidade seguem t calculado $>$ t tabelado, rejeitando, assim, a hipótese de que as médias são estatisticamente iguais.

Tabela 23 – Teste t de *Student* para Precisão Intermediária

Analito	t tabelado (95%)	t calculado
Enalapril	2,45	2,01
Enalaprilato	2,45	1,38
Dicetopiperazina	2,45	2,12

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 24 – Teste t de *Student* para Reprodutibilidade

Analito	t tabelado (95%)	t calculado
Enalapril	2,45	5,05
Enalaprilato	2,45	4,77
Dicetopiperazina	2,45	5,87

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

5.3.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração diferentes: baixo, médio e alto, em triplicata por nível, totalizando nove determinações. Para cada nível, foi calculada uma recuperação média que deve atender a uma faixa de especificação. Nas Tabelas 25 e 26 estão representados os resultados de exatidão para o enalapril e enalaprilato, respectivamente.

Tabela 25 – Resultados de exatidão para o enalapril

Nível de concentração		Conc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Especificação (%)	DPR (%)
Nível baixo – $160 \mu\text{g mL}^{-1}$	A1	157,68	154,91	97	97 – 103	3,66
	A2	158,66				
	A3	148,40				
Nível médio – $200 \mu\text{g mL}^{-1}$	A1	198,29	198,78	99	97 – 103	0,36
	A2	198,45				
	A3	199,60				
Nível alto – $240 \mu\text{g mL}^{-1}$	A1	236,06	237,30	99	97 – 103	0,85
	A2	236,23				
	A3	239,62				

Legenda: A1-A3: replicatas; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 26 – Resultados de exatidão para o enalaprilato

Nível de concentração		Conc ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Conc média ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Especificação (%)	DPR (%)
Nível baixo – $5 \mu\text{g mL}^{-1}$	A1	5,37	5,24	105	80 – 110	5,29
	A2	4,92				
	A3	5,42				
Nível médio – $6 \mu\text{g mL}^{-1}$	A1	5,99	5,96	99	80 – 110	1,12
	A2	5,89				
	A3	6,01				
Nível alto – $7 \mu\text{g mL}^{-1}$	A1	7,57	7,30	104	80 – 110	3,38
	A2	7,08				
	A3	7,27				

Legenda: A1-A3: replicatas; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Conforme os resultados apresentados, todos os valores de recuperação estão dentro do limite especificado, seguindo as orientações sugeridas pela AOAC. Para a recuperação do enalapril, destaca-se os resultados bem próximos a exatidão de 100% para as concentrações em

nível médio e alto, além de ter desvios padrão abaixo de 1%. Em relação ao enalaprilato, a concentração em nível médio foi a que mais se aproximou da concentração teórica de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e apresentou o menor desvio padrão relativo. Sendo assim, foi comprovado que o método possui exatidão adequada para quantificar o enalapril e o enalaprilato.

5.3.6 Robustez

Para determinação da robustez foram avaliadas as seguintes condições:

- a) em relação ao preparo e conservação da amostra: tempo de solubilização no ultrassom e estabilidade da amostra;
- b) em relação à instrumentação analítica: variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, temperatura do forno da coluna e fluxo da fase móvel.

Nas Tabelas 27, 28 e 29 estão apresentados os resultados do teste de robustez, nos quais foram avaliados os impactos em relação ao preparo e conservação da amostra para o enalapril e para a dicetopiperazina. Não foram apresentados resultados para o enalaprilato devido à ausência do analito na amostra, não sendo detectado em nenhuma das condições estudadas.

Tabela 27 – Resultados de robustez em relação ao preparo e conservação da amostra para o enalapril

Condição analítica		t _r (min)	Conc (µg mL ⁻¹)	Conc média (µg mL ⁻¹)	DPR (%)	Varição da concentração em relação à condição normal (%)
Condição normal	A1	1,473	169,73	171,18	0,78	N/A
	A2	1,473	172,37			
	A3	1,467	171,45			
Tempo de ultrassom – 12 minutos	A1	1,467	169,93	170,48	1,30	0,41
	A2	1,467	168,59			
	A3	1,467	172,92			
Tempo de ultrassom – 15 minutos	A1	1,473	171,78	172,65	0,45	0,86
	A2	1,467	172,90			
	A3	1,467	173,28			
Estabilidade 24 horas	A1	1,507	171,66	171,25	0,36	0,04
	A2	1,493	170,54			
	A3	1,480	171,53			

