

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL APLICADA  
A SENOSÍDEOS E NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE  
DICLOFENACO SÓDICO, PARACETAMOL E CAFEÍNA”**

**Fabio Henrique Pinheiro Favarin**

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

**Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro**

**SÃO CARLOS – SP**

**2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F272cL

Favarin, Fabio Henrique Pinheiro.

Cromatografia líquida bidimensional aplicada a senosídeos e na determinação simultânea de diclofenaco sódico, paracetamol e cafeína / Fabio Henrique Pinheiro Favarin. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
80 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

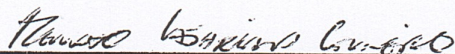
1. Cromatografia líquida. 2. Senosídeos. 3. Quantificação da cafeína. 4. Acetaminofen. 5. Diclofenaco sódico. I. Título.

CDD: 543.0894 (20<sup>a</sup>)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Departamento de Química  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
Curso de Mestrado Profissional

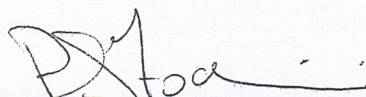
---

*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Profissional do candidato Fabio Henrique Pinheiro Favarin, realizada em 25 de outubro de 2012:*



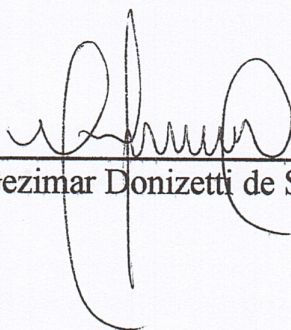
---

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



---

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini



---

Dr. Gezimar Donizetti de Souza

*“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas.”*

**Steve Jobs**

“À minha família e namorada pelo incentivo, apoio e acreditarem nos meus sonhos.”

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por guiar meus passos e minha vida. A Ele toda honra e glória.

Ao professor Renato Lajarim Carneiro pela amizade, companheirismo, ensinamentos e pela excelente orientação.

Aos meus pais Geraldo Mauri e Estela Pinheiro, por sempre me apoiarem em minhas decisões.

À minha namorada, Ana Carolina Honorato, por sempre estar ao meu lado, me apoiando e sem medir esforços para ver o meu sucesso.

Aos professores do departamento de Química da UFSCar por terem colaborado com todo o conhecimento apresentado e discutido no curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos por apresentar o módulo profissional em seus cursos.

Aos funcionários do DQ/UFSCar, em especial aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação.

A todos os colegas das empresas EMS e Sanofi-Aventis pelo incentivo, apoio e colaboração em ceder o espaço da empresa para o desenvolvimento prático do trabalho.

Ao amigo Dr. José Martins, Diretor Científico do Instituto Vita Nova, cediado na EMS.

A todos os colaboradores da empresa EMS que participaram diretamente na elaboração deste trabalho.

Ao grande amigo Marcelo Pereira Minghetti, meu líder na empresa Sanofi-Aventis, que apoiou constantemente a elaboração deste trabalho em conjunto com a empresa.

A todos os colaboradores da empresa Sanofi-Aventis que participaram diretamente na elaboração deste trabalho.

À Anne Beraldo, gerente de projetos da empresa Galderma, que sempre esteve ao meu lado me apoiando para a execução do trabalho de conclusão de curso.

A todos os colaboradores da empresa Galderma que participaram diretamente na elaboração deste trabalho.

A todos os amigos e parentes que torceram e torcem pelo meu sucesso pessoal e profissional.

Aos membros da banca pelas correções e preciosas sugestões.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Área do cromatograma da solução amostra
<b>AP</b>	Area do cromatograma da solução padrão
<b>CL</b>	Cromatografia Líquida
<b>CN</b>	Terminação da fase estacionária Ciano referente a coluna da marca Phenomenex.
<b>CPDO</b>	Comprimido
<b>D</b>	Dose nominal
<b>FS</b>	Valor calculado com dados da coluna cromatográfica
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>ODS</b>	Terminação da fase estacionária C18 referente a coluna da marca GL Science.
<b>PA</b>	Massa da amostra
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PP</b>	Massa da solução padrão
<b>SCX</b>	Terminação da fase estacionária C18 referente a coluna da marca Supelco.
<b>TP</b>	Terminação da fase estacionária referente à coluna da marca Chrom Tech.
<b>TR</b>	Tempo de retenção
<b>UV</b>	Ultravioleta



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (a) Processo cromatográfico que mostra a migração de duas bandas de componentes para baixo de uma coluna. (b) Representação microscópica do particionamento de moléculas do analito A e B para a fase estacionária ligada a um suporte esférico. <sup>1</sup> .....	2
Figura 2: Ilustração de várias interações amostra-colunas que podem afetar a seletividade. <sup>14</sup> .....	6
Figura 3: Fs de colunas cromatográficas. <sup>12</sup> .....	7
Figura 4: Comparação de separação por um método original x método ortogonal. <sup>13</sup>	9
Figura 5: LC x LC e as parcelas de amostras de extrato de milho, utilizando seis diferentes fases (a) Coluna Discovery HS-F5, (b) Coluna Zorbax 300SB-C3; (c) Coluna Zorbax 300SB-C8, (d) Coluna Zorbax SB-CN, (e) Coluna Zorbax Bonus-RP; e (f) Coluna home-made. <sup>29</sup> .....	11
Figura 6: (a) LC x LC com a coluna C3, (b) LC x LC com a coluna Bônus, (c) LC x LC traçado de contorno coluna C3, (d) LC x LC contorno plotado com a coluna Bônus, (e) LC x LC trama com a coluna C3, e (f) LC x LC trama com a coluna Bônus. <sup>37</sup> .....	13
Figura 7: Segunda dimensão, cromatogramas LC utilizando o modo <i>off-line</i> com amostrador automático. <sup>43</sup> .....	14
Figura 8: Molécula do Diclofenaco sódico. <sup>44</sup> .....	15
Figura 9: Molécula do paracetamol. <sup>46</sup> .....	16
Figura 10: Molécula da cafeína. <sup>48</sup> .....	17
Figura 11: Molécula do senosídeo. <sup>50</sup> .....	18
Figura 12: Padrão Método convencional – 1 .....	20
Figura 13: Teste Coluna X-Terra C18 .....	20
Figura 14: Teste Coluna Luna C8.....	21
Figura 15: Teste Coluna SymmetryShield RP18 .....	21
Figura 16: Teste Coluna NovaPak C18 .....	22
Figura 17: Teste Coluna Zr-PBD .....	22
Figura 18: Teste 2 Coluna Zr-PBD .....	23
Figura 19: Padrão1 (3 ativos) Cond. Inicial M1.....	23
Figura 20: Teste Coluna Symmetry C18 .....	24
Figura 21: Teste Coluna XTerra RP8 .....	24
Figura 22: Teste Coluna Hypersil Gold C18 .....	25
Figura 23: Teste Coluna Partisil SCX 10 .....	25
Figura 24: Ilustração do fluxograma utilizado para o desenvolvimento dos métodos convencionais e bidimensionais. ....	27
Figura 25: Padrão Método convencional – 1 .....	32
Figura 26: Padrão Método bidimensional - Vial 1 – 1 .....	33
Figura 27: Padrão Método bidimensional - Vial 2 – 1 .....	33
Figura 28: Padrão Método bidimensional - Vial 3 – 1 .....	33
Figura 29: Padrão Método bidimensional - Vial 4 – 1 .....	33
Figura 30: Padrão Método bidimensional - Vial 5 – 1 .....	34
Figura 31: Padrão Método bidimensional - Vial 6 – 1 .....	34

Figura 32: Padrão Método bidimensional - Vial 7 – 1 .....	34
Figura 33: Padrão Método bidimensional - Vial 8 – 1 .....	35
Figura 34: Padrão Método bidimensional - Vial 9 – 1 .....	35
Figura 35: Padrão Método bidimensional - Vial 10 – 1 .....	36
Figura 36: Padrão Método bidimensional - Vial 11 – 1 .....	36
Figura 37: Padrão Método bidimensional - Vial 12 – 1 .....	36
Figura 38: Padrão Método bidimensional - Vial 13 – 1 .....	36
Figura 39: Padrão Método bidimensional - Vial 14 – 1 .....	37
Figura 40: Padrão Método bidimensional - Vial 15 – 1 .....	37
Figura 41: Padrão Método bidimensional - Vial 16 – 1 .....	37
Figura 42: Padrão Método bidimensional - Vial 17 – 1 .....	37
Figura 43: Padrão Método bidimensional - Vial 18 – 1 .....	38
Figura 44: Padrão Método bidimensional - Vial 19 – 1 .....	38
Figura 45: Padrão Método bidimensional - Vial 20 – 1 .....	38
Figura 46: Método convencional - Amostra 1 .....	39
Figura 47: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 1 .....	40
Figura 48: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 2 .....	40
Figura 49: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 3 .....	40
Figura 50: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 4 .....	40
Figura 51: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 5 .....	40
Figura 52: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 6 .....	41
Figura 53: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 7 .....	41
Figura 54: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 8 .....	41
Figura 55: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 9 .....	42
Figura 56: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 10 .....	42
Figura 57: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 11 .....	42
Figura 58: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 12 .....	42
Figura 59: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 13 .....	42
Figura 60: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 14 .....	43
Figura 61: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 15 .....	43
Figura 62: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 16 .....	43
Figura 63: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 17 .....	43
Figura 64: Método bidimensional – Amostra 1 – Vial 18 .....	43
Figura 65: Método bidimensional – Amostra 1 – Vial 19 .....	44
Figura 66: Método bidimensional – Amostra 1 – Vial 20 .....	44
Figura 67: Método convencional - Fingerprint – Alcachofra .....	45
Figura 68: Método A - Fingerprint – Biogestil .....	45
Figura 69: Método A - Fingerprint – Cascara.....	46
Figura 70: Método A - Fingerprint - Fucus.....	46
Figura 71: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 1 - 270nm .....	47
Figura 72: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 2 - 270nm .....	47
Figura 73: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 3 - 270nm .....	47
Figura 74: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 4 - 270nm .....	47
Figura 75: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 5 - 270nm .....	47
Figura 76: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 6 - 270nm .....	48

Figura 77: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 7 - 270nm .....	48
Figura 78: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 8 - 270nm .....	48
Figura 79: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 9 - 270nm .....	48
Figura 80: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 10 - 270nm .....	48
Figura 81: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 11 - 270nm .....	49
Figura 82: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 12 - 270nm .....	49
Figura 83: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 13 - 270nm .....	49
Figura 84: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 14 - 270nm .....	49
Figura 85: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 15 - 270nm .....	49
Figura 86: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 16 - 270nm .....	50
Figura 87: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 17 - 270nm .....	50
Figura 88: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 18 - 270nm .....	50
Figura 89: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 19 - 270nm .....	50
Figura 90: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 20 - 270nm .....	50
Figura 91: Diclofenaco.....	51
Figura 92: Paracetamol .....	51
Figura 93: Cafeína.....	52
Figura 94: Padrão1 (3 ativos) Cond. Inicial M1.....	52
Figura 95: Amostra 1 M1 .....	53
Figura 96: Padrão1 (3 ativos) Vial 1 .....	53
Figura 97: Padrão1 (3 ativos) Vial 2 .....	54
Figura 98: Padrão1 (3 ativos) Vial 3 .....	54
Figura 99: Padrão1 (3 ativos) Vial 4 .....	54
Figura 100: Padrão1 (3 ativos) Vial 5 .....	55
Figura 101: Padrão1 (3 ativos) Vial 6 .....	55
Figura 102: Padrão1 (3 ativos) Vial 7 .....	55
Figura 103: Amostra 1 Vial 1 .....	56
Figura 104: Amostra 1 Vial 2 .....	56
Figura 105: Amostra 1 Vial 3 .....	56
Figura 106: Amostra 1 Vial 4 .....	57
Figura 107: Amostra 1 Vial 5 .....	57
Figura 108: Amostra 1 Vial 6 .....	57
Figura 109: Amostra 1 Vial 7 .....	57
Figura 110: Amostra (Deg.Oxidativa) M2 .....	58
Figura 111: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 1 .....	59
Figura 112: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 2 .....	59
Figura 113: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 3 .....	59
Figura 114: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 4 .....	60
Figura 115: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 5 .....	60
Figura 116: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 6 .....	60
Figura 117: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 7 .....	61
Figura 118: Teor de Senosídeos - Padrão 1.....	62
Figura 119: Teor de Senosídeos - Padrão 2.....	62
Figura 120: Teor de Senosídeos - Padrão 3.....	63
Figura 121: Teor de Senosídeos - Amostra 1.....	63

Figura 122: Teor de Senosídeos - Amostra 2.....	64
Figura 123: Teor de Senosídeos - Amostra 3.....	64
Figura 124: Fingerprint Test - Alcachofra .....	65
Figura 125: Fingerprint Test – Biogestil.....	65
Figura 126: Fingerprint Test - Cascara.....	66
Figura 127: Fingerprint Test - Fucus .....	66
Figura 128: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Padrão 1 .....	67
Figura 129: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Padrão 2 .....	67
Figura 130: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Padrão 3 .....	68
Figura 131: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Amostra 1 .....	68
Figura 132: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Amostra 2 .....	69
Figura 133: Teste de estresse ( <i>Stress testing</i> ) - Amostra Degradação Ácida .....	69
Figura 134: Teste de estresse ( <i>Stress testing</i> ) - Amostra Degradação Básica .....	70
Figura 135: Teste de estresse ( <i>Stress testing</i> ) - Amostra Degradação Oxidativa ....	70
Figura 136: Padrão Método A - 2 .....	82
Figura 137: Padrão Método A - 3 .....	82
Figura 138: Padrão Método B - Vial 1 – 2 .....	82
Figura 139: Padrão Método B - Vial 2 – 2 .....	83
Figura 140: Padrão Método B - Vial 3 – 2 .....	83
Figura 141: Padrão Método B - Vial 4 – 2 .....	83
Figura 142: Padrão Método B - Vial 5 – 2 .....	83
Figura 143: Padrão Método B - Vial 6 – 2 .....	83
Figura 144: Padrão Método B - Vial 7 – 2 .....	84
Figura 145: Padrão Método B - Vial 8 – 2 .....	84
Figura 146: Padrão Método B - Vial 9 – 2 .....	84
Figura 147: Padrão Método B - Vial 10 – 2 .....	84
Figura 148: Padrão Método B - Vial 11 – 2 .....	84
Figura 149: Padrão Método B - Vial 12 – 2 .....	85
Figura 150: Padrão Método B - Vial 13 – 2 .....	85
Figura 151: Padrão Método B - Vial 14 – 2 .....	85
Figura 152: Padrão Método B - Vial 15 – 2 .....	85
Figura 153: Padrão Método B - Vial 16 – 2 .....	85
Figura 154: Padrão Método B - Vial 17 – 2 .....	86
Figura 155: Padrão Método B - Vial 18 – 2 .....	86
Figura 156: Padrão Método B - Vial 19 – 2 .....	86
Figura 157: Padrão Método B - Vial 20 – 2 .....	86
Figura 158: Padrão Método B - Vial 1 – 3 .....	86
Figura 159: Padrão Método B - Vial 2 – 3 .....	87
Figura 160: Padrão Método B - Vial 3 – 3 .....	87
Figura 161: Padrão Método B - Vial 4 – 3 .....	87
Figura 162: Padrão Método B - Vial 5 – 3 .....	87
Figura 163: Padrão Método B - Vial 7 – 3 .....	87
Figura 164: Padrão Método B - Vial 8 – 3 .....	88
Figura 165: Padrão Método B - Vial 9 – 3 .....	88
Figura 166: Padrão Método B - Vial 10 – 3 .....	88

Figura 167: Padrão Método B - Vial 11 – 3 .....	88
Figura 168: Padrão Método B - Vial 12 – 3 .....	88
Figura 169: Padrão Método B - Vial 13 – 3 .....	89
Figura 170: Padrão Método B - Vial 14 – 3 .....	89
Figura 171: Padrão Método B - Vial 15 – 3 .....	89
Figura 172: Padrão Método B - Vial 16 – 3 .....	89
Figura 173: Padrão Método B - Vial 17 – 3 .....	89
Figura 174: Padrão Método B - Vial 18 – 3 .....	90
Figura 175: Padrão Método B - Vial 19 – 3 .....	90
Figura 176: Padrão Método B - Vial 20 - 3 .....	90
Figura 177: Met.A Amostra 2.....	90
Figura 178: Met.A Amostra 3.....	91
Figura 179: Método B - Amostra 2 - Vial 1 .....	91
Figura 180: Método B - Amostra 2 - Vial 2 .....	91
Figura 181: Método B - Amostra 2 - Vial 3 .....	91
Figura 182: Método B - Amostra 2 - Vial 4 .....	92
Figura 183: Método B - Amostra 2 - Vial 5 .....	92
Figura 184: Método B - Amostra 2 - Vial 6 .....	92
Figura 185: Método B - Amostra 2 - Vial 7 .....	92
Figura 186: Método B - Amostra 2 - Vial 8 .....	92
Figura 187: Método B - Amostra 2 - Vial 9 .....	92
Figura 188: Método B - Amostra 2 - Vial 10.....	93
Figura 189: Método B - Amostra 2 - Vial 11.....	93
Figura 190: Método B - Amostra 2 - Vial 12.....	93
Figura 191: Método B - Amostra 2 - Vial 13.....	93
Figura 192: Método B - Amostra 2 - Vial 14.....	93
Figura 193: Método B - Amostra 2 - Vial 15.....	93
Figura 194: Método B - Amostra 2 - Vial 16.....	94
Figura 195: Método B - Amostra 2 - Vial 17.....	94
Figura 196: Método B - Amostra 2 - Vial 18.....	94
Figura 197: Método B - Amostra 2 - Vial 19.....	94
Figura 198: Método B - Amostra 2 - Vial 20.....	94
Figura 199: Método B - Amostra 3 - Vial 1 .....	94
Figura 200: Método B - Amostra 3 - Vial 2 .....	95
Figura 201: Método B - Amostra 3 - Vial 3 .....	95
Figura 202: Método B - Amostra 3 - Vial 4 .....	95
Figura 203: Método B - Amostra 3 - Vial 5 .....	95
Figura 204: Método B - Amostra 3 - Vial 6 .....	95
Figura 205: Método B - Amostra 3 - Vial 7 .....	95
Figura 206: Método B - Amostra 3 - Vial 8 .....	96
Figura 207: Método B - Amostra 3 - Vial 9 .....	96
Figura 208: Método B - Amostra 3 - Vial 10.....	96
Figura 209: Método B - Amostra 3 - Vial 11.....	96
Figura 210: Método B - Amostra 3 - Vial 12.....	96
Figura 211: Método B - Amostra 3 - Vial 13.....	96

Figura 212: Método B - Amostra 3 - Vial 14.....	97
Figura 213: Método B - Amostra 3 - Vial 15.....	97
Figura 214: Método B - Amostra 3 - Vial 16.....	97
Figura 215: Método B - Amostra 3 - Vial 17.....	97
Figura 216: Método B - Amostra 3 - Vial 18.....	97
Figura 217: Método B - Amostra 3 - Vial 20.....	97
Figura 218: Método B - Amostra 3 - Vial 19.....	98
Figura 219: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 1 - 270nm.....	98
Figura 220: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 2 - 270nm.....	98
Figura 221: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 3 - 270nm.....	98
Figura 222: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 4 - 270nm.....	98
Figura 223: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 5 - 270nm.....	98
Figura 224: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 6 - 270nm.....	99
Figura 225: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 7 - 270nm.....	99
Figura 226: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 8 - 270nm.....	99
Figura 227: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 9 - 270nm.....	99
Figura 228: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 10 - 270nm.....	99
Figura 229: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 11 - 270nm.....	100
Figura 230: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 12 - 270nm.....	100
Figura 231: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 13 - 270nm.....	100
Figura 232: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 14 - 270nm.....	100
Figura 233: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 15 - 270nm.....	100
Figura 234: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 16 - 270nm.....	100
Figura 235: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 17 - 270nm.....	101
Figura 236: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 18 - 270nm.....	101
Figura 237: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 19 - 270nm.....	101
Figura 238: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 20 - 270nm.....	101
Figura 239: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 1 - 270nm.....	101
Figura 240: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 2 - 270nm.....	101
Figura 241: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 3 - 270nm.....	102
Figura 242: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 4 - 270nm.....	102
Figura 243: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 5 - 270nm.....	102
Figura 244: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 6 - 270nm.....	102
Figura 245: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 7 - 270nm.....	102
Figura 246: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 8 - 270nm.....	102
Figura 247: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 9 - 270nm.....	103
Figura 248: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 10 - 270nm.....	103
Figura 249: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 11 - 270nm.....	103
Figura 250: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 12 - 270nm.....	103
Figura 251: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 13 - 270nm.....	103
Figura 252: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 14 - 270nm.....	103
Figura 253: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 15 - 270nm.....	104
Figura 254: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 16 - 270nm.....	104
Figura 255: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 17 - 270nm.....	104
Figura 256: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 18 - 270nm.....	104

Figura 257: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 19 - 270nm .....	104
Figura 258: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 20 - 270nm .....	104
Figura 259: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 1 - 270nm.....	105
Figura 260: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 2 - 270nm.....	105
Figura 261: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 3 - 270nm.....	105
Figura 262: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 4 - 270nm.....	105
Figura 263: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 5 - 270nm.....	105
Figura 264: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 6 - 270nm.....	105
Figura 265: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 7 - 270nm.....	106
Figura 266: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 8 - 270nm.....	106
Figura 267: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 9 - 270nm.....	106
Figura 268: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 10 - 270nm.....	106
Figura 269: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 11 - 270nm.....	106
Figura 270: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 12 - 270nm.....	106
Figura 271: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 13 - 270nm.....	107
Figura 272: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 14 - 270nm.....	107
Figura 273: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 15 - 270nm.....	107
Figura 274: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 16 - 270nm.....	107
Figura 275: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 17 - 270nm.....	107
Figura 276: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 18 - 270nm.....	107
Figura 277: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 19 - 270nm.....	108
Figura 278: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 20 - 270nm.....	108
Figura 279: Padrão2 (3 ativos) Cond. Inicial M1.....	108
Figura 280: Padrão3 (3 ativos) Cond. Inicial M1.....	108
Figura 281: Amostra 2 M1 .....	108
Figura 282: Padrão2 (3 ativos) Vial 1 .....	109
Figura 283: Padrão2 (3 ativos) Vial 2 .....	109
Figura 284: Padrão2 (3 ativos) Vial 3 .....	109
Figura 285: Padrão2 (3 ativos) Vial 4 .....	109
Figura 286: Padrão2 (3 ativos) Vial 5 .....	109
Figura 287: Padrão2 (3 ativos) Vial 6 .....	110
Figura 288: Padrão2 (3 ativos) Vial 7 .....	110
Figura 289: Padrão3 (3 ativos) Vial 1 .....	110
Figura 290: Padrão3 (3 ativos) Vial 2 .....	110
Figura 291: Padrão3 (3 ativos) Vial 3 .....	110
Figura 292: Padrão3 (3 ativos) Vial 4 .....	111
Figura 293: Padrão3 (3 ativos) Vial 5 .....	111
Figura 294: Padrão3 (3 ativos) Vial 6 .....	111
Figura 295: Padrão3 (3 ativos) Vial 7 .....	111
Figura 296: Amostra 2 Vial 1 .....	111
Figura 297: Amostra 2 Vial 2 .....	112
Figura 298: Amostra 2 Vial 3 .....	112
Figura 299: Amostra 2 Vial 4 .....	112
Figura 300: Amostra 2 Vial 5 .....	112
Figura 301: Amostra 2 Vial 6 .....	112

Figura 302: Amostra 2 Vial 7 .....	113
Figura 303: Amostra (Deg.Acida) M2 .....	113
Figura 304: Amostra (Deg.Basica) M2 .....	113
Figura 305: Amostra (Deg.Acida) Vial 1 .....	113
Figura 306: Amostra (Deg.Acida) Vial 2 .....	113
Figura 307: Amostra (Deg.Acida) Vial 3 .....	114
Figura 308: Amostra (Deg.Acida) Vial 4 .....	114
Figura 309: Amostra (Deg.Acida) Vial 5 .....	114
Figura 310: Amostra (Deg.Acida) Vial 6 .....	114
Figura 311: Amostra (Deg.Acida) Vial 7 .....	114
Figura 312: Amostra (Deg.Basica) Vial 1 .....	115
Figura 313: Amostra (Deg.Basica) Vial 2 .....	115
Figura 314: Amostra (Deg.Basica) Vial 3 .....	115
Figura 315: Amostra (Deg.Basica) Vial 4 .....	115
Figura 316: Amostra (Deg.Basica) Vial 5 .....	115
Figura 317: Amostra (Deg.Basica) Vial 6 .....	116
Figura 318: Amostra (Deg.Basica) Vial 7 .....	116



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados para cálculo do Teor de Senosídeos.....	71
Tabela 2: Áreas dos padrões - método convencional Teor de Senosídeos .....	71
Tabela 3: Áreas das amostras - método convencional Teor de Senosídeos.....	71
Tabela 4: Resultados - método convencional Teor de Senosídeos.....	72
Tabela 5: Áreas da injeção 1 do padrão - método bidimensional - Teor de Senosídeos.....	72
Tabela 6: Áreas da injeção 2 do padrão - método bidimensional - Teor de Senosídeos.....	72
Tabela 7: Áreas da injeção 3 do padrão - método bidimensional - Teor de Senosídeos.....	72
Tabela 8: Média das áreas - método bidimensional - Teor de Senosídeos.....	72
Tabela 9: Áreas da amostra 1 - método bidimensional - Teor de Senosídeos .....	72
Tabela 10: Áreas da amostra 2 - método bidimensional - Teor de Senosídeos .....	73
Tabela 11: Áreas da amostra 3 - método bidimensional - Teor de Senosídeos .....	73
Tabela 12: Resultados - método bidimensional Teor de Senosídeos.....	73
Tabela 13: Dados para cálculo do Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína.....	73
Tabela 14: Áreas dos padrões - método convencional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína.....	73
Tabela 15: Áreas das amostras - método convencional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína.....	74
Tabela 16: Resultados - método convencional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína.....	74
Tabela 17: Áreas dos padrões - método bidimensional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína.....	74
Tabela 18: Áreas das amostras - método bidimensional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína.....	74
Tabela 19: Resultados - método bidimensional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína.....	74

## RESUMO

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL APLICADA A SENOSÍDEOS E NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DICLOFENACO SÓDICO, PARACETAMOL E CAFEÍNA. Neste trabalho são propostos métodos analíticos que envolvem a técnica de cromatografia líquida bidimensional para análise de fármacos. A cromatografia líquida bidimensional (LC × LC) fornece um aumento na capacidade de separação de pico em comparação com a técnica unidimensional. Com seu maior poder de separação, ocorre a redução das co-eluições, permitindo melhor quantificação. A separação ortogonal com base em mecanismos de separação diferentes pode melhorar a seletividade e facilitar a análise de compostos em amostras complexas. Um dos princípios que caracteriza a técnica LC-2D é a utilização de métodos ortogonais entre si, deste modo, picos que são eluídos na sequência A, B, C numa primeira coluna, serão eluídos em outra sequência numa segunda coluna que seja ortogonal à primeira. Seletividade é a capacidade do sistema cromatográfico de discriminar diferentes analitos e é determinada como a razão do fator de retenção de dois analitos, ou a relação entre os tempos de retenção. No método LC-2D, devem ser coletadas frações após a passagem por uma primeira coluna e reinjetadas em outra coluna, desta maneira, uma corrida cromatográfica de 10 minutos a um fluxo de 1 mL/minuto, coletando frações de 1 mL, representa 10 novas injeções. Estas frações reinjetadas em uma segunda coluna geram 10 novos cromatogramas, que quando unidos dão origem a uma superfície cromatográfica. Cromatogramas bidimensionais são importantes para avaliar picos cromatográficos sobrepostos não possíveis de serem visualizados numa análise cromatográfica convencional. As amostras utilizadas para ambos os testes foram quantificadas através de cálculos de teor e verificou-se que os métodos são precisos, reprodutivos e as frações coletadas quando quantificadas em comparação ao método inicial apresentaram boa recuperação. Foram desenvolvidos métodos de determinação do teor de senosídeos (série de derivados de antraquinona com efeito laxante), sendo glicosídeos diméricos de ocorrência abundante em plantas do gênero *Senna* e métodos de determinação do teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína. As amostras foram submetidas a condições de estresse para avaliar o surgimento de novas substâncias, caracterizadas como impurezas e/ou produtos de degradação. Comparando os resultados obtidos entre a técnica unidimensional e a bidimensional,

nota-se o aumento significativo da seletividade dos picos, além da resolução entre eles. Em uma análise unidimensional muitas vezes é necessário um tempo de corrida muito extenso para separação completa dos picos. Desenvolvendo métodos bidimensionais pode-se reduzir significativamente o tempo de corrida em uma primeira coluna, fazendo com que os picos sobrepostos sejam separados em uma segunda fase estacionária, ganhando em seletividade.

## ABSTRACT

A TWO-DIMENSIONAL LIQUID CHROMATOGRAPHY APPLIED FOR SENOSIDES AND DETERMINATION OF SIMULTANEOUS DICLOFENAC SODIUM, PARACETAMOL AND CAFFEINE. In this study are proposed analytical methods involving the two-dimensional liquid chromatography for drug analysis. The two-dimensional liquid chromatography (LC × LC) provides an increase in peak separation ability as compared with the technique dimensional. With its more powerful separation occurs reducing co-elutions, allowing better quantification. The orthogonal separation based on different separation mechanisms may improve the selectivity and facilitate analysis of compounds in complex samples. One of the principles characterizing 2D-LC technique is to use orthogonal methods to each other, thus peaks are eluted in the sequence A, B, C in the first column are eluted into another sequence in the second column that is orthogonal to the first . Selectivity is the ability of the chromatographic system of discriminating different analytes and is determined as the ratio of the retention factor of two analytes, or the ratio of the retention times. In the method 2D-LC, fractions should be collected after passing through a first column and reinjected into another column, thus, a chromatographic run 10 minutes at a flow rate of 1 ml / min, collecting fractions of 1 mL, 10 represents new injections. These fractions reinjected into a second column chromatograms new generation 10, which when joined together give rise to a chromatographic surface. Two-dimensional chromatograms are important to evaluate overlapping chromatographic peaks not able to be viewed on a conventional chromatographic analysis. The samples used for both tests were quantified by calculation of content and it was found that methods are needed, reproducible and fractions collected when compared with quantified method had good initial recovery. Methods have been developed for determination of senosides (series of anthraquinone derivatives with laxative effect), and dimeric occurring glycosides abundant in plants of the genus Senna and methods for determining the content of diclofenac sodium, paracetamol and caffeine. The samples were subjected to stress conditions to evaluate the appearance of new substances, characterized as impurities and / or degradation products. Comparing the results between one-dimensional and two-dimensional technique, note the significant increase in the selectivity of the peaks, and the resolution between them. In a dimensional analysis often requires a very long

running time for complete separation of the peaks. Developing two-dimensional methods can significantly reduce the running time on a first column, causing the overlapping peaks are separated in a second stationary phase, gaining in selectivity.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	1
1.2. Colunas cromatográficas .....	2
1.3. Seletividade.....	2
1.4. Aplicações da cromatografia em amostras de origem farmacêutica .....	3
1.5. Cromatografia bidimensional abrangente.....	3
1.6. Por que se trabalhar com métodos LC x LC <i>off-line</i> ?.....	13
1.7. Moléculas envolvidas neste trabalho.....	14
1.7.1. Diclofenaco Sódico .....	14
1.7.2. Paracetamol.....	15
1.7.3. Cafeína .....	16
1.7.4. Senna (Senosídeos) .....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivos gerais.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. DESENVOLVIMENTO .....	19
3.1. Parte experimental .....	19
3.1.1. Teor de Senosídeos.....	19
3.1.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína .....	23
3.2. Fluxo analítico para o desenvolvimento dos métodos convencionais e bidimensionais .....	26
3.3. Métodos Analíticos (condições cromatográficas finais) .....	28
3.3.1. Teor de Senosídeos.....	28
3.3.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína .....	29
3.4. Cromatogramas.....	31
3.4.1. Teor de Senosídeos.....	31
3.4.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína .....	51
3.5.MATLAB® .....	61
3.5.1. Teor de Senosídeos.....	62
3.5.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína .....	67
3.6. Cálculos.....	71
3.6.1. Teor de Senosídeos.....	71
3.6.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína .....	73

3.7. Vantagens e desvantagens .....	75
3.7.1. Vantagens.....	75
3.7.2. Desvantagens.....	76
4. CONCLUSÕES.....	76
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
APÊNDICE 1 .....	82

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência

Esta técnica de separação física é realizada em fase líquida. A amostra é separada em seus componentes ou analítos distribuindo-os entre a fase móvel e a fase estacionária. A fase móvel pode ser simplesmente um solvente orgânico e a fase estacionária pode ser partículas de sílica porosa embalada recheando a coluna cromatográfica.<sup>1</sup> A figura 1.1a é um esquema do processo cromatográfico onde uma mistura de analítos A e B são separados em duas faixas distintas à medida que migram para baixo da coluna. A figura 1.1b é uma representação do processo de particionamento dinâmico dos analítos entre o fluxo líquido e uma partícula de embalagem esférica.<sup>2</sup> O componente B é retardado na coluna por ter mais afinidade com a fase estacionária que o componente A. Um detector monitora a concentração do pico de cada componente separado e gera um traço denominado cromatograma, representado através da figura 1.1c. A técnica de alta eficiência utiliza fases móveis que possuem alto grau de pureza e devem estar livre de oxigênio ou outros gases dissolvidos, devendo ser filtradas e degaseificadas antes do uso. As bombas por sua vez devem ser capazes de proporcionar uma vazão contínua com alta reprodutibilidade, as válvulas de injeção possuem alças de amostragem para inserção de uma amostra com seringas e duas posições. Estas alças podem ter diversos volumes, variando de 5 µL a 2 mL. Os detectores mais utilizados são os ultravioletas, porém outros como o de fluorescência, índice de refração e eletroquímicos também são empregados. E por fim as separações podem se por adsorção, partição ou ambos.<sup>3</sup>



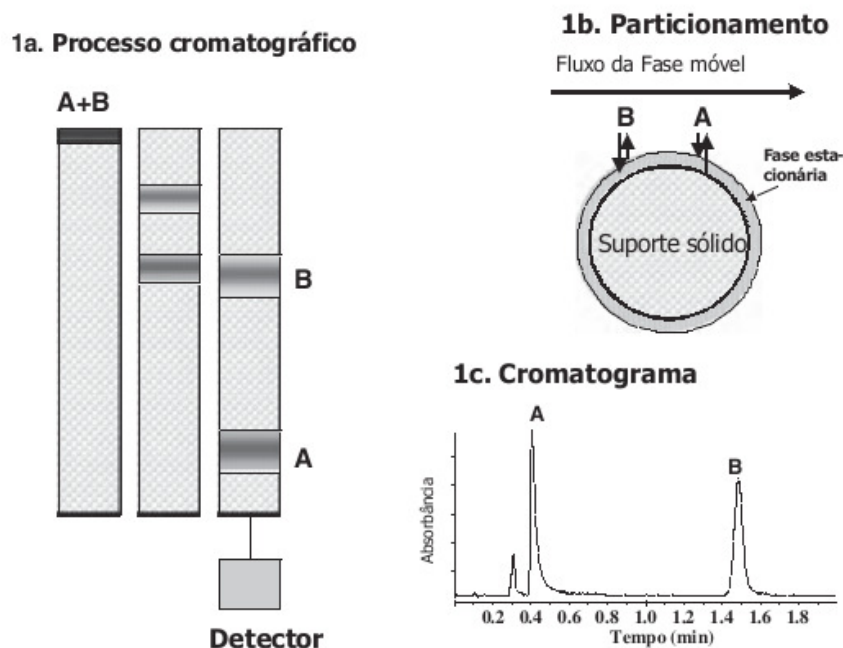


Figura 1: (a) Processo cromatográfico que mostra a migração de duas bandas de componentes para baixo de uma coluna. (b) Representação microscópica do particionamento de moléculas do analito A e B para a fase estacionária ligada a um suporte esférico.<sup>1</sup>

## 1.2. Colunas cromatográficas

A separação de misturas de analitos em cromatografia líquida é realizada no dispositivo chamado de coluna cromatográfica. As colunas de cromatografia líquida, na maioria dos casos, tem o esqueleto de aço inoxidável contendo materiais poliméricos e porosos rígidos. A coluna é o "coração" do sistema cromatográfico e é o único dispositivo onde a separação real dos componentes da amostra ocorre.<sup>4</sup>

## 1.3. Seletividade

É a habilidade do método em separar os compostos de interesse e componentes da amostra em que serão visíveis no detector de um sistema cromatográfico. O aumento da seletividade no desenvolvimento da separação de uma mistura complexa é o principal objetivo de qualquer cromatógrafo. Em um caso ideal a seletividade do sistema só é dependente da diferença na interação dos analitos com a fase estacionária. A seletividade é principalmente dependente da natureza dos analitos e sua interação com a superfície da fase estacionária. Se uma mudança dramática da seletividade é necessária para uma separação particular, a melhor solução é a substituição do tipo da fase estacionária.<sup>5</sup>

#### **1.4. Aplicações da cromatografia em amostras de origem farmacêutica**

Na indústria farmacêutica moderna a cromatografia líquida de alta eficiência é a principal ferramenta analítica aplicada em todas as fases da descoberta de drogas, desenvolvimento e produção. O desenvolvimento de novos compostos é fundamentado sob duas atividades principais: a descoberta da droga e o desenvolvimento de medicamentos. O desenvolvimento de método eficaz e rápido é de extrema importância ao longo do ciclo de vida do desenvolvimento de medicamentos. Isto requer uma compreensão profunda dos princípios da cromatografia líquida e a teoria é a base sólida para apreciar as muitas variáveis que são aprimoradas durante o desenvolvimento rápido e eficaz de seus métodos e o aprimoramento do processo cromatográfico. O parâmetro seletividade, para métodos cromatográficos que utilizam a técnica na indústria farmacêutica, é considerado importante para o desenvolvimento e avaliação crítica destes métodos e deve ser devidamente avaliado na seção de desenvolvimento analítico destes métodos.<sup>5</sup>

#### **1.5. Cromatografia bidimensional abrangente**

Um grande número de colunas foi desenvolvido para suprir a necessidade de garantir que estes parâmetros estejam de acordo com os mais rigorosos guias farmacopéicos mundiais. O grande problema está associado à separação de compostos que possuam estruturas complexas, moléculas com alta massa molecular ou que apresentam uma grande quantidade de compostos ativos para um mesmo método analítico. Em se tratando de cromatografia bidimensional, o que pode acontecer é a co-eluição ou baixa resolução de alguns compostos em uma determinada coluna cromatográfica e que podem se separar em um segundo método com uma coluna de diferente polaridade.<sup>6</sup>

Diversos estudos têm sido desenvolvidos quanto à pesquisa que envolve a análise de amostras complexas. Apesar dos progressos recentes quanto a estes estudos, o desempenho da separação de amostras complexas por cromatografia líquida, em alguns casos, não é suficiente para resolver adequadamente constituintes da amostra dentro de um único método. A cromatografia líquida bidimensional (CL x CL) foi aplicada para melhorar a separação e reduzir a complexidade da amostra a um nível aceitável, que representa o número máximo de componentes que poderiam ser teoricamente separados em uma determinada coluna.<sup>7</sup> Amostras complexas

requerem métodos analíticos de alto poder de resolução, a fim de fornecer uma análise confiável dos componentes da amostra. As análises são frequentemente realizadas em mais de uma dimensão analítica, a fim de fornecer a resolução necessária. Esta ferramenta pode então fornecer ricas informações sobre amostras complexas tanto quanto proporcionar uma melhoria de purificação da amostra. A maioria das abordagens para esta técnica envolvem o acoplamento de uma segunda coluna e também a coleta de frações cromatográficas da primeira coluna seguida por uma reinjeção dos materiais coletados para esta segunda coluna. Em um modo *off-line*, as frações são coletadas em frascos e reinjetadas na segunda coluna. Em um modo *on-line*, uma válvula de comutação é usada para realizar todo este trabalho. Porém o pesquisador poderá selecionar a região de interesse para reinjeção diretamente na segunda coluna. Todas essas abordagens têm a limitação de apenas submeter uma porção da amostra. Para obter uma separação 2-D abrangente de toda a amostra, é desejável que: cada mecanismo de separação seja escolhido de forma a minimizar a quantidade de informação cruzada nos dois sistemas, isto é, os dois mecanismos de separação devem ser diferentes, ou o mais ortogonal possível. Outros aspectos desejáveis estão relacionados ao tempo de análise relativamente curto, a automação de todo o sistema, às condições de funcionamento flexíveis, e a eficaz representação dos dados em duas dimensões.<sup>8</sup>

Uma separação bidimensional abrangente é aquela que emprega ambas as dimensões de separação e desenha cada uma destas dimensões para os componentes de uma amostra. Este tipo de separação multidimensional pode melhorar bastante o desempenho analítico sobre uma única coluna. Os resultados destas duas dimensões precisam ser visualizados como parcelas ou como superfícies tridimensionais, o que representa um paradigma na mudança de cromatogramas unidimensionais que é plotado como resposta do detector em função do tempo.<sup>9</sup>

Esta técnica é muito útil para aumentar a resolução de múltiplos picos coeluídos na primeira coluna e acabam resolvidos no sistema de segunda dimensão de separação. Há muitas combinações de técnicas de separação e métodos de acoplamento destas técnicas atualmente empregadas em sistemas de separação multidimensional.<sup>10</sup>

Tratando-se de métodos cromatográficos ortogonais uma maneira de checar a especificidade é desenvolver um método secundário a fim de separar os picos de

interesse utilizando um mecanismo diferente ou mesmo modificando algum parâmetro cromatográfico, bem como diversos outros fatores que possam ser avaliados durante a fase de desenvolvimento na elaboração efetiva deste método secundário.<sup>11</sup>

Em impurezas envolvidas ou até mesmo os possíveis compostos de degradação que podem estar coeluídos com algum outro pico de interesse, a técnica bidimensional pode ser largamente utilizada, pois pode provocar a separação e o isolamento destes picos que antes estariam coeluídos. São casos como estes que requerem um método ortogonal que envolve duas separações em diferentes seletividades que produzem tempos de retenção diferentes que por fim dois picos não resolvidos em um cromatograma estarão separados em um segundo cromatograma. Neste caso, o termo ortogonal utilizado na indústria farmacêutica está associado a separações que provem diferentes tempos de retenção. Porém, em uma análise comparativa dos cromatogramas obtidos com as diferentes colunas para provar que o método é ortogonal e separou os picos em questão, a ordem de eluição dos compostos devem ser alterada também.<sup>12</sup> Alguns desenvolvimentos podem apresentar picos não resolvidos em um primeiro cromatograma que podem apresentar-se devidamente resolvidos ou separados em um segundo método que é tido como ortogonal ao primeiro utilizado. Métodos que apresentam picos cromatográficos de compostos de degradação ou impurezas apresentam uma quantidade maior de picos em um mesmo cromatograma e alguns deles podem se apresentar coeluídos e se mostrar separados em um método secundário quando algum fator cromatográfico for alterado, caracterizando assim um método ortogonal ao primeiro. Ao fim de um estudo completo e aplicação do método ortogonal, dependendo do caso, podem ser desenvolvidos mais de um método e o que irá determinar qual método deverá ser tido como ortogonal ao primeiro são fatores como medida de pureza dos picos envolvidos, separação e boa resolução entre os picos envolvidos, bem como economia de reagente ou menor tempo de corrida com mesma ou maior resolução entre os picos cromatográficos.<sup>13</sup> A figura 2 apresenta representações de algumas interações amostra-coluna.