Legenda: A1-A3: replicatas; t_r: tempo de retenção; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 28 – Resultados de robustez em relação ao preparo da amostra para a dicetopiperazina

Condição analítica		t _r (min)	Conc (µg mL ⁻¹)	Conc média (µg mL ⁻¹)	DPR (%)	Varição da concentração em relação à condição normal (%)
Condição normal	A1	5,120	19,04	19,23	2,52	N/A
	A2	5,120	19,78			
	A3	5,113	18,87			
Tempo de ultrassom – 12 minutos	A1	5,100	18,45	18,97	2,35	1,35
	A2	5,093	19,16			
	A3	5,100	19,28			
Tempo de ultrassom – 15 minutos	A1	5,113	18,91	18,72	1,76	2,65
	A2	5,107	18,92			
	A3	5,107	18,34			
Estabilidade 24 horas	A1	5,233	18,52	18,95	2,30	1,46
	A2	5,180	19,39			
	A3	5,140	18,95			

Legenda: A1-A3: replicatas; t_r: tempo de retenção; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 29 – Teste t de Student para os resultados de robustez – Preparo da amostra

Condição	t tabelado (95%)	t calculado - enalapril	t calculado - dicetopiperazina
Tempo de ultrassom – 12 minutos	2,78	0,35	0,70
Tempo de ultrassom – 15 minutos	2,78	0,91	1,50
Estabilidade 24 horas	2,78	0,04	0,75

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Conforme os resultados apresentados nas tabelas, pode-se afirmar que a variação do tempo de solubilização da amostra no ultrassom não impactou no tempo de retenção e na quantificação dos picos do enalapril e da dicetopiperazina, uma vez que foram obtidas variações de concentração em relação à condição normal abaixo de 5%. Da mesma maneira, quando avaliada a estabilidade da amostra, o método foi robusto na quantificação de ambos os analitos. Ademais, de acordo com os resultados do teste t de Student, nos quais t tabelado foi menor que t calculado, pode-se afirmar como verdadeira a hipótese de que as médias das concentrações nas condições estudadas são estatisticamente iguais que a média das concentrações na condição normal.

Nas Tabelas 30, 31 e 32 estão expostos os resultados do teste de robustez para avaliação do impacto de pequenas modificações nos parâmetros cromatográficos na detecção e quantificação dos analitos. Novamente, não estão apresentados resultados para o enalaprilato, uma vez que não foi detectado sinal analítico no seu tempo de retenção em nenhuma das condições estudadas.

Tabela 30 – Resultados de robustez em relação à instrumentação analítica para o enalapril

Condição analítica		t _r (min)	Conc (µg mL ⁻¹)	Conc média (µg mL ⁻¹)	DPR (%)	Varição da concentração em relação à condição normal (%)
Condição normal	A1	1,473	169,73	171,18	0,78	N/A
	A2	1,473	172,37			
	A3	1,467	171,45			
Composição da FM 28:72	A1	1,720	166,91	168,63	0,92	1,49
	A2	1,713	169,08			
	A3	1,713	169,90			
Composição da FM 32:68	A1	1,273	169,78	170,43	0,37	0,44
	A2	1,280	170,47			
	A3	1,280	171,03			
Fluxo da FM 1,7 mL min ⁻¹	A1	1,540	179,47	181,03	0,75	5,75
	A2	1,553	181,70			
	A3	1,553	181,92			
Fluxo da FM 1,9 mL min ⁻¹	A1	1,400	160,08	161,54	0,90	5,65
	A2	1,393	161,56			
	A3	1,393	162,98			
pH da FM 2,5	A1	1,607	172,95	174,91	0,97	2,18
	A2	1,607	176,01			
	A3	1,607	175,77			
Temperatura da coluna 48°C	A1	1,493	169,93	169,87	0,28	0,76
	A2	1,500	170,11			
	A3	1,493	170,18			
Temperatura da coluna 52°C	A1	1,460	169,27	170,32	0,66	0,50
	A2	1,433	170,18			
	A3	1,440	171,52			

Legenda: A1-A3: replicatas; t_r: tempo de retenção; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 31 – Resultados de robustez em relação à instrumentação analítica para a dicetopiperazina

Condição analítica		t _r (min)	Conc (µg mL ⁻¹)	Conc média (µg mL ⁻¹)	DPR (%)	Variação da concentração em relação à condição normal (%)
Condição normal	A1	5,120	19,04	19,23	2,52	N/A
	A2	5,120	19,78			
	A3	5,113	18,87			
Composição da FM 28:72	A1	6,487	17,72	18,56	3,93	3,48
	A2	6,487	18,97			
	A3	6,493	18,99			
Composição da FM 32:68	A1	4,007	18,80	18,82	1,45	2,13
	A2	4,067	19,10			
	A3	4,053	18,55			
Fluxo da FM 1,7 mL min ⁻¹	A1	5,340	19,32	19,61	2,23	1,98
	A2	5,360	19,40			
	A3	5,360	20,11			
Fluxo da FM 1,9 mL min ⁻¹	A1	4,847	17,40	18,00	3,23	6,40
	A2	4,840	18,56			
	A3	4,847	18,05			
pH da FM 2,5	A1	5,033	18,75	18,70	0,93	2,76
	A2	5,020	18,85			
	A3	5,020	18,51			
Temperatura da coluna 48°C	A1	5,253	18,54	18,82	1,74	2,13
	A2	5,267	18,75			
	A3	5,273	19,18			
Temperatura da coluna 52°C	A1	4,980	19,30	19,25	1,73	0,10
	A2	4,907	18,89			
	A3	4,900	19,56			

Legenda: A1-A3: replicatas; t_r: tempo de retenção; Conc: concentração; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Tabela 32 – Teste t de Student para os resultados de robustez – Instrumentação analítica

Condição	t tabelado (95%)	t calculado - enalapril	t calculado - dicetopiperazina
Composição da FM 28:72	2,78	1,43	1,32
Composição da FM 32:68	2,78	0,48	1,29
Fluxo da FM 1,7 mL min ⁻¹	2,78	5,68	1,01
Fluxo da FM 1,9 mL min ⁻¹	2,78	5,49	2,81
pH da FM 2,5	2,78	2,03	1,78
Temperatura da coluna 48°C	2,78	0,84	1,21
Temperatura da coluna 52°C	2,78	0,51	0,05

Fonte: Elaborada pelo autor (2023).

Comparando os resultados de robustez para avaliação do impacto de pequenas modificações na composição da fase móvel, pode-se afirmar que para este parâmetro não foram obtidas variações acima de 5% na quantificação dos analitos, apesar de apresentar aumento nos tempos de retenção para composição 28:72 e diminuição para composição 32:68 de etanol e tampão fosfato de sódio.

Em relação ao fluxo da fase móvel, houve variação superior a 5% nas condições de 1,7 e 1,9 mL min⁻¹ na quantificação do enalapril e na condição de 1,9 mL min⁻¹ na quantificação da dicetopiperazina. Com isso, é importante ressaltar que o método é sensível a alterações de fluxo de fase móvel, entretanto, os equipamentos de cromatografia líquida possuem mecanismos que impedem o fluxo de fase móvel variar nesta amplitude, fazendo com que não haja prejuízo na precisão do método. Nas condições de variação de pH da fase móvel e de temperatura da coluna, o método se apresentou robusto, não permitindo variação superior a 5% em ambos analitos.

De acordo com os resultados dos cálculos do teste t de Student para instrumentação analítica, pode-se observar que para o enalapril nas condições de fluxo aumentado e diminuído, e para a dicetopiperazina com o fluxo aumentado, o valor de t calculado foi maior que t tabelado. Isto indica que as médias para essas condições são estatisticamente diferentes que a média encontrada para condição normal. Em contrapartida, para todas as outras condições de instrumentação analítica que foram alteradas, t calculado foi menor que t tabelado, indicando que a hipótese de as médias serem estatisticamente iguais é verdadeira.