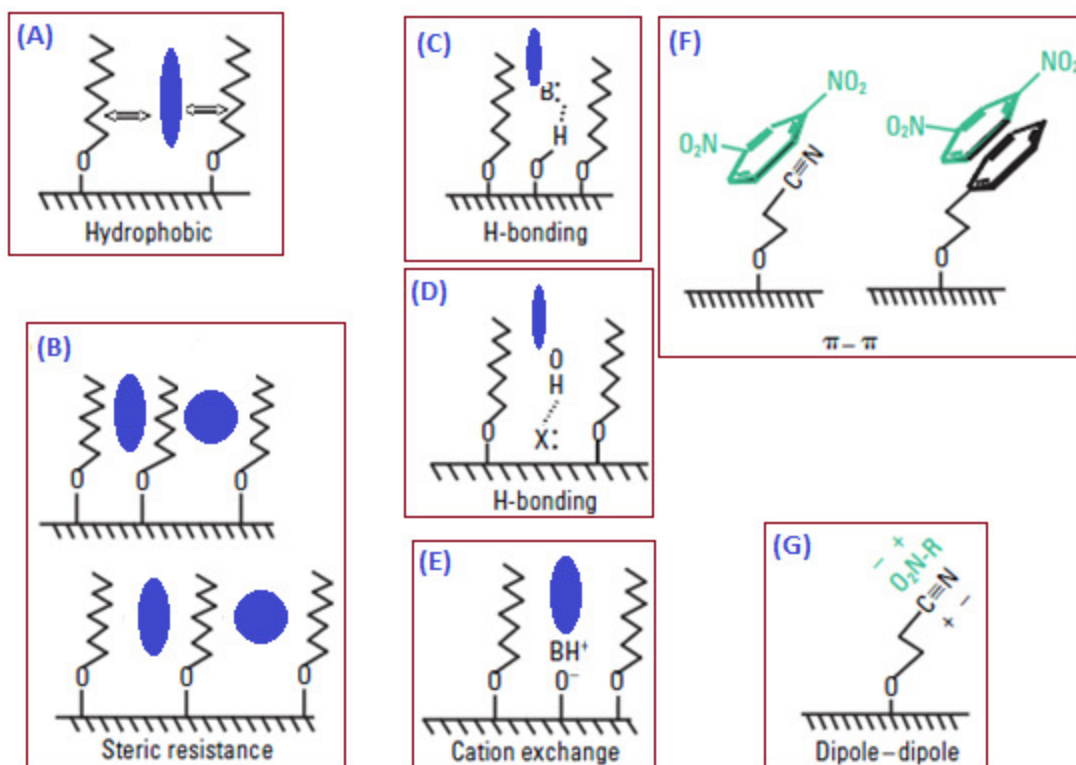


Figura 2: Ilustração de várias interações amostra-colunas que podem afetar a seletividade.<sup>14</sup>

A interação hidrofóbica (figura 2a) é a atração de moléculas de amostra relativamente apolar (verde) para o em torno da fase estacionária C8 apolar. Um grande número de testes de cromatografia que envolvem diferentes solutos e condições cromatográficas foram destinados a medir vários tipos de soluto para caracterizar a seletividade das colunas.<sup>14</sup> Não foi demonstrado que algumas combinações de testes de colunas são suficientes para descrever completamente a seletividade de diferentes colunas e permitir uma escolha de confiança para uma determinada aplicação. Esta abordagem de seletividade começou com o reconhecimento de que a retenção é dominada por interações hidrofóbicas entre moléculas da amostra, a fase móvel e a fase estacionária.<sup>15</sup> No entanto, outras interações entre os solutos mais fracos e as fases estacionárias também podem contribuir para a retenção e, especialmente, a seletividade. Em cada caso, um procedimento quantitativo é necessário para comparar a seletividade das duas colunas.<sup>16</sup> A seleção de colunas a serem testadas no desenvolvimento do método pode ser realizada com o auxílio de um *software* de computador. A vantagem apresentada pelo programa é que ao escolhermos uma coluna para o método convencional ou inicial, em seguida é exibida uma lista de 10 fases estacionárias e alguns parâmetros pelos quais é possível avaliar quais destas serão escolhidas e

que possuem polaridades mais opostas possíveis à coluna convencional, é um guia para os testes preliminares. Este *software* está disponível ao público no site da Farmacopéia Americana ([www.usp.org](http://www.usp.org))<sup>17</sup>. Um exemplo da seleção de uma coluna equivalente é resumido na figura 3. A coluna Luna C<sub>18</sub> da Phenomenex foi escolhida para um ensaio de rotina (figura 3a). Para encontrar colunas alternativas, valores de  $F_s$  (obtidos através de equações envolvendo fatores específicos de cada coluna) foram determinados para várias colunas. Duas colunas equivalentes foram a Prodigy ODS da Phenomenex e a Inertsil ODS-3 de GL Science.<sup>18</sup> Essas duas colunas são de fato equivalentes à coluna original, proporcionando separações quase idênticas em cada caso. Uma coluna um pouco diferente, a H80 J'Sphere da Waters resultou em uma separação inaceitável (figura 3d).<sup>19</sup>

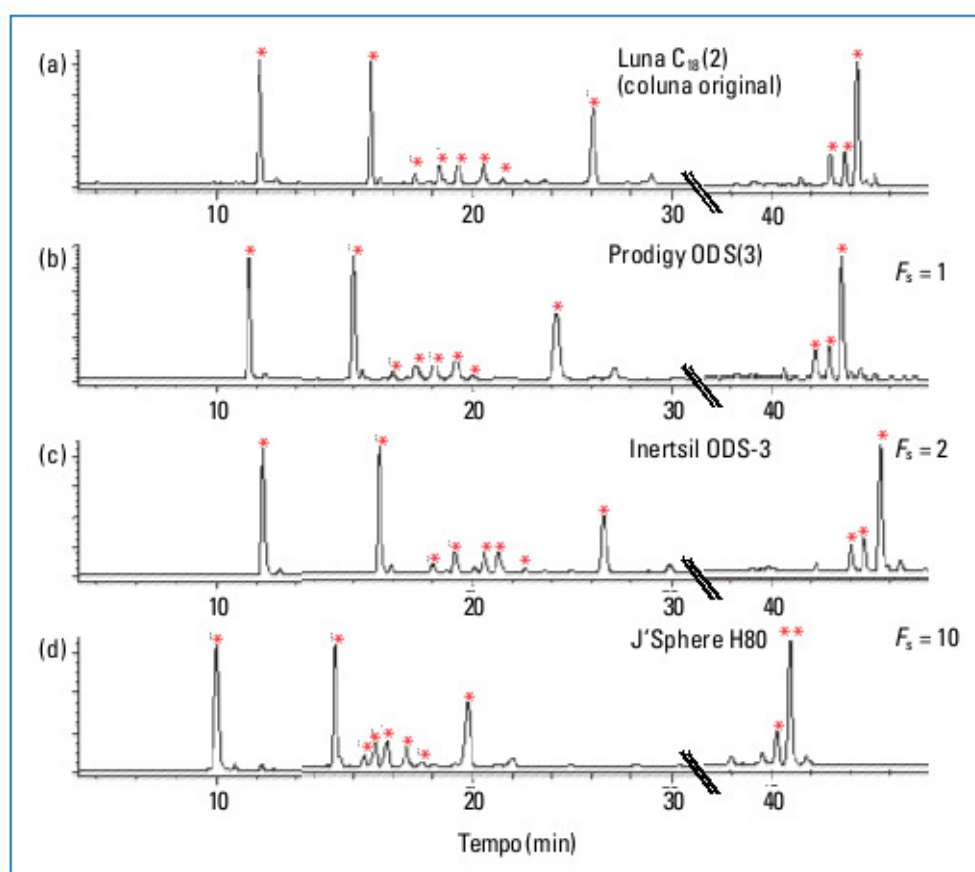


Figura 3:  $F_s$  de colunas cromatográficas.<sup>12</sup>

Para a separação de uma amostra envolvendo um procedimento cromatográfico de fase reversa, a coluna exibida na figura 3 pode ser revertida e a seletividade da melhor coluna é uma função da amostra, em vez da coluna. Existem diferentes motivos para a escolha de uma segunda fase estacionária.<sup>20</sup> Primeiro, uma grande mudança na seletividade da separação pode ser necessária para melhorar a

resolução de picos cromatográficos e segundo, durante o desenvolvimento do método para amostras de composição desconhecida, não pode ser uma preocupação por parte dos pesquisadores de que um menor componente pode ser sobreposto por picos no cromatograma e, portanto, não atendida na análise final.<sup>21</sup> Em terceiro, uma situação semelhante pode surgir. O uso de um procedimento de rotina para amostras que possam conter impurezas imprevistas. Nestes casos é desejável dispor de separações ortogonais, em seletividade, que é muito diferente da prevista pelo ensaio original; isso aumenta a probabilidade de separação de dois picos inicialmente sobrepostos.<sup>22</sup> Uma mudança na seletividade da separação pode ser alcançada por uma mudança na fase móvel ou mesmo temperatura da coluna. Um simples procedimento de seleção de condições para uma separação ortogonal sobre a base de uma mudança na coluna, combinada com uma mudança no solvente da fase móvel de um outro método tem sido descrito na bastante na literatura.<sup>23</sup> A figura 4a mostra um cromatograma para um ensaio original de rotina. Esta amostra foi inicialmente acreditada para conter um ingrediente ativo (pico 3) e quatro impurezas (picos 1, 2, 4 e 5); picos marcados com \* são artefatos do gradiente. O método ortogonal (figura 5b) mostra outro pico que foi sobreposto pelo pico 3 na separação original. Antes desta separação ortogonal que estava disponível, o pico 6 neste exemplo em particular foi esquecido.<sup>24</sup> O valor de  $F_s$  para as duas colunas na figura 4 foi intencionalmente grande ( $F_s = 196$ ); metanol foi utilizado para a fase móvel na figura 4b, em vez de acetonitrila na figura 4a.<sup>25,26,27,28</sup>

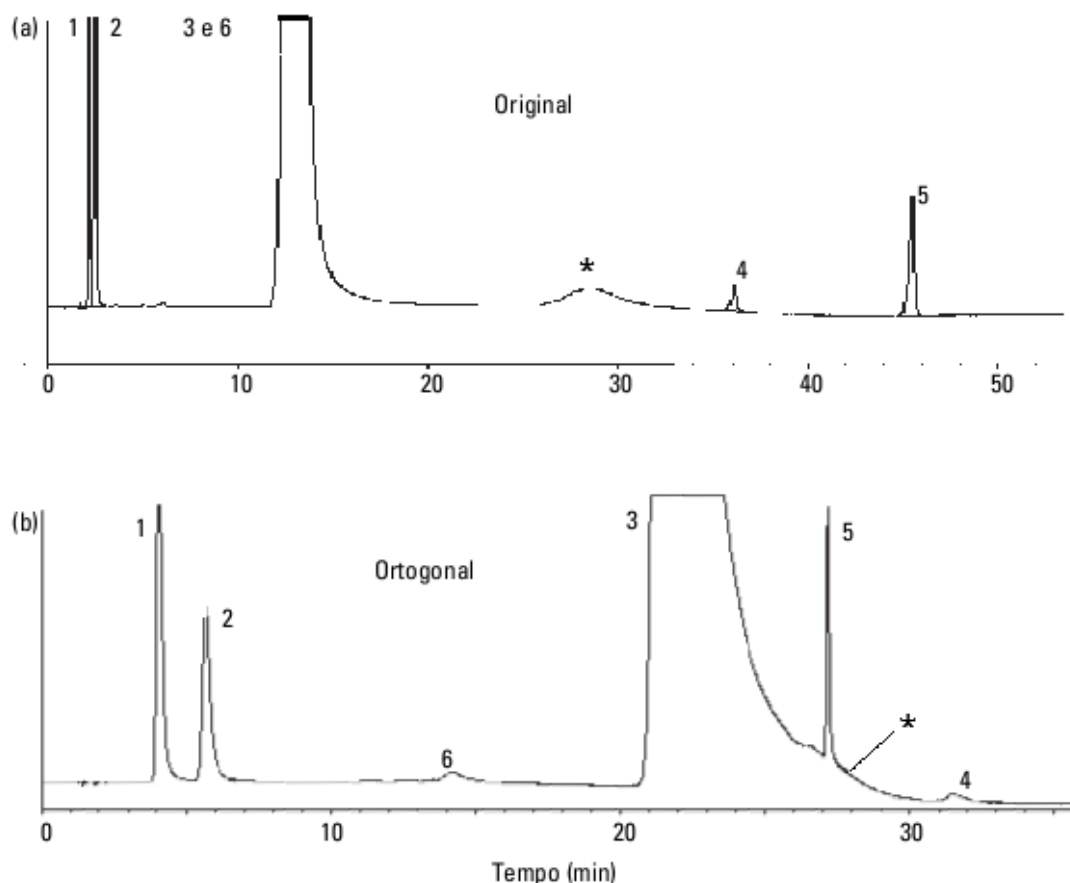


Figura 4: Comparação de separação por um método original x método ortogonal.<sup>13</sup>

O estudo mostra o efeito da seletividade na primeira dimensão da coluna cromatográfica em fase reversa utilizando a linha da cromatografia líquida LC x LC.<sup>29</sup> Diversos tipos de amostras foram investigadas e analisadas sendo necessárias dois tipos de eluições diferentes para causar a eluição total a partir da coluna cromatográfica da primeira dimensão.<sup>30</sup> No caso foram comparados os cromatogramas LC x LC medindo a capacidade dos picos e números de picos. A conclusão é que para alguns casos cerca de seis tipos de fases móveis na primeira dimensão mostraram padrões de separação dos picos muito semelhantes quando comparados com a segunda coluna cromatográfica.<sup>31</sup> Este resultado simplifica a tarefa de escolher o par correto de fases para fase reversa x fase reversa, ainda mais em se tratando de ingredientes ativos farmacêuticos de cadeia complexa (Senosídeos) ou por mais de um pico por método (Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína).

O poder de separação da técnica (LC x LC) é grande para este tipo de método em comparação a métodos (1D-LC). O conceito LC x LC foi introduzido há três décadas e recentemente Peter W. Carr realizou alguns estudos em LC x LC em amostras



com os tempos de análise entre 15-60 minutos, entretanto com a segunda dimensão executada na escala de 6-40 segundos e durante a segunda dimensão utilizou de temperaturas entre 100 e 120°C.<sup>32</sup> Com isso, a viscosidade do eluente diminuiu consideravelmente e o fluxo pode ser aumentado para cerca de 3 mL/minuto. Stoll comparou as capacidades de picos e quantidade de picos observados entre as duas técnicas e concluiu que a performance da técnica LC-LC pode encurtar consideravelmente o tempo de corrida, além de melhorar a capacidade do pico.<sup>33</sup>

Concluiu-se que para amostras de extratos que possuem cadeias grandes, que a amostragem da primeira dimensão deve ser rápida o suficiente para limitar as perdas resultantes da resolução entre os picos e em segundo lugar que os tempos de retenção da primeira e segunda dimensão devem ser minimamente correlacionados. Isto é frequentemente chamado de ortogonalidade. Em terceiro, os picos das amostras devem cobrir todo o espaço de separação 2D. Em condições práticas, os 3 critérios supracitados devem ser atendidos para que a técnica seja considerada LC x LC.<sup>34,35</sup>

Existem alguns fatores que podem corroborar para que os critérios sejam atendidos com maior rapidez e qualidade, um deles é trabalhando com a escolha de colunas com ortogonalidades bem distintas uma das outras dentro da primeira e segunda dimensão. Outro fator seria avaliar o efeito de gradientes para a fase móvel em uma das dimensões, fazendo com que a ortogonalidade possa aumentar. Para os desenvolvimentos dos métodos foram testados fatores como alterações de componentes da fase móvel entre as duas dimensões, alteração do pH de componentes da fase móvel, utilização de gradientes e por fim, a grande mudança e que acarreta-se nos melhores resultados é a troca de colunas cromatográficas.<sup>36</sup>

Nos gráficos da figura 5 é possível verificar as três dimensões da coluna de LC x LC e estes não mostram a clara superioridade de qualquer uma das seis fases móveis da primeira dimensão, isto se deve ao grande número de picos que são difíceis de diferenciar. Estas seis diferentes fases móveis apresentam diferenças bem sutis, o que não significa que para outros métodos elas não possam ser úteis.<sup>37</sup>

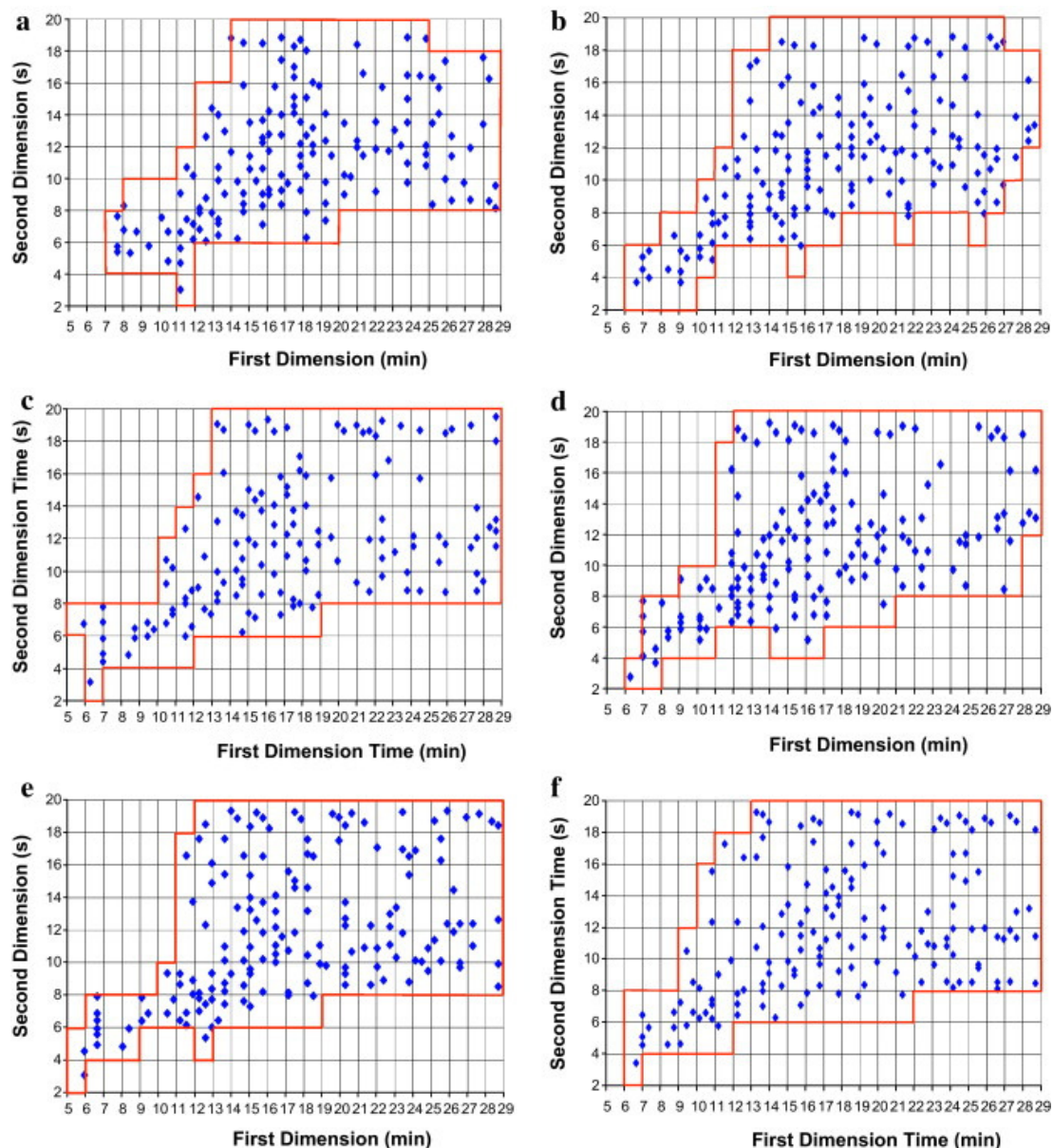


Figura 5: LC  $\times$  LC e as parcelas de amostras de extrato de milho, utilizando seis diferentes fases (a) Coluna Discovery HS-F5, (b) Coluna Zorbax 300SB-C3; (c) Coluna Zorbax 300SB-C8, (d) Coluna Zorbax SB-CN, (e) Coluna Zorbax Bonus-RP; e (f) Coluna home-made.<sup>29</sup>

A figura 6 ilustra a importância da utilização em LC  $\times$  LC de fatores que podem incapacitar a ortogonalidade do método, e traz tipos de soluções que podem ser utilizadas no cotidiano para suprir grandes tempos de corrida, picos coeluídos e mal resolvidos que ocorrem com frequência em cromatogramas de métodos (1D-LC).<sup>38,39,40</sup>

Outro exemplo da técnica multidimensional LC  $\times$  LC analisando compostos fenólicos e antioxidantes naturais é mostrado no artigo <sup>41</sup>. No caso, na primeira dimensão foi utilizada uma coluna de sílica-PEG e uma C18 na segunda dimensão. Os resultados demonstraram que a combinação entre as colunas de PEG e C18 forneceram uma

baixa seletividade entre a primeira e segunda dimensão. O que fez com que o método ganhasse ortogonalidade foi a utilização de gradientes nas duas dimensões durante a separação dos picos. Esse mix de colunas e gradientes em duas dimensões fez com que os picos ganhassem resolução e aumentassem a capacidade de separação entre os picos que representavam os compostos em questão, porém com a utilização de duas colunas, sendo uma de fase normal e outra de fase reversa, foram utilizados dois cromatógrafos com específicas fases móveis para cada método em análise.

O artigo escrito por Evans C.R. e Jorgenson J.W., que mostra a utilização da técnica multidimensional LC x LC na separação de moléculas biológicas. Segundo os autores em separações multidimensionais, dois ou mais métodos de separação independentes são acoplados, em um esforço único para resolver misturas complexas. A principal vantagem de separações multidimensionais frente aos unidimensionais é o alto potencial de resolução. O método multidimensional eleva o poder de separação dos picos, garantindo aos picos cromatográficos esta resolução almejada.<sup>42</sup>

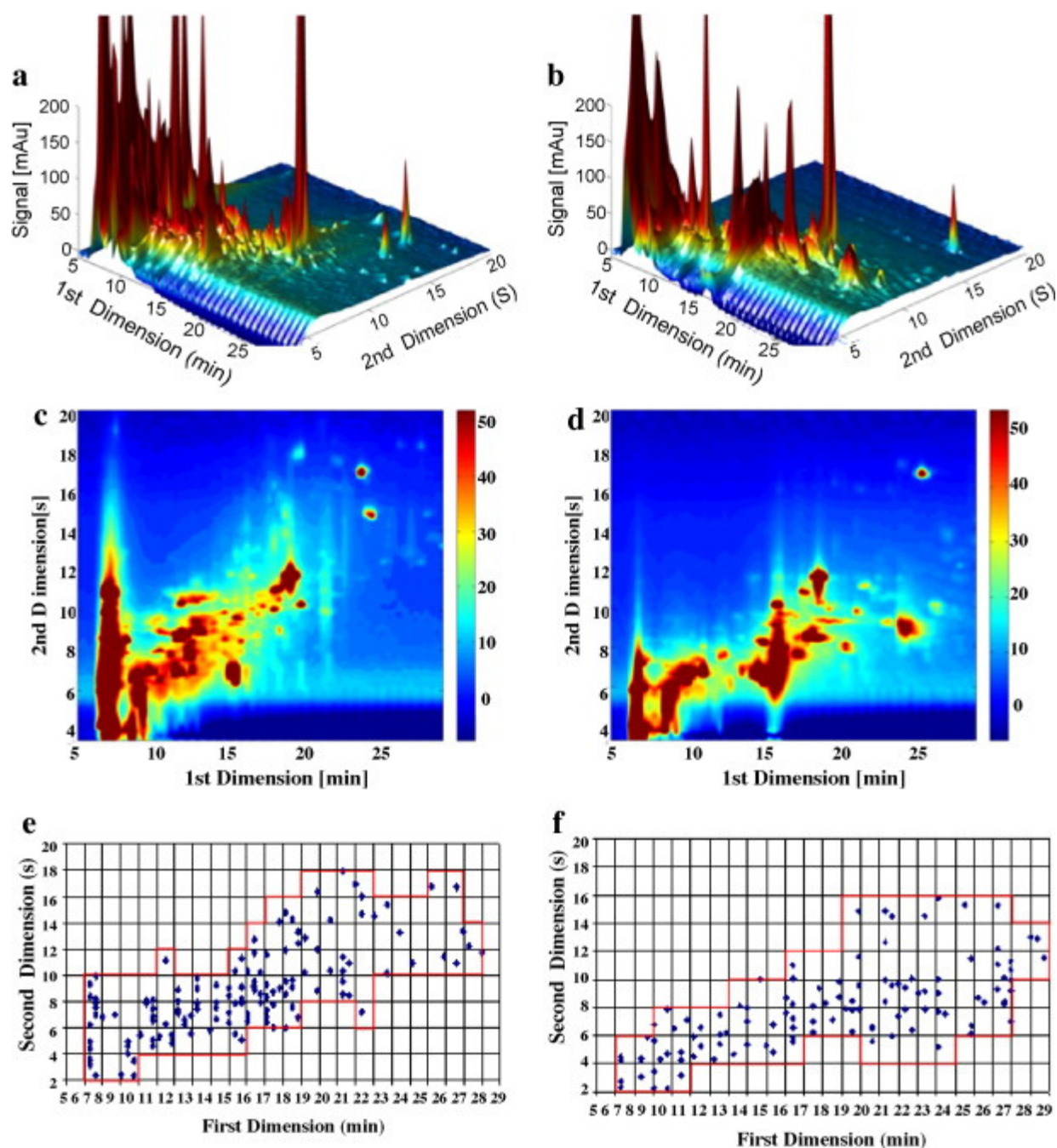


Figura 6: (a) LC  $\times$  LC com a coluna C3, (b) LC  $\times$  LC com a coluna Bônus, (c) LC  $\times$  LC traçado de contorno coluna C3, (d) LC  $\times$  LC contorno plotado com a coluna Bônus, (e) LC  $\times$  LC trama com a coluna C3, e (f) LC  $\times$  LC trama com a coluna Bônus.<sup>37</sup>

### 1.6. Por que se trabalhar com métodos LC x LC *off-line*?

Um artigo que ilustra os benefícios da utilização da técnica *off-line* para o desenvolvimento de métodos (LC  $\times$  LC) é descrito pela empresa Dionex Thermo Scientific que em um primeiro momento ilustra os pontos positivos da técnica LC  $\times$  LC onde as separações multidimensionais estão cada vez mais sendo utilizadas para análises em amostras complexas dentro da indústria farmacêutica com o intuito

de aumentar a resolução entre os picos e pontua a importância de um parâmetro a ser considerado importante, a utilização da abordagem *off-line*.

A escolha pela técnica *off-line* garante ao sistema mais flexibilidade e separações mais eficientes podendo ser utilizados uma gama maior de colunas e fase móvel, o que permite a capacidade de realizar re-injeções de frações, nas quais o pesquisador tem flexibilidade para coletá-las como desejar. O ponto principal que o artigo mostra é a utilização de um instrumento que é considerado um amostrador automático cuja função é garantir a repetibilidade da coleta de frações da primeira coluna para a segunda coluna. A figura 7 ilustra que a presença de um amostrador automático em um método *off-line* garante ao sistema a repetibilidade necessária para que as frações coletadas possam ser re-injetadas em outra coluna de tal modo que os picos ganhem a resolução e capacidade de separação esperados.<sup>43</sup>

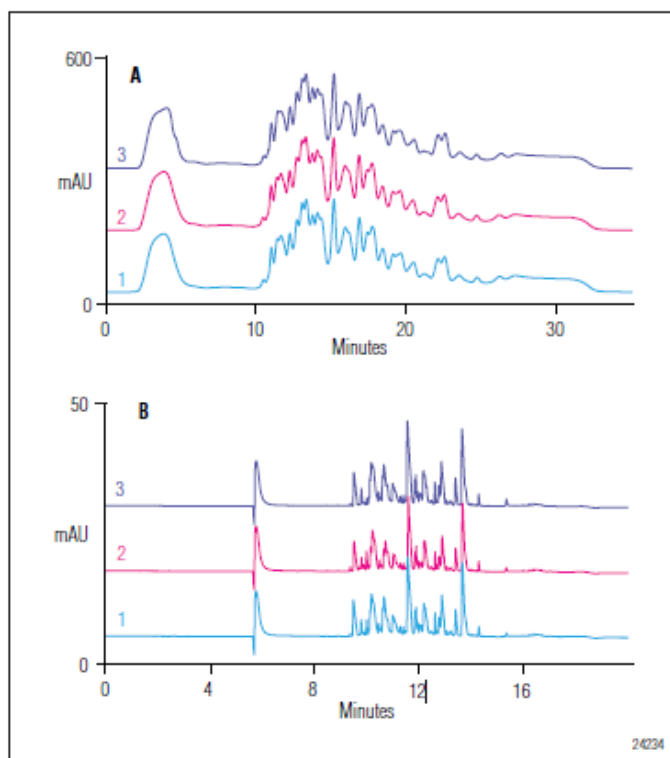


Figura 7: Segunda dimensão, cromatogramas LC utilizando o modo *off-line* com amostrador automático.<sup>43</sup>

## 1.7. Moléculas envolvidas neste trabalho

### 1.7.1. Diclofenaco Sódico

A figura 8 representa a molécula do Diclofenaco Sódico, sódio [o-(2,6-dicloroanilino) fenil acetato] é uma droga relativamente segura e eficaz com ações anti-reumáticas,

analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas, com sua utilização amplamente voltada para o tratamento de doenças degenerativas das articulações e outras condições artríticas.<sup>44</sup>

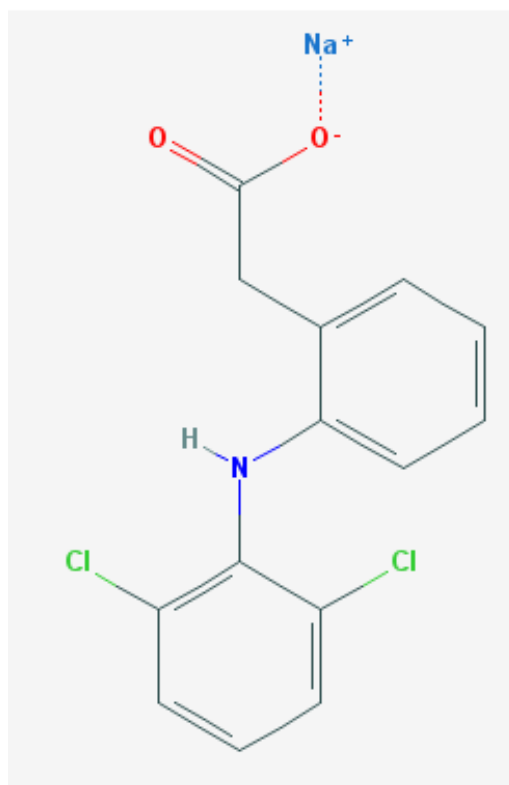


Figura 8: Molécula do Diclofenaco sódico.<sup>44</sup>

Pode ser fornecido tanto como o sódio ou sal de potássio no Reino Unido, Índia, Brasil e Estados Unidos. Na China, na maioria das vezes como o sal de sódio, enquanto em alguns outros países apenas como o sal de potássio e está disponível como um medicamento genérico em um número de formulações.

A ação de uma única dose é muito maior (6 a 8 horas) do que o próprio período de meia-vida curta que a droga indica.<sup>45</sup>

### 1.7.2. Paracetamol

A figura 9 representa a molécula do Paracetamol ou acetaminofeno é um analgésico e redutor de febre. Comumente utilizado para o alívio de dores de cabeça, é um ingrediente importante em muitos remédios para resfriado e gripe. Em combinação com outros analgésicos, o paracetamol também pode ser usado no tratamento da dor mais intensa como a dor pós-cirúrgica e prestação de cuidados paliativos em pacientes com câncer avançado.<sup>46</sup>

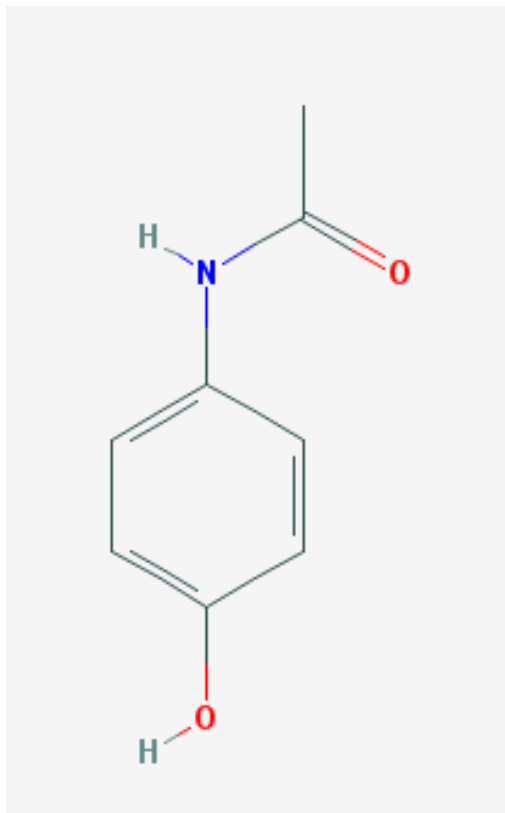


Figura 9: Molécula do paracetamol.<sup>46</sup>

A toxicidade do paracetamol é a principal causa de insuficiência hepática aguda no mundo ocidental. Não é considerado cancerígeno em doses terapêuticas. O uso prolongado diariamente aumenta o risco de complicações gastrointestinais superiores, tais como sangramento do estômago, e podem causar danos nos rins ou fígado. O paracetamol é metabolizado pelo fígado e é hepatotóxico. Os efeitos secundários podem ser mais prováveis em alcoólatras crônicos ou pacientes com danos hepáticos.<sup>47</sup>

### 1.7.3. Cafeína

A cafeína, representada pela figura 10, é um alcalóide cristalino branco que atua como uma droga estimulante. A cafeína é encontrada em quantidades variáveis nas sementes, folhas e frutos de algumas plantas, onde age como um pesticida natural que paralisa e mata alguns insetos que se alimentam de plantas. Algumas fontes incluem erva mate e frutos do guaraná. Em humanos, a cafeína age como um estimulante do sistema nervoso central e temporariamente afasta sonolência. É a droga mais consumida do mundo, mas, ao contrário de muitas outras substâncias

psicoativas, é legal e não regulamentada em quase todas as partes do mundo. Em algumas pessoas, a cafeína pode causar a interrupção do sono, especialmente durante a noite.<sup>48</sup>

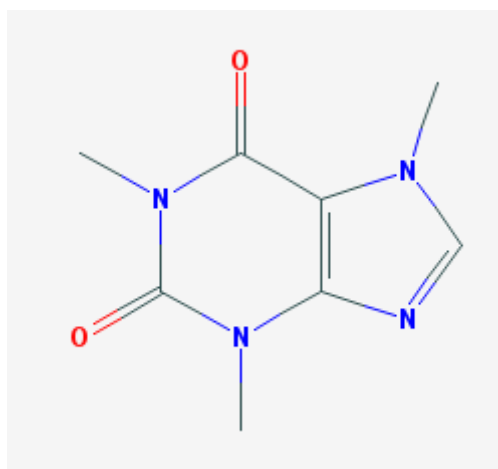


Figura 10: Molécula da cafeína.<sup>48</sup>

O uso regular pode desenvolver uma tolerância forte para este efeito, e os estudos geralmente não apoiaram a noção comum de que o consumo normal de bebidas com cafeína contribui significativamente para a desidratação. A cafeína foi isolada pela primeira vez do café em 1820 pelo químico alemão Ferdinand Runge Friedlieb, e depois de forma independente em 1821 pelo francês Pierre Robiquet químicos, Pierre Pelletier e Joseph Caventou.<sup>49</sup>

#### 1.7.4. Senna (Senosídeos)

Glicosídeos Senna ou senosídeos, representados pela figura 11, são uma série de derivados de antraquinona e são úteis como um laxante. Eles são glicosídeos diméricos, nomeados após a sua ocorrência abundante em plantas do gênero Senna.

Senna (do árabe Sana) é um grande gênero de plantas de florescência na família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. O número de espécies é geralmente estimado em cerca de 260, mas alguns autores acreditam que existem mais de 350. Os Sennas são normalmente arbustos ou subarbustos, alguns são ervas ou árvores de pequeno porte. Muitas espécies têm nectários extraflorais e a inflorescência é um cacho, ou algum arranjo.<sup>50</sup>



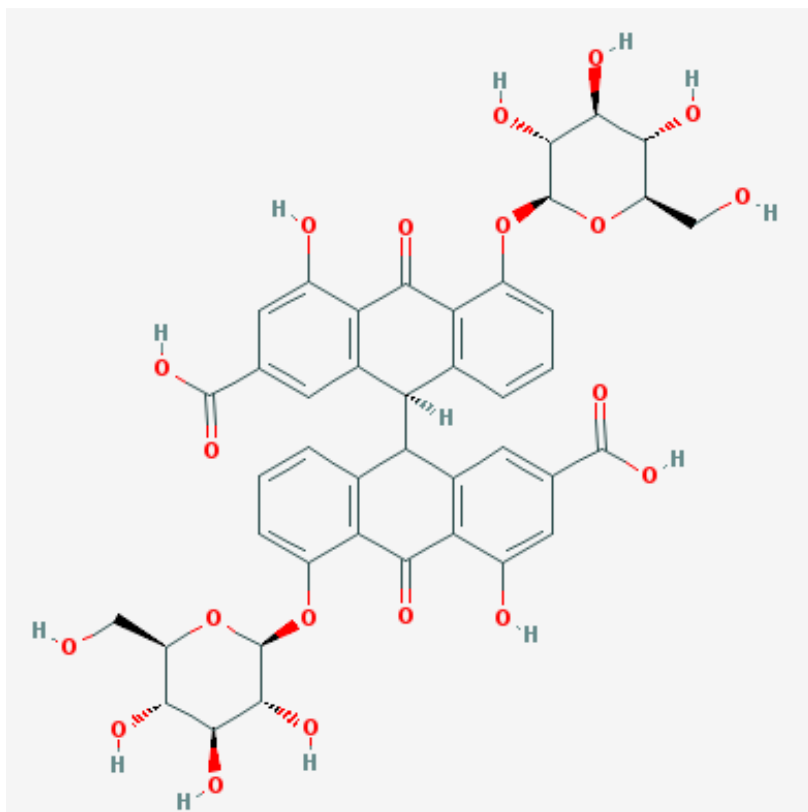


Figura 11: Molécula do senosídeo.<sup>50</sup>

As flores das plantas do gênero *Senna* não produzem néctar. Elas são polinizadas e oferecem pólen como uma recompensa para os polinizadores. Espécies de *Senna* fazem boas plantas ornamentais e são utilizadas para paisagismo. A grande variedade de espécies e adaptações ecológicas faz, pelo menos, um punhado de sennas adequado para qualquer clima mais quente do que temperados.

Na medicina Sennas têm por milênios desempenhado um papel importante na fitoterapia e medicina popular. Alexandrina Senna (*S. Alexandrina*) foi e ainda é um item importante pelo povo Ababdeh e cultivadas comercialmente, tradicionalmente ao longo do Nilo, mas mais geralmente em muitas regiões do noroeste do Oceano Índico. Sennas atuam como purgantes e tem como ativos derivados de ingredientes de antraquinona e seus glicosídeos.<sup>51</sup> Ela aumenta os movimentos peristálticos do cólon pela mucosa do cólon irritante. As plantas são na maioria das vezes preparadas como uma infusão. O uso de longa data, principalmente de Alexandria Senna é refletido pela sua presença em muitos remédios de ervas e tônicos. Senna também é o principal ingrediente encontrado na maioria dos chás dietéticos. A combinação de agir como um estimulante que reduz o apetite e as propriedades laxativas que provocam o alimento se mova através de seu sistema antes de tantas calorias pode ser absorvida é uma combinação que pode levar à rápida perda de

peso.<sup>52</sup> Todas as moléculas utilizadas neste trabalho são provenientes de compostos largamente utilizados na indústria farmacêutica e por estarem mais facilmente acessíveis nas mesmas, foram escolhidas para compor as amostras testes dos métodos desenvolvidos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

Esse trabalho teve como objetivo geral avaliar a técnica de cromatografia bidimensional ortogonal como ferramenta analítica dentro dos setores de Controle de Qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento das indústrias farmacêuticas.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar teor de senosídeos em plantas do gênero *Senna* pelos métodos convencionais e bidimensional avaliando precisão e reprodutibilidade dos métodos. Evitando ao máximo co-eluições devido à grande complexidade do extrato analisado.
- Avaliar métodos de determinação do teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína em um medicamento que contém os ingredientes ativos.
- Avaliar o surgimento de impurezas através de testes em condições de estresse.

## **3. DESENVOLVIMENTO**

### **3.1. Parte experimental**

#### **3.1.1. Teor de Senosídeos**

A figura 12 mostra que para as condições cromatográficas expostas para o método convencional seguindo como parâmetro os guias farmacopéicos como base para desenvolvimento das condições ideais para o método, o cromatograma obtido apresentou as seguintes características. Este cromatograma da figura 12 ilustra exatamente as condições descritas dentro do método convencional e foram

necessários uma série de testes para se chegar a uma condição para o desenvolvimento final do método bidimensional em relação ao convencional desenvolvido.

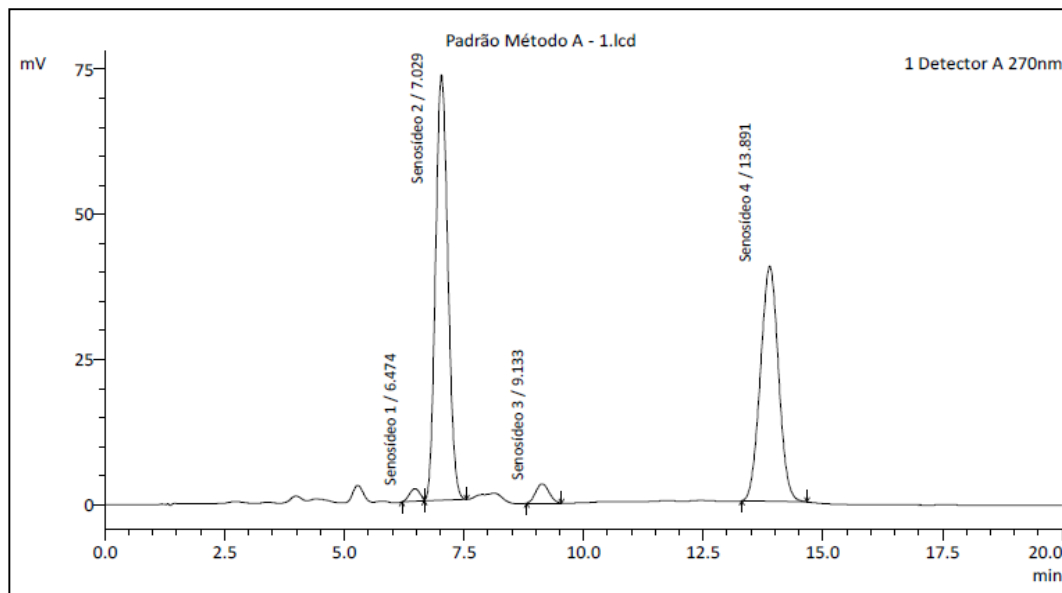


Figura 12: Padrão Método convencional – 1

Quanto a figura 13, os métodos demandaram uma série de testes prévios, em diversas outras condições. É possível notar claramente a coeluição dos Senosídeos 1 e 2. Para este caso as condições do método foram as mesmas, exceto pela coluna cromatográfica utilizada, Lichrosphere XTerra C18 (150 x 4,0mm), 5  $\mu$ m.

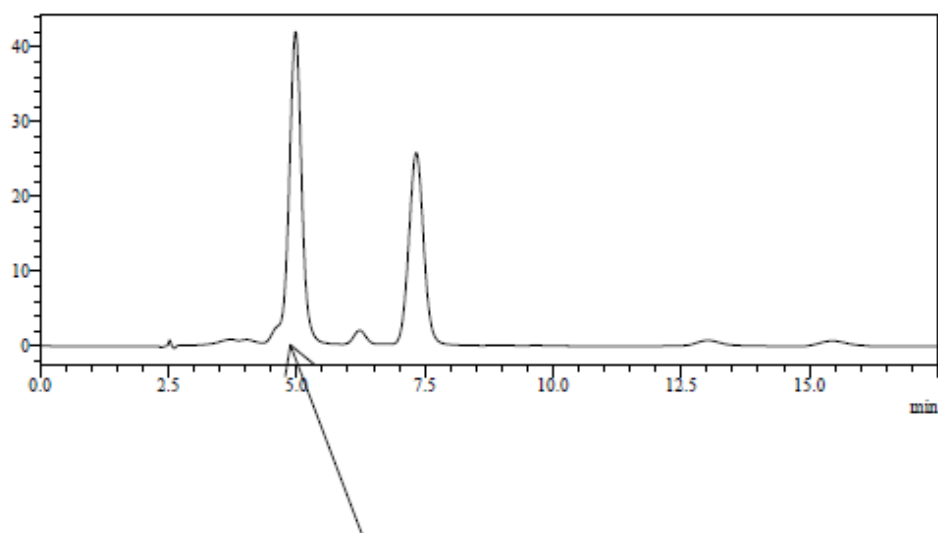


Figura 13: Teste Coluna X-Terra C18

Na figura 14, o cromatograma apresenta uma linha de base sem estabilidade e para os 25 minutos de corrida, os picos estão totalmente descaracterizados, ou seja, não é possível presenciar em quais tempos de retenção estão presentes cada Senosídeo, inviabilizando totalmente a coluna utilizada Luna C8 (250 x 4,0mm).

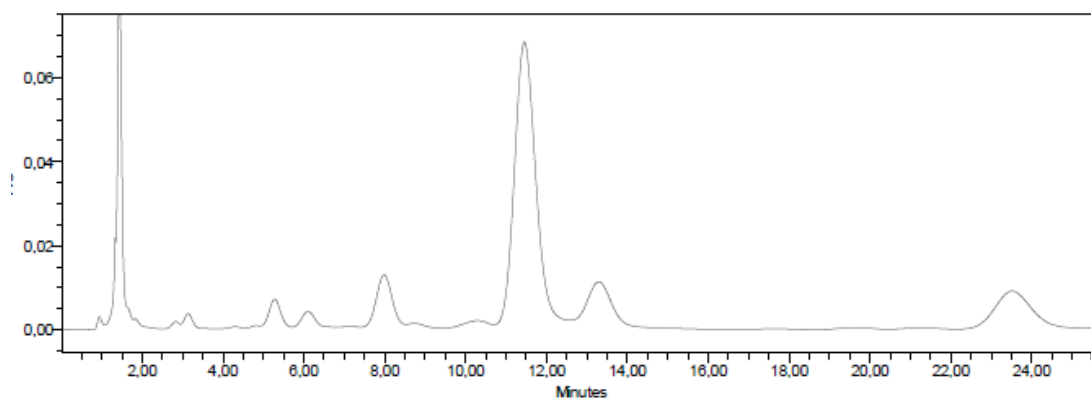


Figura 14: Teste Coluna Luna C8

Na figura 15, a coluna SymmetryShield RP18 (150 x 3,0mm) 5  $\mu$ m, o mesmo pode ser observado, ou seja, o surgimento de picos característicos da fase móvel, ou diluente, impossibilitando a caracterização dos 4 Senosídeos, tornando o método não seletivo e não específico.

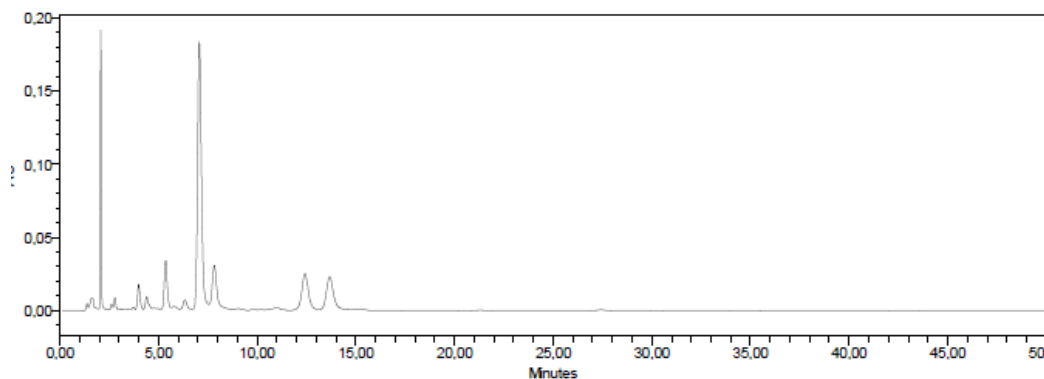


Figura 15: Teste Coluna SymmetryShield RP18

Na figura 16, a coluna utilizada foi uma NovaPak C18 (250 x 4,0mm) 5  $\mu$ m. O que se observa é que em menos de 10 minutos de corrida tem-se a eluição dos picos dos Senosídeos, entretanto os picos 1 e 2 estão novamente coeluidos e além disto, a linha de base apresenta muitos ruídos para uma injeção da solução padrão, inviabilizando totalmente a utilização destas condições cromatográficas para este método.

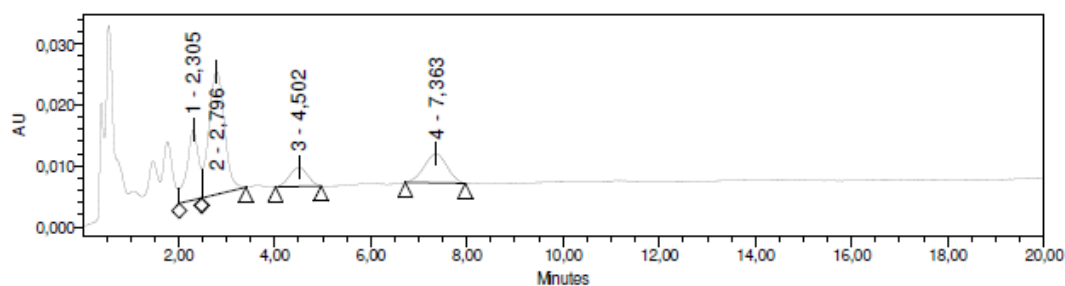


Figura 16: Teste Coluna NovaPak C18

A figura 17, mostra o cromatograma resultado da utilização de uma coluna Discovery Zr-PBD (75 x 4,6mm) 3  $\mu$ m. Nota-se a presença dos 4 picos em menos de 10 minutos, entretando alguns deles apresentam cauda, a linha de base não está completamente estável e além disto há um princípio de coeluição entre os Senosídeos 1 e 2.

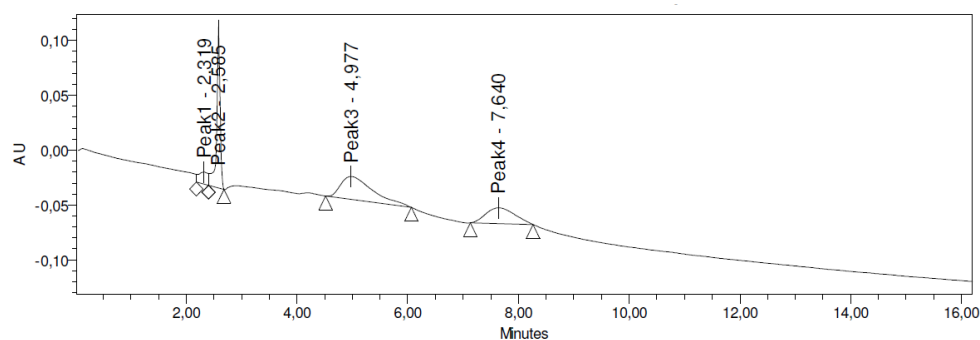


Figura 17: Teste Coluna Zr-PBD

O cromatograma da figura 18 é um caso em que a mesma coluna do exemplo acima, ou seja, Discovery Zr-PBD (75 x 4,6mm) 3  $\mu$ m, porém aumentando a proporção de solvente aquoso, ou seja, solução tampão fosfato, que acabou arrastando os picos para 20 a 40 minutos de eluição, surgiram novas coeluições e praticamente todos estão com cauda, inviabilizando em todos os sentidos estas condições cromatográficas.

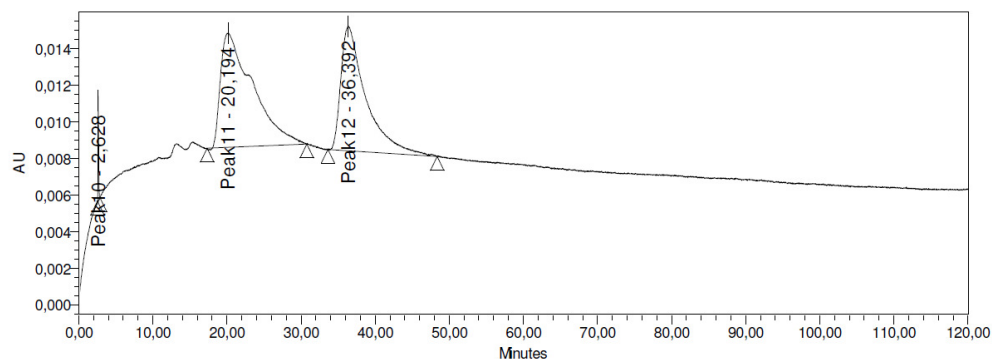


Figura 18: Teste 2 Coluna Zr-PBD

### 3.1.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

A figura 19 ilustra as condições cromatográficas expostas para o método convencional seguindo como parâmetro os guias farmacopéicos como base para desenvolvimento das condições ideais para o método. Em um primeiro instante verificamos que em teoria não haveria a necessidade de ser desenvolvido um método bidimensional para os 3 ativos, pois o cromatograma da figura 19 indica a separação dos picos cromatográficos, entretanto algumas amostras foram estressadas em condições ácidas, básicas e oxidativas com o objetivo de verificar o aparecimento de picos. Muitos destes podem aparecer como co-eluídos nas condições do método convencional, e neste momento o método bidimensional passa a ter a importância a vista, uma vez que pode separar estes possíveis picos que surgiram, representados como compostos de degradação, podendo até mesmo serem quantificados.