Desta forma, pode-se concluir que o método se manteve preciso na maioria das condições estudadas, tanto quando modificado o preparo da amostra, quanto nas modificações dos parâmetros cromatográficos, com exceção, apenas, do fluxo de bombeamento da fase móvel.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o método de quantificação simultânea de teor e impurezas de enalapril em comprimidos foi otimizado, alterando a coluna cromatográfica, o volume de injeção, a composição e o fluxo da fase móvel. O método proposto apresentou boa capacidade de separação dos analitos, menor tempo de análise e menor gasto de solvente orgânico. Deste modo, pode-se concluir que o método proposto trouxe melhoria na produtividade da análise e diminuição no impacto ambiental.

A partir das alterações realizadas na metodologia analítica, houve diminuição dos tempos de retenção dos analitos. Com isso, há um aumento da eficiência analítica, aliando menor tempo e consumo de solvente e energia. Deste modo, o método otimizado pode ser considerado como mais vantajoso que o farmacopeico, uma vez que é mais eficiente, sem perder qualidade na separação, com bons valores de resolução, números de pratos por metro e fator caudal.

Além disso, foi comprovado que o método otimizado está mais alinhado aos princípios da Química Analítica Verde quando comparado ao método farmacopeico. Para isso, foram utilizadas três ferramentas de comparação, a NEMI, a *Eco-Scale* e a GAPI, nas quais as três apresentaram resultados favoráveis ao método otimizado.

Na validação analítica, foram realizados os testes de seletividade, linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão e robustez e os resultados obtidos foram satisfatórios e estão dentro dos critérios especificados pela RDC N° 166/17.

REFERÊNCIAS

A EMAM, Aml *et al.* Ecofriendly chromatographic methods for determination of co-prescribed drugs, olanzapine and metformin, in rat plasma. **Bioanalysis**, Beni-Suef, v. 12, n. 9, p. 597-613, 2020. Future Science Ltd.

AL-ARFAJ, Nawal A.; AL-ABDULKAREEM, Eman A.; ALY, Fatma A.. Determination of enalapril maleate and atenolol in their pharmaceutical products and in biological fluids by flow-injection chemiluminescence. **Luminescence**, v. 24, n. 1, p. 422-428, 2009.

AL-OMARI, M.M. *et al.* Effect of the drug-matrix on the stability of enalapril maleate in tablet formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Dhahran, v. 25, n. 1, p. 893-902, 2001.

AMORIM, Antônia Fádia Valentim de. **Métodos Cromatográficos**. Fortaleza: Uece, 2019.

AMORIM, Patrícia Mendonça da Silva. **Estratégias de tratamento de resíduos químicos gerados na FCF/USP**. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

AOAC International, **Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)**. Gaithersburg: AOAC International, 2016.

AQUINO NETO, Francisco Radler de; NUNES, Denise da Silva e Souza. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

BHARDWAJ, Sunny Piyush; SINGH, Saranjit. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v. 46, n. 1, p. 113-120, jan. 2008.

BORTALIEIRO, Cláudio. **Fundamentos de cromatografia líquida de alto desempenho: avanços e inovações**. Cascavel: Agilent Technologies, 2016. 131 slides.

BOUABDALLAH, Sondes *et al.* Determination and Degradation Study of Enalapril Maleate by High Performance Liquid Chromatography. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, Jarzouna, v. 51, n. 8, p. 735-741, 2017.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6^a. ed. Brasília: ANVISA, 2019.

BRASIL. Guia nº 10, de 12 de setembro de 2017. **Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica**.

BRASIL. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe Sobre a Validação de Métodos Analíticos e Dá Outras Providências.**

BRASIL. Resolução nº 658, de 30 de março de 2022. **Dispõe Sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos e Dá Outras Providências.**

BRASIL. **Sociedade Brasileira de Cardiologia 2020** – Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Brasília: Revista Brasileira de Hipertensão, 2020. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/sbc-dha/profissional/revista/28-2/diretrizes-2020.pdf>. Acesso em: 20 de out. 2022.

BRASIL. **Pesquisa Nacional de Saúde 2019**: percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e Grandes Regiões. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101764.pdf>. Acesso em: 27 de nov. 2023.

BRITISH Pharmacopoeia 2022. London: Her Majesty's Stationary Office, 2022.

BRITO, Natilene Mesquita *et al.* Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas**: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 129-146, 2003.