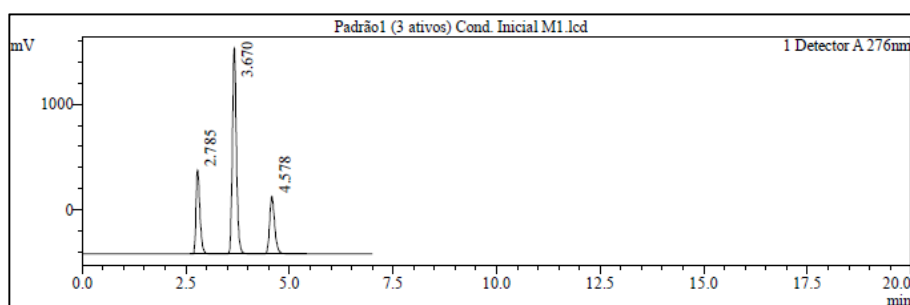


Figura 19: Padrão1 (3 ativos) Cond. Inicial M1

Entretanto para se chegar a este cromatograma, nomeado como convencional, alguns testes prévios foram feitos. O cromatograma da figura 20 é o resultado do método utilizado e chamado de convencional com exatamente as mesmas

condições cromatográficas descritas pelo método, porém utilizando uma coluna Symmetry C18 (250 x 4,6 mm), 5  $\mu$ m. Nota-se a coeluição de dois ativos, o Diclofenaco Sódico e a Cafeína, fazendo com que dentro das condições escolhidas, a coluna se tornasse inviável para esta separação. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

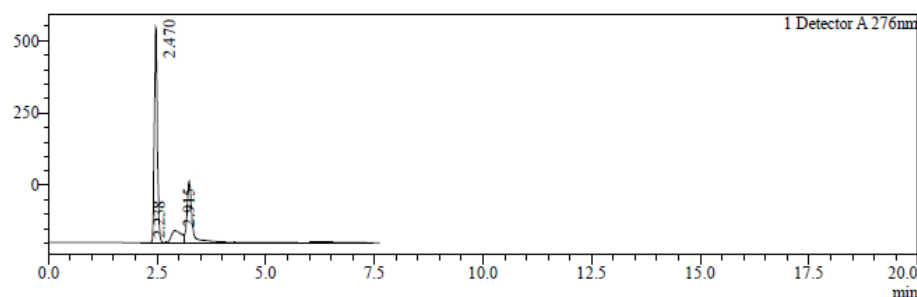


Figura 20: Teste Coluna Symmetry C18

A figura 21 é resultado de outro teste, cuja coluna utilizada foi uma XTerra RP8, com as mesmas dimensões da Symmetry, porém o que se nota novamente são picos coeluidos o que faz com que o primeiro deles adquira-se uma cauda, tornando mais uma vez as condições do método para esta coluna cromatográfica, inviável para o desenvolvimento.

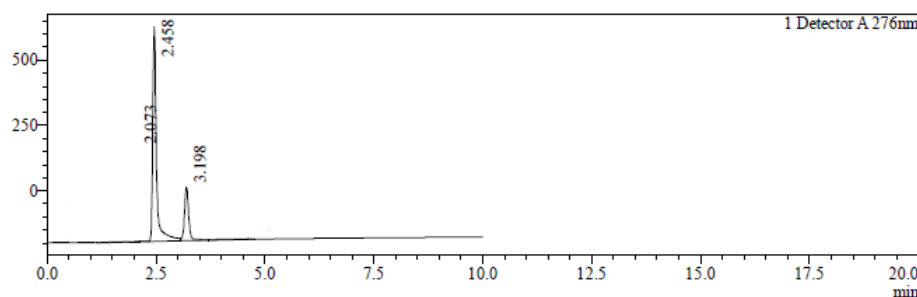


Figura 21: Teste Coluna XTerra RP8

O terceiro teste preconizou a utilização de uma coluna Hypersil Gold C18, cromatograma representado pela figura 22. Novamente com as mesmas medidas predescritas. Neste momento, é possível constatar um cenário um pouco mais confortável, pois o primeiro pico está completamente separado dos outros, porém os dois últimos por sua vez, não estão separados.

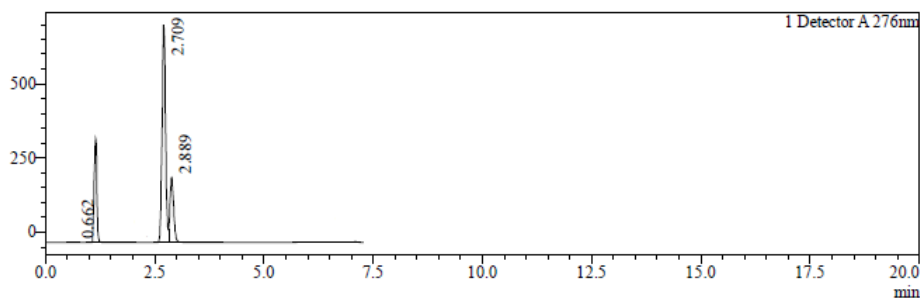


Figura 22: Teste Coluna Hypersil Gold C18

O efeito variação da proporção da fase móvel pode ser observado no cromatograma da figura 23. No caso em questão, as condições testadas são exatamente as mesmas do método convencional, ou seja, a coluna utilizada foi uma Partisil SCX 10 (250 x 4,6 mm), 5  $\mu$ m C18, e a fase móvel utilizada retirou pela metade a concentração de solvente orgânico, fazendo com que os picos se tornassem mais dispersos e separados dentro da corrida cromatográfica, entretanto o cenário acaba sendo não tão viável uma vez que a ideia dos métodos desenvolvidos é garantir uma boa separação de todos os picos dos ativos, porém dentro do menor tempo possível, com objetivo de economia de horas de equipamento, horas de analista e conseqüentemente reagentes para o preparo de fase móvel.

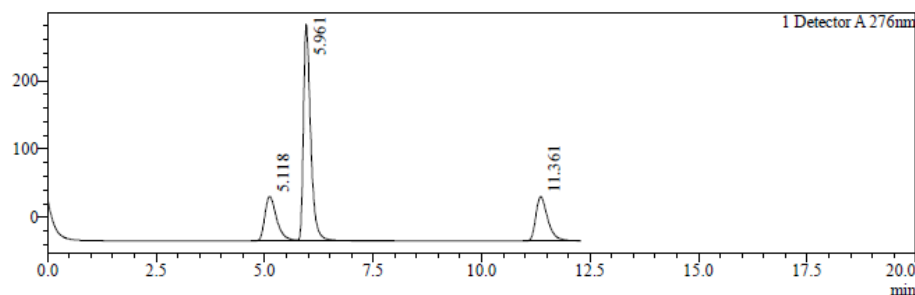


Figura 23: Teste Coluna Partisil SCX 10

O principal objetivo com os testes preliminares, tanto dos testes para o teor de Senosídeos quanto para o teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína, é desenvolver condições ideais de métodos bidimensionais, estes por sua vez, ortogonais ao convencional. As principais ferramentas utilizadas para estes testes foram as colunas cromatográficas disponíveis na indústria em conjunto com o *software* dentro do site ([www.usp.com](http://www.usp.com)). Foram avaliados unicamente parâmetros qualitativos, ou seja, avaliações de desempenho dos picos, co-eluições e disposições (tempos de retenção) dentro dos cromatogramas testados. O que não



está supracitado como objetivo/ferramentas dos testes não foi desenvolvido como premissa para a realização dos mesmos, como parâmetros de resolução, fatores de acidez das fases estacionárias e outros correlatos.

### **3.2. Fluxo analítico para o desenvolvimento dos métodos convencionais e bidimensionais**

O desenvolvimento analítico dos métodos pode ser verificado. O fluxograma da figura 24 demonstra os principais passos aplicados na prática para o desenvolvimento dos métodos convencionais e bidimensionais. O exemplo mostra que um vial contendo a solução padrão ou amostra é colocado dentro do amostrador do cromatógrafo, e em seguida a amostra passa pela fase estacionária convencional e pelo detector. Após passagem pelo detector as frações são coletadas de acordo com as condições do método, por exemplo, em um fluxo de 1 mililitro por minuto, uma corrida com vinte minutos, serão vinte coletas a cada minuto. Estas coletas são feitas cronometrando minuto a minuto. Os novos vials são colocados dentro do mesmo equipamento. Troca-se a coluna e coloca-se a coluna do método bidimensional. Após ajuste das condições cromatográficas para este método bidimensional, os novos vials passam pela coluna e após passagem pelo detector serão gerados novos cromatogramas.

Os métodos foram desenvolvidos com a premissa de não utilizar uma válvula solenoide ou de comutação para as injeções entre os métodos convencionais e bidimensionais. Todas as coletas das frações foram executadas de maneira manual.

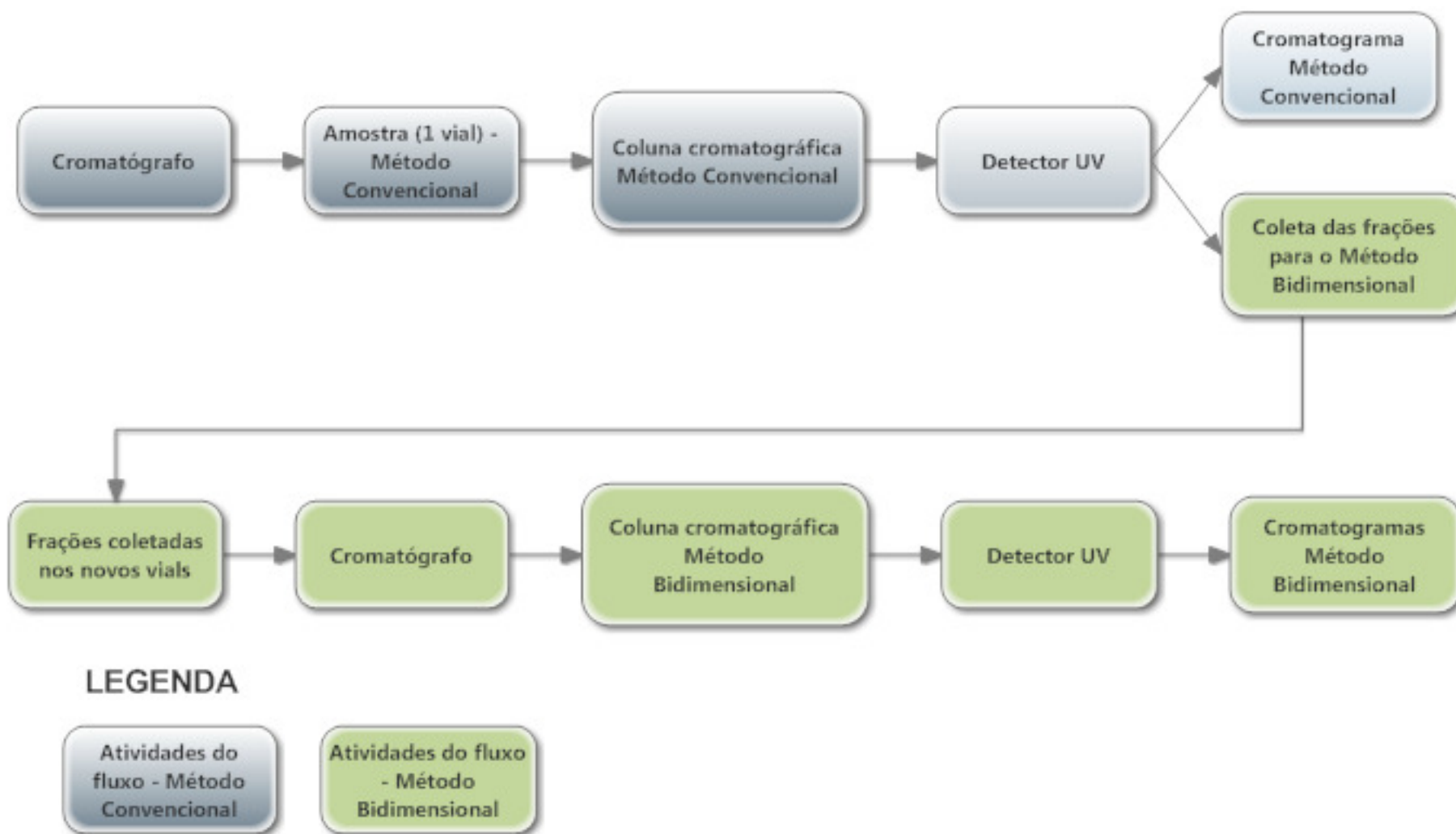


Figura 24: Ilustração do fluxograma utilizado para o desenvolvimento dos métodos convencionais e bidimensionais.

### 3.3. Métodos Analíticos (condições cromatográficas finais)

#### 3.3.1. Teor de Senosídeos

O método desenvolvido para a análise do teor de Senosídeos teve como fase móvel a preparação de uma solução tampão de fosfato, pesando cerca de 3,40 g de fosfato de potássio (marca Merck) em um béquer e dissolvendo-o em cerca de 100 mL de água purificada. O conteúdo da solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completo até o menisco do balão com água purificada e por fim o pH foi ajustado para 3,0 com alguns mililitros de ácido fosfórico PA (marca Merck). A fase móvel utilizada foi tampão fosfato e Metanol HPLC 6:4 v/v (marca Merck).

Para este método foi utilizado um cromatografo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo Prominence, composto de uma unidade de bombeamento de solvente (modelo LC-20AB), um auto-injetor (modelo SIL-20A), um forno de colunas (modelo CTO-20A), detector UV-VIS (modelo SPD-20A), um controlador de sistema (modelo CBM-20A) e um rack changer (modelo C) acoplados a um computador.

Para o método convencional a coluna cromatográfica utilizada foi uma Inertisil ODS 3 (150 x 4,0mm), 3 $\mu$ m da marca GL Science Inc., com um fluxo cromatográfico de 1,0 mL/min, durante todo o método o forno da coluna permaneceu com temperatura controlada de 35°C e as amostras a 6°C. O comprimento de onda do detector foi de 270 nm e todas as injeções foram de 50  $\mu$ L. Foram ao todo 3 injeções da solução padrão e 3 injeções de cada preparação de solução amostra com 20 minutos de tempo de corrida. Todas as 6 injeções foram coletadas frações após passagem pelo detector. A cada minuto de corrida exatamente 1 mL era coletado em um novo vial após passagem pelo detector. Logo após as 6 injeções do método convencional, obteve-se 120 vials a serem reinjetados nas condições do método bidimensional. Este método por sua vez utilizou-se da mesma preparação de fase móvel, entretanto a proporção foi alterada para 7 partes de solução tampão para 3 partes de Metanol HPLC. A coluna cromatográfica que sustentou o desenvolvimento do método bidimensional foi a Lichrosphere CN (250 x 4,0mm), 5 $\mu$ m da marca Sigma-Aldrich. O volume de injeção permaneceu 50  $\mu$ L, o volume de injeção em 1,0 mL/min, as temperaturas de forno de coluna cromatográfica e amostras também permaneceram

as mesmas. Os 120 novos vials foram injetados nestas condições cromatográficas por um tempo de corrida de 20 minutos.

O preparo da solução diluente foi feito utilizando uma solução de Metanol HPLC: Água Purificada 1:1 v/v. Esta solução foi utilizada para os preparos das soluções de padrão e amostras.

O preparo da solução padrão foi feito pesando 5,06 mg de padrão primário de Senosídeos em um balão volumétrico de 100 mL, foi adicionado cerca de 50 mL de diluente, o padrão foi diluído e o volume completo para os 100 mL do balão volumétrico.

Os preparos das soluções amostras foram feitos pesando 204,56 mg (amostra 1), 204,54 mg (amostra 2) e 204,58 mg (amostra 3) para balão volumétrico de 200 mL. Foi adicionado cerca de 100 mL de diluente, as soluções amostras foram agitadas até completa dissolução e o volume foi completo para 200 mL do balão volumétrico.

#### **3.3.1.1. Fingerprint Test**

O teste de fingerprint foi feito utilizando exatamente as mesmas condições do método de Teor de Senosídeos, porém outras amostras de extratos naturais foram utilizados. No caso em questão, foram 4 amostras: Fucus (*Fucus vesiculosus* L.) 150 mg extrato seco, Biogestil (*Peumus boldus*) 250 mg Molina extrato seco, Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana* D.C.) 380 mg extrato seco e Alcachofra (*Cynara scolymus* L.) 350 mg extrato seco. As amostras foram diluídas no mesmo diluente do método para atingirem a mesma concentração de sene por mililitro na amostra a ser testada. Para que o teste possa ser representativo e demonstrar que não há interações de picos cromatográficos referentes a estes extratos junto ao método de teor de senosídeos foi decidido que se exibissem os cromatogramas em 2 comprimentos de onda, 270 e 220 nm. No entanto não houve a necessidade de reinjeções a 220 nm uma vez que os cromatogramas dos métodos iniciais não apresentaram diferenças significativas entre 220 e 270 nm.

#### **3.3.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína**

O método desenvolvido para a análise do teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína teve como fase móvel a preparação de uma solução tampão de fosfato,

pesando cerca de 7,10 g de fosfato de dissódico dibásico anidro (marca Merck) em um béquer e dissolvendo-o em cerca de 100 mL de água purificada. O conteúdo da solução foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e o volume foi completado até o menisco do balão com água purificada e por fim o pH foi ajustado para 6,5 com alguns mililitros de ácido fosfórico PA (marca Merck). A fase móvel utilizada foi de tampão fosfato, Acetonitrila HPLC (marca Carlo Erba) e água purificada 2:1,2:10 v/v/v.

Para este método foi utilizado um cromatografo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo Prominence, composto de uma unidade de bombeamento de solvente (modelo LC-20AB), um auto-injetor (modelo SIL-20A), um forno de colunas (modelo CTO-20A), detector UV-VIS (modelo SPD-20A), um controlador de sistema (modelo CBM-20A) e um rack changer (modelo C) acoplados a um computador.

Para o método convencional a coluna cromatográfica utilizada foi uma Partisil 10 SCX (250 x 4,6mm), 5µm da marca Whatman, com um fluxo cromatográfico de 1,5 mL/min, durante todo o método o forno da coluna permaneceu com temperatura controlada de 35°C e as amostras a 6°C. O comprimento de onda do detector foi de 276 nm e todas as injeções foram de 20 µL. Foram ao todo 3 injeções da solução padrão e 2 injeções de cada preparação de solução amostra com 7 minutos de tempo de corrida. Todas as 5 injeções foram coletadas frações após passagem pelo detector. A cada minuto de corrida o volume era coletado em um novo vial após passagem pelo detector. Logo após as 5 injeções do método convencional, obteve-se 35 vials a serem reinjetados nas condições do método bidimensional. Este método por sua vez utilizou-se da coluna cromatográfica Vydac 210 TP Diphenyl (250 x 4.6mm), 5µm da marca Chromtec. O volume de injeção permaneceu 20 µL, o volume de injeção em 1,5 mL/min, as temperaturas de forno de coluna cromatográfica e amostras também permaneceram as mesmas. Os 35 novos vials foram injetados nestas condições cromatográficas por um tempo de corrida de 15 minutos.

O preparo da solução diluente foi o mesmo da fase móvel. Esta solução foi utilizada para os preparos das soluções de padrão e amostras.

O preparo da solução padrão foi feito pesando 31,0 mg de padrão primário de Diclofenaco Sódico, 3,9 mg de Paracetamol e 5,4 mg de Cafeína em um balão volumétrico de 50 mL, foi adicionado cerca de 25 mL de diluente, o padrão foi diluído e o volume completado para os 50 mL do balão volumétrico.

Os preparos das soluções amostras foram feitos pesando 43,02 mg (amostra 1) e 43,08 mg (amostra 2) para balão volumétrico de 50 mL. Foi adicionado cerca de 25 mL de diluente, as soluções amostras foram agitadas até completa dissolução e o volume foi completo para 50 mL do balão volumétrico.

### **3.3.2.1. Teste de estresse (*Stress testing*)**

O método utilizado para o Teste de estresse (*Stress testing*) foi o mesmo (convencional e bidimensional) para o teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína, entretanto a mudança foi no preparo das amostras para condução dos testes.

As condições para o teste de estresse (*Stress testing*) foram ácida (HCl 1 mol/L por 4 dias), básica (NaOH 10 mol/L por 4 dias) e Oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% por 4 dias).

Foi preparada uma única amostra, pesando 34,06 mg, 39,64 mg e 33,55 mg para balão volumétrico de 50 mL, respeitando respectivamente as condições ácida, básica e oxidativa, foi adicionado cerca de 5 mL de cada solução degradante e as soluções permaneceram durante o período supracitado devidamente armazenada em temperatura ambiente controlada (25°C), após este período as soluções foram completas até o volume de 50 mL do balão volumétrico com o diluente do mesmo método. Para a preparação da amostra foram 3 injeções suportando o método convencional e 21 injeções suportando o método bidimensional.

## **3.4. Cromatogramas**

### **3.4.1. Teor de Senosídeos**

#### **3.4.1.1. Método convencional – Padrão**

O desenvolvimento do método de teor de Senosídeos contemplou 3 injeções da solução padrão para o método convencional. Para o cromatograma representado pela figura 25 nota-se que dentro dos 20 minutos de corrida, a 270 nm, o padrão apresentou a ordem de eluição sendo disposta como Senosídeo 1 a 6,474 minutos, Senosídeo 2 a 7,029 minutos, Senosídeo 3 a 9,133 minutos e o Senosídeo 4 a 13,891 minutos. Este é o cromatograma típico para o preparo da Solução Padrão.

Há baixa resolução entre os picos dos Senosídeos 1 e 2 e a linha de base apresenta-se estável para este método. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

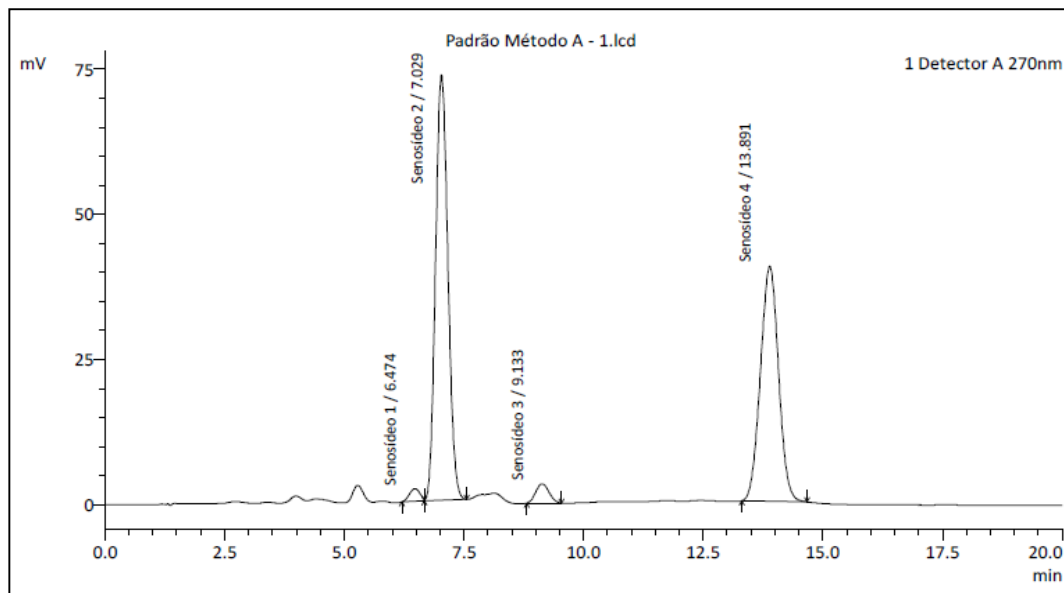


Figura 25: Padrão Método convencional – 1

### 3.4.1.2. Método bidimensional – Padrão

As frações coletadas de acordo com o descrito no método analítico resultaram nos cromatogramas referentes ao método bidimensional. Foram 20 coletas, que representaram 20 novos vials a serem reinjetados nas condições do método bidimensional. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho. O cromatograma do vial 1, representado pela figura 26, para o padrão referente a injeção do método bidimensional, representa o primeiro minuto de corrida do método convencional, coletado e reinjetado nas condições do método bidimensional. Não há eluição de picos cromatográficos, e a mesma característica é notada para os próximos vials, 2, 3, 4 e 5, representados pelas figuras 27 a 30.

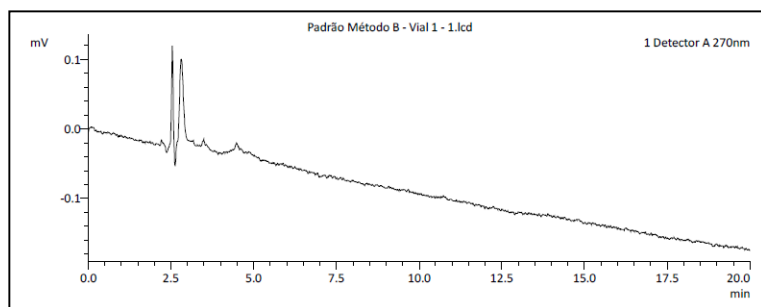


Figura 26: Padrão Método bidimensional - Vial 1 – 1

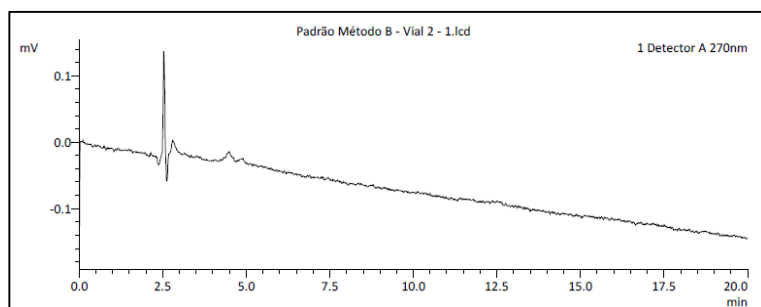


Figura 27: Padrão Método bidimensional - Vial 2 – 1

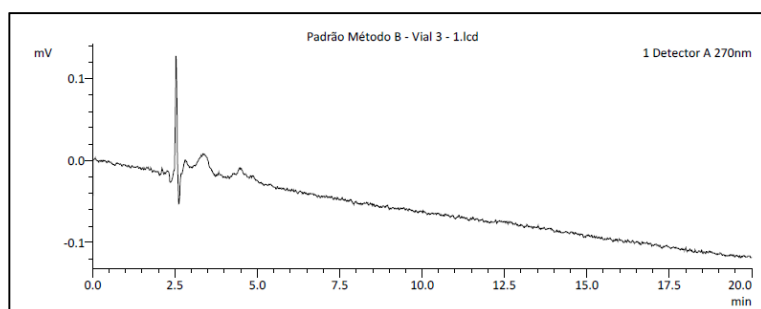


Figura 28: Padrão Método bidimensional - Vial 3 – 1

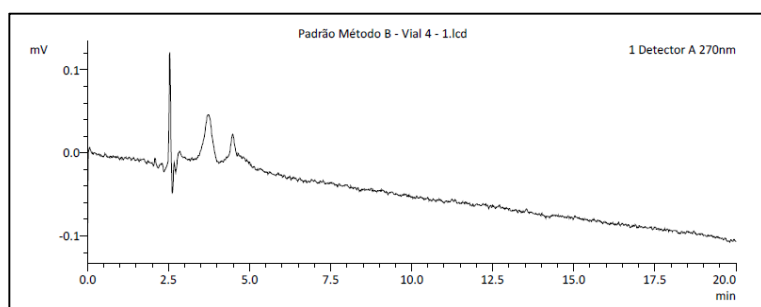


Figura 29: Padrão Método bidimensional - Vial 4 – 1



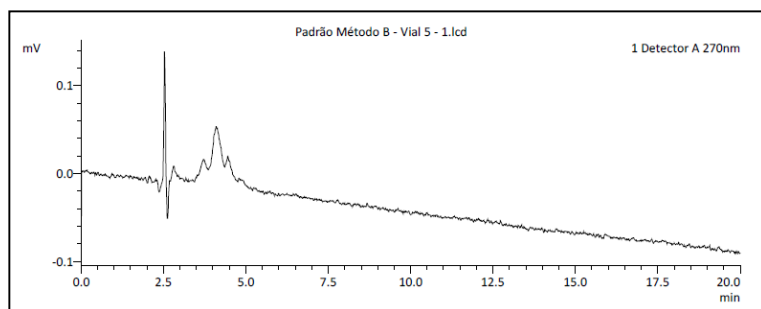


Figura 30: Padrão Método bidimensional - Vial 5 – 1

Já o cromatograma do vial 6, mostrado através da figura 31, que representa o sexto minuto de corrida do método convencional, nota-se a presença do pico do Senosídeo 1, com 4,631 minutos, ou seja, temos o primeiro isolamento de picos dentro da corrida cromatográfica.

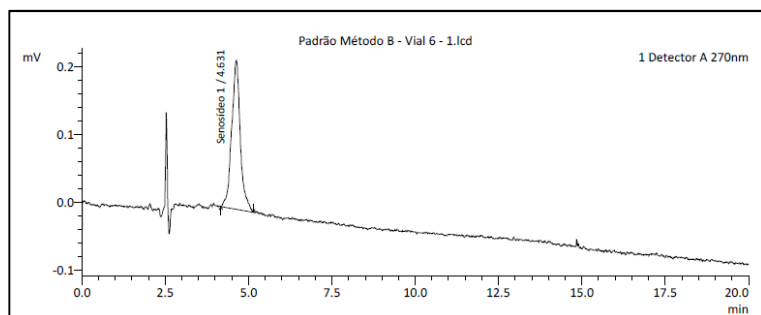


Figura 31: Padrão Método bidimensional - Vial 6 – 1

Na figura 32, o cromatograma do vial 7, que representa o sétimo minuto de corrida do método convencional, nota-se a presença do pico do Senosídeo 2, com 5,006 minutos, ou seja, temos o surgimento do segundo ativo, separado dos outros 3.

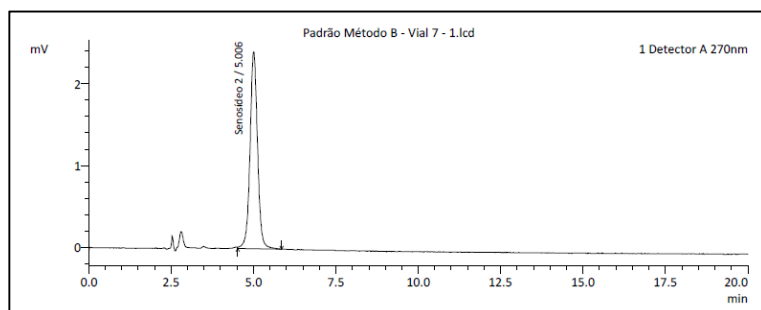


Figura 32: Padrão Método bidimensional - Vial 7 – 1

Como a área é muito grande para o pico do Senosídeo 2 nas condições do método convencional, o pico pode ser observado novamente no cromatograma do vial 8, que

representa o oitavo minuto de corrida do método convencional, nota-se a presença do pico do Senosídeo 2, com 5,037 minutos, indicado pela figura 33.

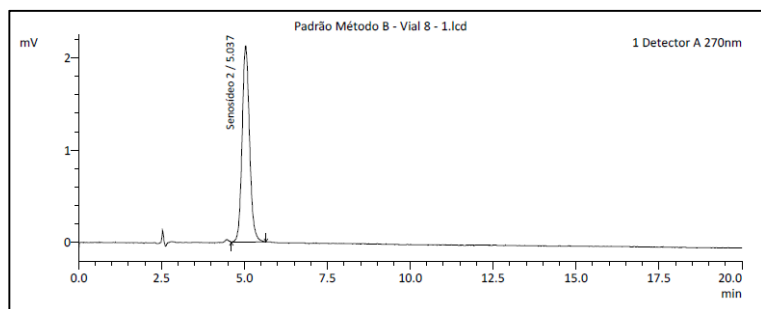


Figura 33: Padrão Método bidimensional - Vial 8 – 1

O cromatograma do vial 9, representado pela figura 34, que representa o nono minuto de corrida do método convencional, nota-se a presença do pico do Senosídeo 3, com 6,276 minutos, ou seja, temos o surgimento do terceiro ativo, separado dos outros 3, e diferente dos outros, desta vez o sinal está baixo, ou seja, espera-se que no próximo vial, tenhamos a eluição novamente deste pico.

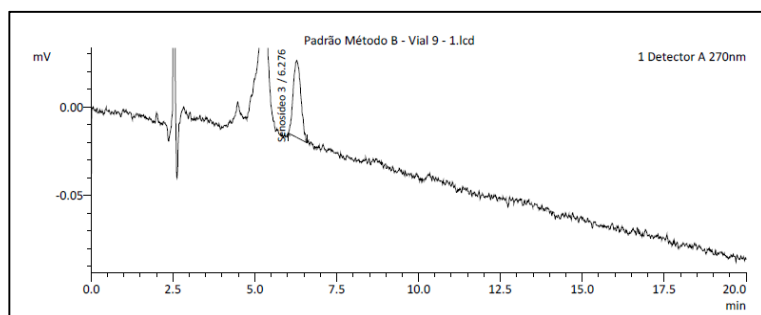


Figura 34: Padrão Método bidimensional - Vial 9 – 1

Exatamente como previsto, através da figura 35, o cromatograma do vial 10, que representa o décimo minuto de corrida do método convencional, tem-se a eluição do Senosídeo 3 novamente, agora de forma isolada dos outros ativos, com 6,276 minutos de corrida. Na sequência dos próximos vials 11, 12 e 13, é possível notar a ausência de ativos na corrida cromatográfica indicados através das figuras 36 a 38.

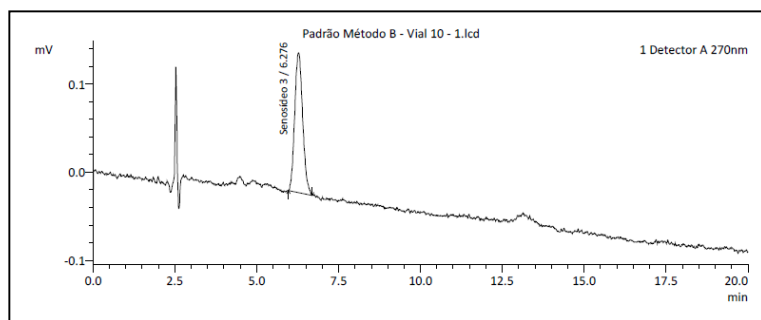


Figura 35: Padrão Método bidimensional - Vial 10 – 1

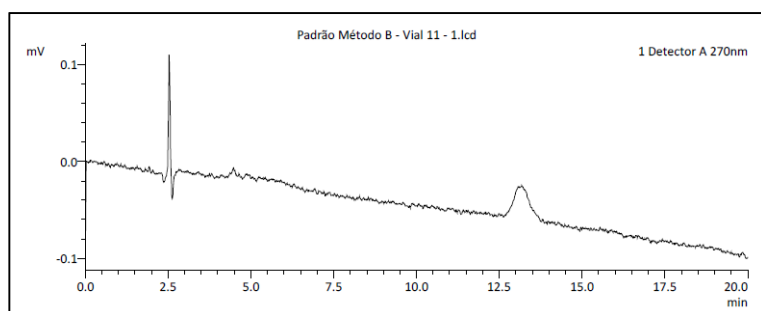


Figura 36: Padrão Método bidimensional - Vial 11 – 1

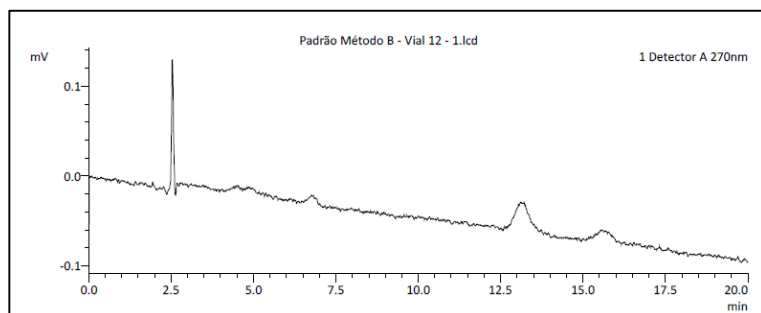


Figura 37: Padrão Método bidimensional - Vial 12 – 1

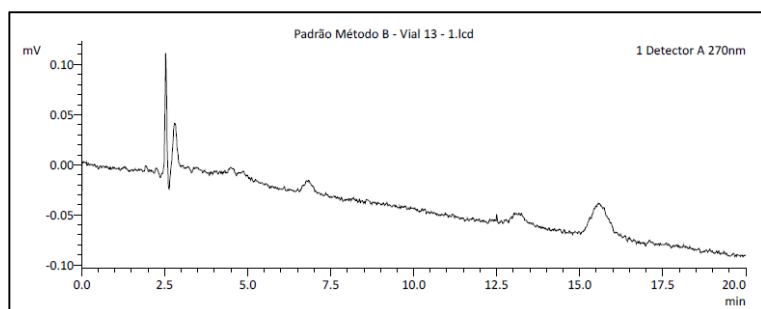


Figura 38: Padrão Método bidimensional - Vial 13 – 1

Por fim, os vials 14 e 15 (figuras 39 e 40), que representam os décimo quarto e décimo quinto minutos de corrida referente ao método convencional, reinjetados nas condições cromatográficas do método bidimensional, verificamos claramente a

eluição do pico Senosídeo 4 com 7,388 minutos no vial 14 e 7,385 minutos no vial 15 respectivamente. Conseqüentemente os vials 16, 17, 18, 19 e 20 não apresentam novas eluições de ingredientes ativos (figuras 41 a 45).

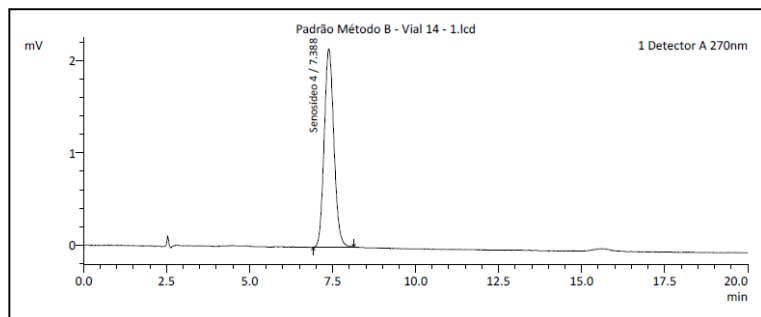


Figura 39: Padrão Método bidimensional - Vial 14 – 1

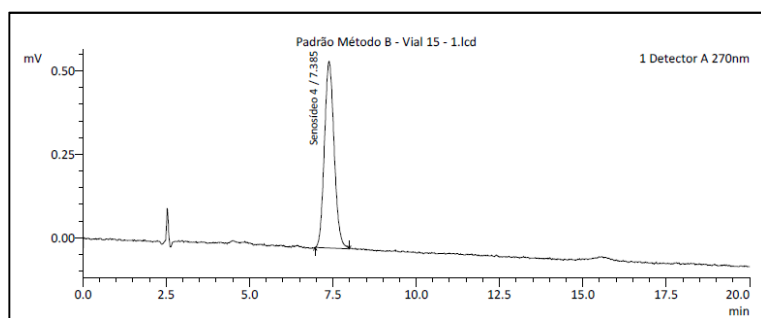


Figura 40: Padrão Método bidimensional - Vial 15 – 1

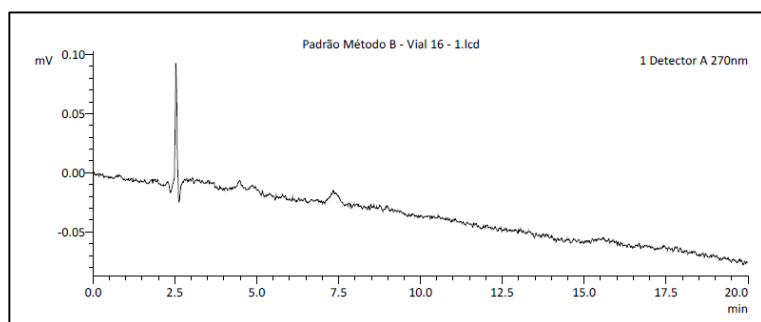


Figura 41: Padrão Método bidimensional - Vial 16 – 1

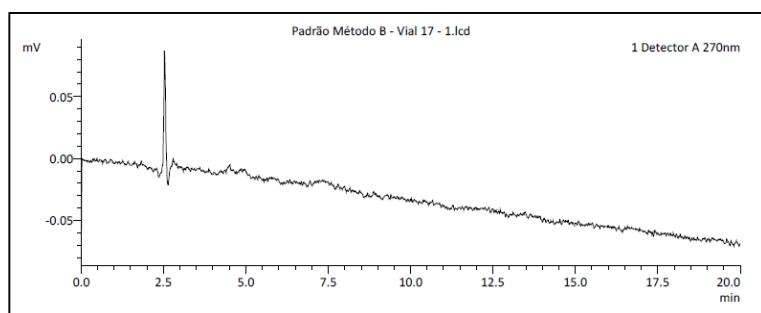


Figura 42: Padrão Método bidimensional - Vial 17 – 1

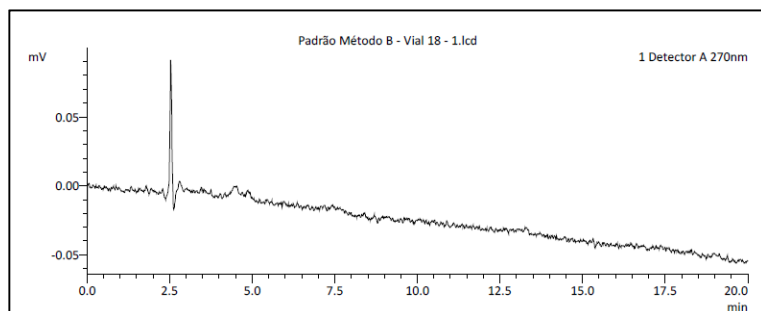


Figura 43: Padrão Método bidimensional - Vial 18 – 1

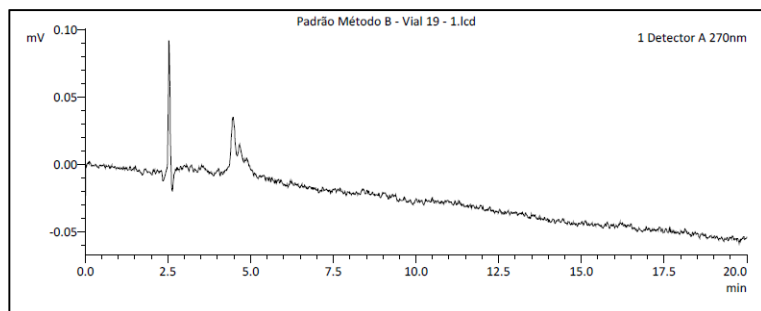


Figura 44: Padrão Método bidimensional - Vial 19 – 1

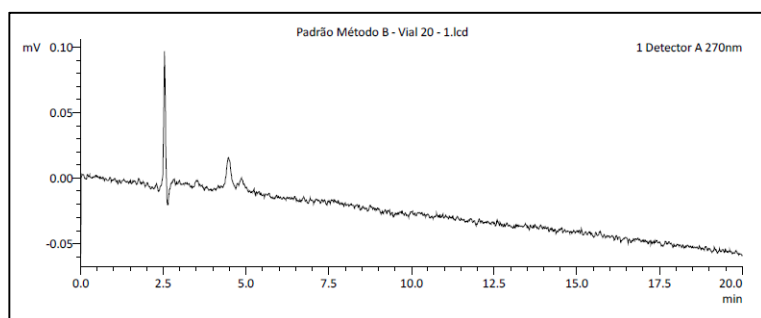


Figura 45: Padrão Método bidimensional - Vial 20 – 1

Através dos métodos desenvolvidos convencional e bidimensional foi possível a separação dos compostos ativos, distribuídos entre os vials, representados pelos cromatogramas bidimensionais.

### 3.4.1.3. Método convencional – Amostra

O desenvolvimento do método de teor de Senosídeos contemplou 3 injeções das soluções amostras para o método convencional. Nota-se que dentro dos 20 minutos de corrida, representada pela figura 46 que a 270 nm a amostra apresentou eluição dos picos do Senosídeo 1 e 2 com 7,069 minutos, o Senosídeo 3 a 8,837 minutos e

o Senosídeo 4 a 13,845 minutos. Este é o cromatograma típico para a o preparo da Solução amostra. A linha de base está carregada de outros picos, referentes ao placebo ou excipiente da amostra do extrato natural e, além disto, os picos dos ativos estão apresentando uma leve cauda. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

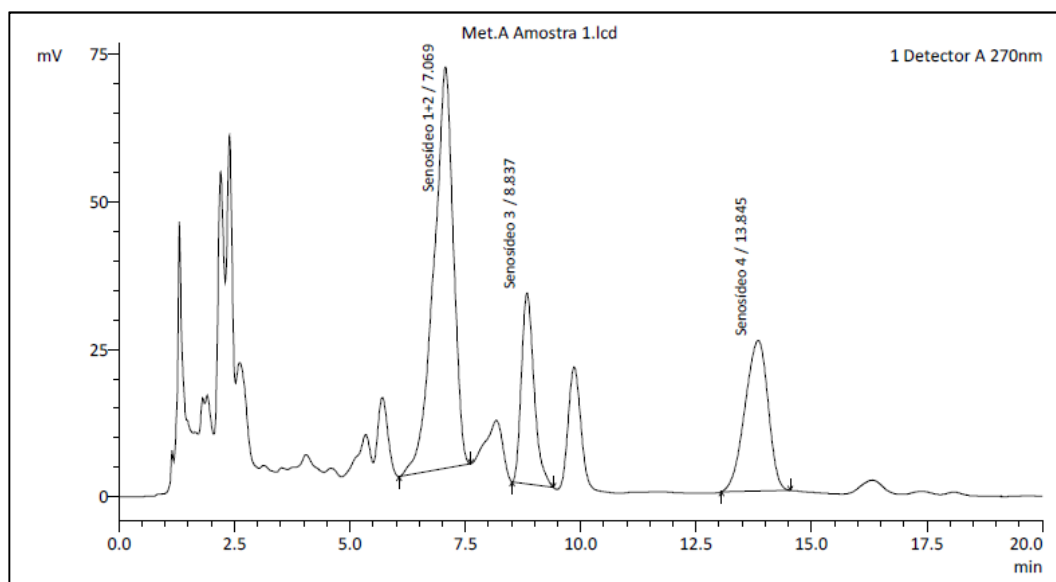


Figura 46: Método convencional - Amostra 1

#### 3.4.1.4. Método bidimensional – Amostra

As frações das amostras foram coletadas de acordo com o descrito no método analítico resultaram em nos cromatogramas referentes ao método bidimensional. Foram 20 coletas, que representaram 20 novos vials a serem reinjetados nas condições do método bidimensional, representados pelas figuras 47 a 51. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho. A mesma característica pode ser observada para os vials iniciais da corrida do método convencional, ou seja, os vials 1, 2, 3, 4 e 5 referentes aos primeiros 5 minutos de corrida, respectivamente, do método inicial apresentaram apenas ruídos característicos de fase móvel ou diluente. A grande vantagem inicial notada é que a linha de base já não mais apresenta eluições dos picos referentes a excipientes ou placebo, o que cede aos cromatogramas um aspecto “limpo” de interferentes.

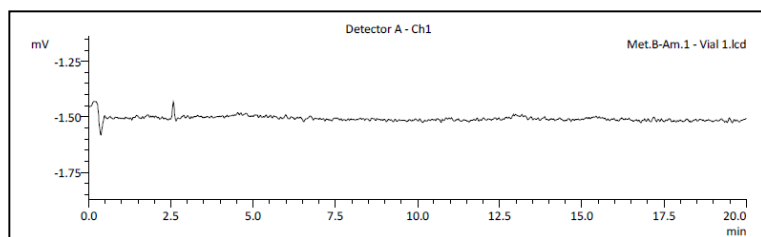


Figura 47: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 1

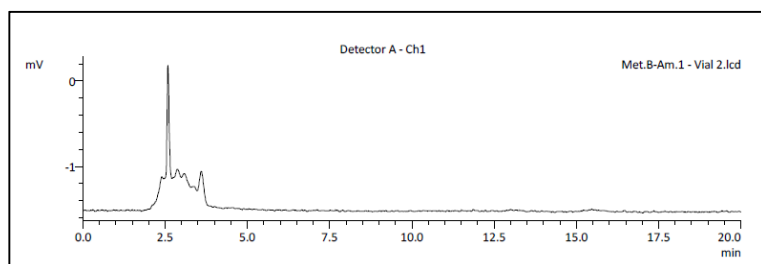


Figura 48: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 2

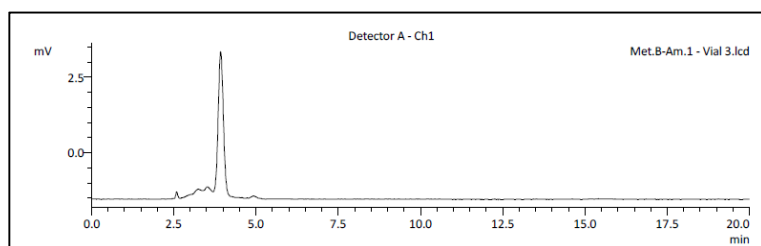


Figura 49: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 3

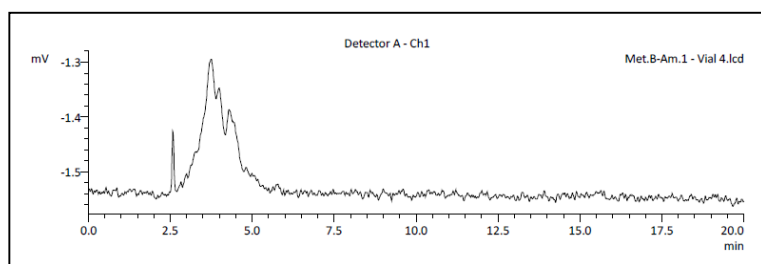


Figura 50: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 4

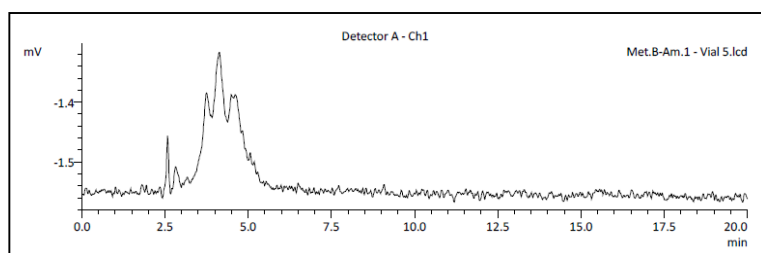


Figura 51: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 5

A figura 52 mostra o cromatograma do vial 6 referente a sexta fração, ou sexto minuto de corrida do método anterior, é possível notar a presença do Senosídeo 1 com 4,736 minutos, e a segunda grande vantagem do método pode ser verificada, ou seja, houve a separação dos Senosídeos 1 e 2 sendo que o segundo poderá ser visto no cromatograma a seguir, referente ao vial 7 (figura 54), ou sétimo minuto de corrida, com eluição a 5,014 minutos.