CALZERRA, Natália Tabosa Machado *et al.* Aspectos fisiopatológicos da hipertensão arterial dependente de angiotensina II: revisão integrada da literatura. **Acta Brasiliensis**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 69-73, 28 maio 2018.

CIOLA, Remolo. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**: hplc. São Paulo: Edgard Blucher, 1998.

CHUNG, Man-Chin *et al.* Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 155-180, jun. 2005.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S.. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 606 p.

ESTADOS UNIDOS. United States Environmental Protection Agency. **Enalapril Diketopiperazine**. Disponível em: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/properties/DTXSID10151178>. Acesso em: 25 nov. 2023.

GAŁUSZKA, Agnieszka; MIGASZEWSKI, Zdzisław; NAMIEŚNIK, Jacek. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 50, p. 78-84, out. 2013.

GOMES, Eduardo. **Análise comparativa da farmacocinética do enalapril e da hidroclorotiazida quando utilizados em formulação isolada e em associação**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

GOMES, Rachel Novaes *et al.* Desenvolvimento da química verde no cenário brasileiro. **Fitos**, Rio de Janeiro, Edição Especial, p. 80-89, 2018.

GÓMEZ-DÍEZ, Manuel *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of enalapril and its active metabolite, enalaprilat, at four different doses in healthy horses. **Research in Veterinary Science**, [S.L.], v. 97, n. 1, p. 105-110, ago. 2014. Elsevier BV.

GONSALEZ, Sabrina Ribeiro *et al.* Inappropriate activity of local renin-angiotensin-aldosterone system during high salt intake: impact on the cardio-renal axis. **Brazilian Journal of Nephrology**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 170-178, 18 jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO).

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. McGraw Hill, 11^a ed. 2006.

HARRIS, Daniel C.. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. São Paulo: LTC, 2005. 661 p.

KANNIAIAH, Kanaka Parvathi *et al.* Environmental impact of greenness assessment tools in liquid chromatography – A review. **Microchemical Journal**, Kattankulathur, v. 170, 2021. Elsevier BV.

KOPPALA, Srinivasarao; REDDY, V. Ranga; ANIREDDY, Jaya Shree. User-Friendly HPLC Method Development and Validation for Determination of Enalapril Maleate and Its Impurities in Enalapril Tablets. **Journal of Chromatographic Science**, Hyderabad, p. 1-10, 2017.

LAGUARDIA, Miguel de; ARMENTA, Sergio. Practical Consequences of Green Analytical Chemistry. In: LAGUARDIA, Miguel de; ARMENTA, Sergio. **Green Analytical Chemistry**. [S.L.]: Elsevier, 2011. Cap. 10. p. 219-232.

LANÇAS, Fernando Mauro. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2016. 352 p.

LENARDÃO, Eder João *et al.* "Green chemistry" - Os 12 Princípios da Química Verde e sua Inserção nas Atividades de Ensino e Pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LOPES, Vitor Augusto Ramos; PINTO, Gláucia Maria Ferreira. Uso de etanol como solvente alternativo na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação de clomazone em defensivos agrícolas. **Revista Eletrônica FACP**, n. 22, 2023. ISSN 2316-350X. Disponível em: <<http://revista.facp.com.br/index.php/reFACP/article/view/99>>. Acesso em: 19 jul. 2023.

LOGOYDA, Liliya *et al.* Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of enalapril maleate in present of their impurities: application to tablet analysis. **International Journal Of Applied Pharmaceutics**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 98-102, 6 jan. 2018.

MALDANER, Liane; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MALEATO DE ENALAPRIL: comprimidos. Responsável técnico Ricardo Jonsson. Campinas: Sanofi Medley Farmacêutica Ltda., 2022. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/maleato-de-enalapril-medley/bula>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 4. ed, Ed. JOHN WILEY & SONS, 2004.

MILLER, William. Death of a Genius: his fourth dimension, time, overtakes einstein. **Life**, [S.L.], p. 62-64, 1955.

MOHAMED, Heba M; LAMIE, Nesrine T. Analytical Eco-Scale for Assessing the Greenness of a Developed RP-HPLC Method Used for Simultaneous Analysis of Combined Antihypertensive Medications. **Journal of AOAC International**, Cairo, v. 99, n. 5, p. 1260-1265, 2016.