As sequências dos vials 8 a 20 (figuras 53 a 66) apresentam a mesma característica dos cromatogramas da solução padrão, ou seja, o método é seletivo e específico para quantificação dos Senosídeos 1, 2, 3 e 4 nas amostras, frente ao padrão.

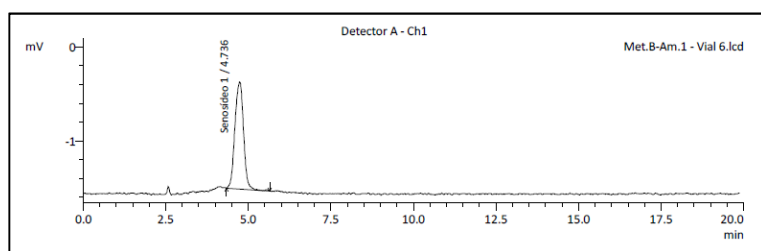


Figura 52: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 6

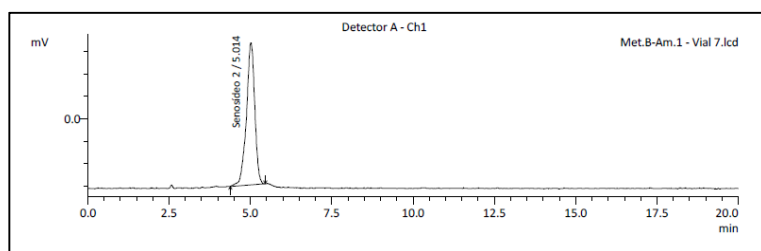


Figura 53: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 7

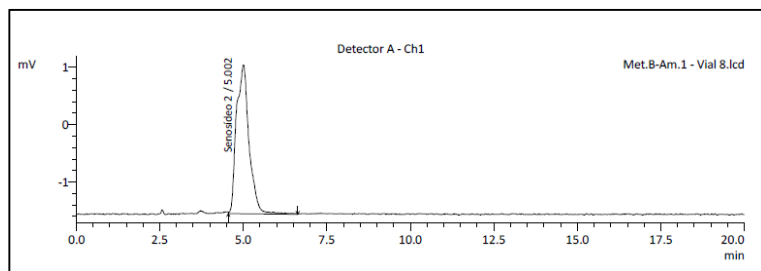


Figura 54: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 8



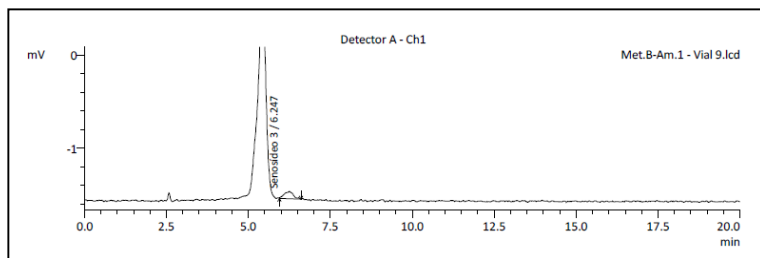


Figura 55: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 9

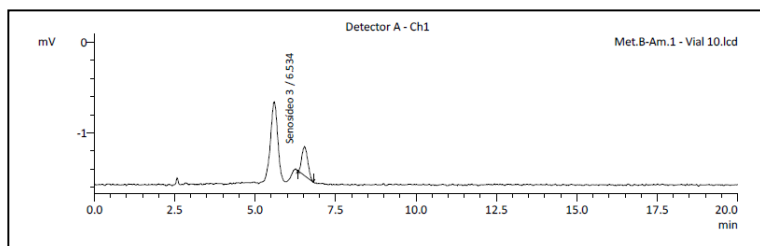


Figura 56: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 10

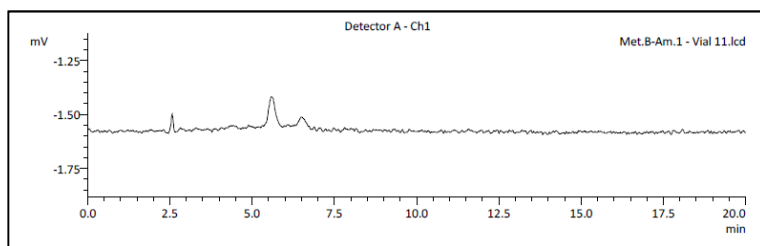


Figura 57: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 11

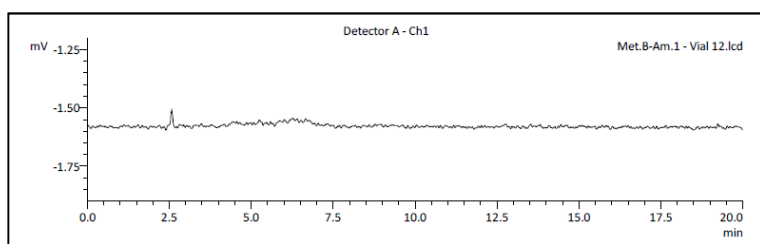


Figura 58: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 12

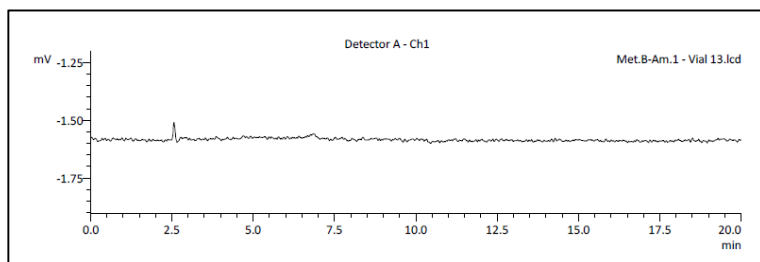


Figura 59: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 13

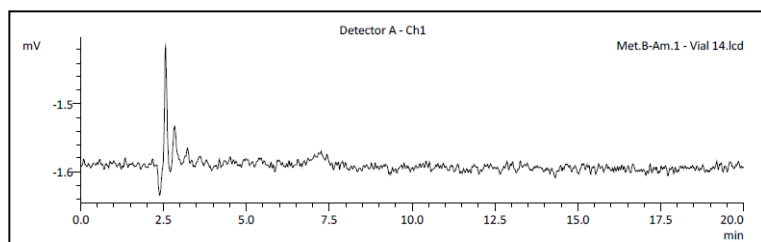


Figura 60: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 14

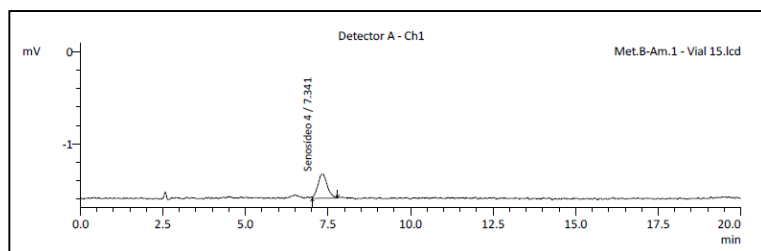


Figura 61: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 15

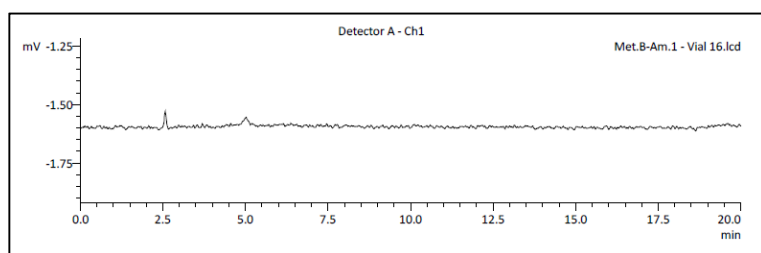


Figura 62: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 16

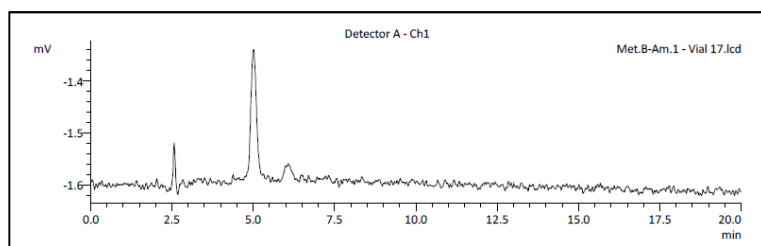


Figura 63: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 17

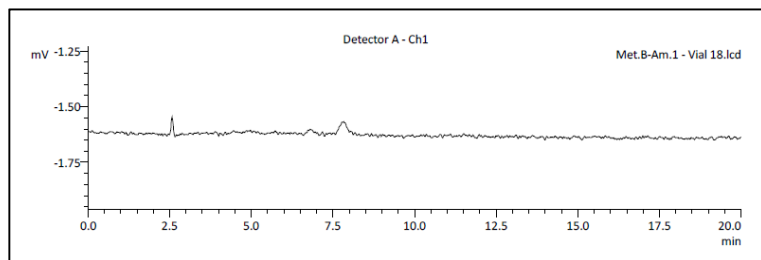


Figura 64: Método bidimensional - Amostra 1 - Vial 18

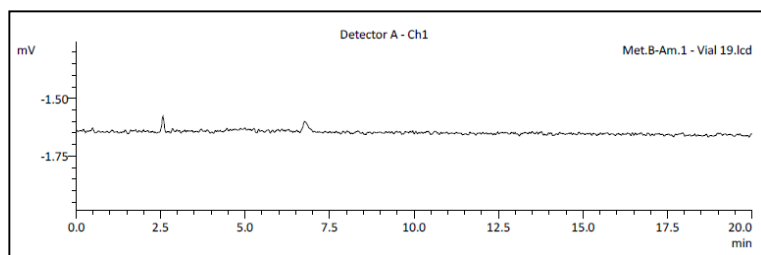


Figura 65: Método bidimensional – Amostra 1 – Vial 19

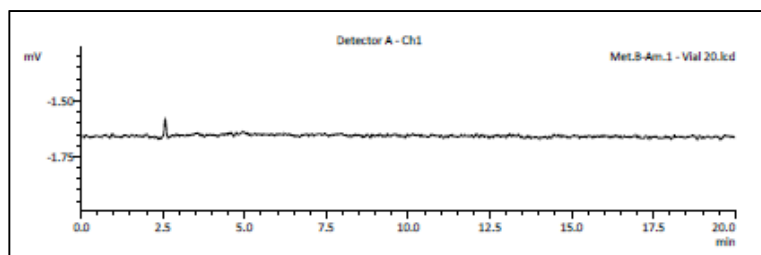


Figura 66: Método bidimensional – Amostra 1 – Vial 20

O método bidimensional foi capaz de separar os Senosídeo 1 e 2 que apresentam-se co-eluidos no método convencional. Todas as linhas de base para a amostra apresentam-se estáveis nos cromatogramas bidimensionais.

### 3.4.1.5. Fingerprint Test

#### 3.4.1.5.1. Método convencional

O teste de fingerprint tem como objetivo o preparo de amostras de outros extratos e no caso estes por sua vez foram escolhidos aleatoriamente no comércio, de ter um controle negativo de resultados de picos referentes a estes extratos nos mesmos tempos de retenção dos picos de Senosídeos, provando a identidade dos picos dos ativos em questão.

O desenvolvimento do método para o Fingerprint Test contemplou 4 injeções sendo uma de cada extrato para o método convencional. As condições cromatográficas foram exatamente as mesmas dos métodos convencionais e bidimensionais para o teor de Senosídeos, mudando apenas o preparo das amostras, sendo estas outros tipos de extratos naturais. O que se espera é a ausência de picos nos extratos naturais selecionados, provando o controle negativo para estes frente a amostra de Senosídeos. A figura 67 representa o cromatograma típico para a o preparo da solução amostra do extrato de Alcachofra, sendo este o caso em que mais houve a

presença de instabilidade na linha de base, porém mesmo assim, nota-se que esta instabilidade, ou surgimento destes picos se deve ao excipiente ou placebo, além do sinal estar muito baixo em comparação com o cromatograma da solução amostra de Senosídeos. A figura 68 representa o cromatograma típico para a o preparo da solução amostra do extrato de Biogestil, a figura 69 representa o cromatograma típico para a o preparo da solução amostra do extrato de Cascara e a figura 70 o extrato de Fucus.

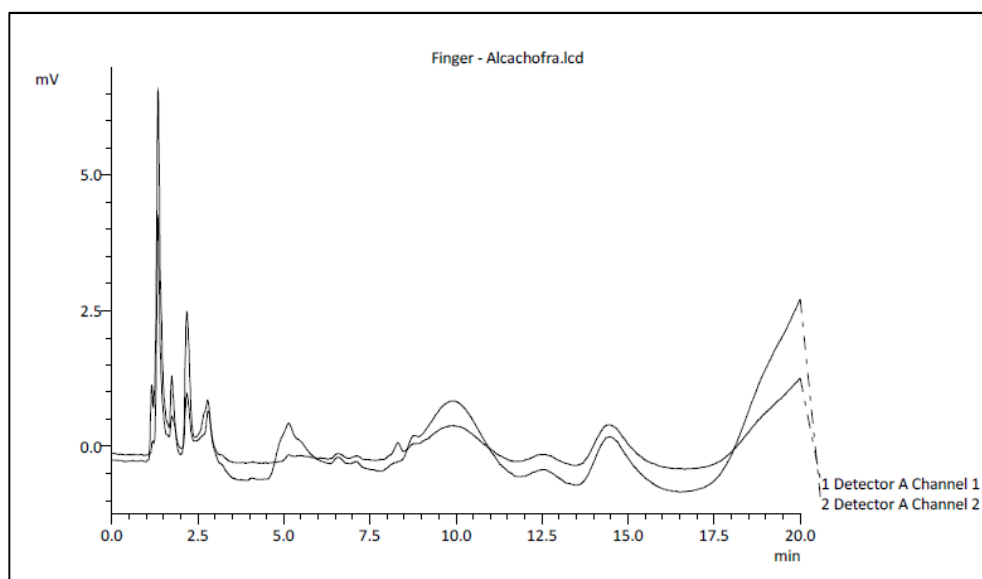


Figura 67: Método convencional - Fingerprint – Alcachofra

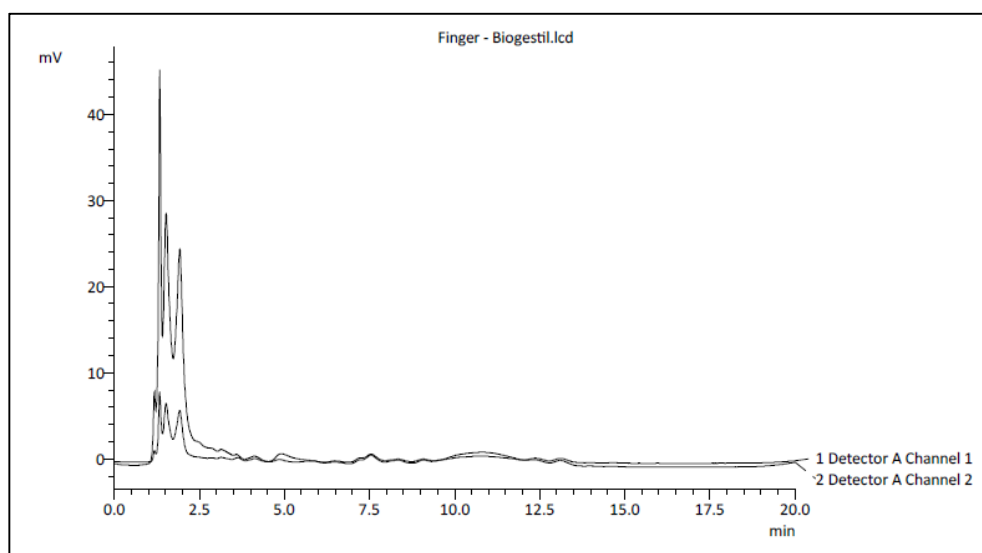


Figura 68: Método A - Fingerprint – Biogestil

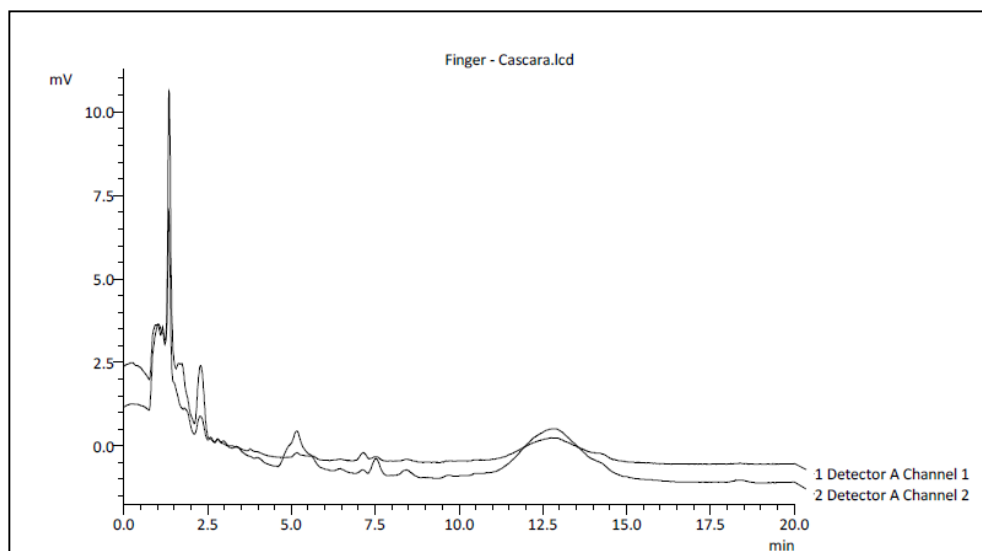


Figura 69: Método A - Fingerprint – Cascara

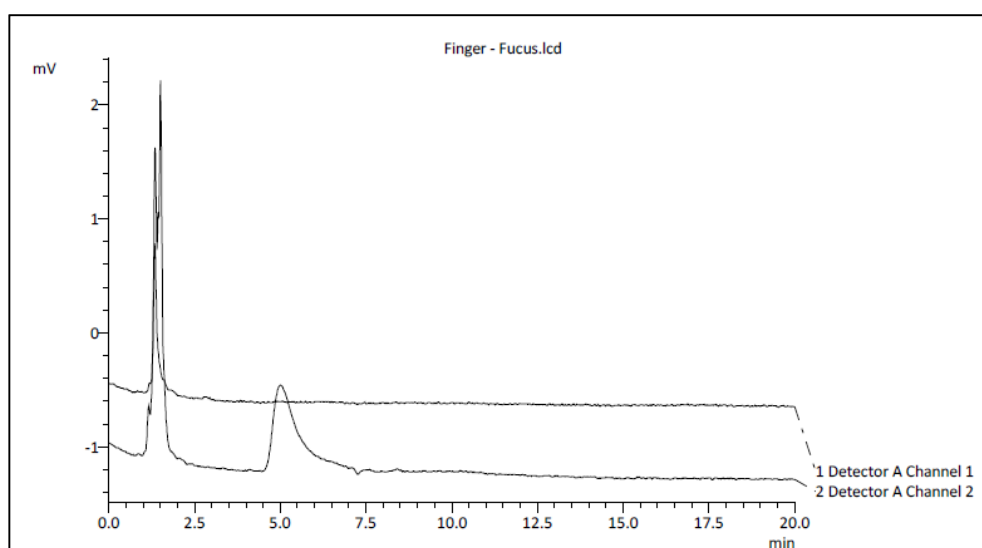


Figura 70: Método A - Fingerprint - Fucus

### 3.4.1.5.2. Método bidimensional

As frações das amostras foram coletadas de acordo com o descrito no método analítico resultaram em nos cromatogramas referentes ao método bidimensional. Foram 20 coletas, que representaram 20 novos vials a serem reinjetados nas condições do método bidimensional. Como a amostra de Alcachofra foi a que apresentou uma quantidade maior de picos, as figuras 71 a 90 representam os 20 novos vials nas condições do método bidimensional. Nota-se que não há o surgimento de nenhum pico cromatográfico característico do extrato natural de Alcachofra, que é o caso em que mais foi possível se observar picos referentes ao excipiente no cromatograma do método convencional.

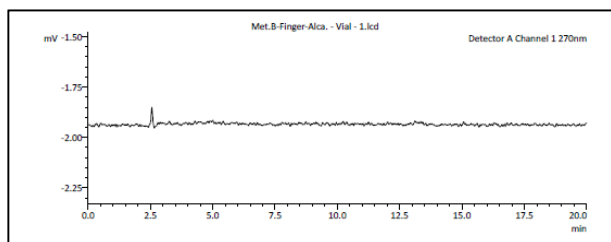


Figura 71: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 1 - 270nm

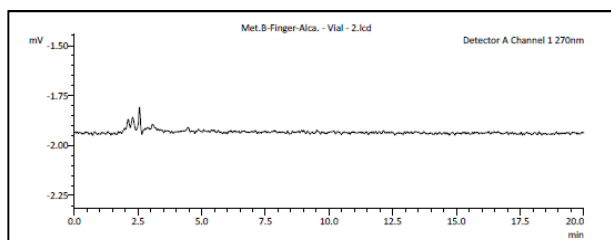


Figura 72: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 2 - 270nm

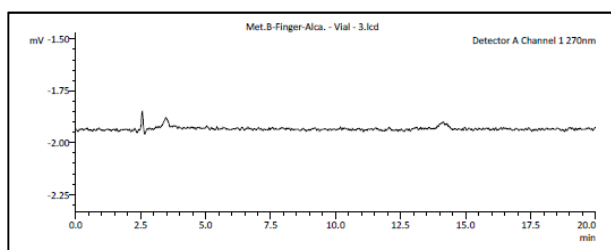


Figura 73: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 3 - 270nm

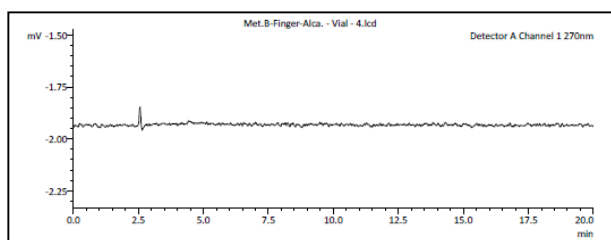


Figura 74: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 4 - 270nm

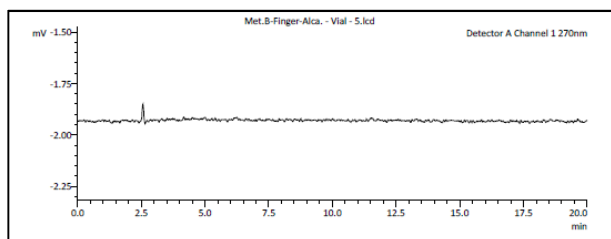


Figura 75: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 5 - 270nm

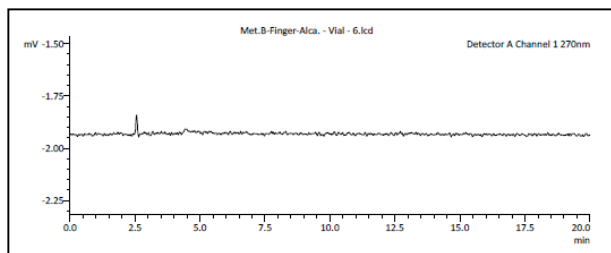


Figura 76: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 6 - 270nm

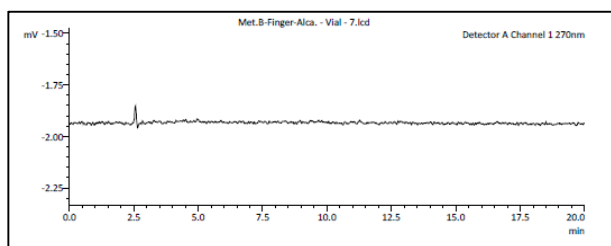


Figura 77: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 7 - 270nm

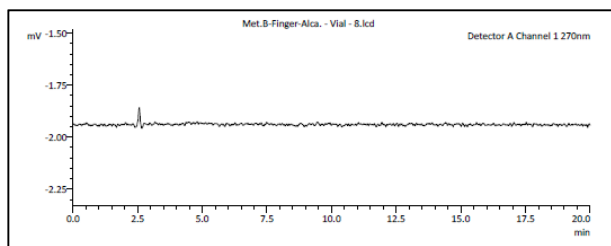


Figura 78: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 8 - 270nm

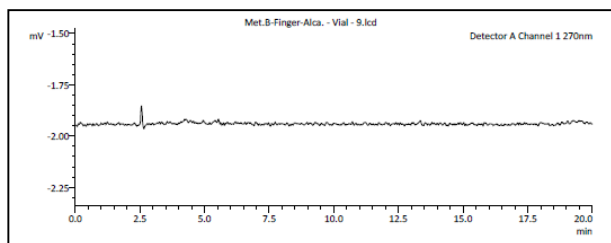


Figura 79: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 9 - 270nm

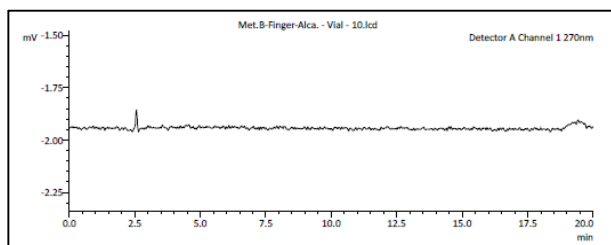


Figura 80: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 10 - 270nm

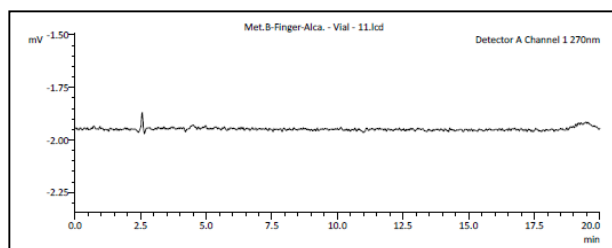


Figura 81: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 11 - 270nm

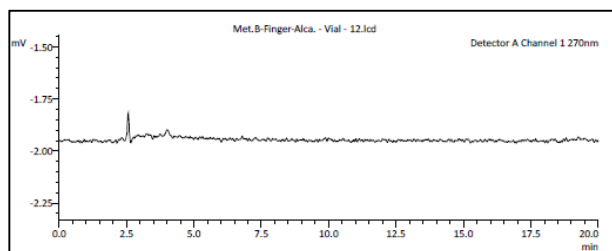


Figura 82: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 12 - 270nm

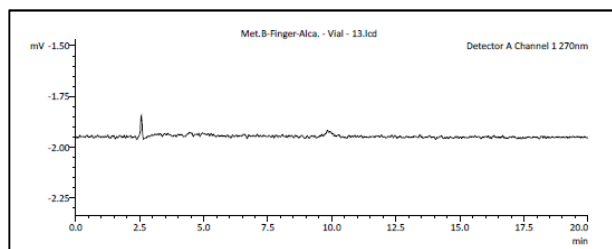


Figura 83: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 13 - 270nm

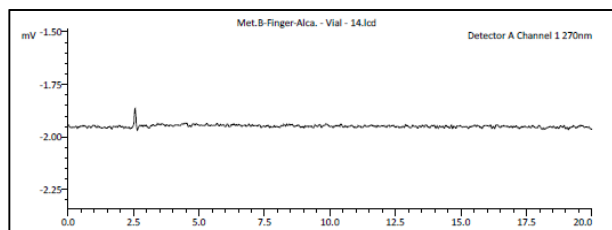


Figura 84: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 14 - 270nm

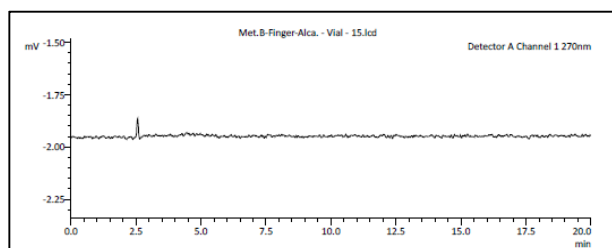


Figura 85: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 15 - 270nm



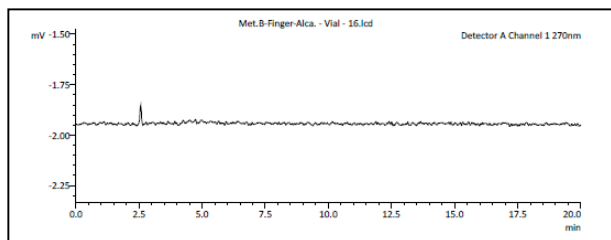


Figura 86: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 16 - 270nm

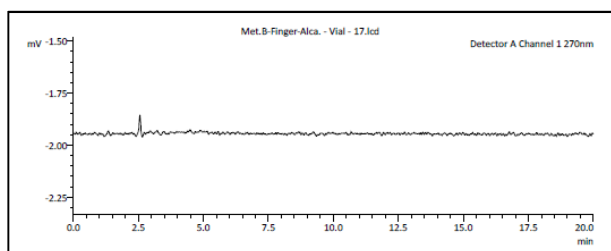


Figura 87: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 17 - 270nm

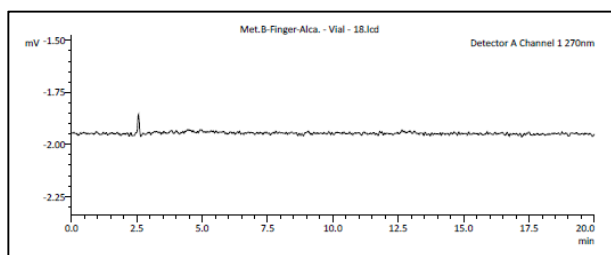


Figura 88: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 18 - 270nm

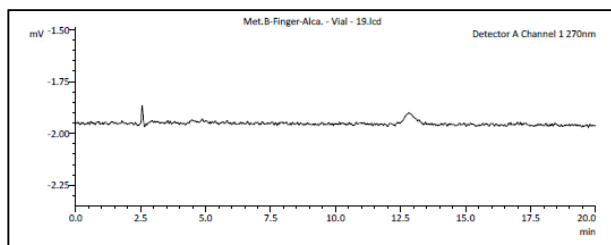


Figura 89: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 19 - 270nm

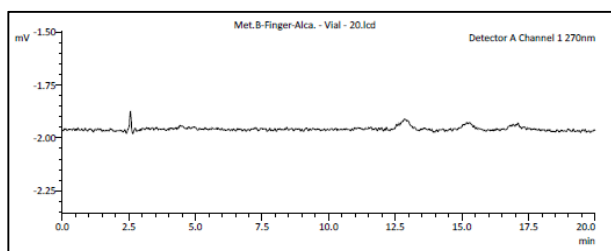


Figura 90: Método bidimensional - Fingerprint - Alcachofra - Vial 20 - 270nm

Com isso tem-se outra grande vantagem, porém no caso em questão, fingerprint test foi concluído com sucesso provando a identidade dos métodos convencionais e bidimensionais tão somente para o teor de Senosídeos, sendo este específico e

seletivo para os ativos em questão. Os cromatogramas bidimensionais para os extratos de Fucus, Cascara e Biogestil estão dispostos no apêndice deste trabalho.

### 3.4.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

#### 3.4.2.1. Identificação

Para o teste de identificação baseado nos tempos de retenção dos ingredientes ativos foram preparadas soluções padrão utilizando padrão primário USP. Os três cromatogramas (figuras 91 a 93) mostram que o Diclofenaco Sódico elui a 2,787 minutos, o Paracetamol a 3,652 minutos e a Cafeína a 4,584 minutos, ou seja, com menos de 5 minutos de corrida as condições cromatográficas do método convencional foram capazes de separar os picos dos ativos. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

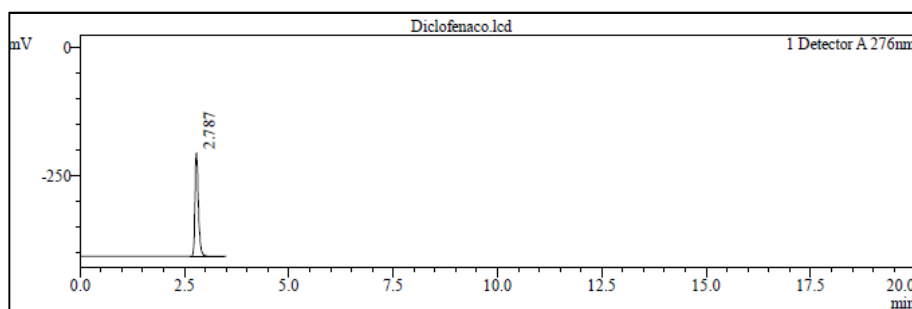


Figura 91: Diclofenaco

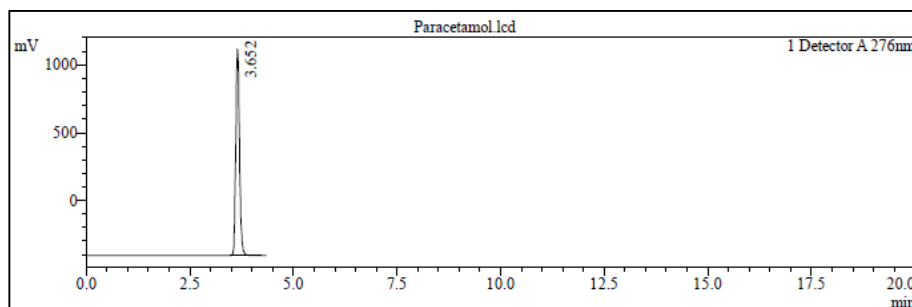


Figura 92: Paracetamol

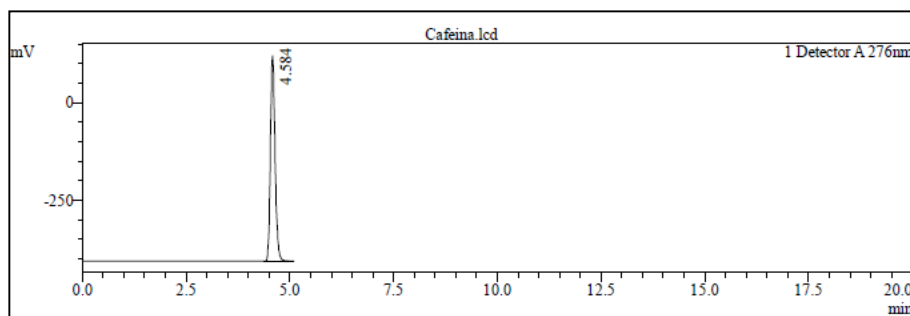


Figura 93: Cafeína

### 3.4.2.2. Método convencional – Padrão

O desenvolvimento do método de teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína contemplou 3 injeções da solução padrão para o método convencional.

A solução padrão preparada com o mix dos 3 ativos foi injetada seguindo as mesmas condições desenvolvidas para o método convencional e no cromatograma (figura 94) é possível verificar a separação total dos picos sendo eluidos na sequencia Diclofenaco Sódico a 2,785 minutos, Paracetamol a 3,670 minutos e Cafeína a 4,578 minutos. Em relação ao volume da área, a sequência de eluição da maior para menor é representada por Paracetamol, Diclofenaco Sódico e Cafeína. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

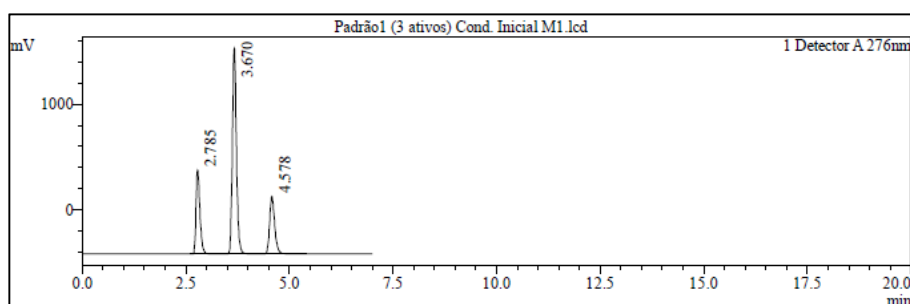


Figura 94: Padrão1 (3 ativos) Cond. Inicial M1

### 3.4.2.3. Método convencional – Amostra

O desenvolvimento do método de teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína contemplou 2 injeções das soluções amostra para o método convencional.

Conseqüentemente a mesma situação pode ser vista quando se observa o cromatograma da solução amostra pós-desenvolvimento do método convencional. O cenário (figura 95) é positivo para identificação dos picos na mesma sequência de

eluição, sendo esta Diclofenaco Sódico com 2,786 minutos, Paracetamol com 3,664 minutos e Cafeína com 4,578 minutos. E em se tratando de volume de área, do maior para o menor tem-se Paracetamol, Diclofenaco Sódico e Cafeína. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

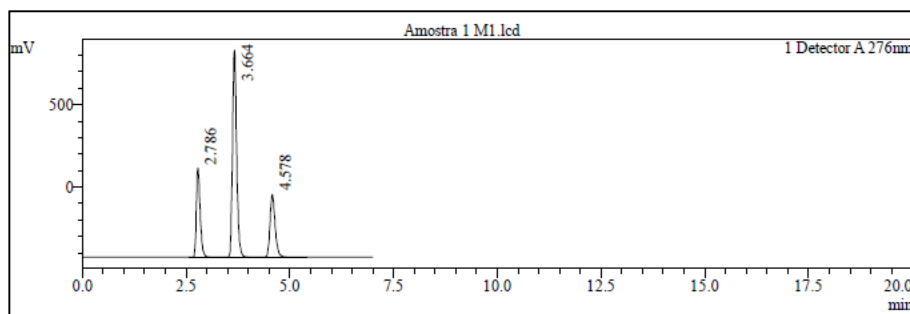


Figura 95: Amostra 1 M1

#### 3.4.2.4. Método bidimensional – Padrão

Os cromatogramas do método bidimensional estão descritos abaixo, são 7 cromatogramas coletados em 7 frações pós passagem pelo detector frente as condições do método inicial. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho. O cromatograma do vial 1, o mesmo que o da primeira fração do método inicial. O que vemos sempre nos primeiros cromatogramas (figuras 96 e 97), e neste caso 1 e 2 são sinais apenas da linha de base, representados pelo volume morto da coluna inicial, conseqüentemente não há evidências de picos dos ativos. Este método preconiza a utilização de uma coluna de polaridade totalmente oposta ao método convencional, trata-se da coluna Vydac 210 TP Dyphenyl (250 x 4 mm), 5  $\mu$ m, com isso espera-se obter a inversão na ordem de eluição dos picos frente ao método inicial. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

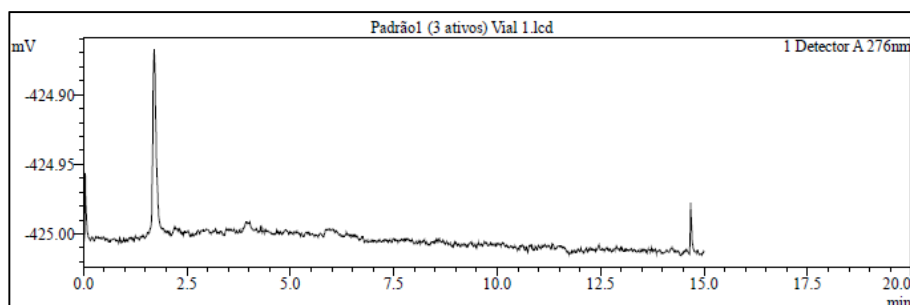


Figura 96: Padrão1 (3 ativos) Vial 1

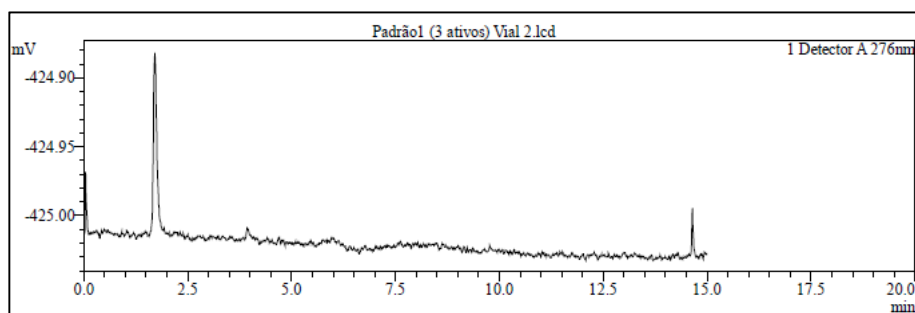


Figura 97: Padrão1 (3 ativos) Vial 2

Já em se tratando do vial 3 (figura 98) sendo este a terceira fração do método inicial, nota-se a coeluição do ingrediente ativo que possuía o menor sinal do cromatograma inicial, ou seja, o pico da Cafeína é eluído a 5,098 minutos, consequentemente já é possível caracterizar a inversão na ordem de eluição dos picos, sendo proporcionado pela ortogonalidade na polaridade das colunas utilizadas.

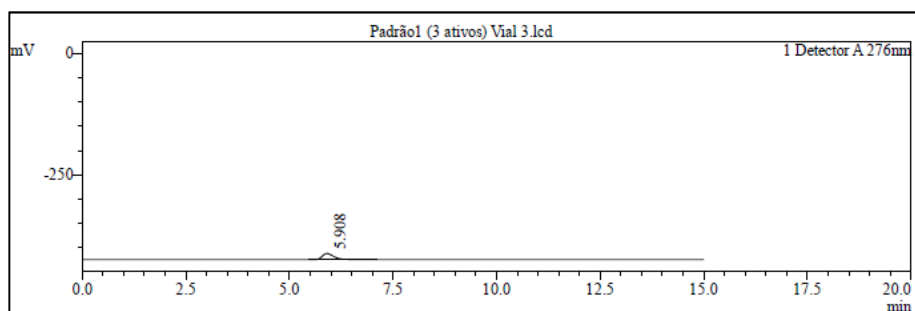


Figura 98: Padrão1 (3 ativos) Vial 3

Já o cromatograma do vial 4 (figura 99) representado pela quarta fração, indica a eluição a 2,202 minutos do pico de maior área, ou seja, Paracetamol.

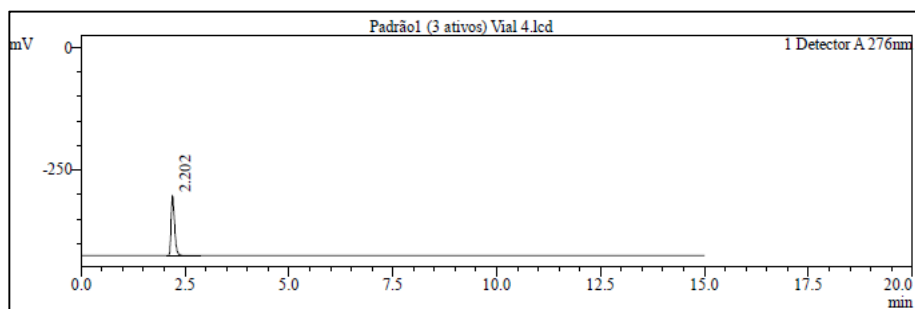


Figura 99: Padrão1 (3 ativos) Vial 4

E por fim, o vial 5 (figura 100) representado pela quinta fração, mostra a eluição do pico do Diclofenaco Sódico com 3,936 minutos, caracterizando a inversão total dos picos de Diclofenaco Sódico e Cafeína se comparados ao método convencional. Isto se deve ao fato da polaridade oposta das colunas cromatográficas utilizada para os métodos, sendo este um fator de ortogonalidade para o experimento.

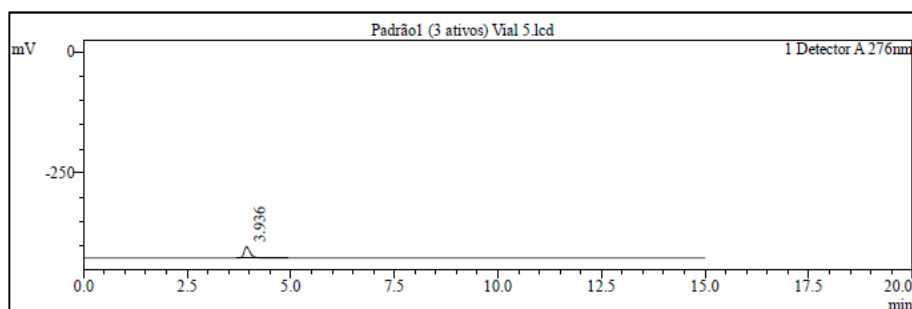


Figura 100: Padrão1 (3 ativos) Vial 5

As figuras 101 e 102 mostram os cromatogramas dos vials 6 e 7 e são representados pelas últimas injeções das frações iniciais e o cenário observado é tido pela linha de base, ou seja, ausência de picos referentes aos ativos farmacêuticos em questão.

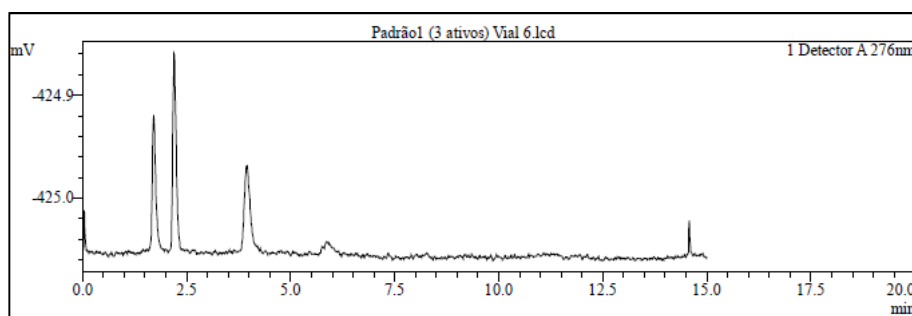


Figura 101: Padrão1 (3 ativos) Vial 6

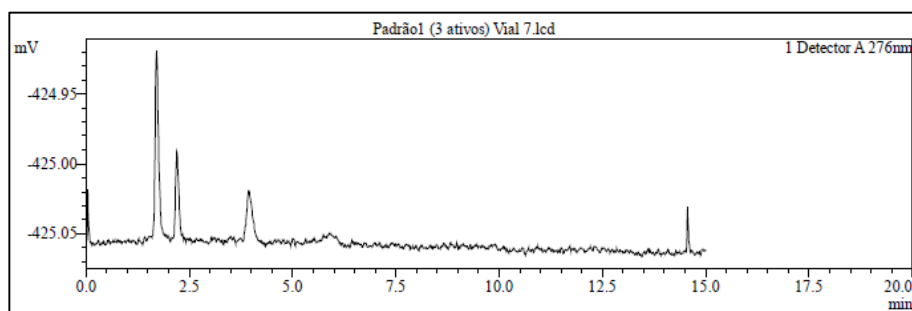


Figura 102: Padrão1 (3 ativos) Vial 7

### 3.4.2.5. Método bidimensional – Amostra

O que se esperava deste método é exatamente os mesmos cenários para os cromatogramas das amostras, e é o que pode-se notar nas figuras 103 a 109. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

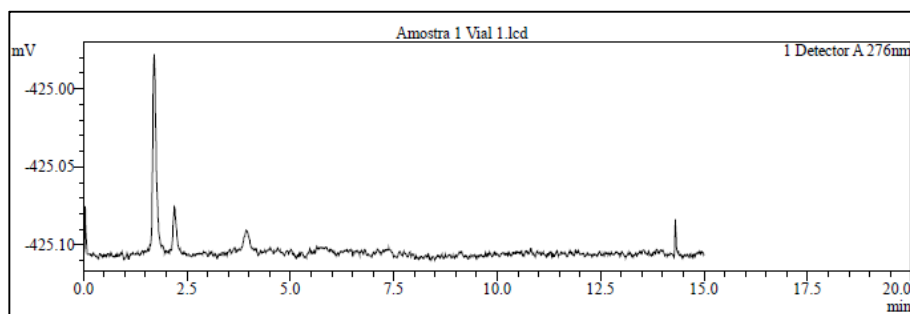


Figura 103: Amostra 1 Vial 1

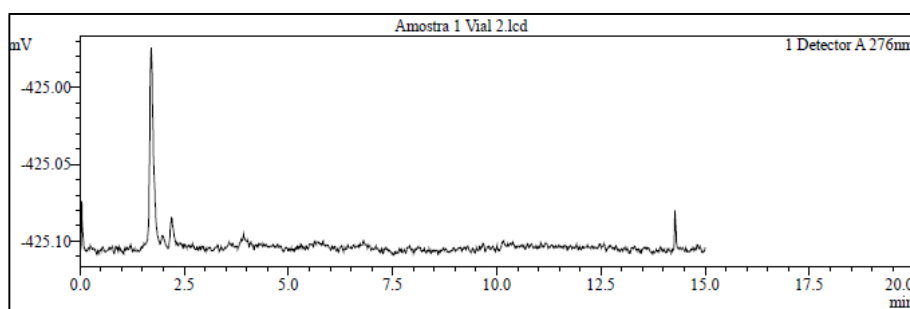


Figura 104: Amostra 1 Vial 2

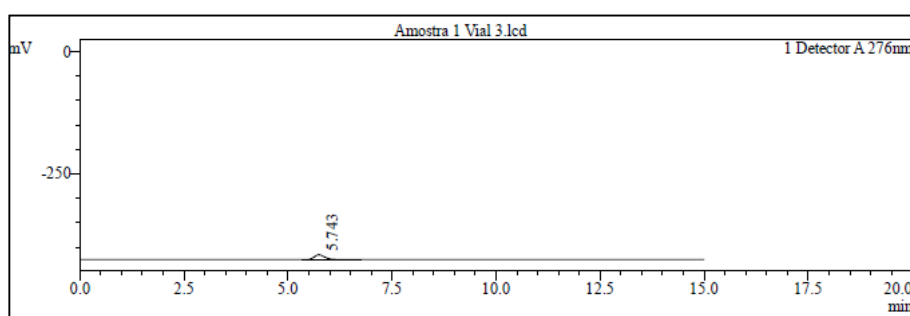


Figura 105: Amostra 1 Vial 3

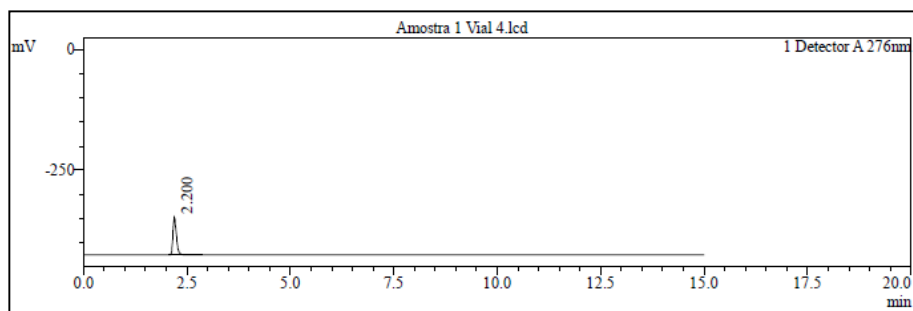


Figura 106: Amostra 1 Vial 4

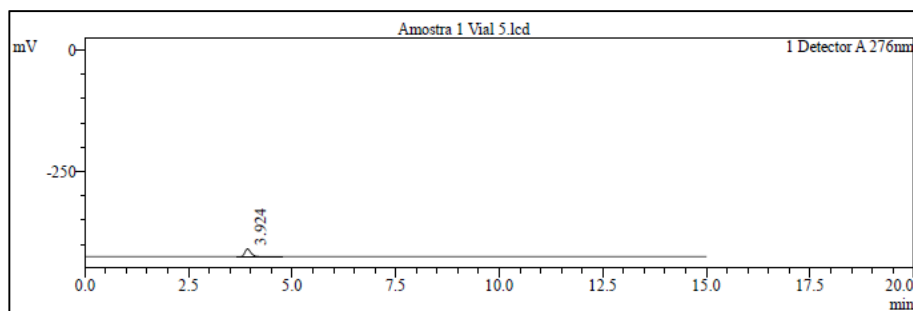


Figura 107: Amostra 1 Vial 5

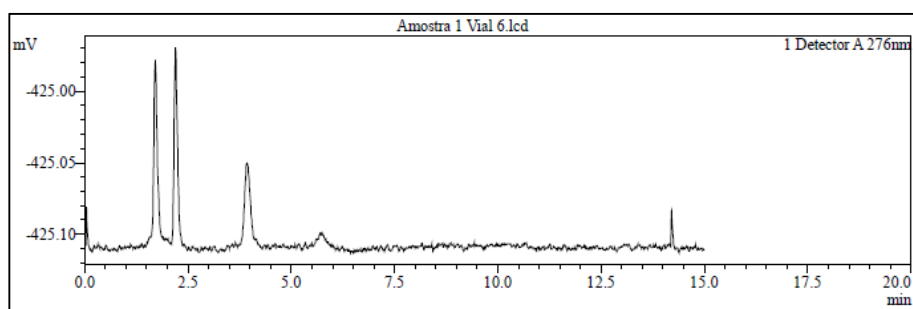


Figura 108: Amostra 1 Vial 6

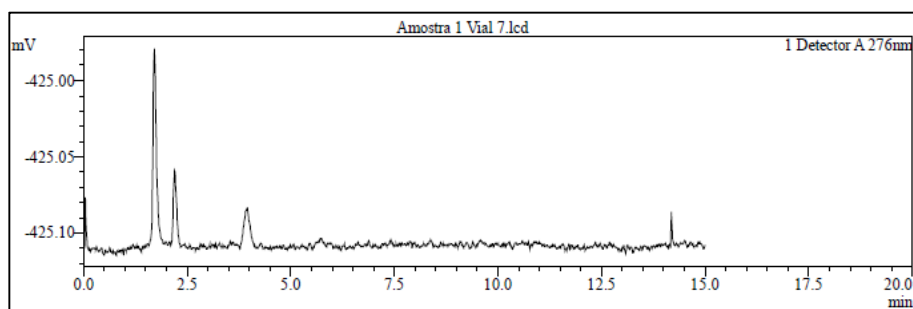


Figura 109: Amostra 1 Vial 7



### 3.4.2.6. Teste de estresse (*Stress testing*)

#### 3.4.2.6.1. Método convencional – Amostra

O objetivo principal do teste de estresse é avaliar o surgimento de picos cromatográficos que a princípio estariam co-eluídos no método convencional e através do método bidimensional inverter a ordem de eluição dos mesmos, os separando nos vials coletados. As condições cromatográficas de estresse ácido, básico e oxidativo estão descritas na seção dos métodos desenvolvidos e utilizou como premissa os guias nacionais para aplicação das condições estressantes.

O desenvolvimento do método contemplou 3 injeções da solução amostra para cada padrão em cada uma das 3 condições de estresse para o método convencional. O caso abaixo é para a amostra estressada nas condições oxidativas. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

Na figura 110 a sequência de eluição é tida por Diclofenaco Sódico a 2,771 minutos, Composto de Degradação 1 a 3,444 minutos, Paracetamol a 3,651 minutos e Cafeína a 4,562 minutos. Com isto podemos notar claramente o surgimento de 1 pico caracterizado como composto de degradação pós condições de estresse oxidativa. O mesmo está com um princípio de coeluição com o pico do Paracetamol o tornando não seletivo e sem resolução.

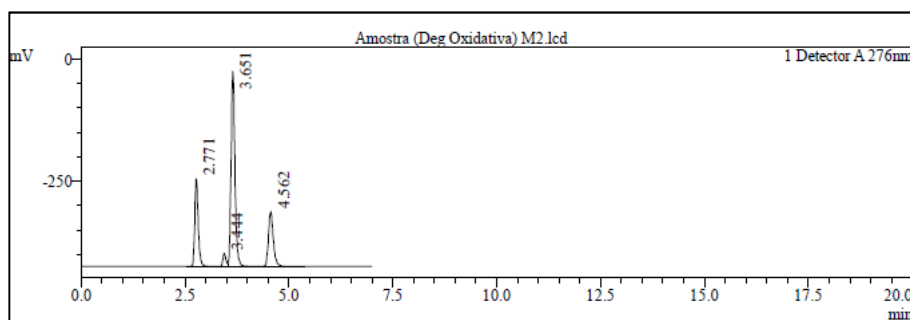


Figura 110: Amostra (Deg.Oxidativa) M2

#### 3.4.2.6.2. Método bidimensional – Amostra

As frações coletadas de acordo com o descrito no método analítico resultaram em 21 cromatogramas referentes ao método bidimensional. O restante dos cromatogramas está disposto no apêndice deste trabalho.

Os cromatogramas dos vials 1 e 2 (figuras 111 e 112) estão mostrando o mesmo cenário para as amostras caracterizadas para o teste de teor, ou seja, sem aplicação

de degradantes. Não houve o surgimento de picos referentes aos ingredientes ativos, nem mesmo o composto de degradação 1.

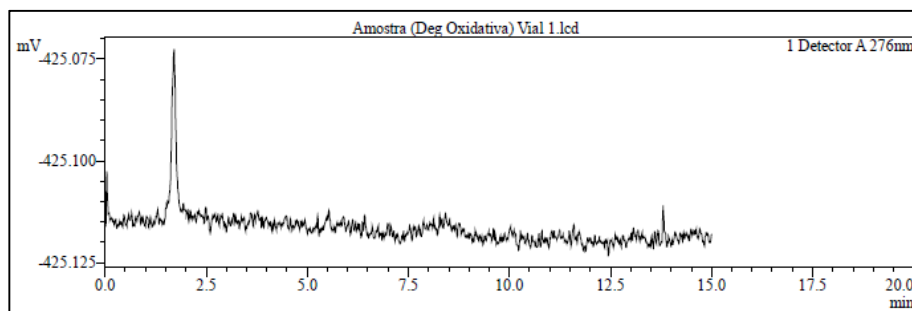


Figura 111: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 1

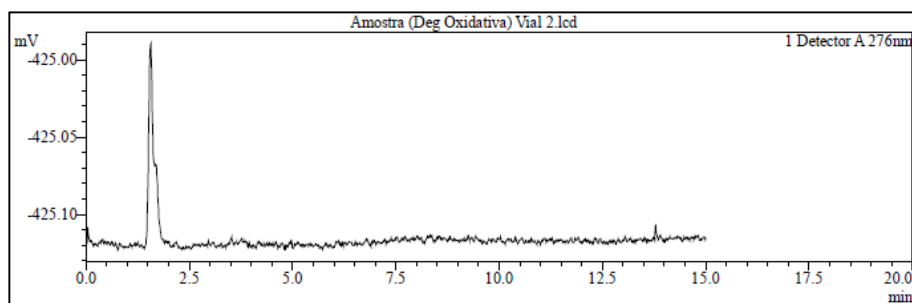


Figura 112: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 2

Já o cromatograma referente ao vial 3 (figura 113), ou terceira fração da coleta da amostra degradada oxidativamente mostra o cenário com eluição de dois picos cromatográficos, sendo estes, o Paracetamol a 1,645 minutos e a Cafeína a 5,386 minutos. Os sinais estão baixos, porém quando aplicados e vistos tridimensionalmente mais a frente do trabalho, torna-se mais claras suas evidências.

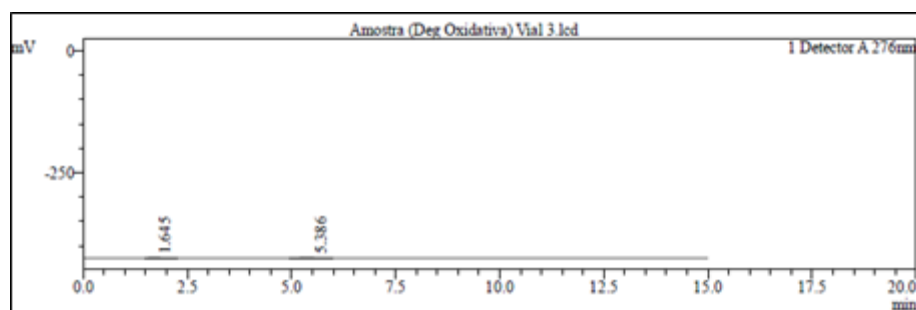


Figura 113: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 3

Já o cromatograma do vial 4 (figura 114) indica que a 7,722 minutos, o composto de degradação 1 é eluído, separando-se dos demais ativos farmacêuticos. As

intensidades estão com sinais bem baixos porém de acordo com as integrações foi possível verificar a presença de picos em alguns cromatogramas para o teste de estresse. Não observamos picos na figura 115.

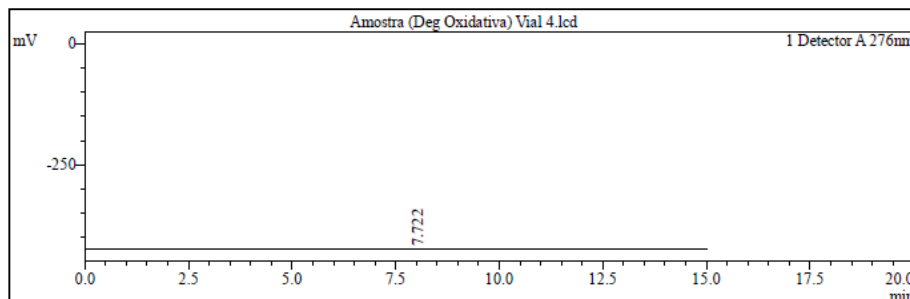


Figura 114: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 4

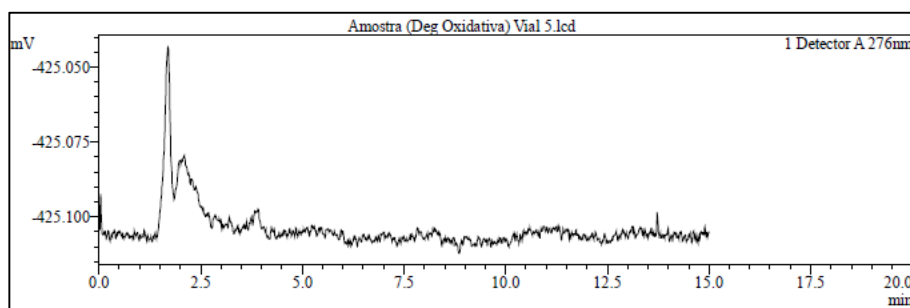


Figura 115: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 5

Por fim o cromatograma do vial 6 (figura 116), referente ao sexto minutos de corrida indica a eluição do pico do Diclofenaco Sódico a 2,899 minutos. Não observamos picos na figura 117.

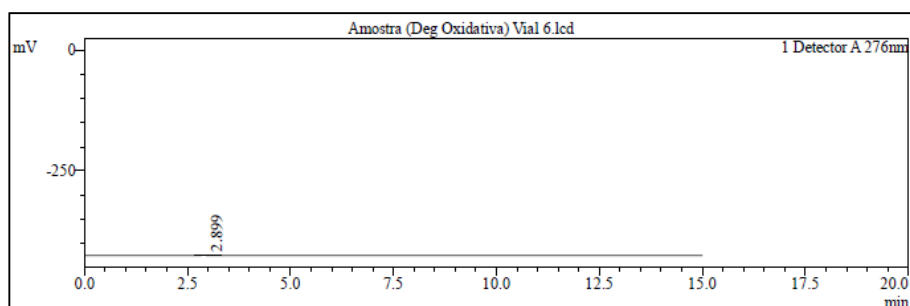


Figura 116: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 6

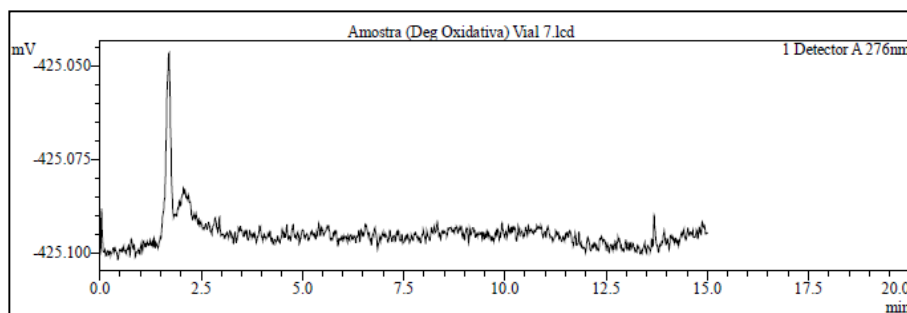


Figura 117: Amostra (Deg.Oxidativa) Vial 7

### 3.5.MATLAB®

Todos os cromatogramas referentes a injeções da primeira coluna e cromatogramas referentes a injeções da segunda coluna foram tratados através do *software* MATLAB®. O programa é relacionado a uma linguagem de alto nível e um ambiente para computação numérica, visualização e programação. Permite analisar dados, desenvolver algoritmos e criar modelos e aplicações. No caso do trabalho em questão, a utilização para tratamento dos dados pode mostrar a visualização dos cromatogramas de maneira tridimensional. Com isto nas figuras 118 a 135 é possível notar uma dimensão relacionada ao tempo de eluição da primeira coluna, outra dimensão relacionada ao tempo de eluição da segunda coluna e mais uma dimensão relacionada a intensidade de absorção no comprimento de onda do método desenvolvido. A grande vantagem desta ferramenta é permitir a quantificação dos picos cromatográficos não mais em área e sim por volume.