MOHAN, Manindra *et al.* Validation of stability indicating hplc method for the determination of enalapril maleate in tablet formulations. **International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences**, Dehradun, v. 3, n. 5, p. 180-183, 2011.

NOCITE, José Roberto. Fisiopatologia da Hipertensão Arterial e Avaliação do Paciente Hipertenso. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 257-262, 1988.

PEREIRA, Dárcio Gomes. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

PERES, T. B.; Noções básicas de cromatografia. **Centro de pesquisa e desenvolvimento ambiental-Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

PIOTKA-WASYLKA, J.. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: green analytical procedure index. **Talanta**, [S.L.], v. 181, n. 1, p. 204-209, 2018.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chem.**, 16, p. 4546-4551, 2014. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/getauthorversionpdf/c4gc01149j>. Acesso em: 12 dez. 2022.

PLOTKA, Justyna M., A new tool for the evaluation of the analytical procedure: green analytical procedure index. **Talanta**, Gdansk, v. 181, n. 1, p. 204-209, 2018.

REMKO, M.. Acidity, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some ACE inhibitors. **Chemical Papers**, Bratislava, v. 61, n. 2, p. 133-141, 2007.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SALAMOUN, Jaroslav; SLAIS, Karel. Elimination of peak splitting in the liquid chromatography of the proline-containing drug enalapril maleate. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 537, p. 249-257, 1991.

SANTOS, Giovanny. *et al.* A química por trás dos medicamentos distribuídos pelo programa farmácia popular no Brasil: rotas sintéticas, relação estrutura-atividade e perspectivas futuras. **Química Nova**, [S.L.], v. 44, n. 10, p. 1280-1299, 2021. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

SHAABAN, Heba. New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Dammam, v. 408, n. 25, p. 6929-6944, 2016.

SHAABAN, Heba; MOSTAFA, Ahmed. Sustainable Eco-Friendly Ultra-High-Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Caffeine and Theobromine in Commercial Teas: evaluation of greenness profile using nemi and eco-scale assessment tools. **Journal of AOAC International**, Dammam, v. 101, n. 6, p. 1781-1787, 2018.

SKOOG, Douglas A.; NIEMAN, Holler. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2002. 409 p.

SNYDER, Lloyd R.. **High Performance Liquid Chromatography**: advances and perspectives. Londres: C. Horvath, 1980.

SNYDER, Lloyd R.; KIRKLAND, Joseph J.; DOLAN, John W.. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 3. ed. Londres: Wiley, 2009.

SOUZA, Márcia Cristina de. **Síntese e caracterização estrutural de complexos envolvendo os fármacos maleato de enalapril, hidrocloreotiazida e clortalidona**. 2011. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

SOUSA-AGUIAR, Eduardo F. *et al.* Green Chemistry: the evolution of a concept. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1257-1261, 2014.

SPINOSA, Helenice de Souza. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.

STOLARCZYK, Mariusz *et al.* Application of derivative spectrophotometry for determination of enalapril, hydrochlorothiazide and valsartan in complex pharmaceutical preparations. **Acta Polonae Pharmaceutica: Drug Research**, Kraków, v. 65, n. 3, p. 275-281, 2008.

STOLL, Dwight R.. Essentials of LC Troubleshooting, Part V: What happened to my sensitivity?. **LCGC North America**, v. 40, n. 10, p. 471-475, 2022.

SWADESH, Joel K.. **HPLC: practical and industrial applications**. 2. ed. Crc Press, 2000. 480 p.

TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-RF) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616- 623, 2002.

UNITED States Pharmacopeia. 43.ed. Rockville: United States Pharmacopeia, 2022.

VALENTINI, Sóstenes Rosa; SOMMER, Willy Arno; MATIOLI, Graciette. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**, Maringá, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VAN AKEN, Koen; STREKOWSKI, Lucjan; PATINY, Luc. EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological parameters. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Oostende, v. 2, p. 1-7, 2006.

WYVRATT, Matthew J. et al. Reductive amination of ethyl 2-oxo-4-phenylbutanoate with L-alanyl-L-proline. Synthesis of enalapril maleate. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 49, n. 15, p. 2816-2819, jul. 1984. American Chemical Society (ACS).