### 3.5.1. Teor de Senosídeos

#### 3.5.1.1. Padrão

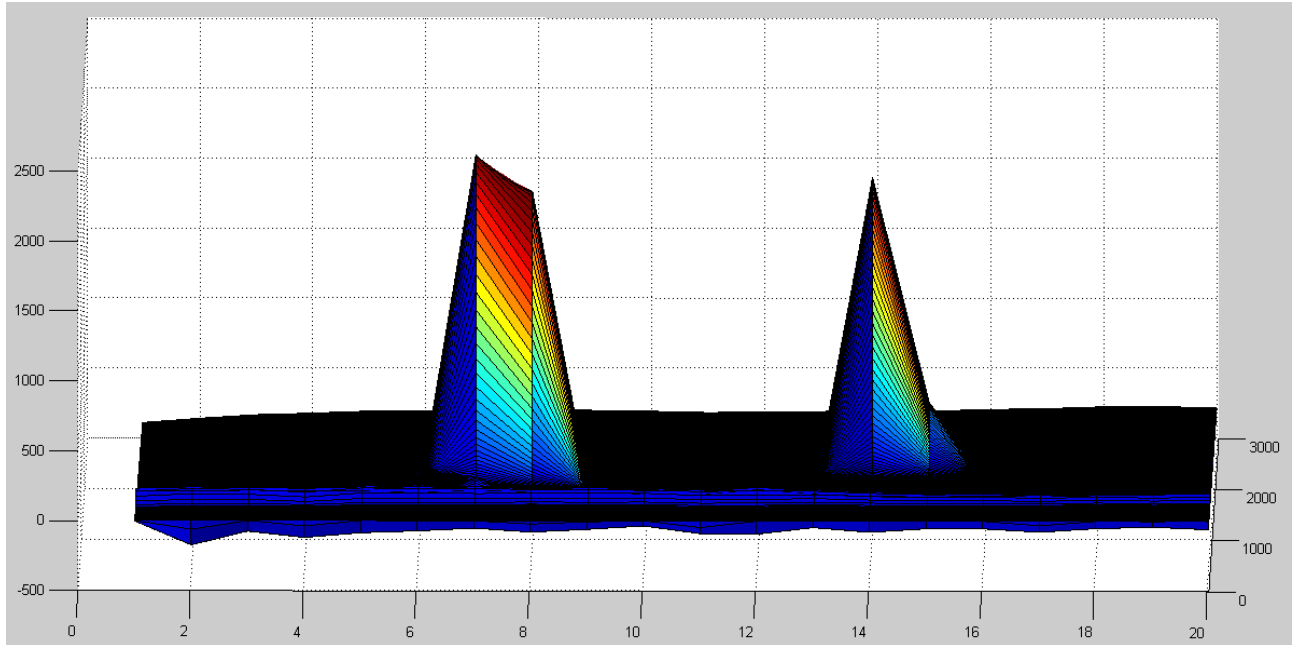


Figura 118: Teor de Senosídeos - Padrão 1

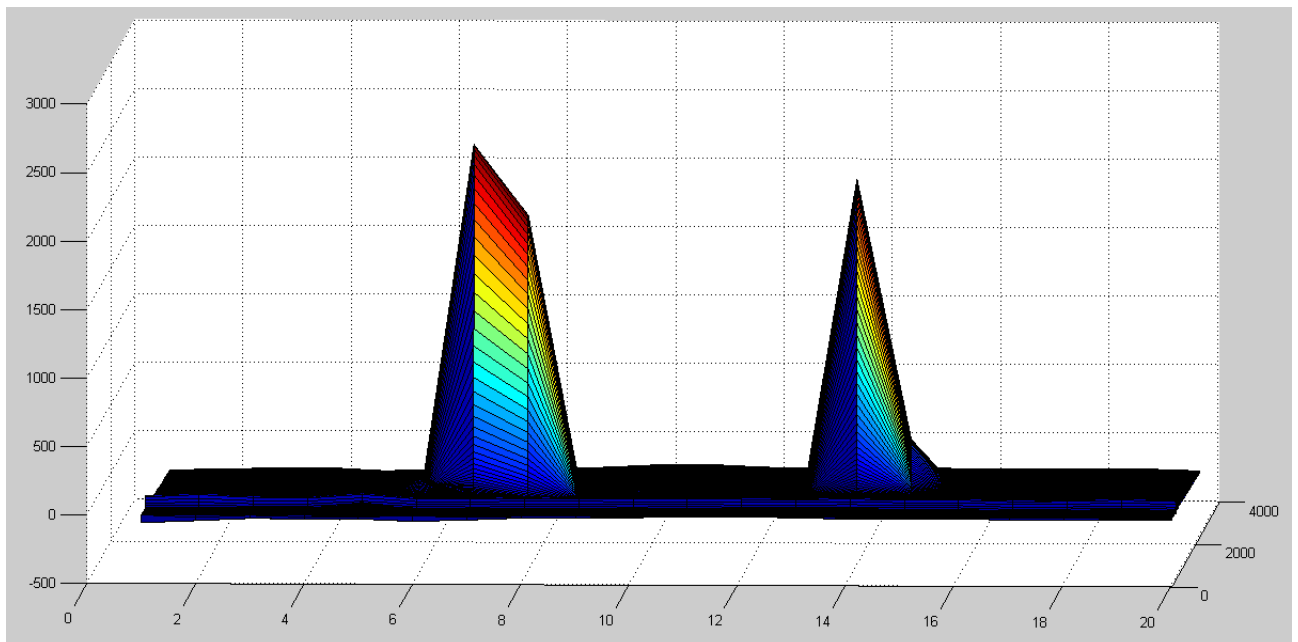


Figura 119: Teor de Senosídeos - Padrão 2

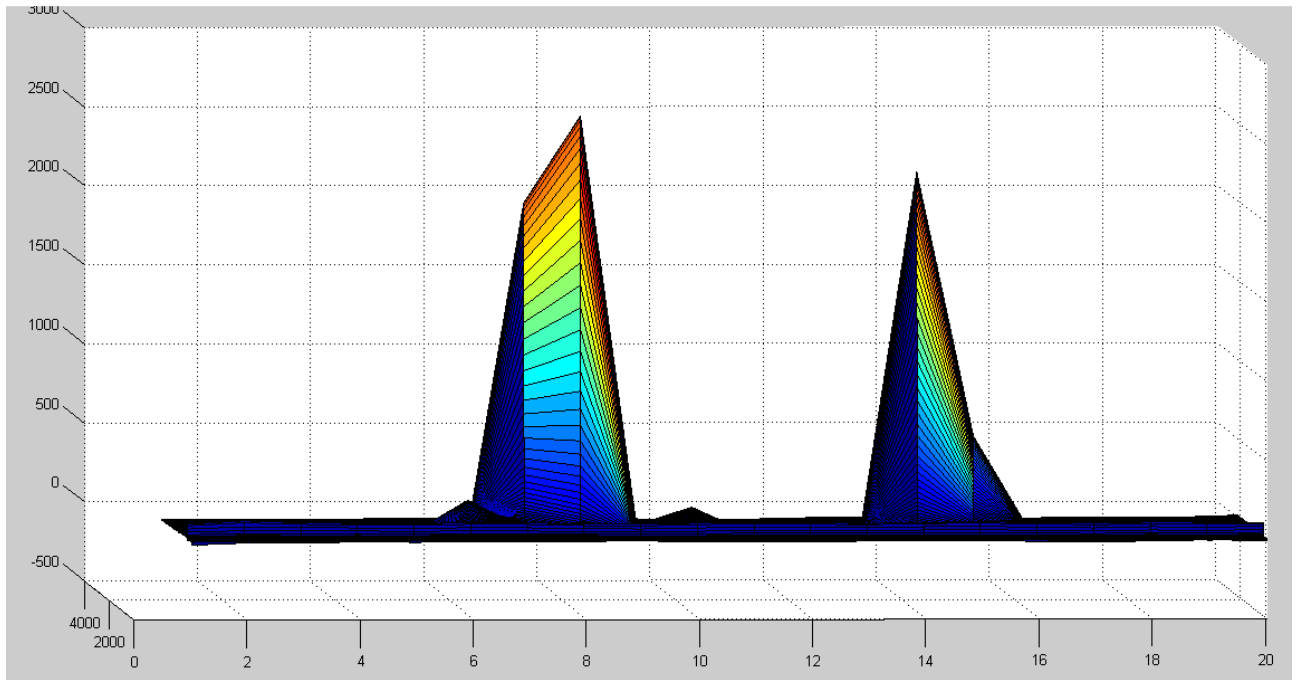


Figura 120: Teor de Senosídeos - Padrão 3

### 3.5.1.2. Amostra

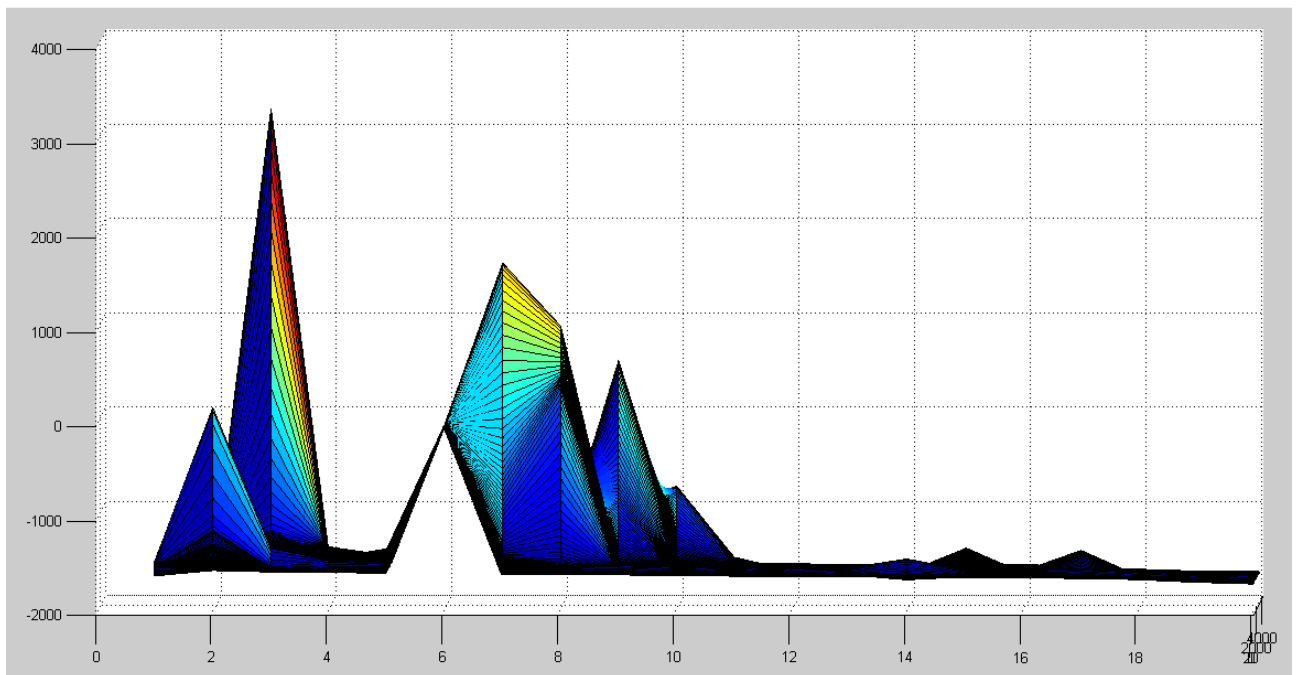


Figura 121: Teor de Senosídeos - Amostra 1

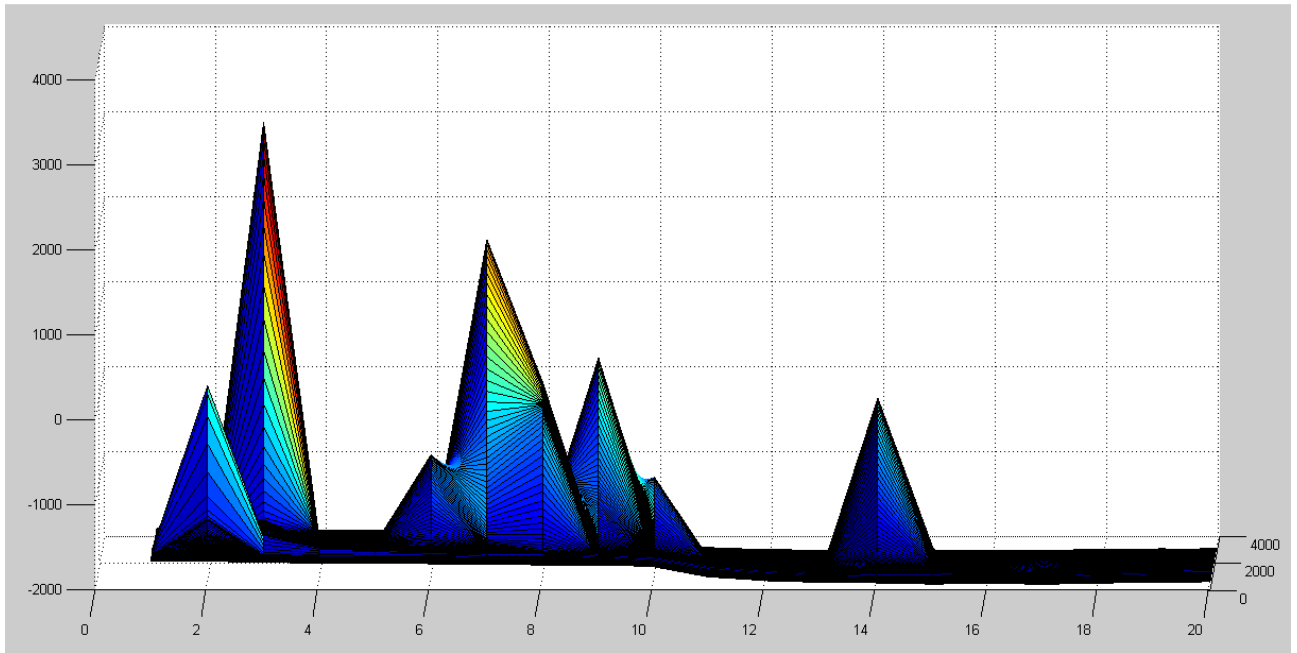


Figura 122: Teor de Senosídeos - Amostra 2

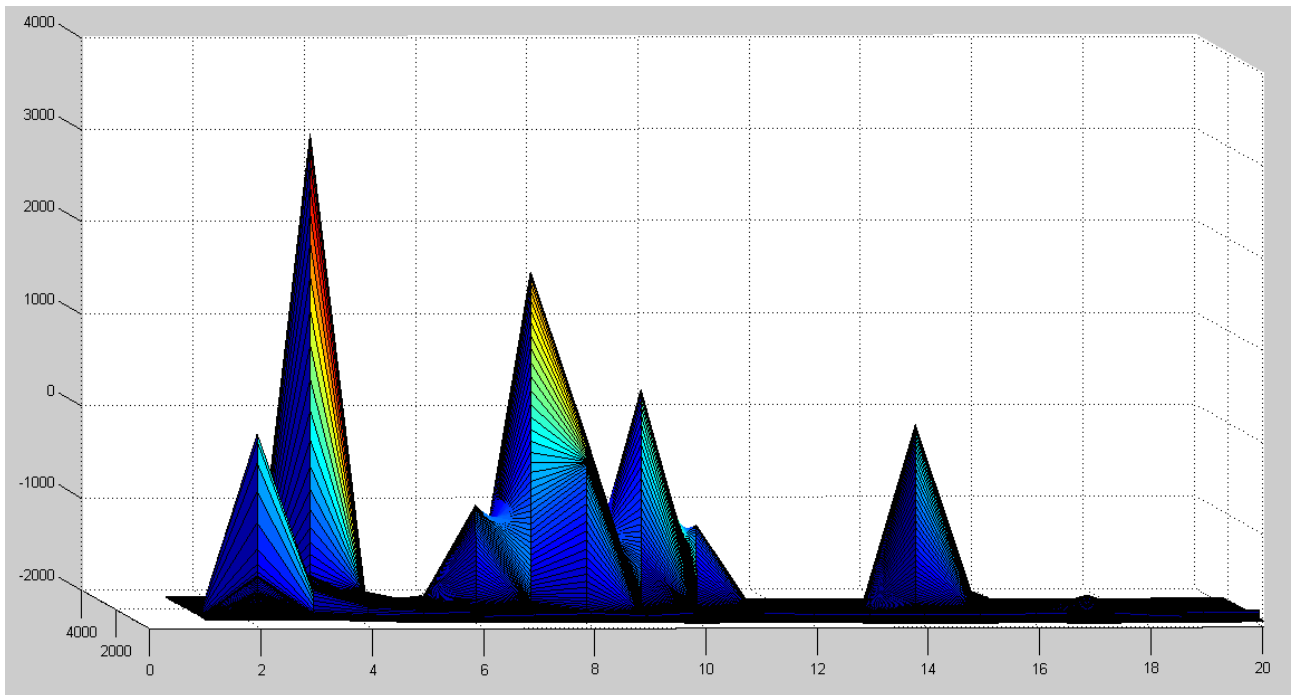


Figura 123: Teor de Senosídeos - Amostra 3

### 3.5.1.3. Fingerprint Test

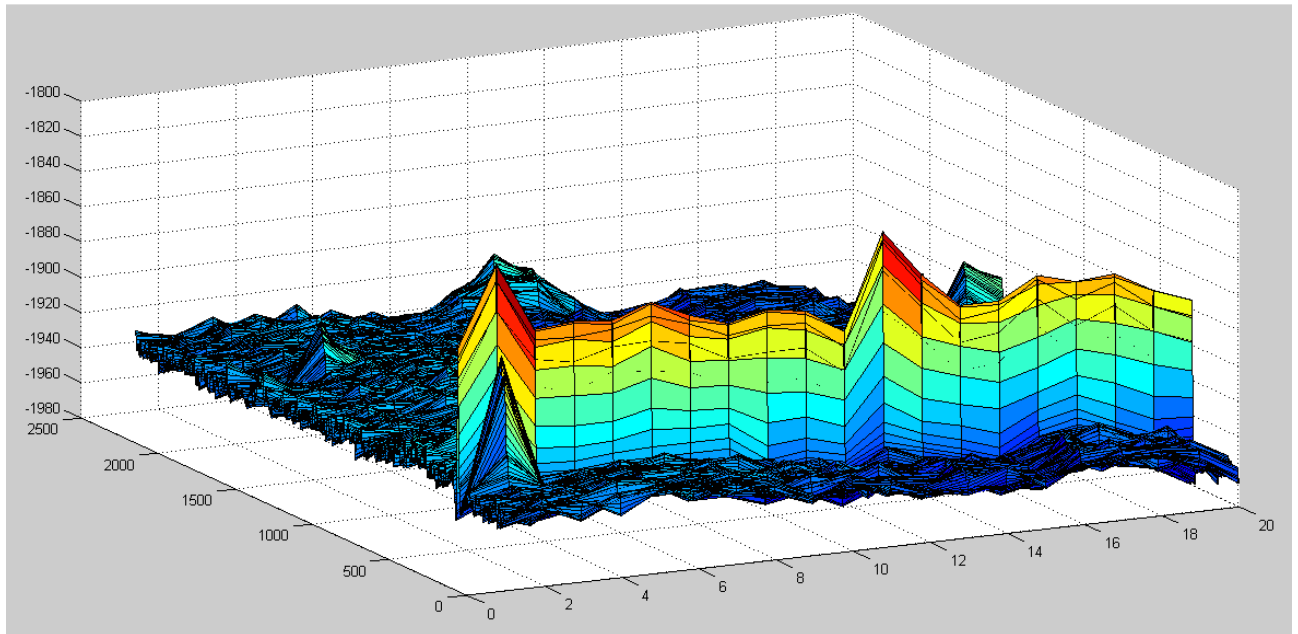


Figura 124: Fingerprint Test - Alcachofra

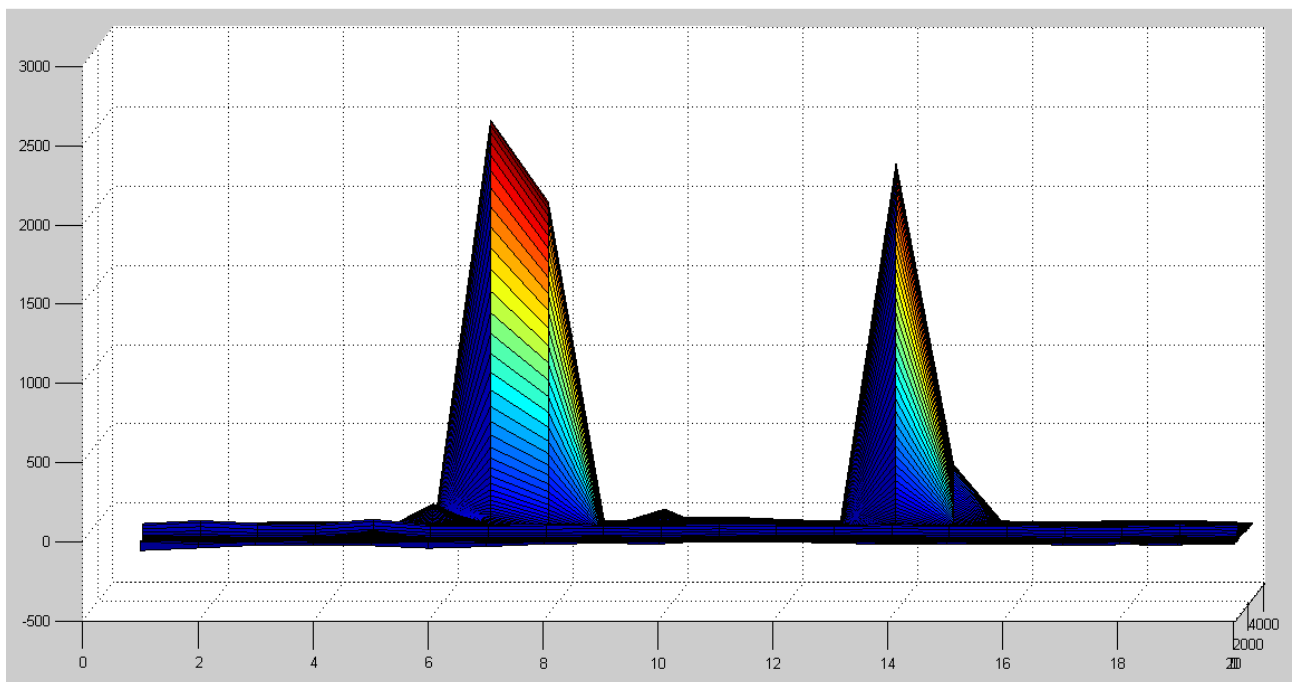


Figura 125: Fingerprint Test – Biogestil



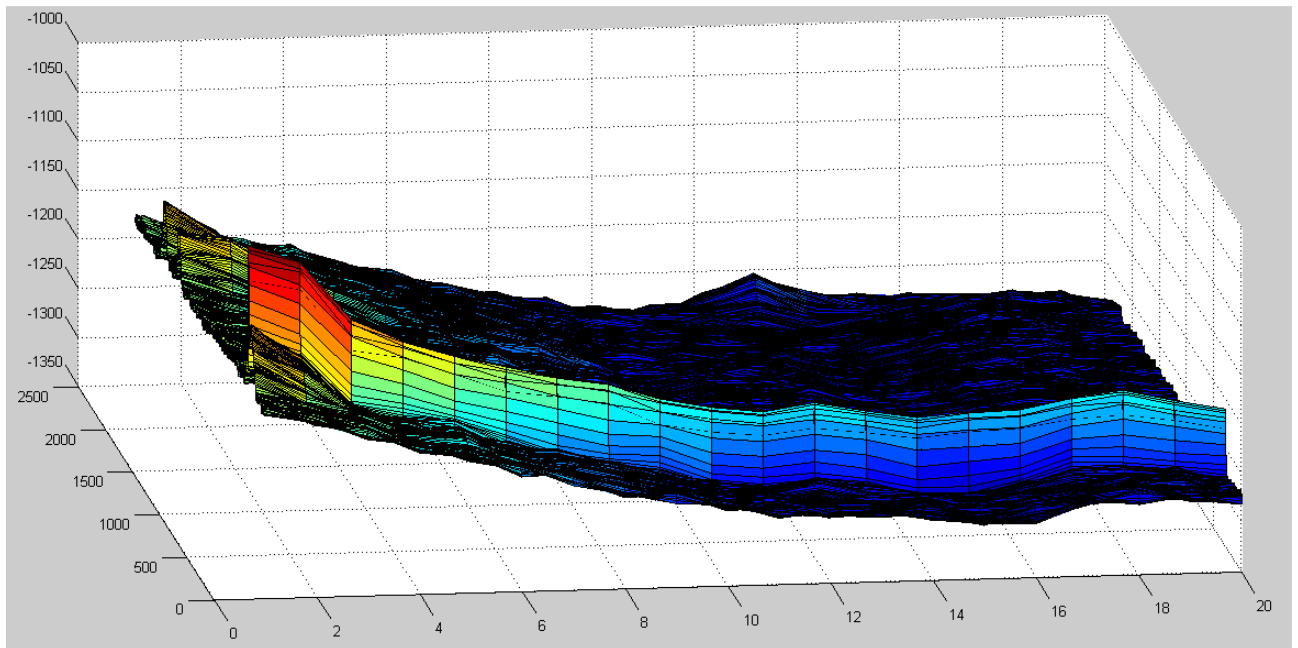


Figura 126: Fingerprint Test - Cascara

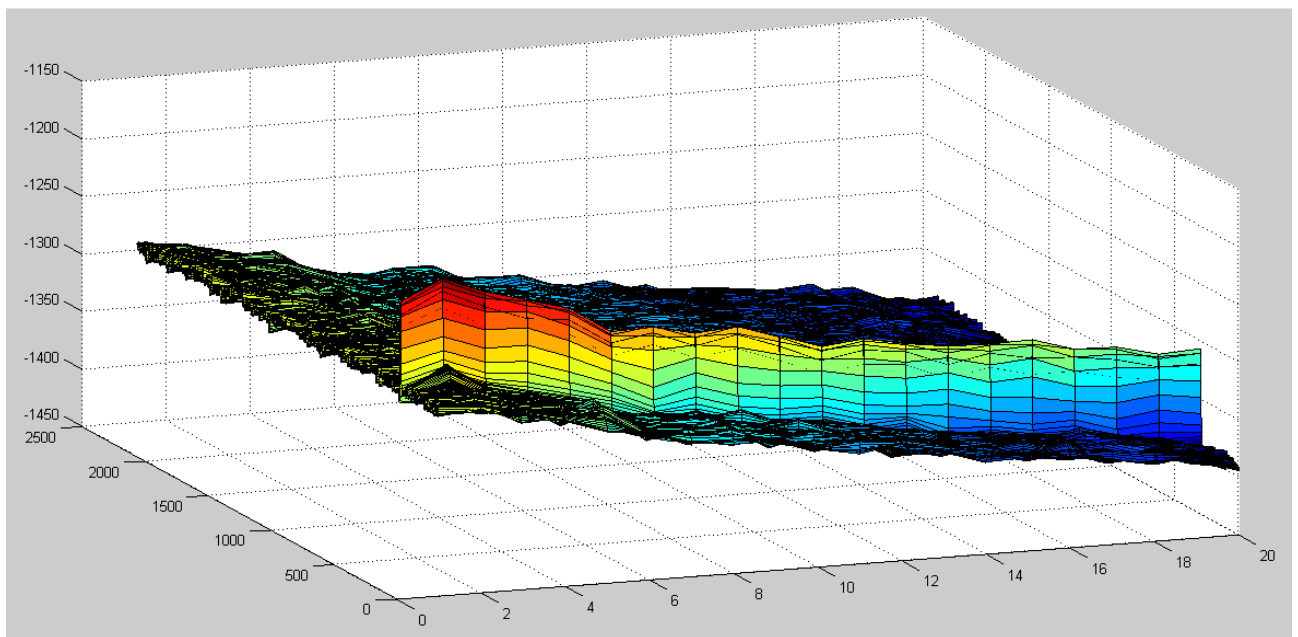


Figura 127: Fingerprint Test - Fucus

### 3.5.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

#### 3.5.2.1. Padrão

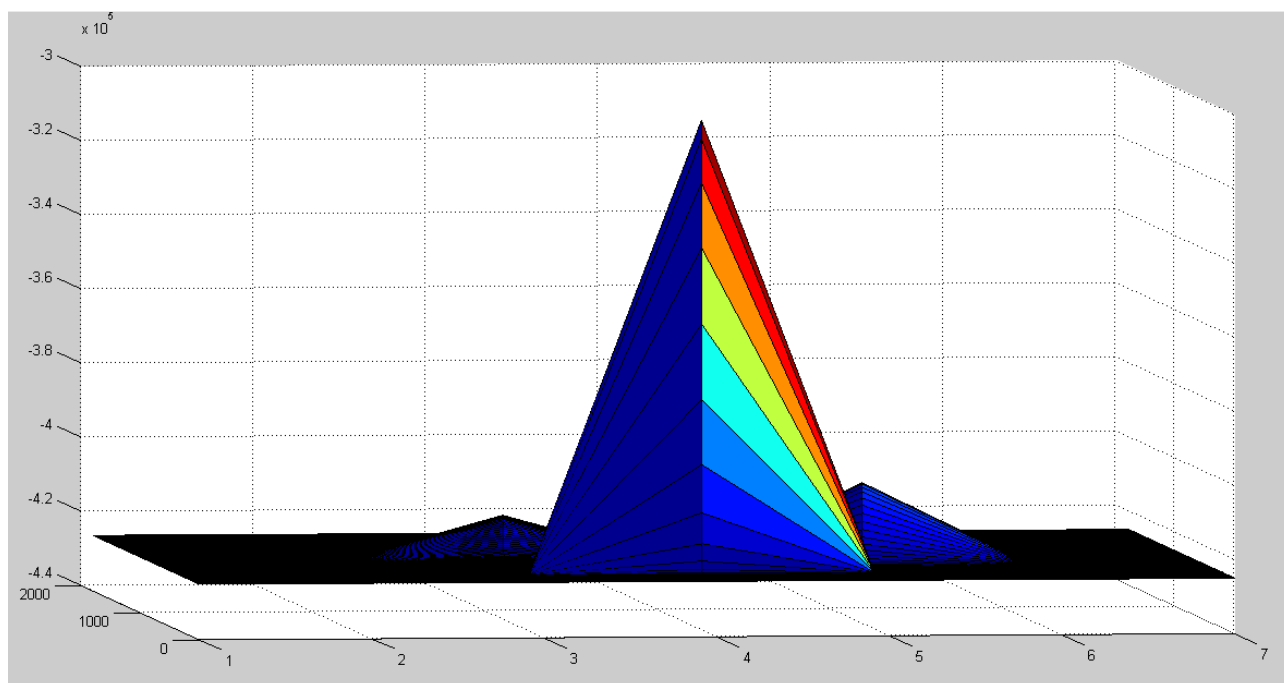


Figura 128: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Padrão 1

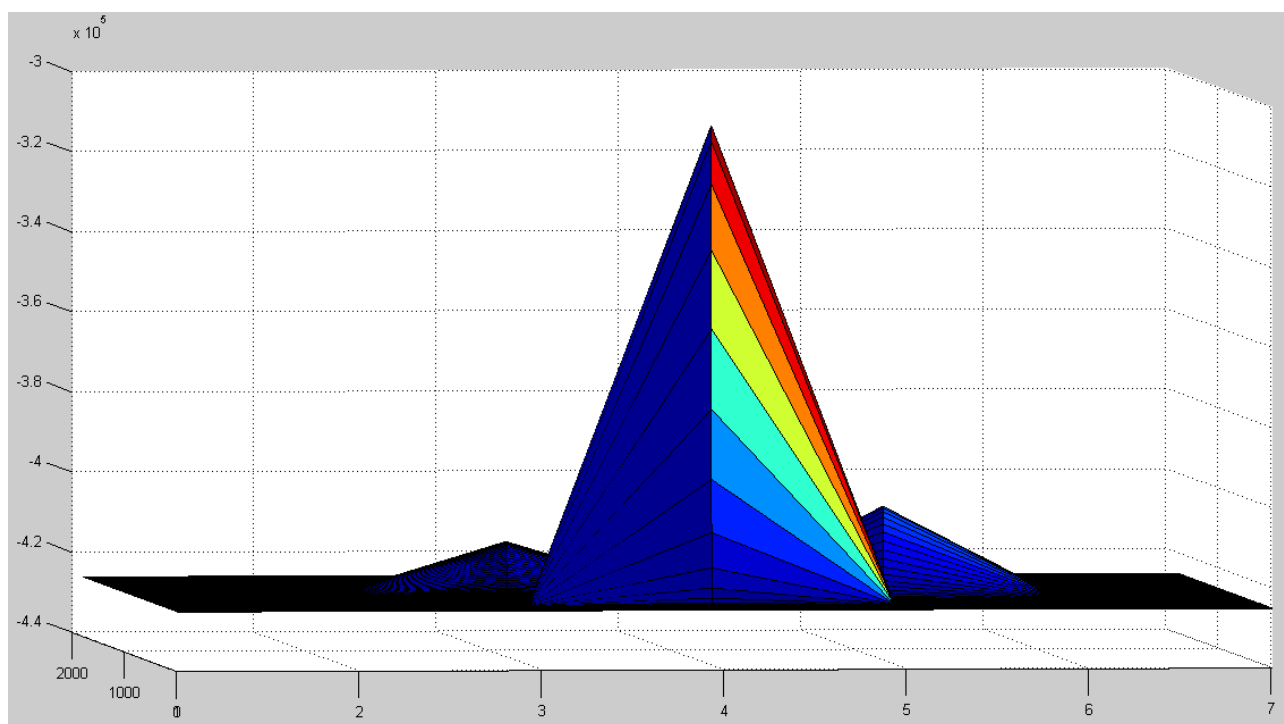


Figura 129: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Padrão 2

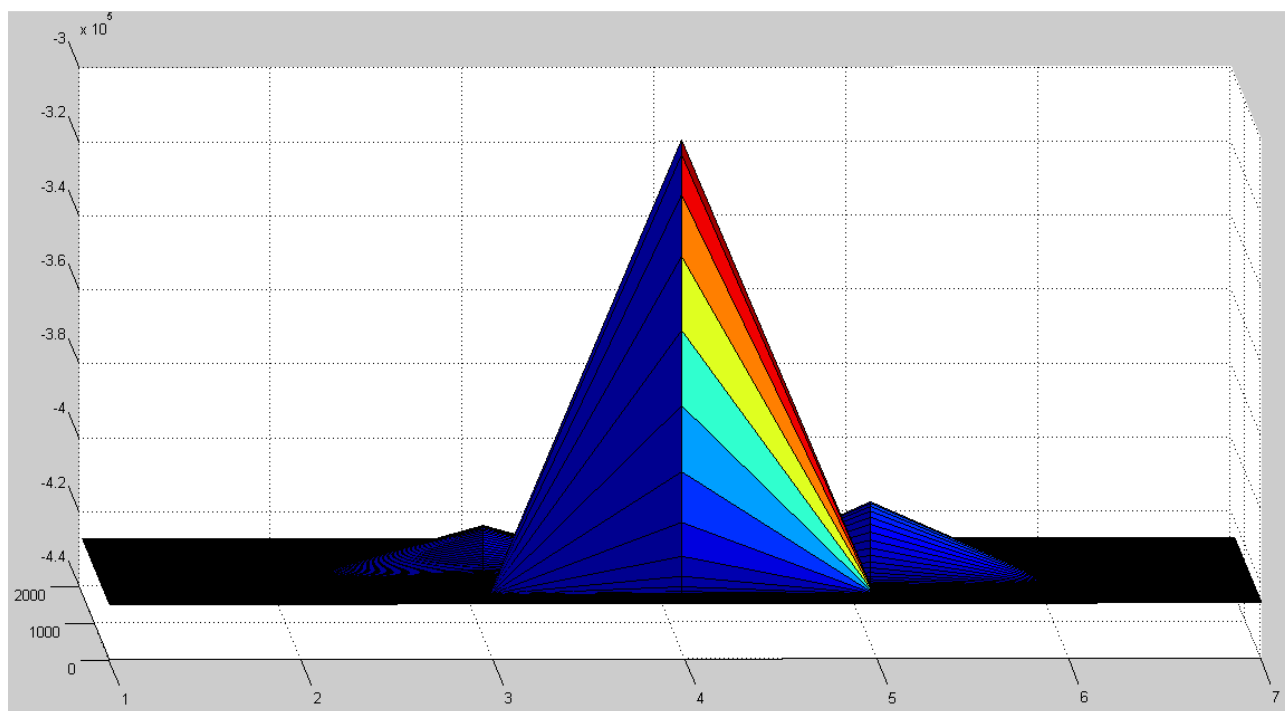


Figura 130: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Padrão 3

### 3.5.2.2. Amostra

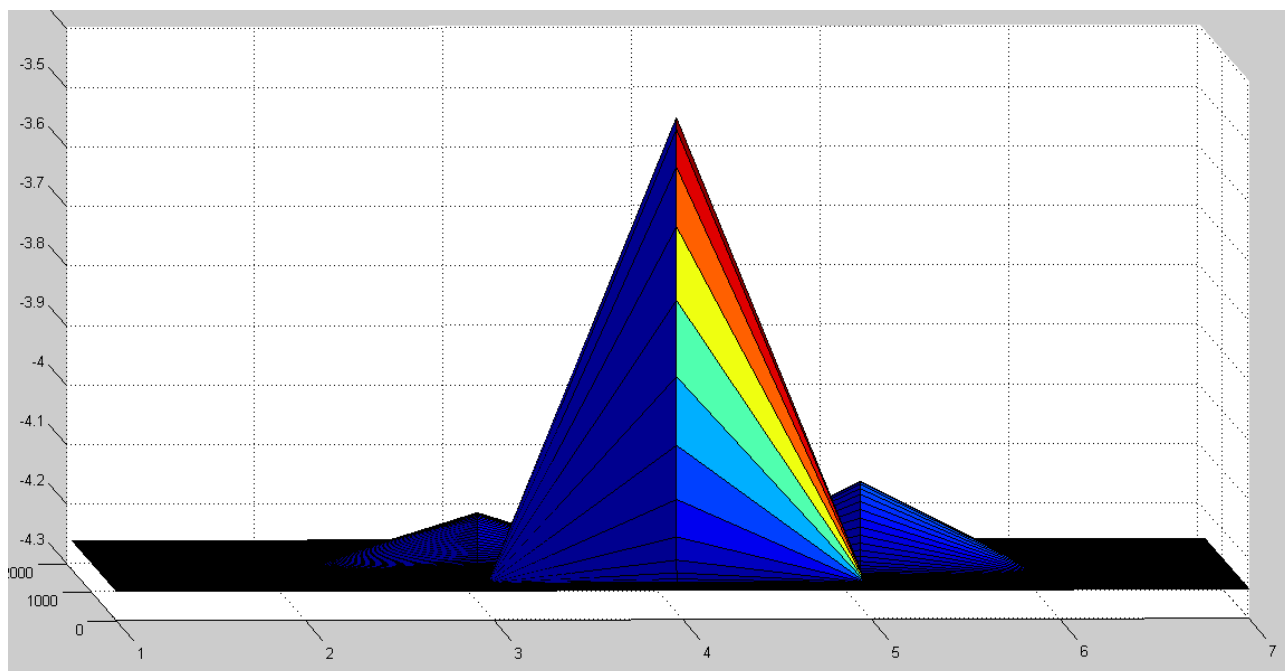


Figura 131: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Amostra 1

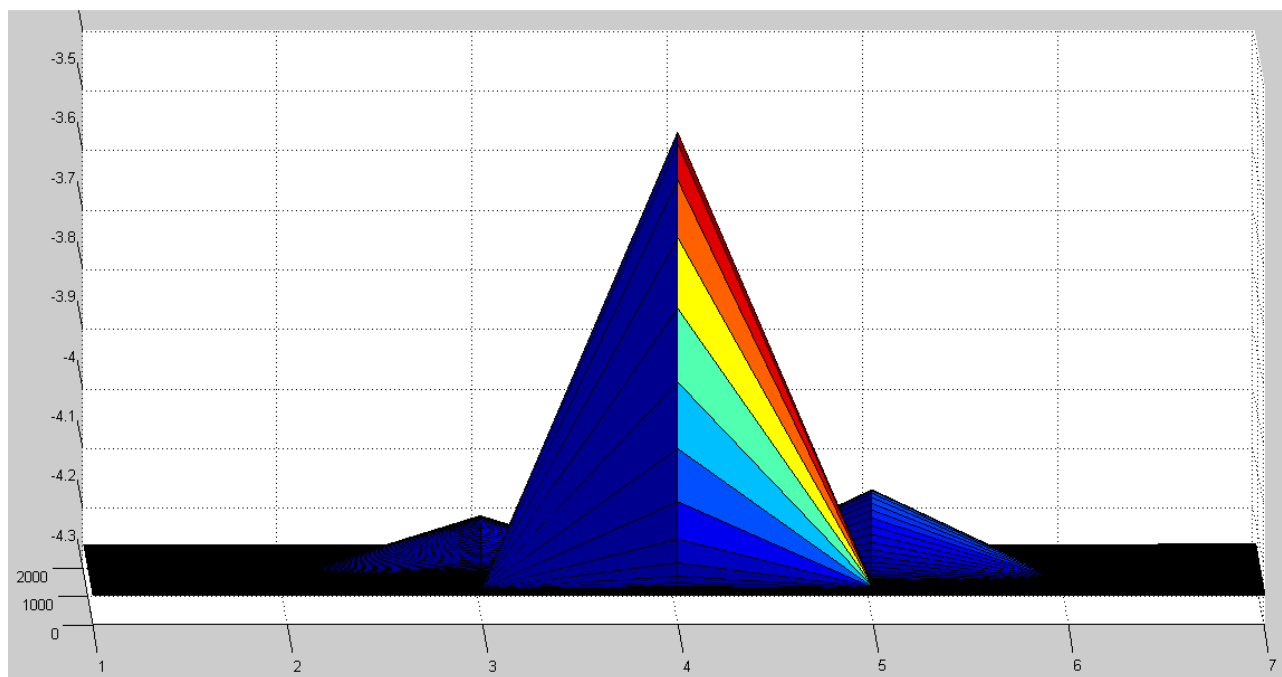


Figura 132: Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína - Amostra 2

### 3.5.2.3. Teste de estresse (*Stress testing*)

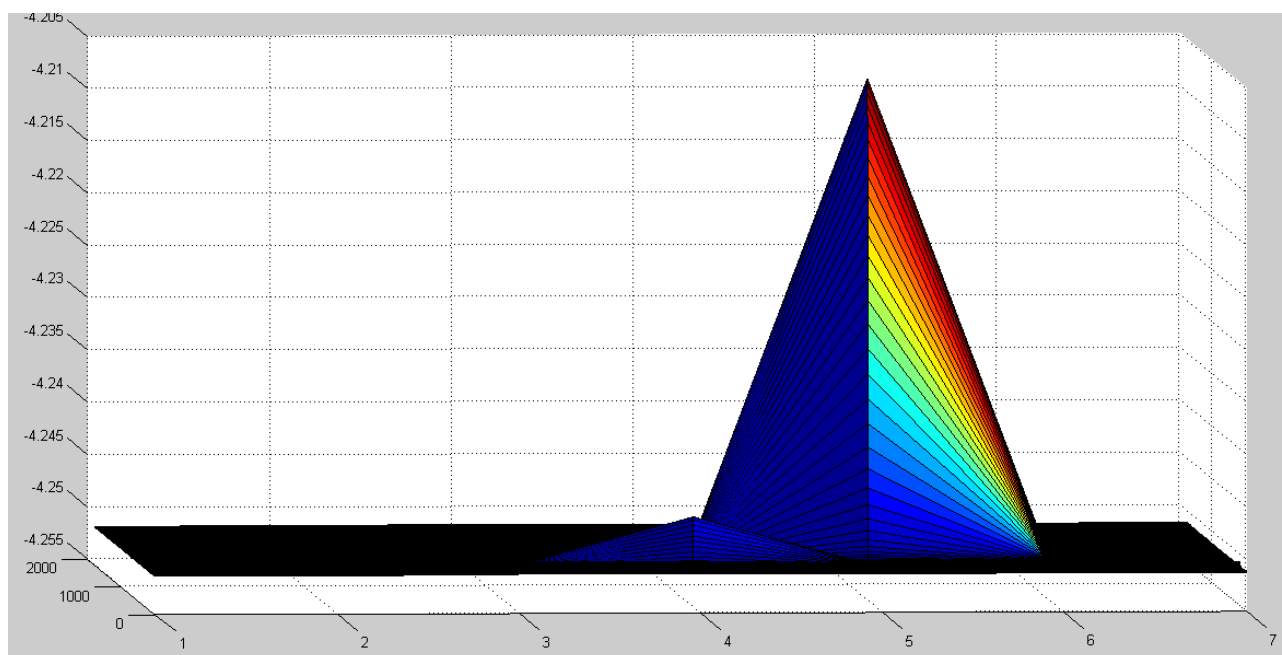


Figura 133: Teste de estresse (*Stress testing*) - Amostra Degradação Ácida

#### 3.5.2.3.1. Amostra Degradação Basica

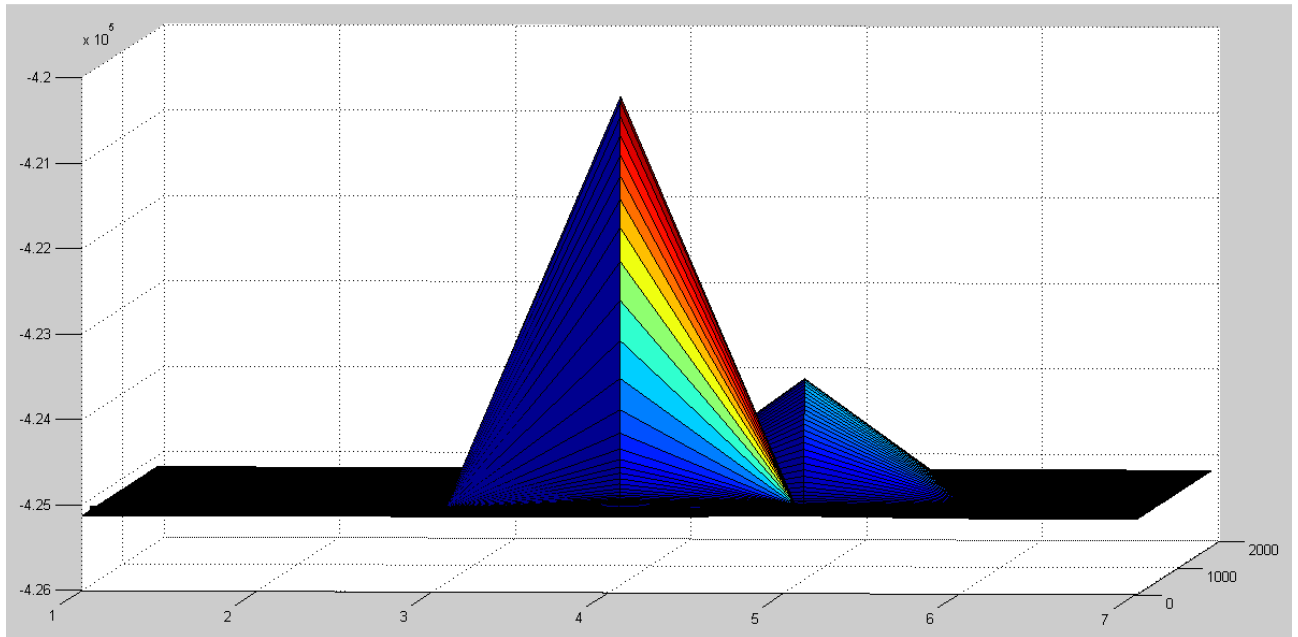


Figura 134: Teste de estresse (*Stress testing*) - Amostra Degradação Básica

### 3.5.2.3.2. Amostra Degradação Oxidativa

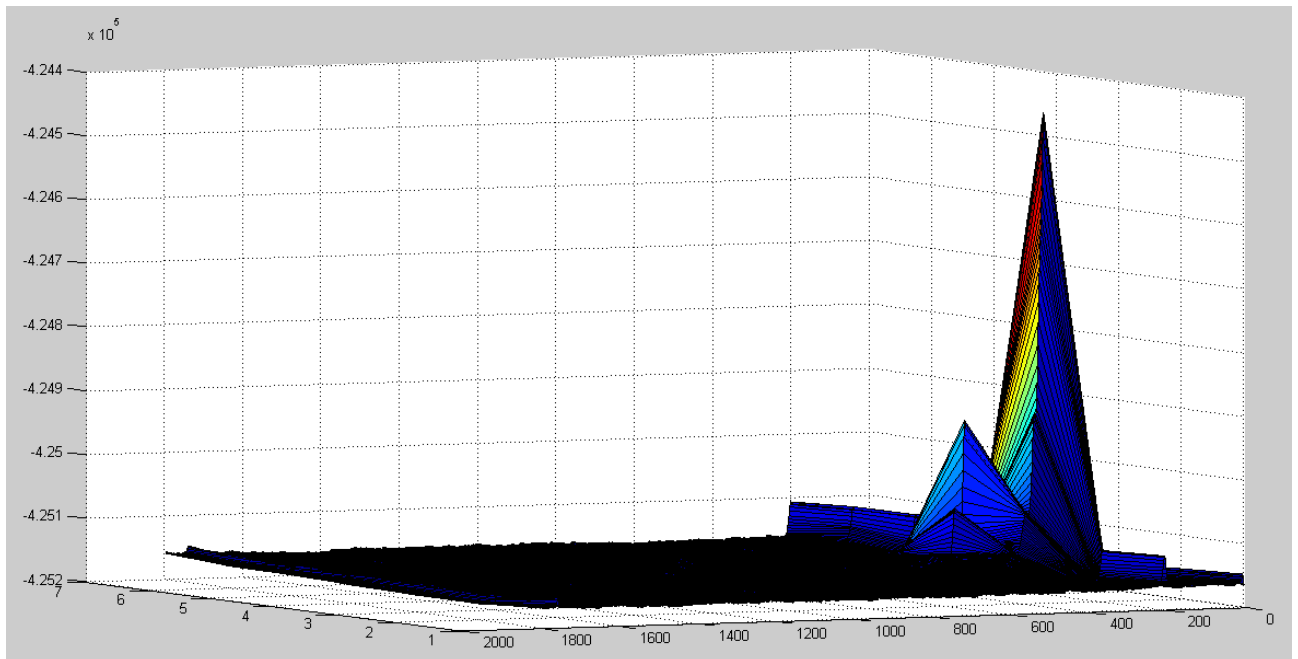


Figura 135: Teste de estresse (*Stress testing*) - Amostra Degradação Oxidativa

### 3.6. Cálculos

#### 3.6.1. Teor de Senosídeos

Os resultados obtidos foram divididos entre métodos convencionais e métodos bidimensionais, o principal objetivo é demonstrar os efeitos da técnica quando seus resultados são avaliados e comparados.

A seguir são mostrados os dados para que os cálculos possam ser realizados e todos os fatores para que os resultados de teor das amostras fossem demonstrados em miligramas por comprimido e em porcentagem como recuperação frente ao padrão primário.

Tabela 1: Dados para cálculo do Teor de Senosídeos

Massa Padrão (mg)		Diluição Padrão (mL)		Dados da fórmula	
5,06		100		<b>AA</b>	Somatória das áreas dos picos de senosídeos da amostra
Massa Amostra (mg)		Diluição Amostra (mL)		<b>AP</b>	Peso do padrão (mg)
1	204,56	200		<b>AP</b>	Somatória das áreas dos picos de senosídeos do padrão
2	204,54	Peso Médio		<b>PA</b>	Peso da amostra (mg)
3	204,58	195	(mg/cpdo)	<b>PM</b>	Peso médio do comprimido
Dose nominal do Cpdo				<b>D</b>	Dose nominal do comprimido
13	(mg/cpdo)				

#### Método convencional

Tabela 2: Áreas dos padrões - método convencional Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2		Senosídeo 3		Senosídeo 4	
Injeção	TR	Área	TR	Área	TR	Área	TR	Área
1	6,474	33690	7,029	1318228	9,133	64180	13,891	1065673
2	6,467	34512	7,024	1339317	9,126	66092	13,881	1082404
3	6,488	33643	7,043	1329156	9,147	65526	13,914	1082254
<b>Média</b>	<b>6,476</b>	<b>33948</b>	<b>7,032</b>	<b>1328900</b>	<b>9,135</b>	<b>65266</b>	<b>13,895</b>	<b>1076777</b>

Tabela 3: Áreas das amostras - método convencional Teor de Senosídeos

Senosídeo 1 + 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4	
Injeção	TR	Área	TR	Área	TR	TR	Área
1	7,069	1999457	8,837	616891	7,069	13,845	888948
2	7,046	1985249	8,811	622856	7,046	13,794	904721
3	7,044	1985448	8,808	623681	7,044	13,784	889057

Tabela 4: Resultados - método convencional Teor de Senosídeos

Teor Amostra		
Amostra	(mg/cpdo)	%
1	13,50	103,85
2	13,53	104,08
3	13,47	103,62

## Método bidimensional

Tabela 5: Áreas da injeção 1 do padrão - método bidimensional - Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4		
Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área
6	4,631	3953	7	5,006	38075	9	6,276	705	14	7,388	43890
			8	5,037	33176	10	6,276	2691	15	7,385	11316
			<b>Soma</b>		<b>71251</b>	<b>Soma</b>		<b>3396</b>	<b>Soma</b>		<b>55206</b>

Tabela 6: Áreas da injeção 2 do padrão - método bidimensional - Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4		
Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área
6	4,631	2945	7	5,008	39021	9	6,259	762	14	7,38	46770
			8	5,014	33493	10	6,26	2615	15	7,382	8561
			<b>Soma</b>		<b>72514</b>	<b>Soma</b>		<b>3377</b>	<b>Soma</b>		<b>55331</b>

Tabela 7: Áreas da injeção 3 do padrão - método bidimensional - Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4		
Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área
6	4,631	3229	7	5,006	34173	9	6,236	768	14	7,337	45520
			8	5,006	40720	10	6,248	2731	15	7,337	12095
			<b>Soma</b>		<b>74893</b>	<b>Soma</b>		<b>3499</b>	<b>Soma</b>		<b>57615</b>

Tabela 8: Média das áreas - método bidimensional - Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4		
Média	4,631	3376	Média	5,013	72886	Média	6,259	3424	Média	7,368	56051

Tabela 9: Áreas da amostra 1 - método bidimensional - Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4		
Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área
6	4,736	20619	7	5,014	56982	9	6,247	2147	15	7,341	5121
			8	5,002	68147	10	6,534	4094			
			<b>Soma</b>		<b>125129</b>	<b>Soma</b>		<b>6241</b>			

Tabela 10: Áreas da amostra 2 - método bidimensional - Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4		
Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área
6	4,710	20300	7	4,987	65443	9	6,167	2147	14	7,281	41365
			8	4,975	58728	10	6,510	4601	15	7,284	4860
			<b>Soma</b>		<b>124171</b>		<b>Soma</b>	<b>6748</b>		<b>Soma</b>	<b>46225</b>

Tabela 11: Áreas da amostra 3 - método bidimensional - Teor de Senosídeos

Senosídeo 1			Senosídeo 2			Senosídeo 3			Senosídeo 4		
Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área	Vial	TR	Área
6	4,711	20680	7	4,986	63822	9	6,177	4544	14	7,283	40728
			8	4,977	56916	10	6,501	40728	15	7,277	4551
			<b>Soma</b>		<b>120738</b>		<b>Soma</b>	<b>45272</b>		<b>Soma</b>	<b>45279</b>

Tabela 12: Resultados - método bidimensional Teor de Senosídeos

Teor Amostra		
Amostra	(mg/cpdo)	%
1	11,17	85,89
2	14,03	107,95
3	16,48	126,81

### 3.6.2. Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Tabela 13: Dados para cálculo do Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Massas (mg)		Dose Nominal		Diluição		Dados da fórmula	
Padrão		mg/comprimido		Padrão		AA	Área do pico do ativo na amostra
Diclofenaco	31,0	Diclofenaco	50	Diclofenaco	50	AP	Área do pico do ativo no padrão
Paracetamol	3,9	Paracetamol	300	Paracetamol	50	PP	Peso do padrão (mg)
Cafeína	5,4	Cafeína	30	Cafeína	50	T	Teor do padrão (%)
Amostra 1	43,02	<b>Peso Médio do Comprimido</b>		Amostra	50	PA	Peso da amostra (mg)
Amostra 2	43,08	625	(mg/cpdo)			PM	Peso médio do comprimido
						D	Dose nominal do comprimido

#### Método convencional

Tabela 14: Áreas dos padrões - método convencional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Diclofenaco Sódico			Paracetamol			Cafeína		
Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área
1	2,785	5311017	1	3,670	13465033	1	4,578	4696109
2	2,785	5314149	2	3,670	13471259	2	4,578	4687936
3	2,785	5314353	3	3,670	13468223	3	4,578	4698592
<b>Média</b>	<b>2,785</b>	<b>5313173</b>	<b>Média</b>	<b>3,670</b>	<b>13468172</b>	<b>Média</b>	<b>4,578</b>	<b>4694212</b>



Tabela 15: Áreas das amostras - método convencional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Diclofenaco Sódico			Paracetamol			Cafeína		
Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área
1	2,786	3492471	1	3,664	8780870	1	4,578	3267368
2	2,785	3493839	2	3,663	8782543	2	4,577	3267448

Tabela 16: Resultados - método convencional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Teor Amostra 1			Teor Amostra 2	
Ativo	(mg/cpdo)	%	(mg/cpdo)	%
Diclofenaco	296,04	98,68	295,74	98,58
Paracetamol	36,94	123,14	36,90	122,99
Cafeína	54,61	109,21	54,53	109,06

## Método bidimensional

Tabela 17: Áreas dos padrões - método bidimensional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Diclofenaco Vial 3			Paracetamol Vial 4			Cafeína Vial 5		
Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área
1	5,908	262628	1	2,202	703513	1	3,936	234234
2	5,830	263062	2	2,201	684877	2	3,929	241099
3	5,773	259759	3	3,929	241099	3	3,920	233461
<b>Média</b>	<b>5,837</b>	<b>261816</b>	<b>Média</b>	<b>2,777</b>	<b>543163</b>	<b>Média</b>	<b>3,928</b>	<b>236265</b>

Tabela 18: Áreas das amostras - método bidimensional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Diclofenaco Vial 3			Paracetamol Vial 4			Cafeína Vial 5		
Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área	Injeção	TR	Área
1	5,713	173885	1	2,200	450477	1	3,924	165496
2	5,701	177655	2	2,200	443605	2	3,917	161478

Tabela 19: Resultados - método bidimensional Teor de Diclofenaco Sódico, Paracetamol e Cafeína

Teor Amostra 1		
Amostra	(mg/cpdo)	%
Diclofenaco	299,11	99,70
Paracetamol	46,99	156,64
Cafeína	54,95	109,91
Teor Amostra 2		
Amostra	(mg/cpdo)	%
Diclofenaco	298,70	99,57
Paracetamol	46,21	154,03
Cafeína	53,54	107,09

### 3.7. Vantagens e desvantagens

#### 3.7.1. Vantagens

As principais vantagens da técnica aplicada ao desenvolvimento deste trabalho são:

- Para métodos que envolvem o teor de vários componentes ativos de um mesmo fármaco, os picos referentes a estes ativos podem apresentar um grau de pureza de pico mais elevado uma vez que podem ser vistos em um gráfico em 2D, constatando a negatificação de interferentes como diluente ou fase móvel.
- Ainda para o exemplo supracitado, o primeiro método ou método convencional pode apresentar um tempo de corrida bem curto, dependendo do número de picos cromatográficos, alguns métodos podem conter até mesmo menos de cinco minutos de corrida, onde as frações serão coletadas e reinjetadas em um segundo método, ou bidimensional, e este por ser ortogonal ao primeiro inverte a ordem de eluição dos picos cromatográficos referidos no método convencional, o que pode ser comprovado no desenvolvimento deste trabalho.
- Desenvolvidos os métodos convencionais e bidimensionais o pesquisador pode plotar os valores em um software estatístico, este por sua vez pode gerar um gráfico 2D, conforme mostrado no trabalho, pelo qual conclusões sobre a alteração da ordem de eluição dos picos cromatográficos para os métodos de teor de ingredientes ativos, sendo mais de um em um mesmo fármaco, é possível, constatando através dos perfis dos picos (tamanho ou altura) no método convencional e em comparação com o método bidimensional.
- Para os métodos que envolvem a determinação de impurezas ou compostos de degradação, a visualização dos métodos convencionais e bidimensionais já desenvolvidos podem mostrar ao pesquisador, após plotagem de dados dentro do software estatístico, a interação destes picos cromatográficos, ou referentes aos ingredientes ativos degradados ou a novos picos cromatográficos, referentes a impurezas, com componentes como fase móvel e diluente.

- Para o desenvolvimento do método convencional, o pesquisador pode encontrar um certo número de picos cromatográficos que por sua vez dentro do método bidimensional, ortogonal ao primeiro, podem ser vistos, e além disto novos picos aparecerem, o que representa que estes novos por sua vez estavam sobrepostos aos picos do método convencional. Com isso, podem ser isolados e até mesmo quantificados.

### **3.7.2. Desvantagens**

As principais desvantagens da técnica aplicada ao desenvolvimento deste trabalho são:

- Para que o pesquisador consiga desenvolver os métodos, sendo eles ortogonais, este desenvolvimento pode demandar tempo, gastos, sejam eles com reagentes, padrão, amostras e preparações. Este tempo está relacionado ao ajuste de volumes de injeção corretos, determinação de colunas cromatográficas, fases móveis, diluentes, determinações das concentrações, comprimentos de onda do HPLC, fluxos de fase móvel, tempos de coleta das frações, e muitos outros relacionados, todos eles para os métodos, para garantirem que sejam ortogonais.
- As frações do método convencional foram coletadas manualmente após passagem pelo detector, neste caso, existe uma dificuldade em se manter a repetibilidade da coleta para todas as injeções.
- A plotagem dos dados no software estatístico também ocasiona uma demanda, dependendo do número de frações coletadas no método convencional, bastante tempo. Exige-se muita atenção para que os dados sejam plotados sequencialmente e com os valores corretos para que o gráfico 2D resultante apresente confiabilidade e seja representativo dos valores plotados tanto para padrão, como para amostra.

## **4. CONCLUSÕES**

As principais conclusões deste trabalho foram:

- Os desenvolvimentos dos métodos descritos neste trabalho corroboram com o que foi descrito na introdução do tema abordado. Para um método

cromatográfico LC x LC bidimensional é necessário primeiramente que o pesquisador detenha alguns conhecimentos fundamentais sobre a técnica, e em pode não só aplicar em moléculas complexas como o senosídeos, mas também a fármacos com mais de um ingrediente ativo em sua composição, proteínas, outros tipos de extratos e grande parte de compostos com grandes cadeias. O método apresenta diversas vantagens após o seu desenvolvimento e validação, que em sua grande maioria podem gerar grandes estudos para o setor.

- Os desenvolvimentos se demonstraram eficazes, precisos e reprodutivos. Isto se deve ao fato de que a técnica (LC x LC) quando aplicado a fármacos de cadeia complexas ou com mais de um pico cromatográfico. Um fator importante para o sucesso nos desenvolvimentos destes métodos foi uma boa fundamentação em diferentes tipos de colunas cromatográficas, que acabaram sendo ortogonais e respondendo de acordo com as condições testadas.
- Os resultados apresentados para os métodos desenvolvidos para a caracterização das substâncias de degradação, indicaram resultados positivos para identificação de novos compostos ou impurezas após aplicação da condição de estresse da amostra. Isto se deve ao fato de que picos cromatográficos ausentes no método convencional, se tornaram presentes no método bidimensional, o que os caracterizam como produtos de degradação ou impurezas cromatográficas.
- Os métodos convencionais e bidimensionais para cada um dos desenvolvimentos deste trabalho podem servir como referência futura para utilização tanto dentro da indústria como em estudos acadêmicos, pois se demonstraram satisfatórios quanto aos resultados apresentados, sendo considerados valiosos para outros novos estudos de caso e aplicações da técnica ou até mesmo otimização de parâmetros ou condições cromatográficas ainda que possíveis.
- Os testes também foram conclusivos para as amostras de outros extratos que faziam parte do *Fingerprint Test*. Este teste pode mostrar através de seus cromatogramas e após o tratamento estatístico que as amostras aplicadas às mesmas condições cromatográficas dos métodos desenvolvidos, não apresentou interferentes em relação a amostra em questão. Isto é relevante

para que o método se torne seletivo e específico para tão exclusivamente o extrato em análise.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. C. POOLE, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, v.1, p. 2, 2003.
2. J. MILLER, *Chromatography: Concepts and Contrasts*, Wiley, New York, v.2, 2004.
3. CASS Q.B.; DEGANI A. L. G.; VIEIRA P. C., *Cromatografia um breve ensaio, Química Nova na Escola, Cromatografia Número 7, Maio. p. 24, 1998.*
4. S. AHUJA; M.W. DONG, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, Elsevier, Amsterdam, p. 4, 2005.
5. S. AHUJA; M.W. DONG, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*, Elsevier, Amsterdam, p. 48, 2005.
6. Serial coupled columns reversed-phase separations in high-eficiência liquid chromatography tools for analysis of complex real samples. *Journal of Chromatography A*, p. 208-215, 2008.
7. GILAR M.; OLIVOVA P.; DALY A.; GEBLER J. C., *Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography*.
8. BUSHEY M.; JORGESON J. W. *Automated Instrumentation for Comprehensive Two-Dimensional High Performance Liquid Chromatography of Proteins*.
9. Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-efficiency liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities. *Journal of Chromatography A*, p. 58-62, 2005.
10. "Orthogonal" separations for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, p.122-135, 2006.
11. Determining orthogonal and similar chromatographic systems from injection of mixtures in liquid chromatography-diode array detection and the interpretation of correlation coefficients color maps. *Journal of Chromatography A*, p. 117-128, 2004.
12. SNYDER L. R.; DOLAN, J. W.; CARR, P. W. *J. Chromatogr. A*, p.77-116, 2004.
13. VITHA, M.; CARR, P. W. *J. Chromatogr. A*, p.143-194, 2006.
14. STOLL, D. R.; CARR, P. W. *J. Am. Chem. Soc.*, p.5034-5035, 2006.
15. <[www.usp.org](http://www.usp.org)>. Acesso em 22/01/2012.
16. KRUPCZYNSKA, K.; BUSZEWSKI, B.; JANDERA, P. *Anal. Chem.*, p.227-234, 2004.
17. WALTER, T. H.; IRANETA, P.; CAPPARELLA, M. *J. Chromatogr.*, p.177-183, 2005.
18. CROES, K., *J. Chromatogr.*, p.123-130, 2005.
19. JOHNSON A. R.; JOHNSON C. M.; STOLL D. R. *Identifying orthogonal and similar reversed phase liquid chromatography stationary phases using the system selectivity cube and the hydrophobic subtraction model*, 2012
20. ZENG J.; ZHANG X.; GUO Z.; FENG J.; XUE X.; LIANG X., *A new method for chemical identification based on orthogonal parallel liquid chromatography separation and accurate molecular weight confirmation*, 2011

21. FONT L. M.; FONTANA A.; GALCERAN M.T.; ITURRINO L.; PEREZ V., Orthogonal analytical screening for liquid chromatography–mass spectrometry method development and preparative scale-up, 2010.
22. WANG Z.; ZHANG Z.; LIU O.; DONOVAN B., Development of an orthogonal method for mometasone furoate impurity analysis using supercritical fluid chromatography, 2011.
23. DOLAN J.W.; SNYDER L.R., Selecting an “orthogonal” column during high-performance liquid chromatographic method development for samples that may contain non-ionized solutes, 2008.
24. WEST C.; LESELLIER E., Orthogonal screening system of columns for supercritical fluid chromatography, 2008
25. FAN W.; ZHANG Y.; CARR P.W.; RUTAN S.C.; DUMAREY M.; SCHELLINGER A. P.; PRITTS W., Application of Snyder–Dolan classification scheme to the selection of “orthogonal” columns for fast screening of illicit drugs and impurity profiling of pharmaceuticals – I. Isocratic elution, 2009.
26. DOLAN J.W.; MAULE A.; BINGLEY D.; WRISLEY L.; CHAN C.C.; ANGOD M.; LUNTE C.; KRISKO R.; WINSTON J.M.; HOMEIER. B.A.; MCCALLEY D.V.; SNYDER L.R., *J. Chromatogr. A*, p. 59, 2004.
27. GU H.; HUANG Y.; FILGUEIRA M.; CARR P.W., Effect of first dimension phase selectivity in *online* comprehensive two dimensional liquid chromatography (LC × LC), p.1-2, 2011.
28. STOLL D.R.; WANG X.; PORTER S.E.G.; RUTAN S.C.; CARR P.W., *J. Chromatogr. A*, p. 3, 2007.
29. FRANCOIS I.; SANDRA K.; SANDRA P., *Anal. Chim.*, p.14, 2009.
30. GUIOCHON G.; MARCHETTI N.; MRIZIQ K.; SHALLIKER R.A., *J. Chromatogr. A*, p. 109, 2008.
31. ISSAQ H.J.; CHAN K.C.; JANINI G.M.; CONRADS T.P.; VEENSTRA T.D., *J. Chromatogr. B*, p. 35, 2005.
32. GOWDA G.A.N.; ZHANG S.C.; GU H.W.; ASIAGO V.; SHANAIAH N.; RAFTERY D.; *Expert Rev. Mol. Diagn.*, p. 617, 2008.
33. ALEXANDER A.J.; *MA J. Chromatogr. A*, p. 1338, 2009.
34. IM K.; PARK H.W.; LEE S.; CHANG T. *J. Chromatogr. A.*, p. 4606, 2009.
35. POTTS L.W.; STOLL D.R.; LI X.P.; CARR P.W. *J. Chromatogr. A*, p. 5700, 2010.
36. GU H.; HUANG Y.; FILGUEIRA M.; CARR P.W., Effect of first dimension phase selectivity in *online* comprehensive two dimensional liquid chromatography (LC × LC), p.4-5, 2011.
37. PAEK C.; MCCORMICK A.V; CARR P.W. *J. Chromatogr. A*, p. 6475, 2010.
38. GU H.; HUANG Y.; FILGUEIRA M.; CARR P.W., Effect of first dimension phase selectivity in *online* comprehensive two dimensional liquid chromatography (LC × LC), p.3, 2011.
39. HÁJEK T.; SKERÍKOVA V.; CESLA P.; VYNUCHALOVA K.; JANDERA P. Multidimensional LC x LC analysis of phenolic and flavone natural antioxidants with UV-electrochemical coulometric and MS detection. *J Sep Sci.*, p.28, 2009.
40. EVANS C.R.; JORGENSON J.W. Multidimensional LC-LC and LC-CE for high-resolution separations of biological molecules. *Anal Bioanal Chem.*, p.1952-1961, 2004.
41. Novel *Off-line* Multidimensional LC Method for Separation and Tandem MS Detection of Tryptic Peptides. Disponível em < <http://www.dionex.com/en->

- us/webdocs/70475-TN78-LC-Peptides-05Feb09-LPN2155.pdf> Acesso em 20/02/2012.
42. JINA W.; ZHANGB J.; Determination of diclofenac sodium by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection, 2000.
  43. JIN W.; CHEN H. *Electroanal. Chem.*, p. 155, 1997.
  44. CELMA C.; ALLUÉ J.A.; PRUNONOSA J.; PERAIRE C.; OBACH R. Simultaneous determination of paracetamol and chlorpheniramine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, 2000.
  45. CAMPANERO M.A.; CALAHORRA B.; GARCIA E.; OCÁRIZ A.L.; HONORATO J. Rapid liquid chromatographic assay for the determination of acetaminophen in plasma after propacetamol administration: application to pharmacokinetic studies, 1999.
  46. DUIJIN J.V.; STEGEN G.H.D. Analysis of caffeine and trigonelline using high-performance liquid chromatography, 2002.
  47. ROSARIO M. D.; GUTIERREZ L.; DELGADO Y.; GALLIGNARI M.; ZAMBRANO A.; GOMEZ A.; RAMOS G.; ROMERO C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with *on-line* sample cleanup in a switching-column system, 2005.
  48. SUN S.W.; SU H.T. Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets, 2002.
  49. BALA S.; UNİYAL G.C.; DUBEY T.; SINGH S.P. An improved method for the analysis of sennosides in *Cassia angustifoliaby* high-performance liquid chromatography, 2001.
  50. DEMIREZER L.O.; KARAHAN N.; UCAKTURK E.; KURUUZUM A.; GUVENALP Z.; KAZAZ C. HPLC Fingerprinting of Sennosides in Laxative Drugs with Isolation of Standard Substances from Some Senna Leaves, 2011





# APÊNDICE 1

## CROMATOGRAMAS - TEOR DE SENOSÍDEOS

### PADRÃO - MÉTODO A

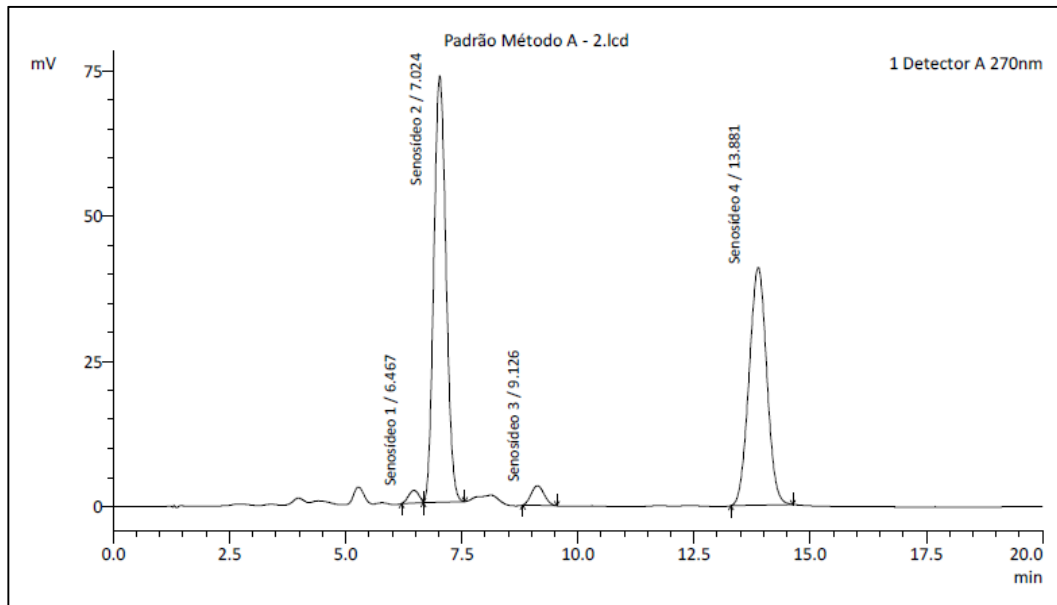


Figura 136: Padrão Método A - 2

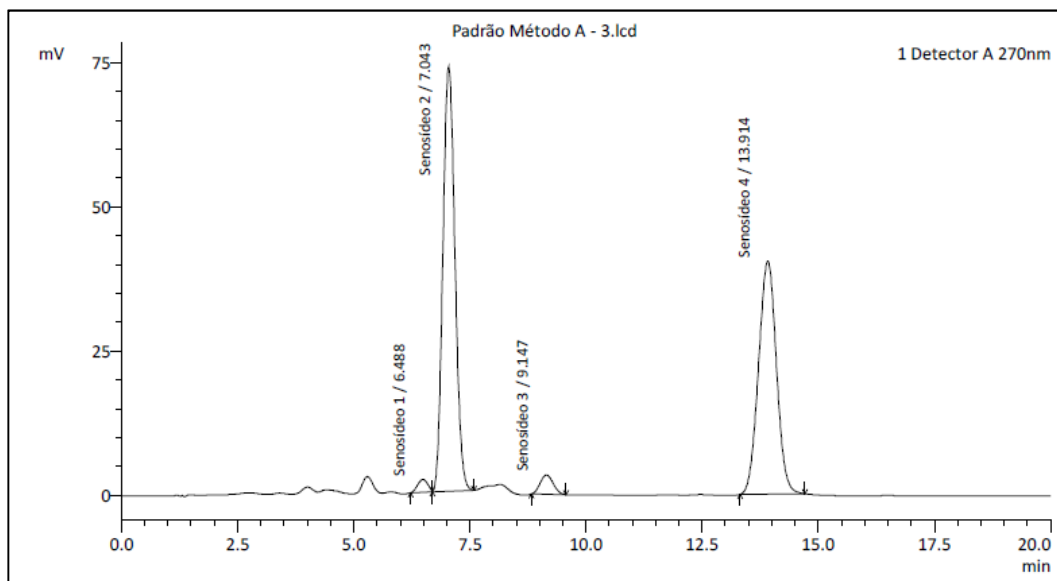


Figura 137: Padrão Método A - 3

### PADRÃO - MÉTODO B

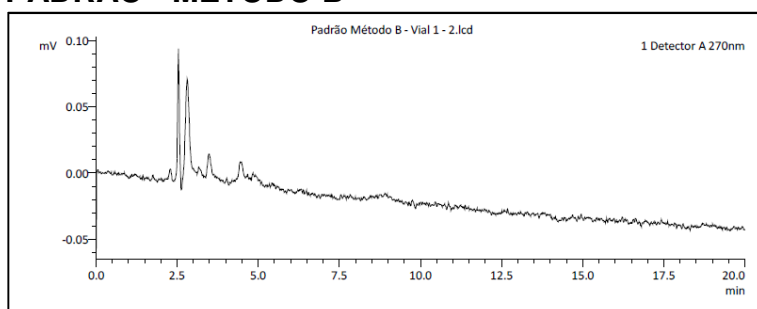


Figura 138: Padrão Método B - Vial 1 - 2

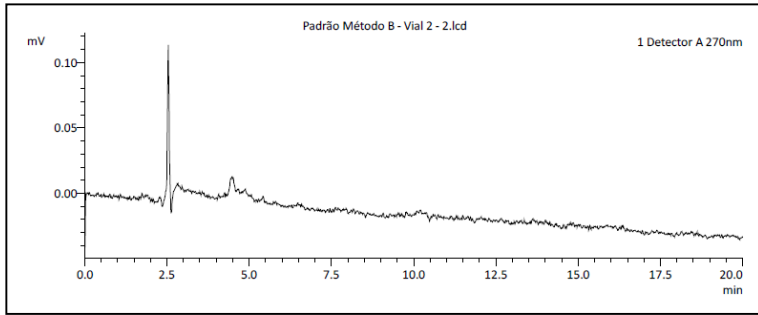


Figura 139: Padrão Método B - Vial 2 – 2

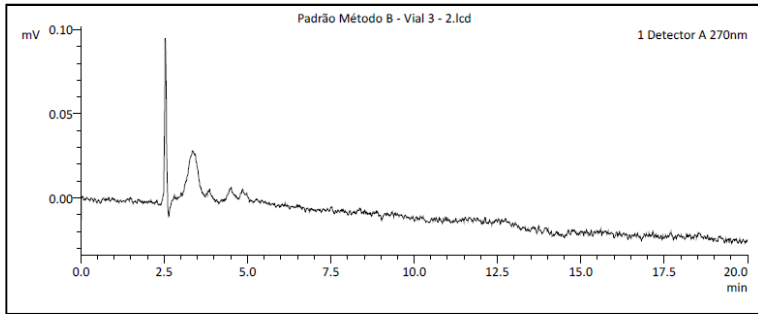


Figura 140: Padrão Método B - Vial 3 – 2

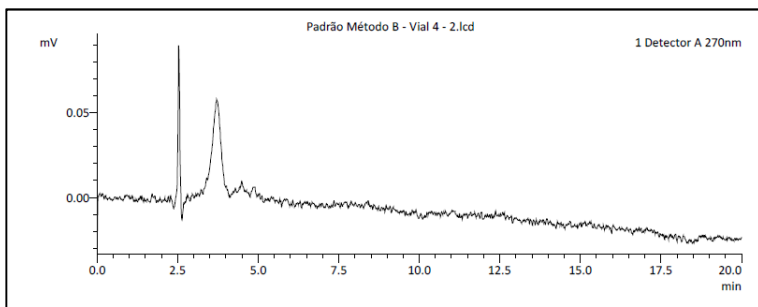


Figura 141: Padrão Método B - Vial 4 – 2

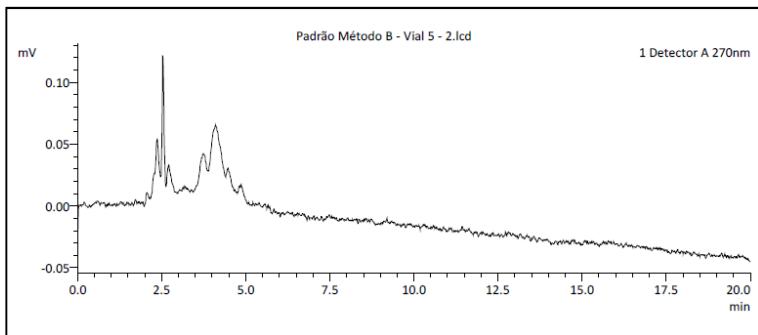


Figura 142: Padrão Método B - Vial 5 – 2

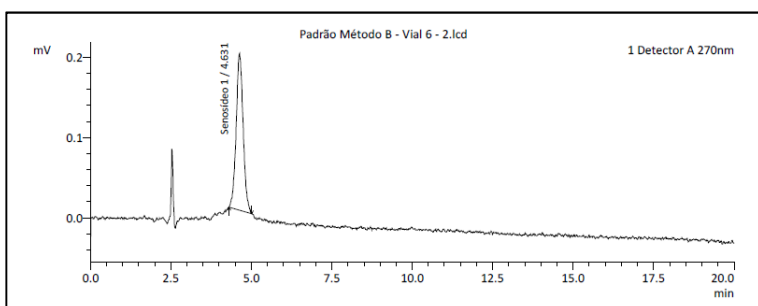


Figura 143: Padrão Método B - Vial 6 – 2

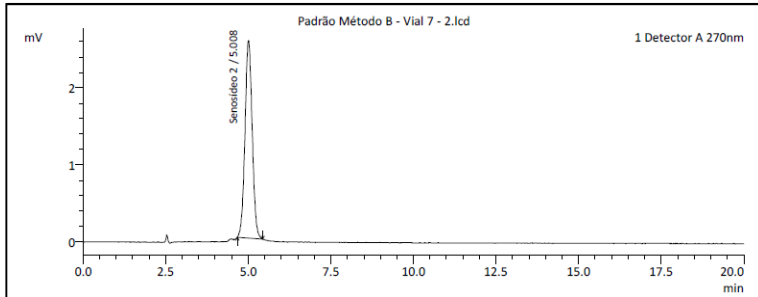


Figura 144: Padrão Método B - Vial 7 – 2

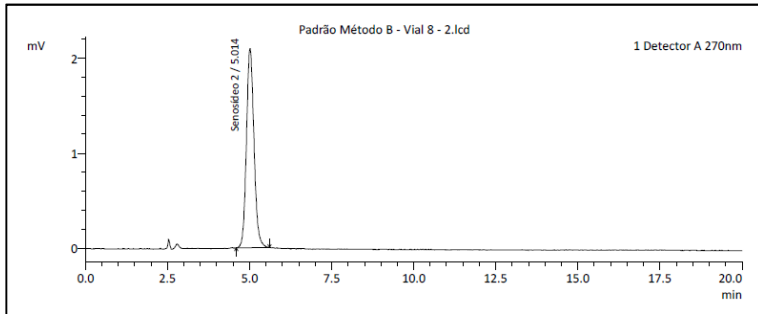


Figura 145: Padrão Método B - Vial 8 – 2

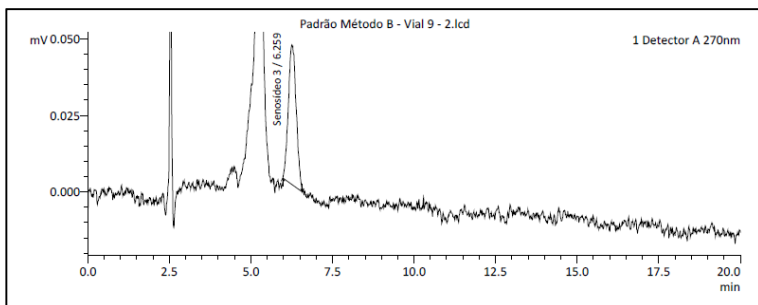


Figura 146: Padrão Método B - Vial 9 – 2

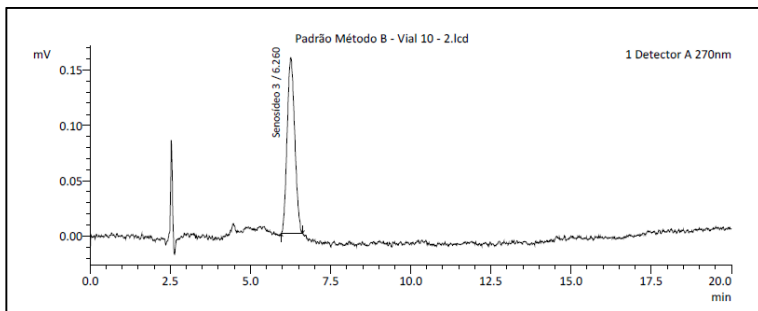


Figura 147: Padrão Método B - Vial 10 – 2

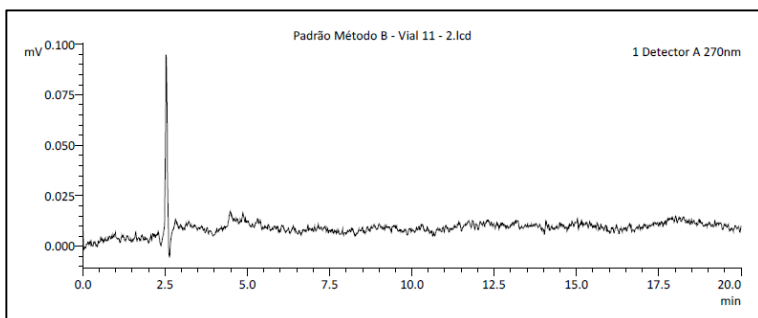


Figura 148: Padrão Método B - Vial 11 – 2

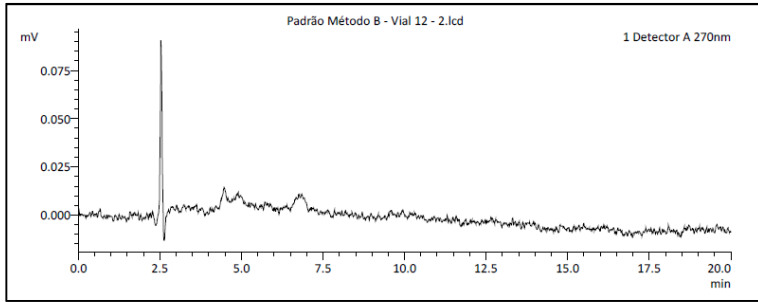


Figura 149: Padrão Método B - Vial 12 – 2

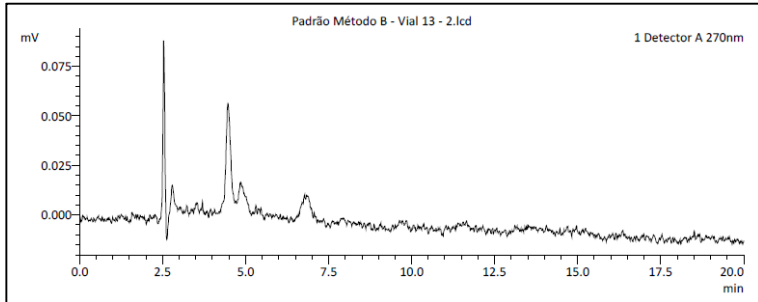


Figura 150: Padrão Método B - Vial 13 – 2

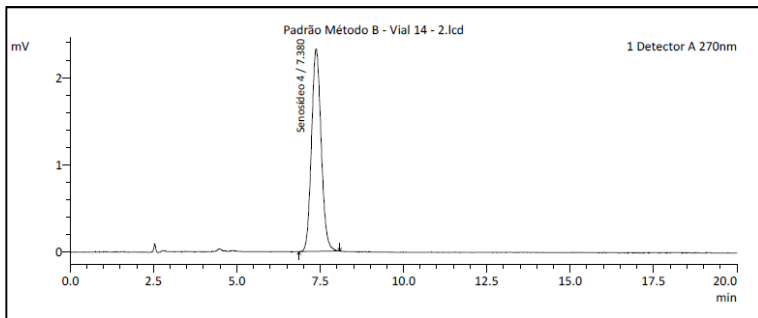


Figura 151: Padrão Método B - Vial 14 – 2

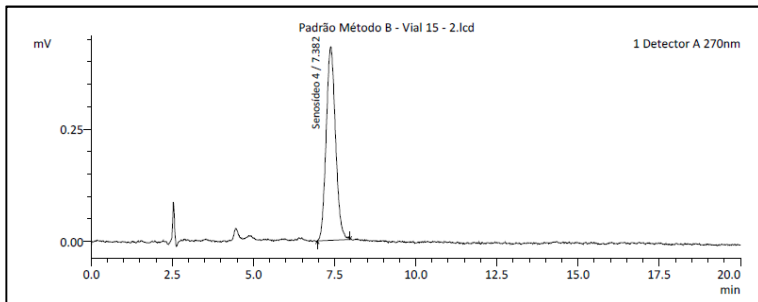


Figura 152: Padrão Método B - Vial 15 – 2

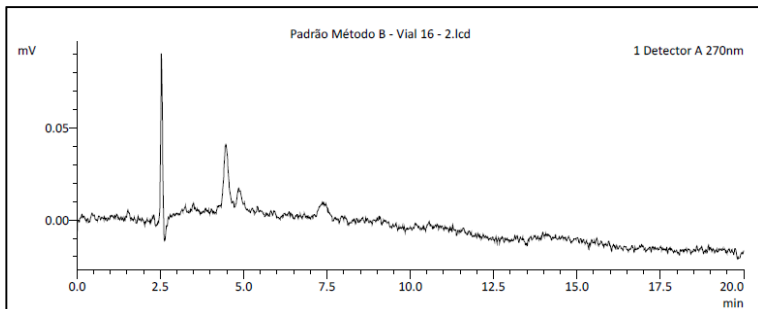


Figura 153: Padrão Método B - Vial 16 – 2

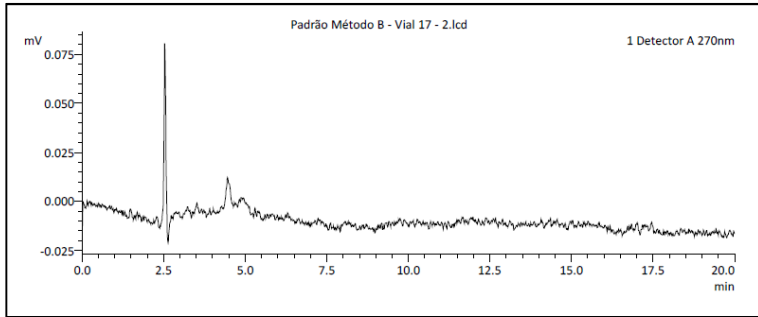


Figura 154: Padrão Método B - Vial 17 – 2

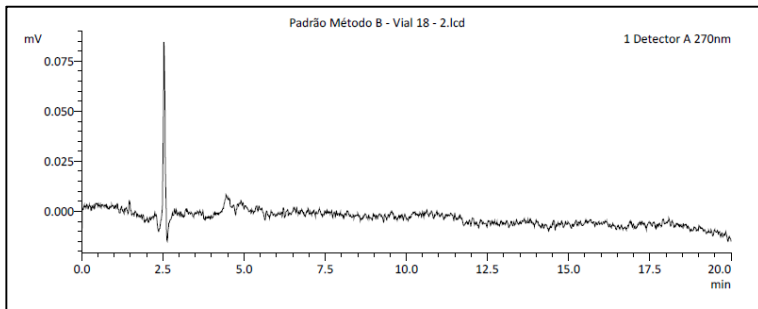


Figura 155: Padrão Método B - Vial 18 – 2

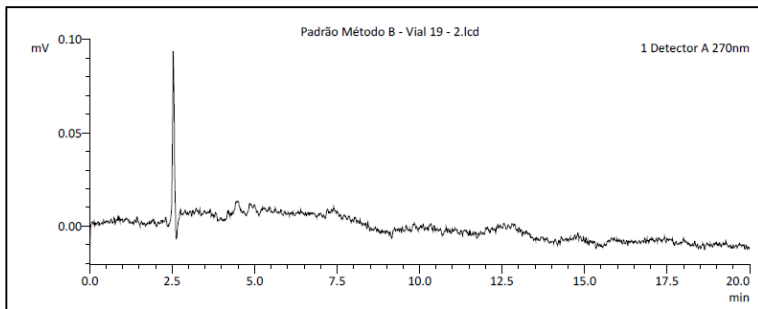


Figura 156: Padrão Método B - Vial 19 – 2

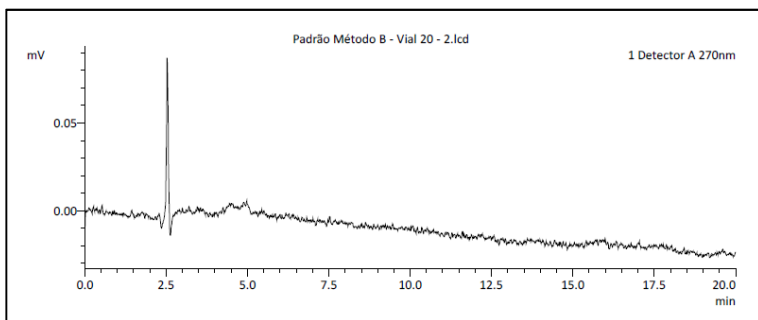


Figura 157: Padrão Método B - Vial 20 – 2

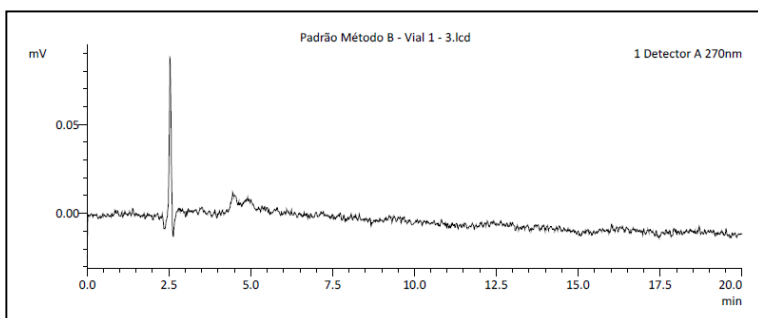


Figura 158: Padrão Método B - Vial 1 – 3

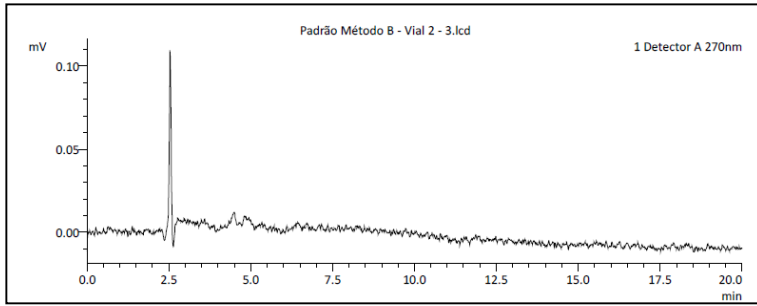


Figura 159: Padrão Método B - Vial 2 – 3

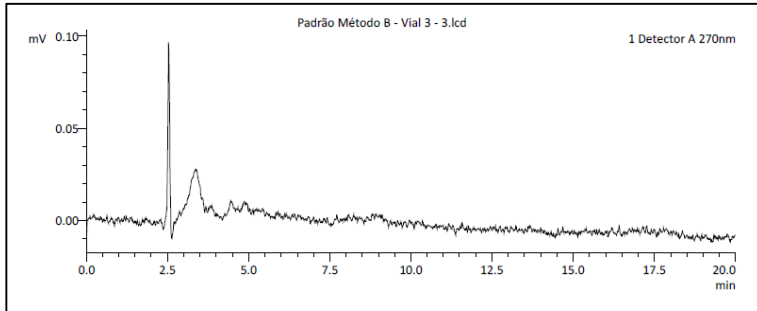


Figura 160: Padrão Método B - Vial 3 – 3

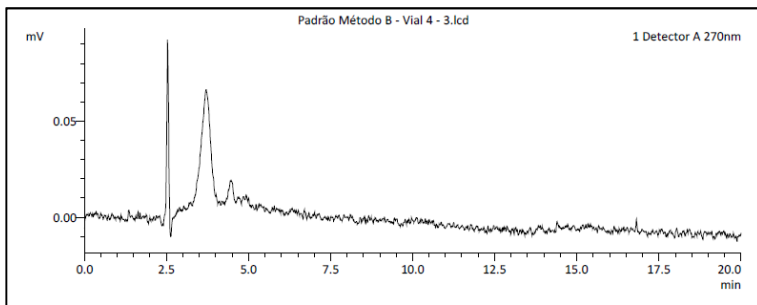


Figura 161: Padrão Método B - Vial 4 – 3

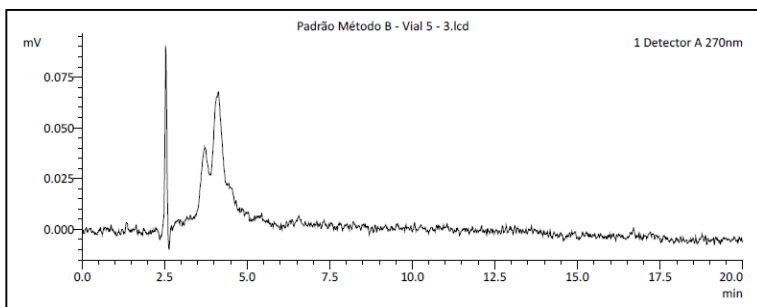


Figura 162: Padrão Método B - Vial 5 – 3

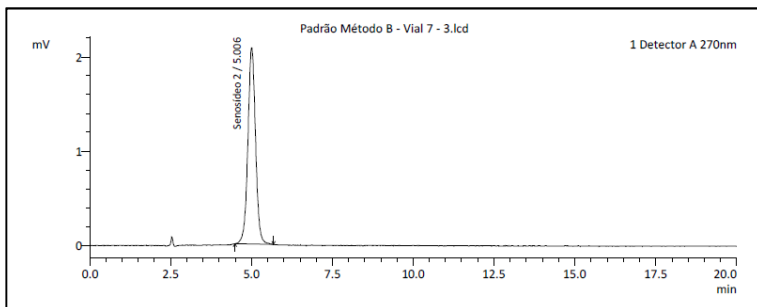


Figura 163: Padrão Método B - Vial 7 – 3

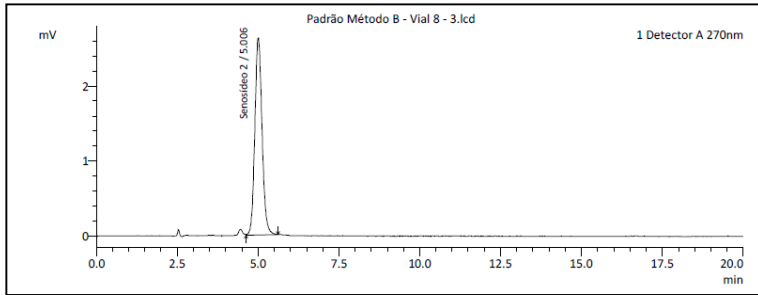


Figura 164: Padrão Método B - Vial 8 – 3

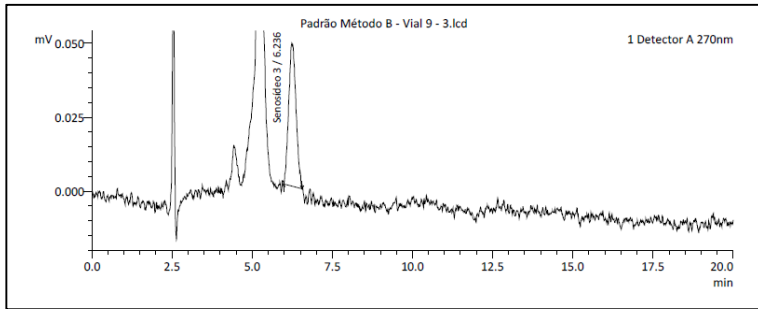


Figura 165: Padrão Método B - Vial 9 – 3

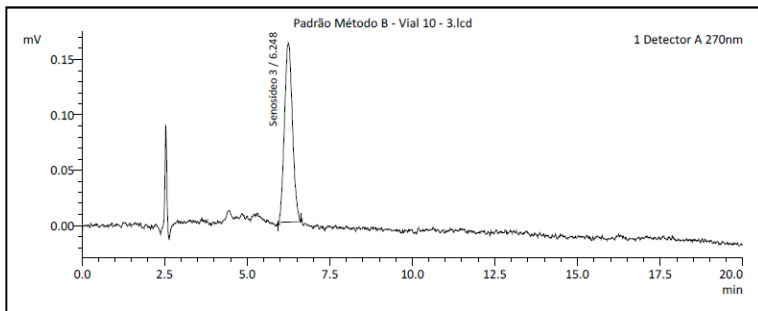


Figura 166: Padrão Método B - Vial 10 – 3

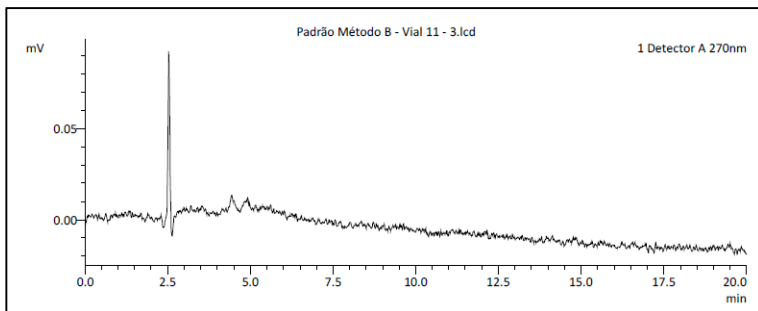


Figura 167: Padrão Método B - Vial 11 – 3

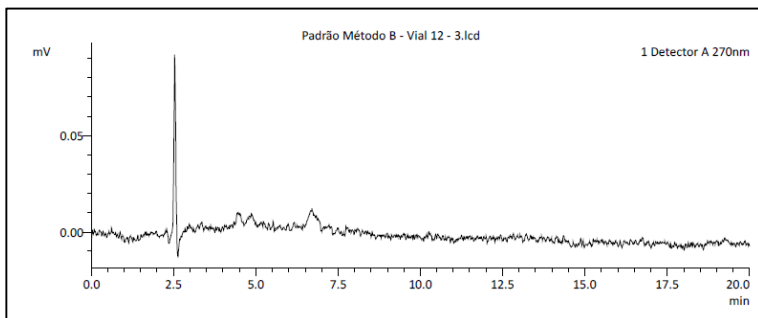


Figura 168: Padrão Método B - Vial 12 – 3

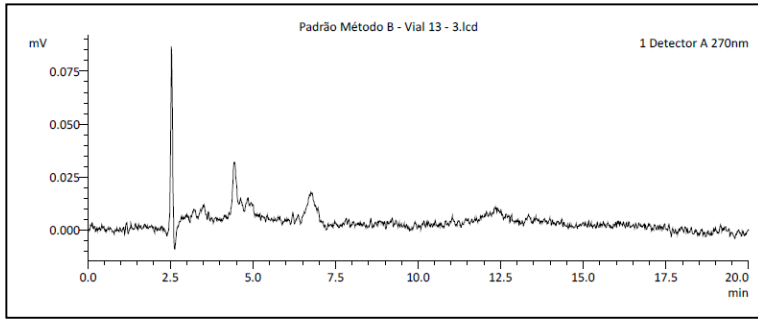


Figura 169: Padrão Método B - Vial 13 – 3

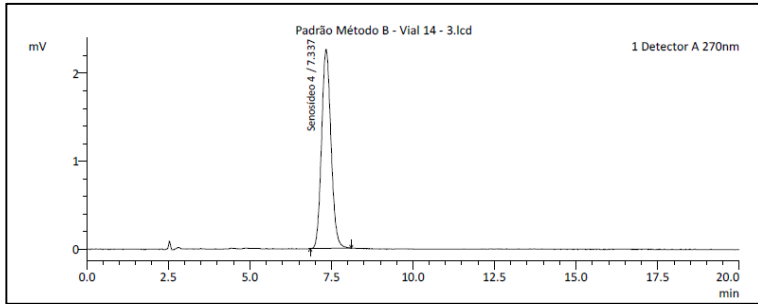


Figura 170: Padrão Método B - Vial 14 – 3

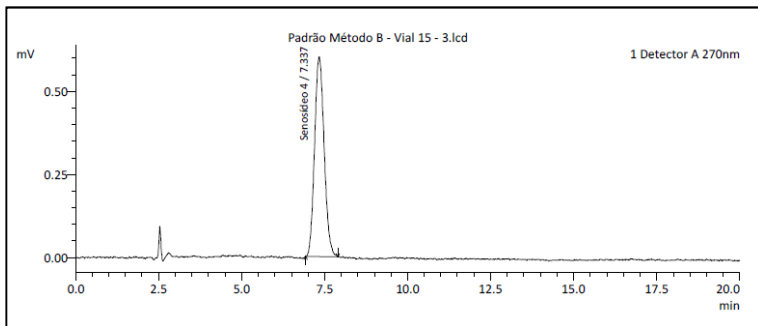


Figura 171: Padrão Método B - Vial 15 – 3

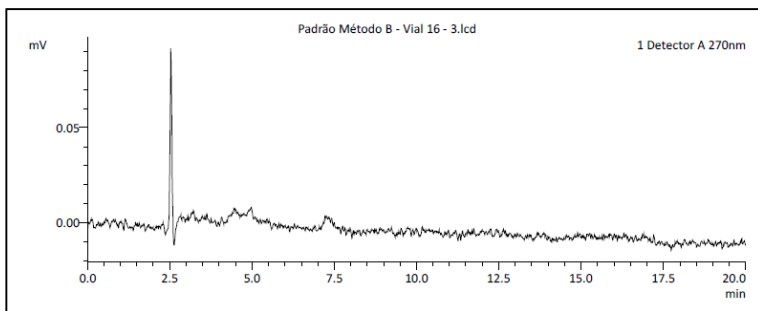


Figura 172: Padrão Método B - Vial 16 – 3

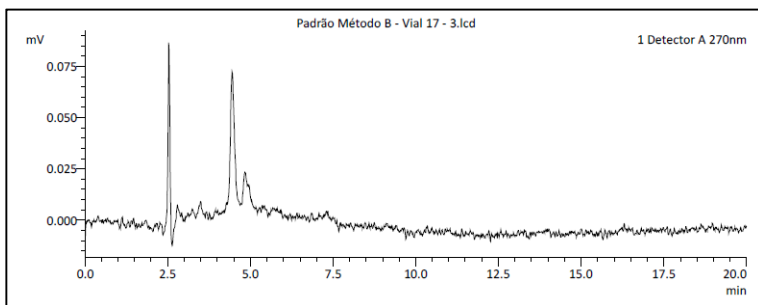


Figura 173: Padrão Método B - Vial 17 – 3



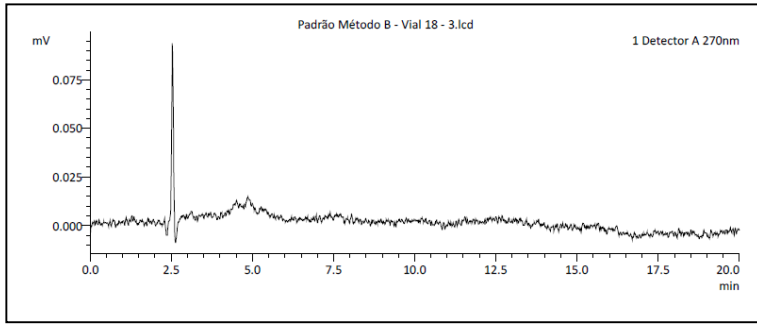


Figura 174: Padrão Método B - Vial 18 – 3

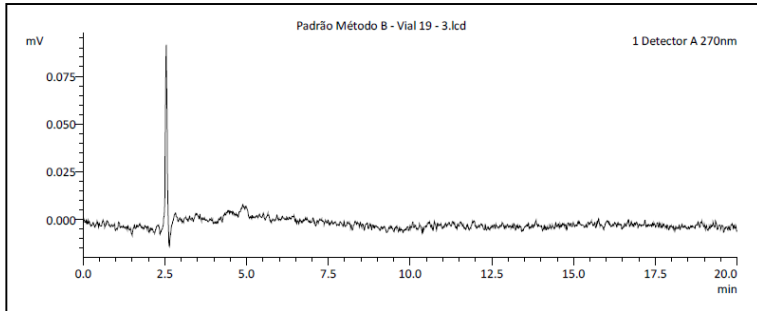


Figura 175: Padrão Método B - Vial 19 – 3

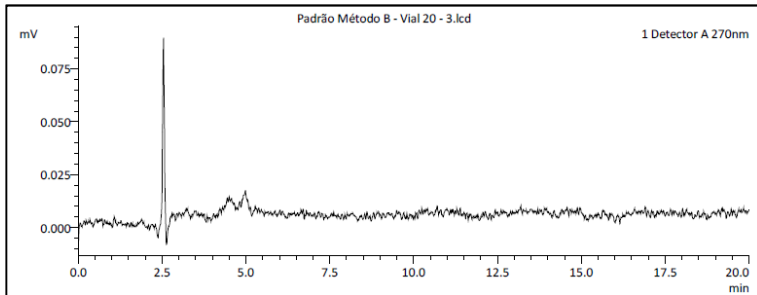


Figura 176: Padrão Método B - Vial 20 - 3

## AMOSTRA - MÉTODO A

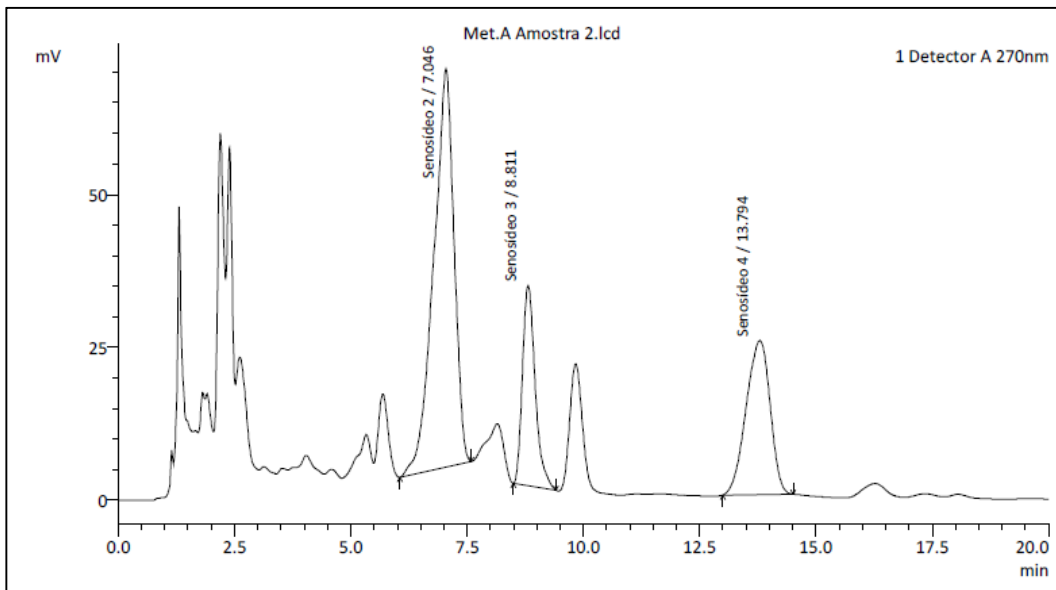


Figura 177: Met.A Amostra 2

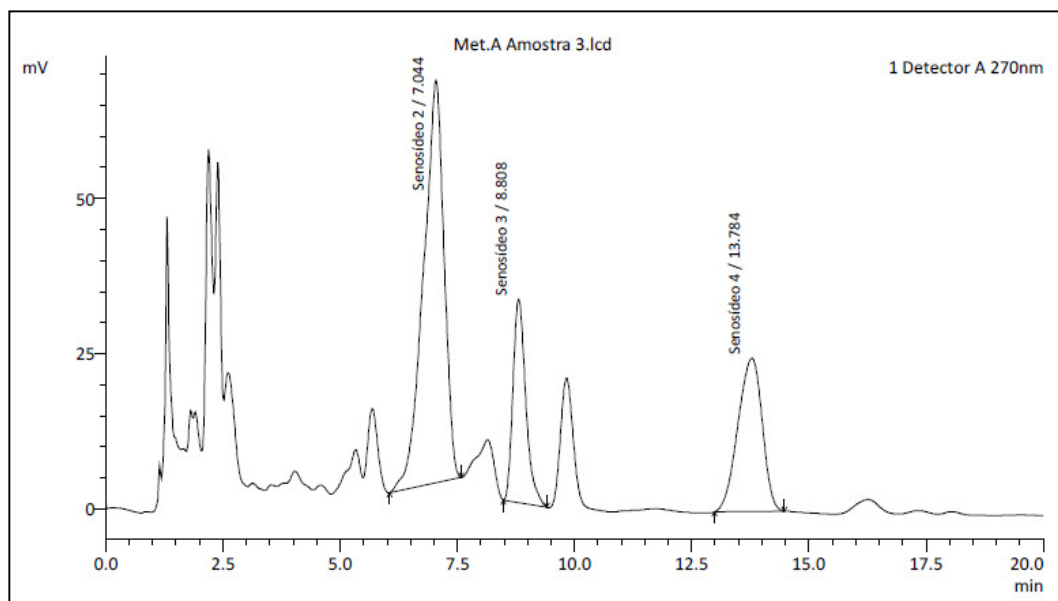


Figura 178: Met.A Amostra 3

### AMOSTRA - MÉTODO B

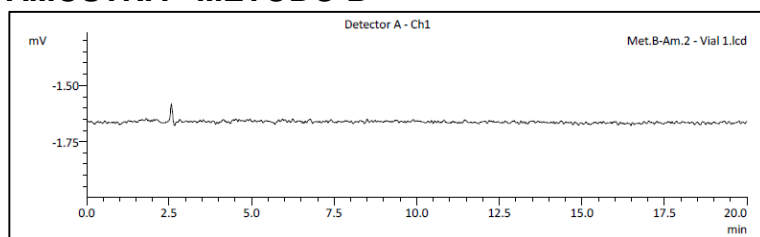


Figura 179: Método B - Amostra 2 - Vial 1

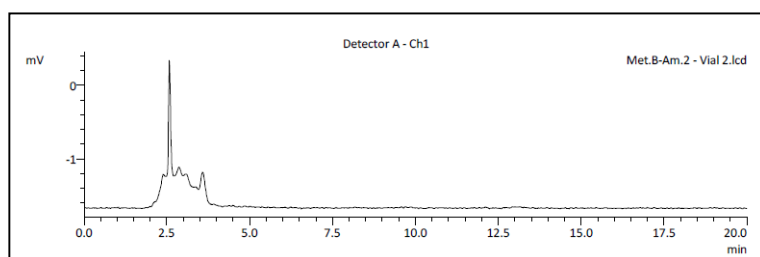


Figura 180: Método B - Amostra 2 - Vial 2

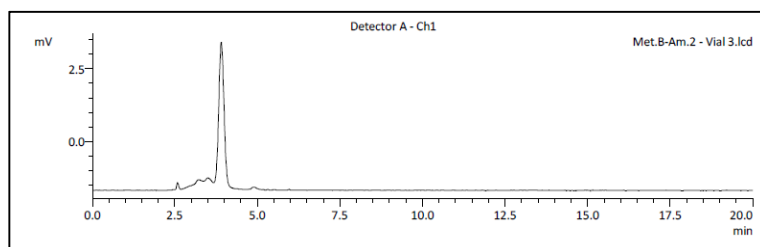


Figura 181: Método B - Amostra 2 - Vial 3

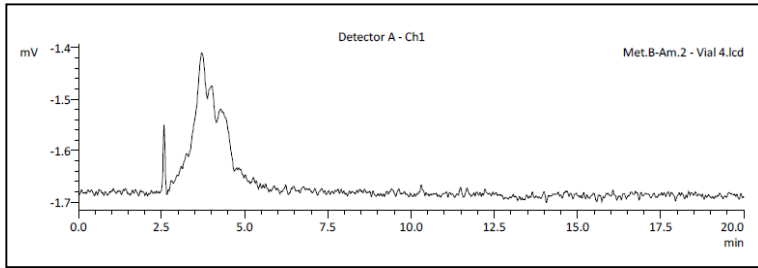


Figura 182: Método B - Amostra 2 - Vial 4

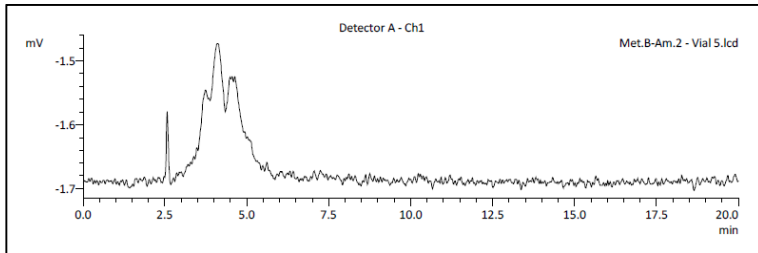


Figura 183: Método B - Amostra 2 - Vial 5

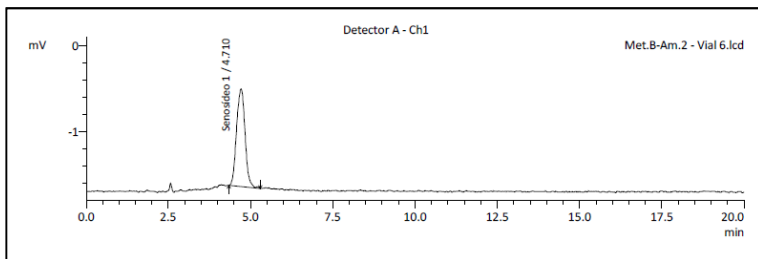


Figura 184: Método B - Amostra 2 - Vial 6

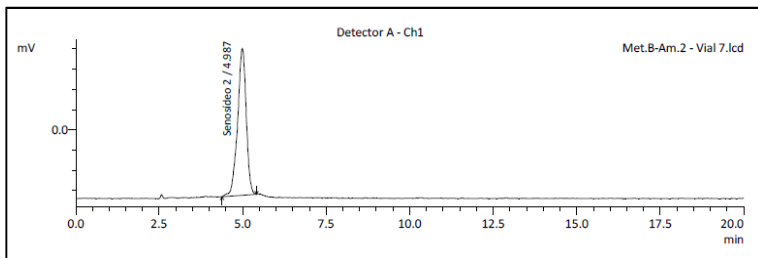


Figura 185: Método B - Amostra 2 - Vial 7

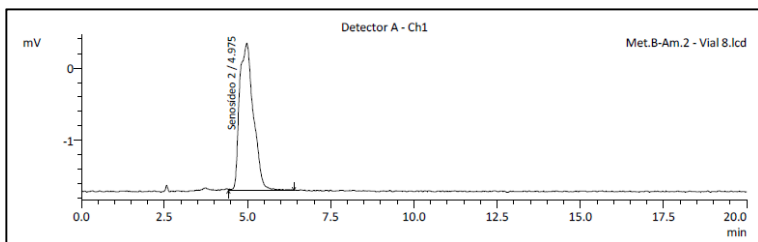


Figura 186: Método B - Amostra 2 - Vial 8

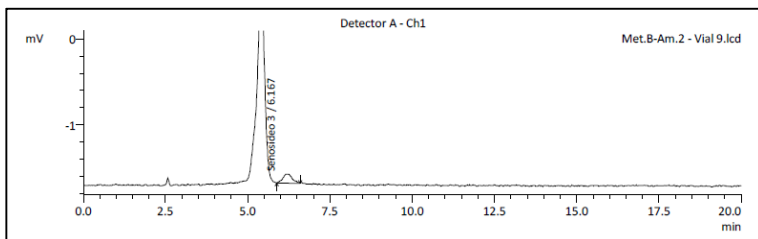


Figura 187: Método B - Amostra 2 - Vial 9

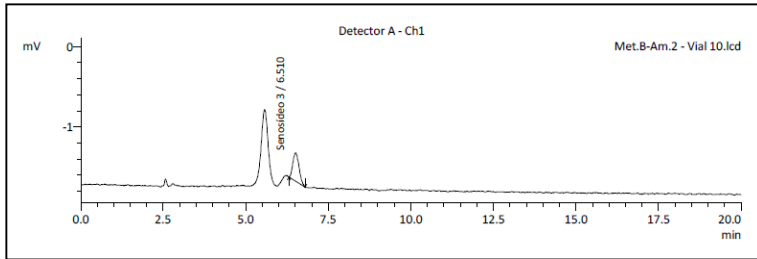


Figura 188: Método B - Amostra 2 - Vial 10

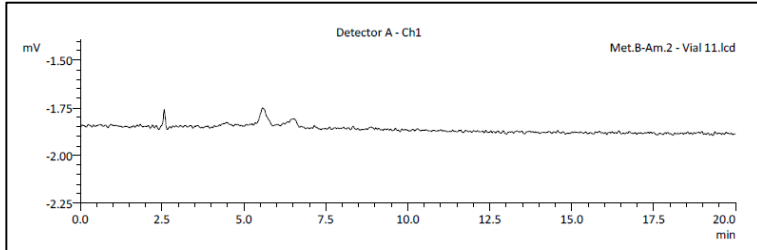


Figura 189: Método B - Amostra 2 - Vial 11

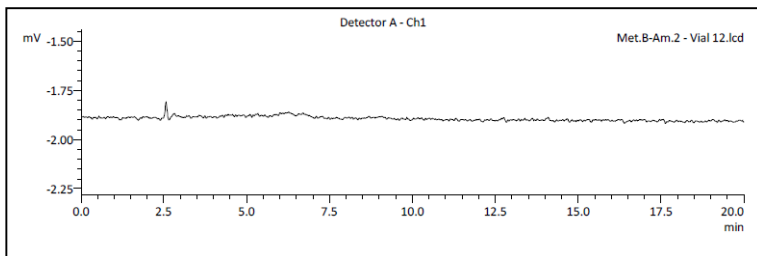


Figura 190: Método B - Amostra 2 - Vial 12

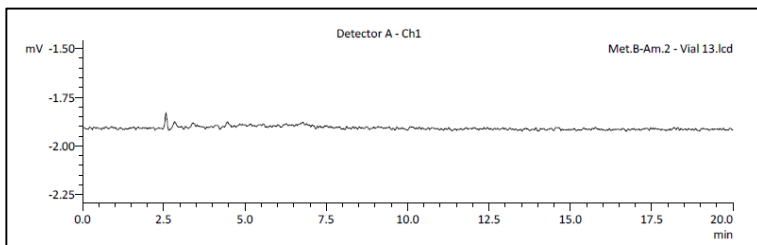


Figura 191: Método B - Amostra 2 - Vial 13

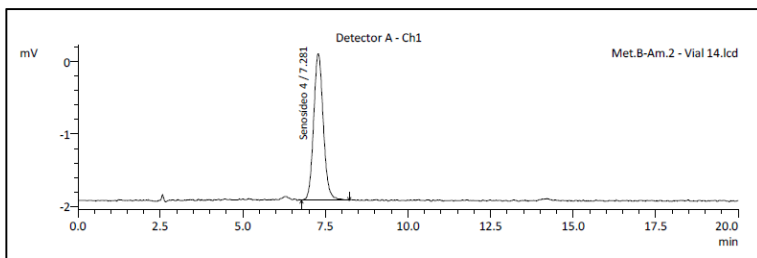


Figura 192: Método B - Amostra 2 - Vial 14

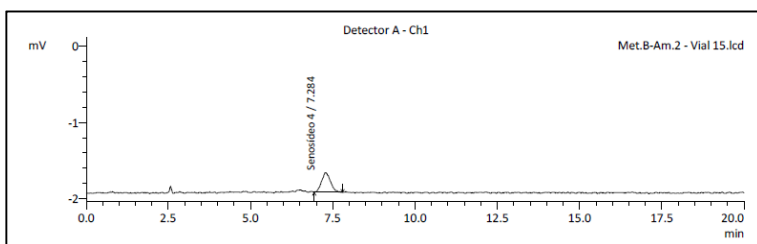


Figura 193: Método B - Amostra 2 - Vial 15

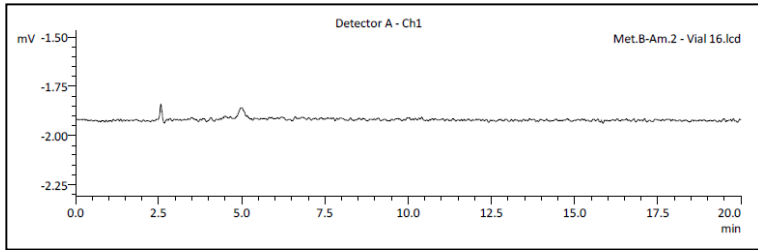


Figura 194: Método B - Amostra 2 - Vial 16

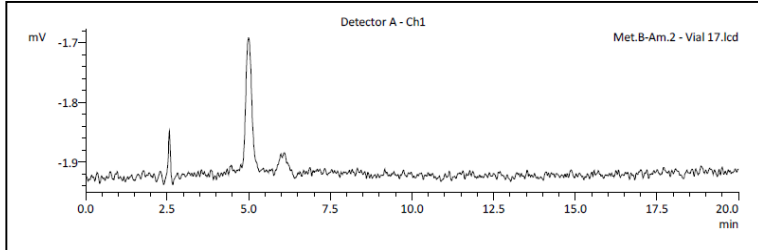


Figura 195: Método B - Amostra 2 - Vial 17

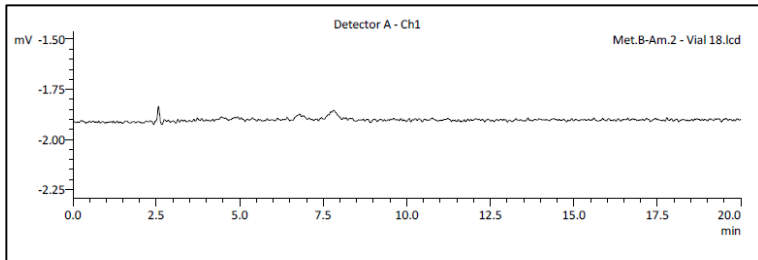


Figura 196: Método B - Amostra 2 - Vial 18

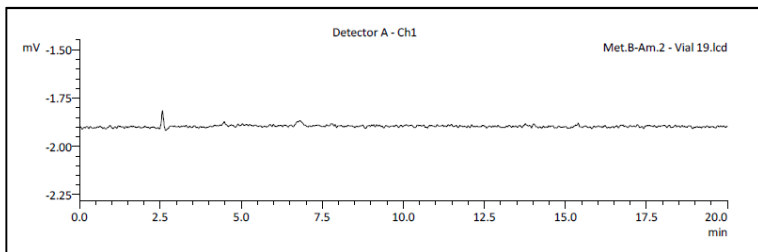


Figura 197: Método B - Amostra 2 - Vial 19

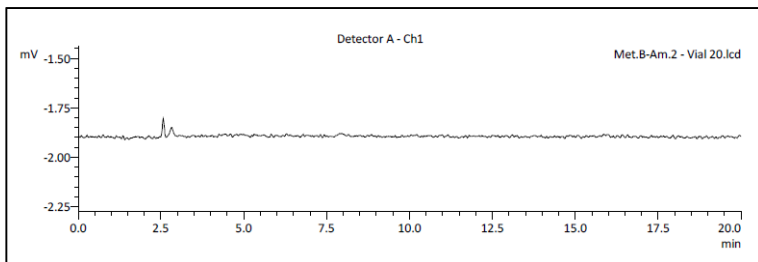


Figura 198: Método B - Amostra 2 - Vial 20

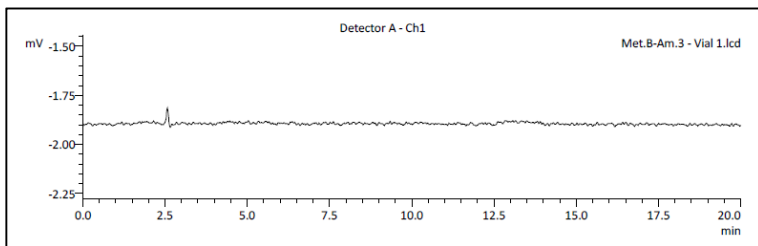


Figura 199: Método B - Amostra 3 - Vial 1

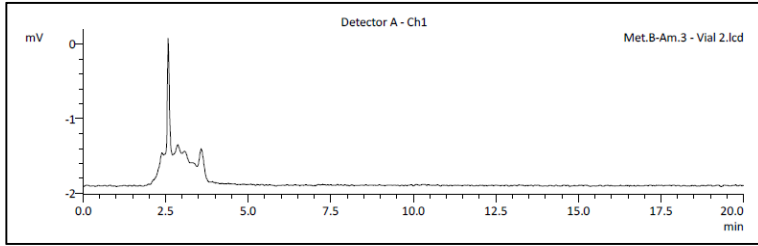


Figura 200: Método B - Amostra 3 - Vial 2

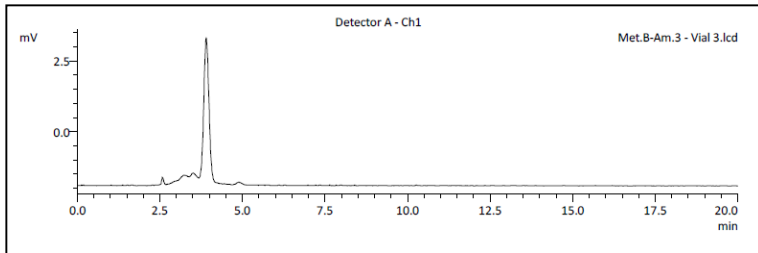


Figura 201: Método B - Amostra 3 - Vial 3

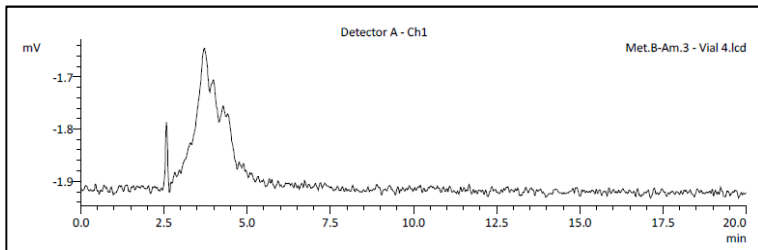


Figura 202: Método B - Amostra 3 - Vial 4

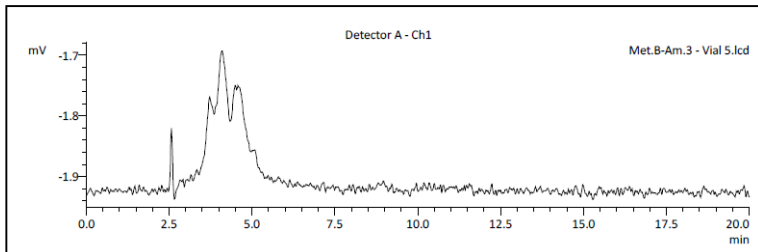


Figura 203: Método B - Amostra 3 - Vial 5

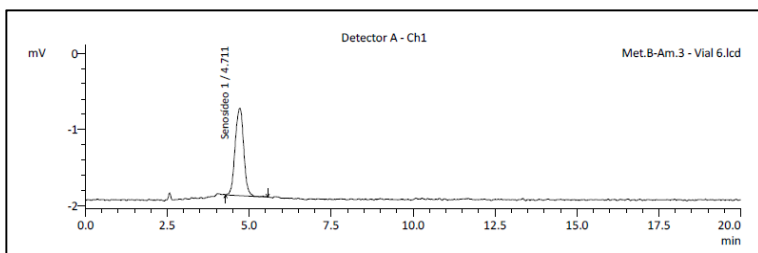


Figura 204: Método B - Amostra 3 - Vial 6

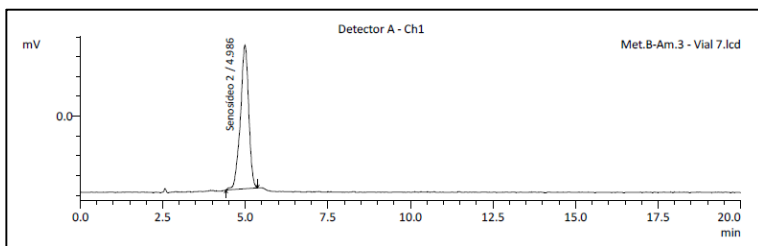


Figura 205: Método B - Amostra 3 - Vial 7

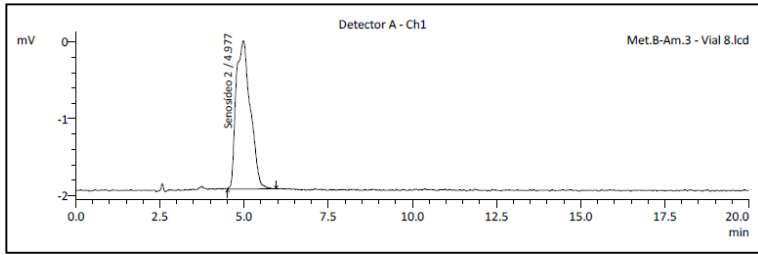


Figura 206: Método B - Amostra 3 - Vial 8

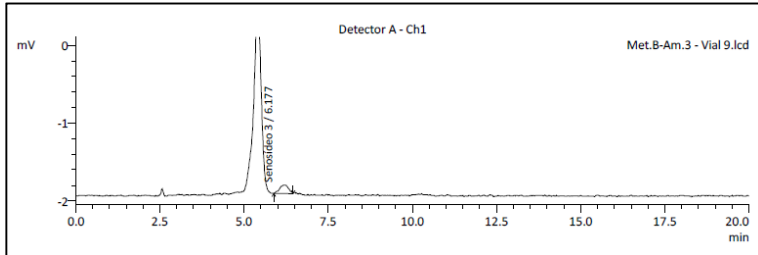


Figura 207: Método B - Amostra 3 - Vial 9

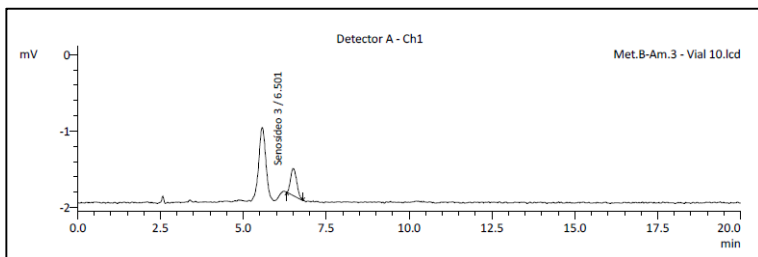


Figura 208: Método B - Amostra 3 - Vial 10

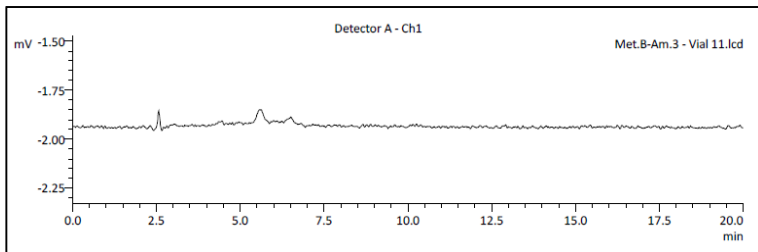


Figura 209: Método B - Amostra 3 - Vial 11

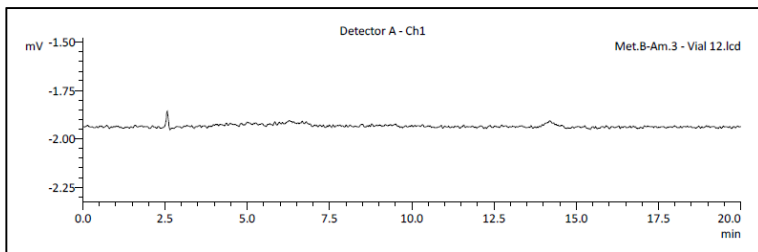


Figura 210: Método B - Amostra 3 - Vial 12

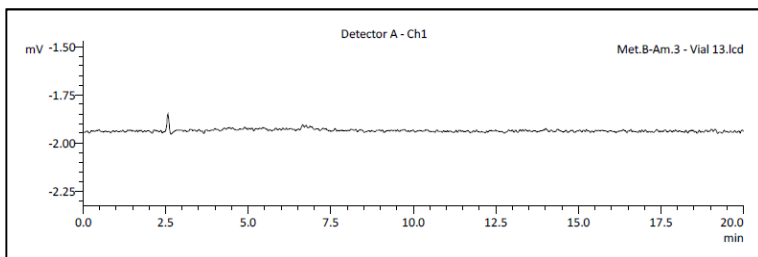


Figura 211: Método B - Amostra 3 - Vial 13

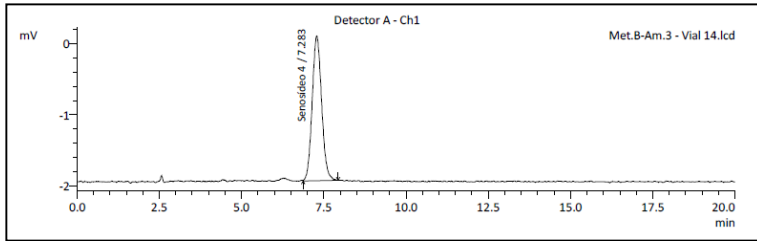


Figura 212: Método B - Amostra 3 - Vial 14

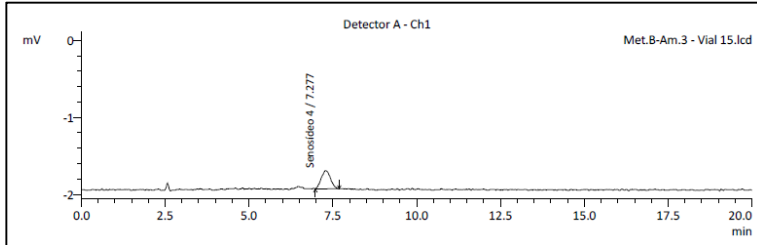


Figura 213: Método B - Amostra 3 - Vial 15

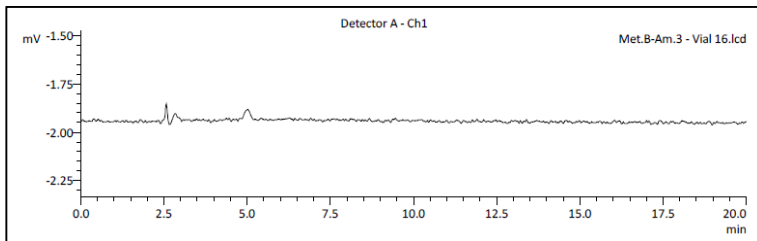


Figura 214: Método B - Amostra 3 - Vial 16

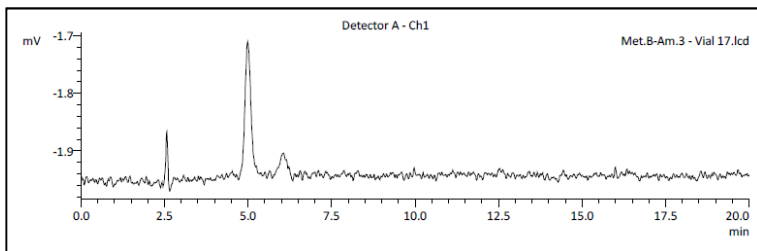


Figura 215: Método B - Amostra 3 - Vial 17

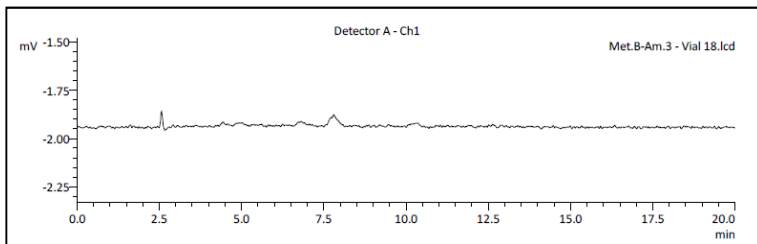


Figura 216: Método B - Amostra 3 - Vial 18

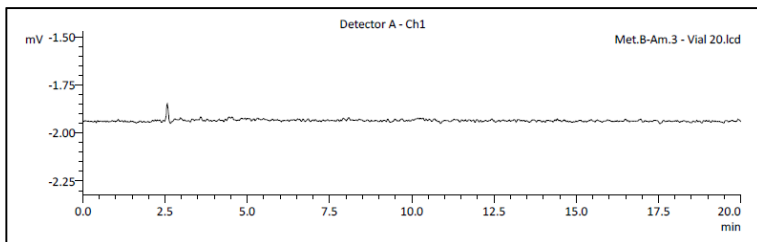


Figura 217: Método B - Amostra 3 - Vial 20



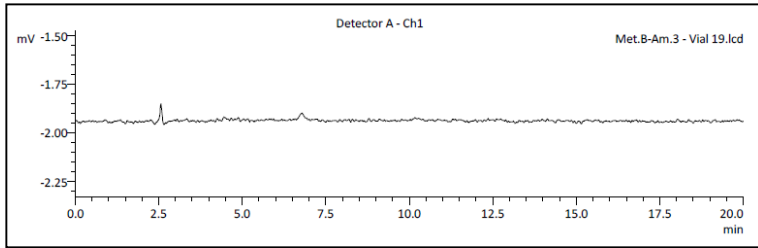


Figura 218: Método B - Amostra 3 - Vial 19

## FINGERPRINT TEST - MÉTODO B

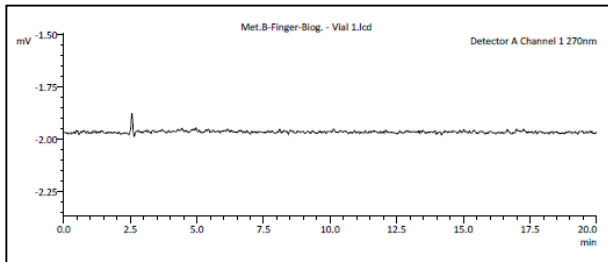


Figura 219: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 1 - 270nm

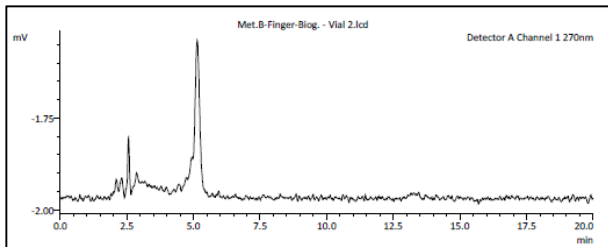


Figura 220: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 2 - 270nm

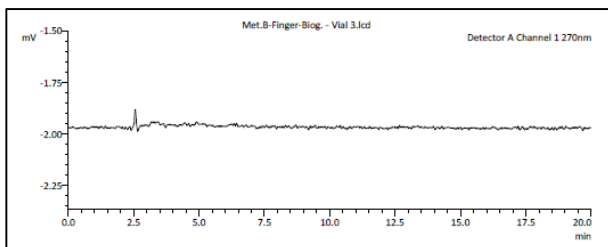


Figura 221: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 3 - 270nm

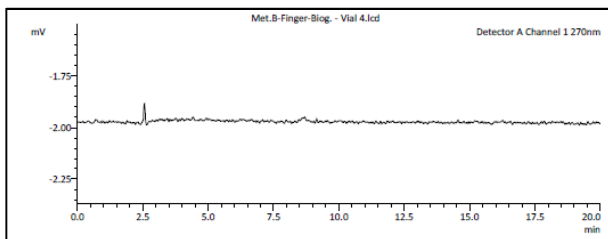


Figura 222: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 4 - 270nm

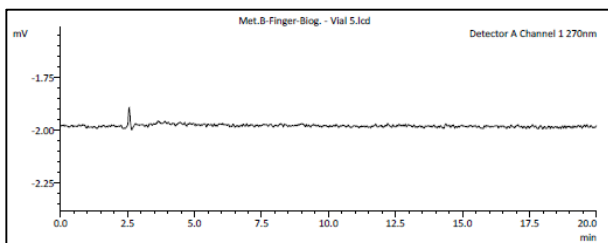


Figura 223: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 5 - 270nm

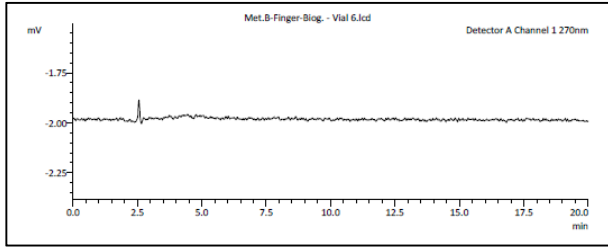


Figura 224: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 6 - 270nm

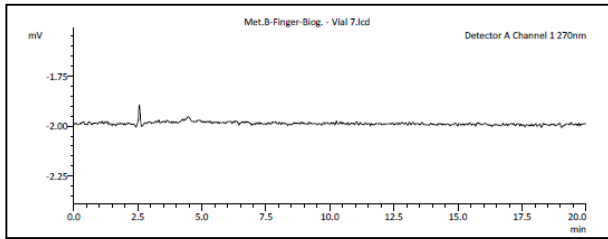


Figura 225: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 7 - 270nm

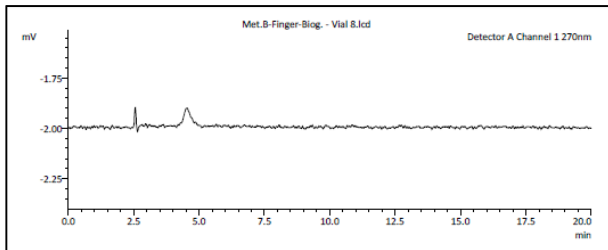


Figura 226: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 8 - 270nm

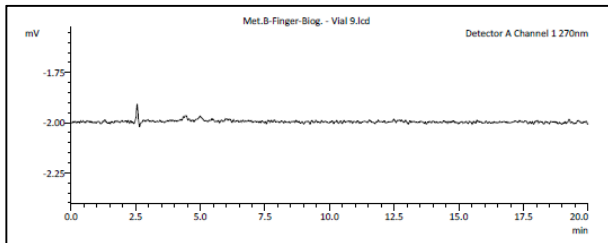


Figura 227: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 9 - 270nm

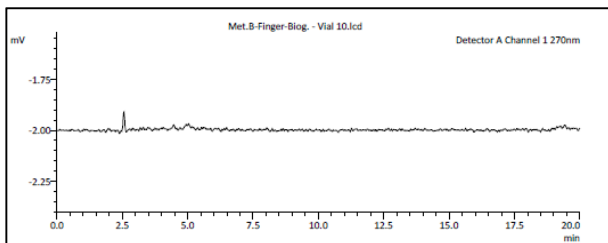


Figura 228: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 10 - 270nm

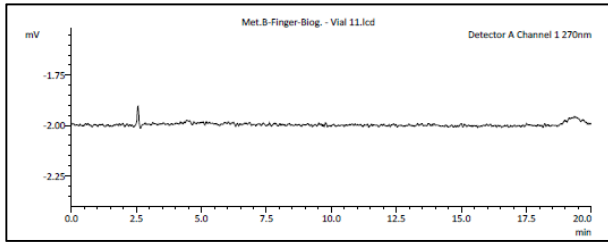


Figura 229: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 11 - 270nm

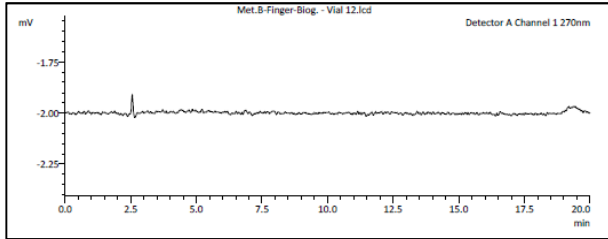


Figura 230: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 12 - 270nm

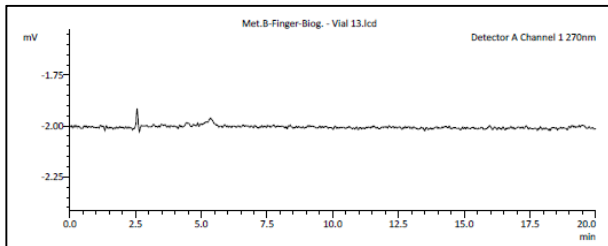


Figura 231: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 13 - 270nm

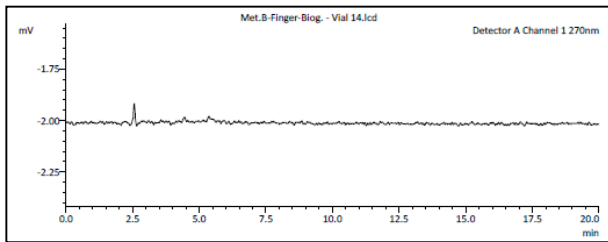


Figura 232: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 14 - 270nm

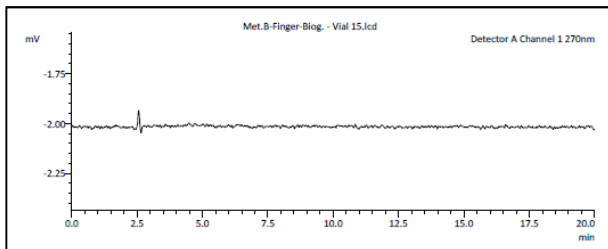


Figura 233: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 15 - 270nm

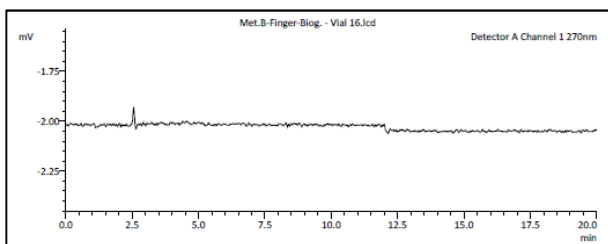


Figura 234: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 16 - 270nm

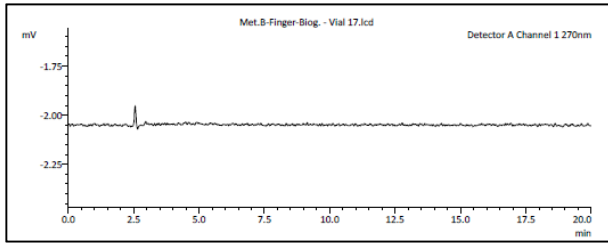


Figura 235: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 17 - 270nm

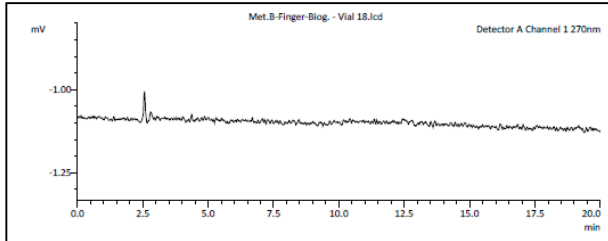


Figura 236: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 18 - 270nm

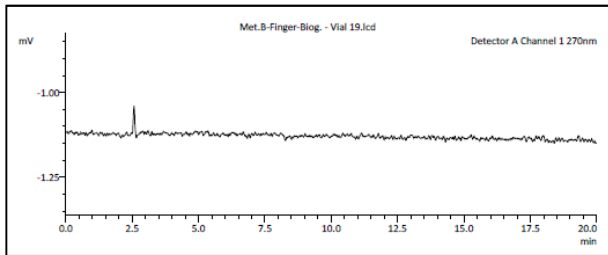


Figura 237: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 19 - 270nm

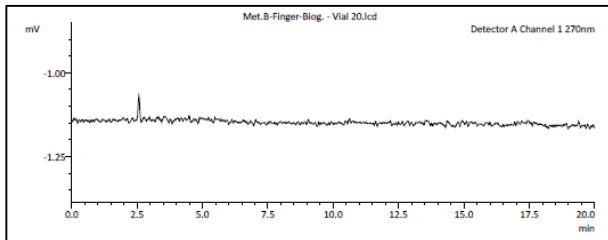


Figura 238: Método B - Fingerprint - Biogestil - Vial 20 - 270nm

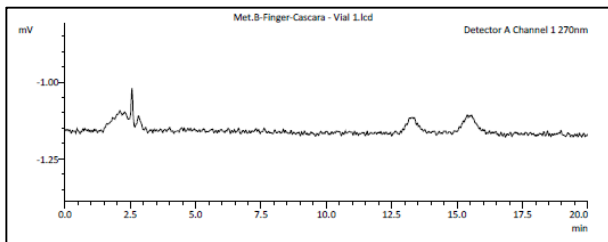


Figura 239: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 1 - 270nm

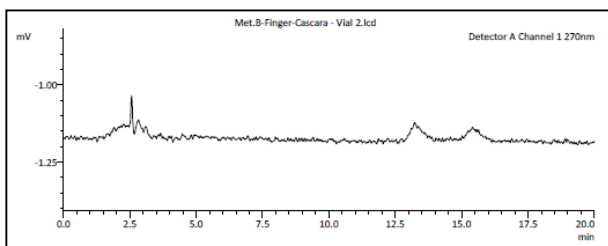


Figura 240: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 2 - 270nm

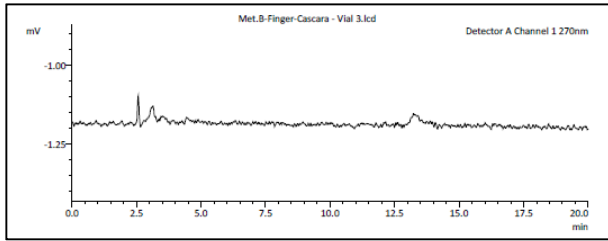


Figura 241: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 3 - 270nm

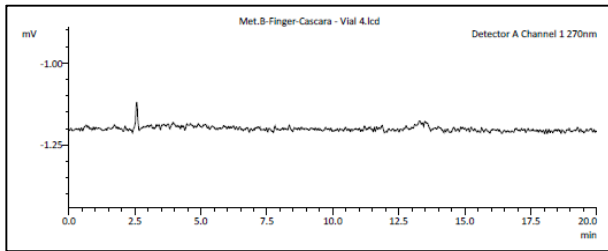


Figura 242: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 4 - 270nm

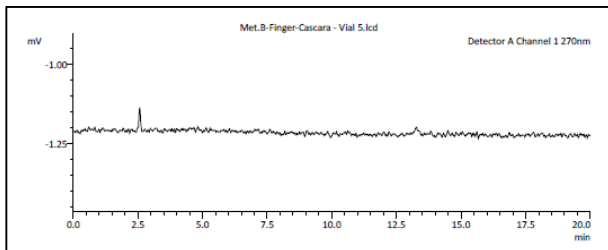


Figura 243: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 5 - 270nm

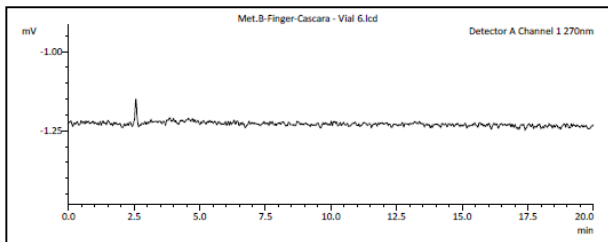


Figura 244: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 6 - 270nm

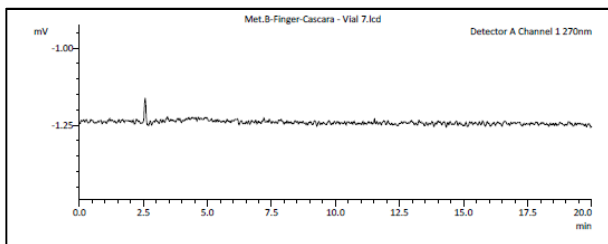


Figura 245: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 7 - 270nm

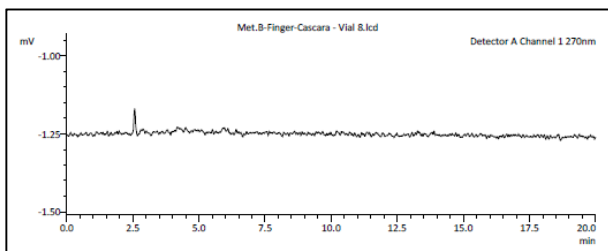


Figura 246: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 8 - 270nm

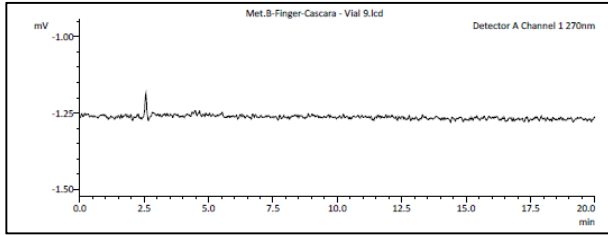


Figura 247: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 9 - 270nm

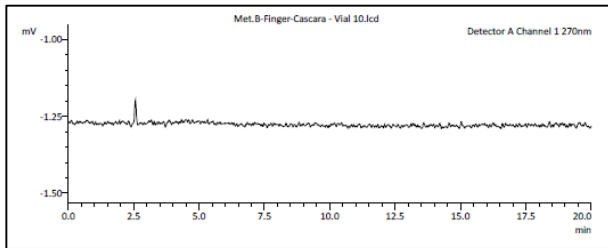


Figura 248: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 10 - 270nm

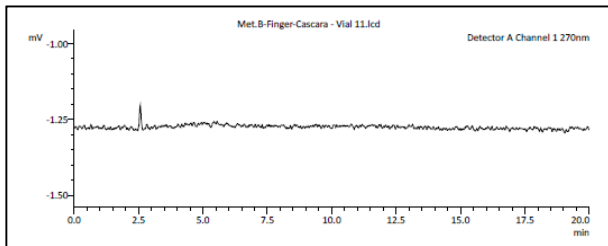


Figura 249: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 11 - 270nm

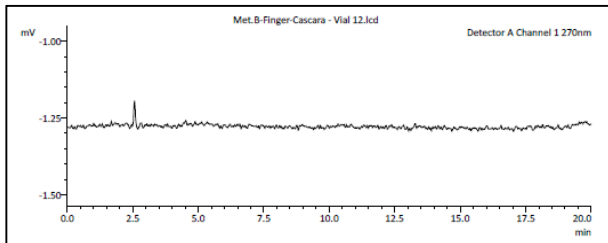


Figura 250: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 12 - 270nm

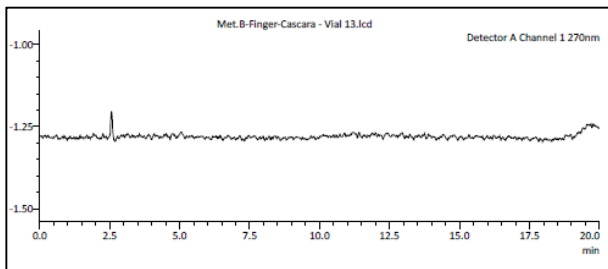


Figura 251: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 13 - 270nm

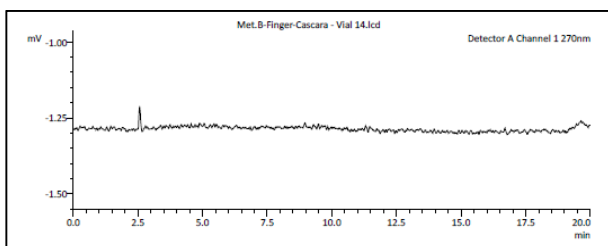


Figura 252: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 14 - 270nm

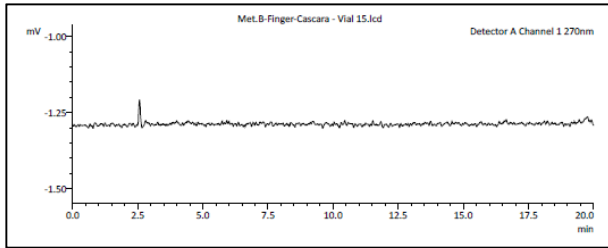


Figura 253: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 15 - 270nm

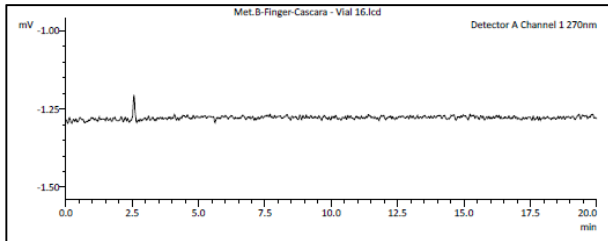


Figura 254: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 16 - 270nm

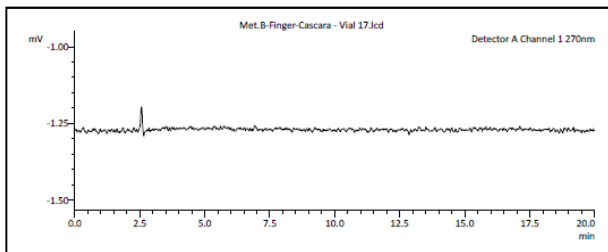


Figura 255: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 17 - 270nm

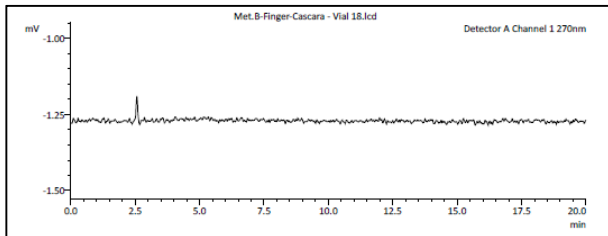


Figura 256: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 18 - 270nm

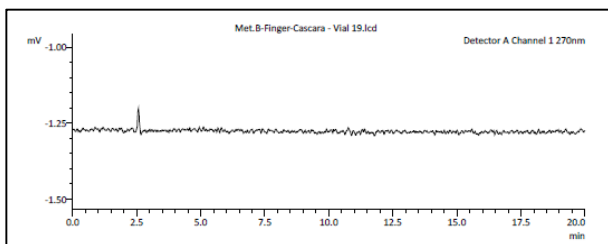


Figura 257: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 19 - 270nm

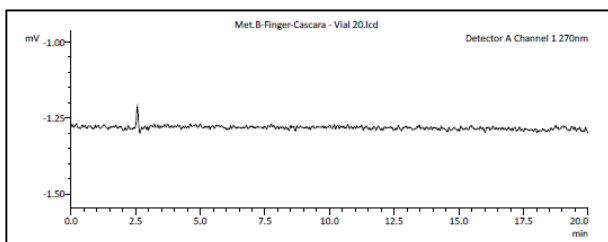


Figura 258: Método B - Fingerprint - Cascara - Vial 20 - 270nm

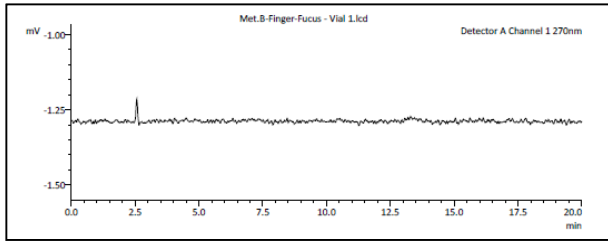


Figura 259: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 1 - 270nm

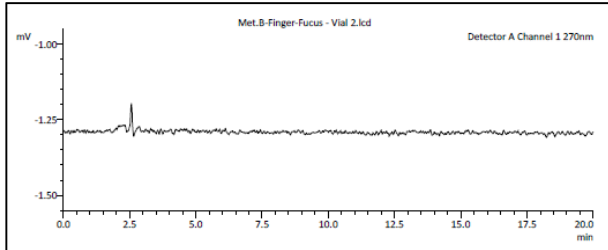


Figura 260: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 2 - 270nm

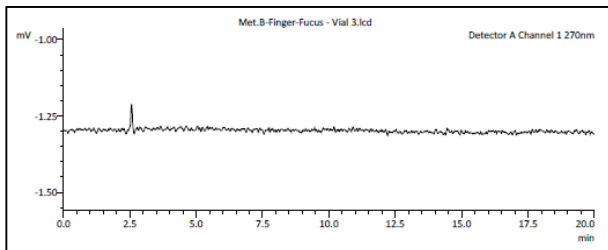


Figura 261: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 3 - 270nm

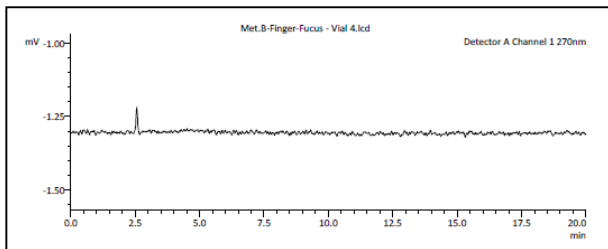


Figura 262: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 4 - 270nm

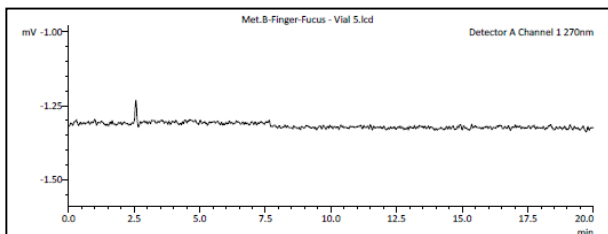


Figura 263: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 5 - 270nm

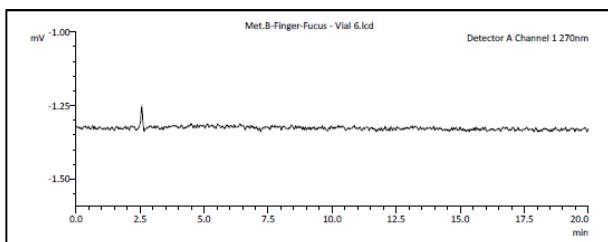


Figura 264: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 6 - 270nm



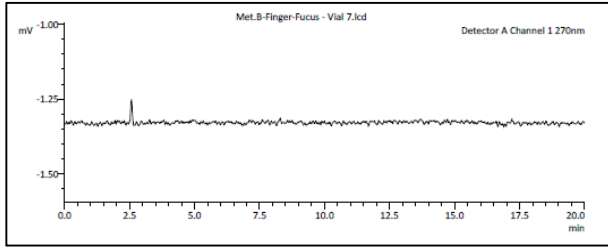


Figura 265: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 7 - 270nm

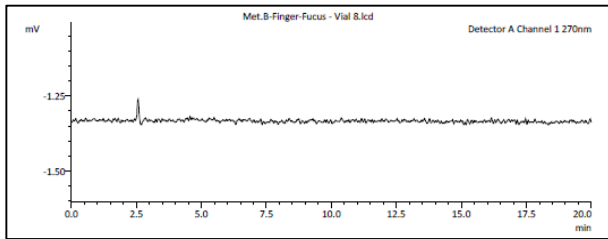


Figura 266: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 8 - 270nm

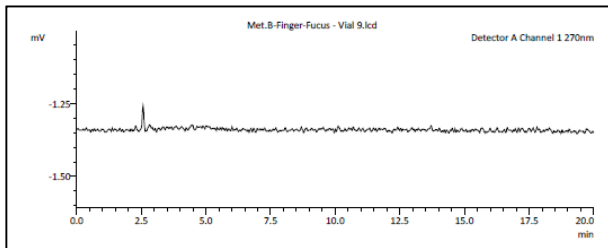


Figura 267: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 9 - 270nm

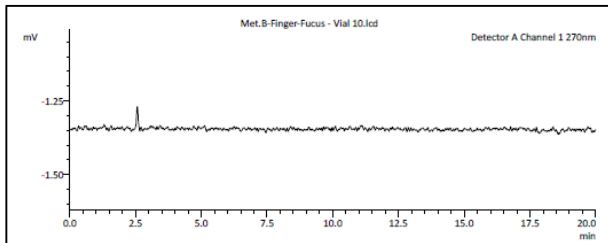


Figura 268: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 10 - 270nm

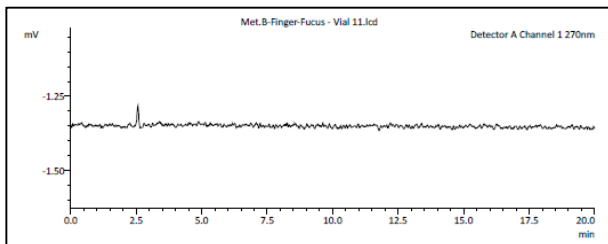


Figura 269: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 11 - 270nm

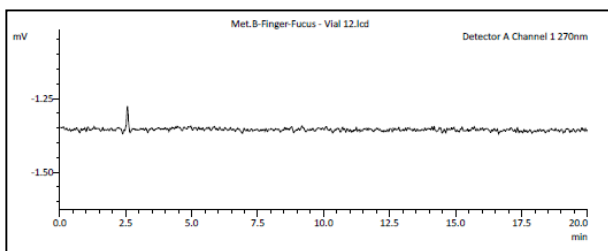


Figura 270: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 12 - 270nm

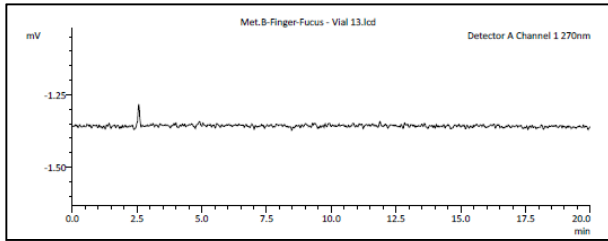


Figura 271: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 13 - 270nm

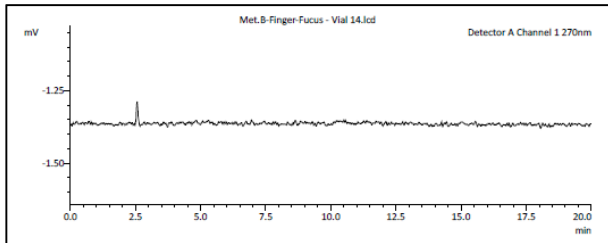


Figura 272: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 14 - 270nm

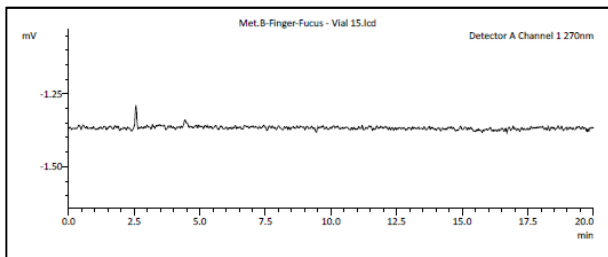


Figura 273: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 15 - 270nm

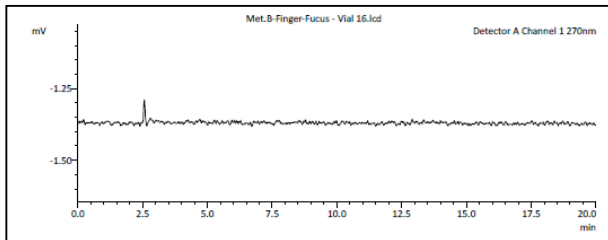


Figura 274: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 16 - 270nm

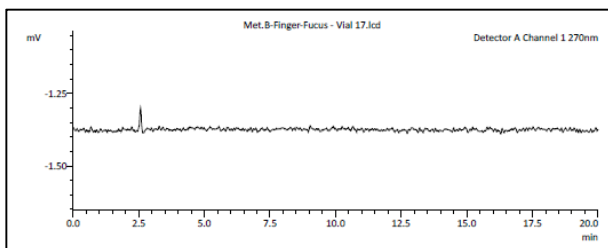


Figura 275: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 17 - 270nm

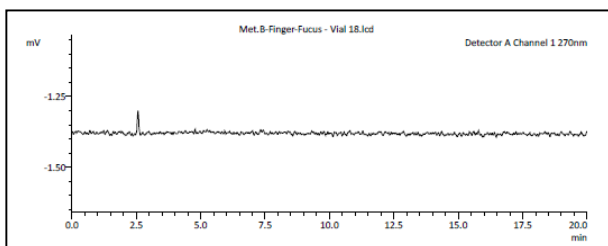


Figura 276: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 18 - 270nm

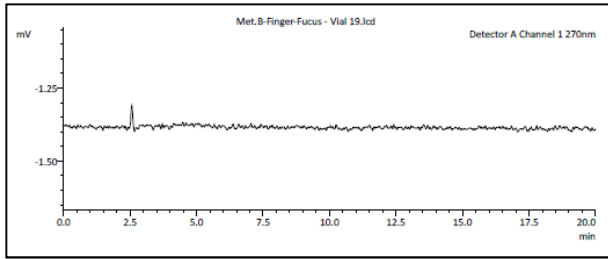


Figura 277: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 19 - 270nm

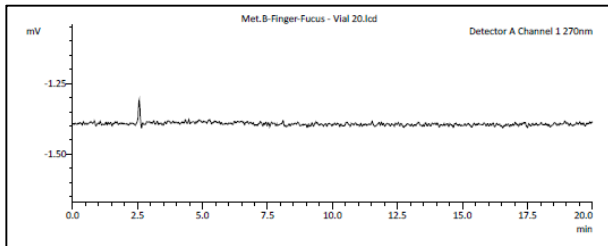


Figura 278: Método B - Fingerprint - Fucus - Vial 20 - 270nm

## TEOR DE DICLOFENACO SÓDICO, PARACETAMOL E CAFEÍNA PADRÃO - MÉTODO A

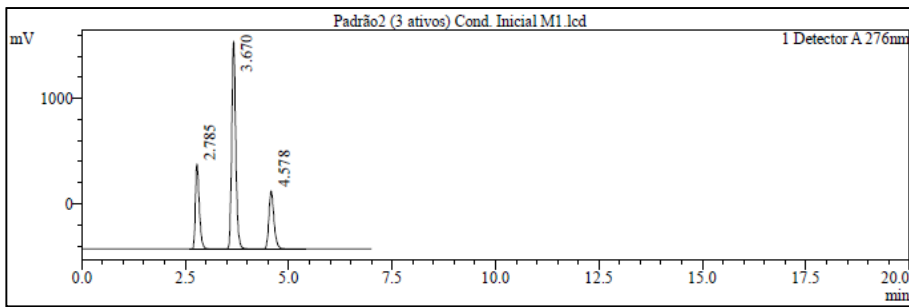


Figura 279: Padrão2 (3 ativos) Cond. Inicial M1

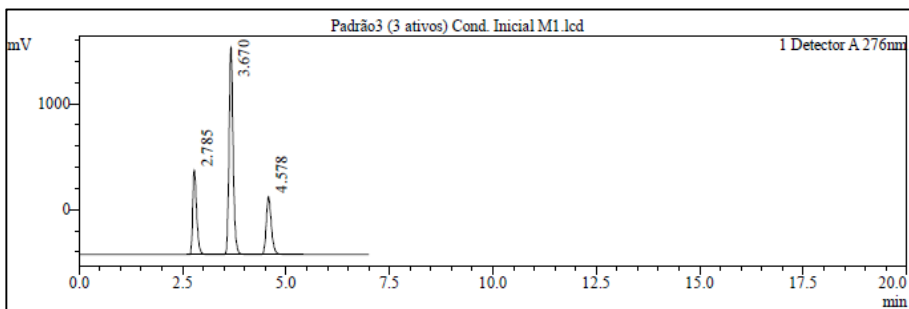


Figura 280: Padrão3 (3 ativos) Cond. Inicial M1

## AMOSTRA - MÉTODO A

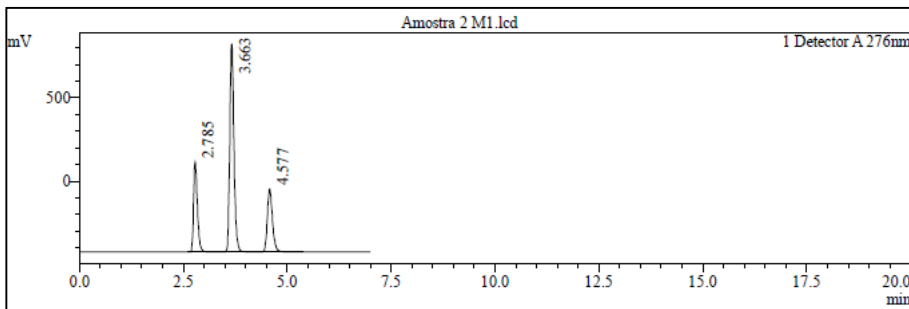


Figura 281: Amostra 2 M1

## PADRÃO - MÉTODO B

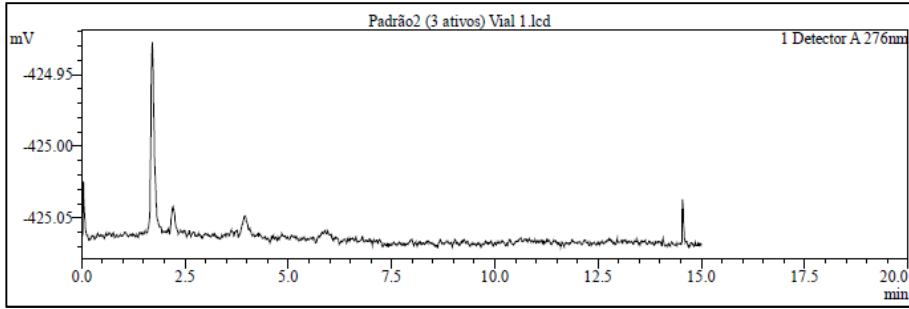


Figura 282: Padrão2 (3 ativos) Vial 1

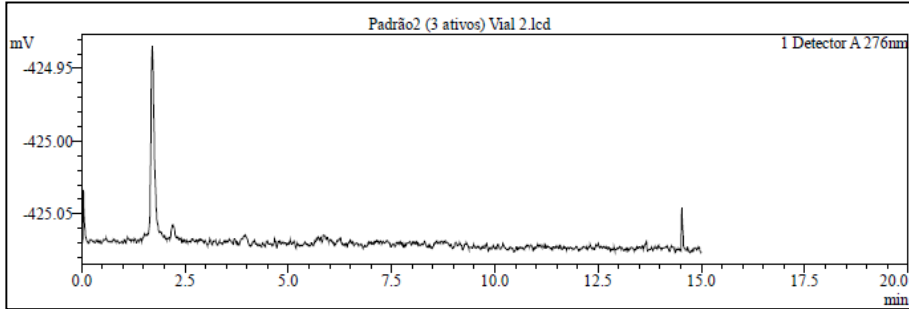


Figura 283: Padrão2 (3 ativos) Vial 2

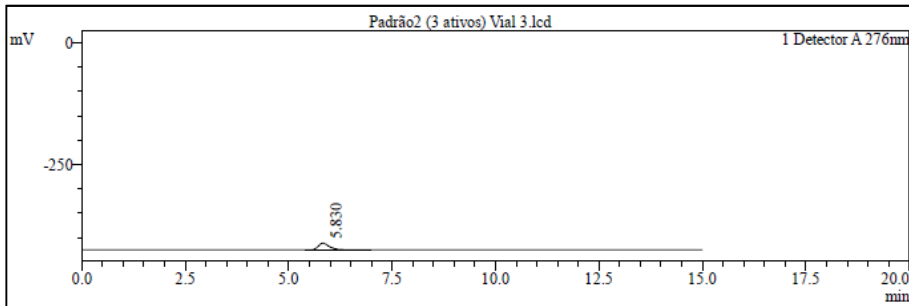


Figura 284: Padrão2 (3 ativos) Vial 3

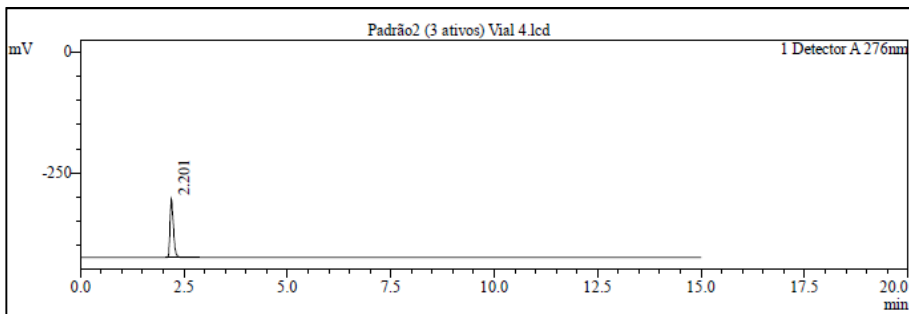


Figura 285: Padrão2 (3 ativos) Vial 4

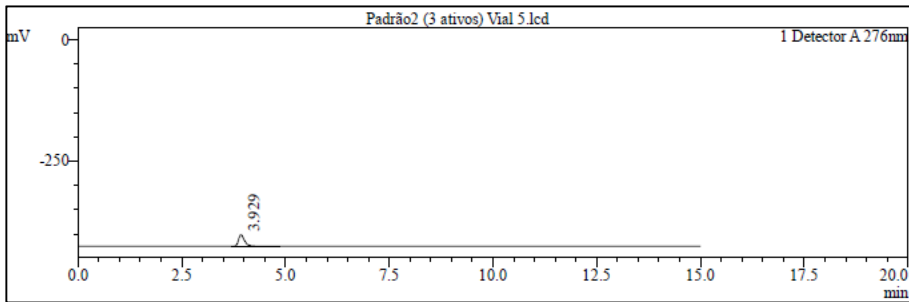


Figura 286: Padrão2 (3 ativos) Vial 5

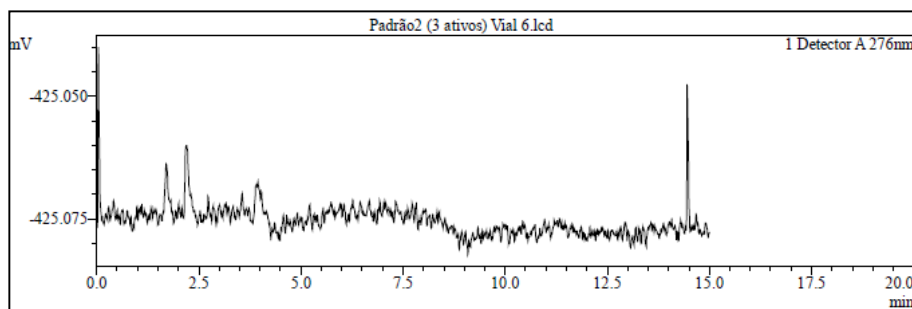


Figura 287: Padrão2 (3 ativos) Vial 6

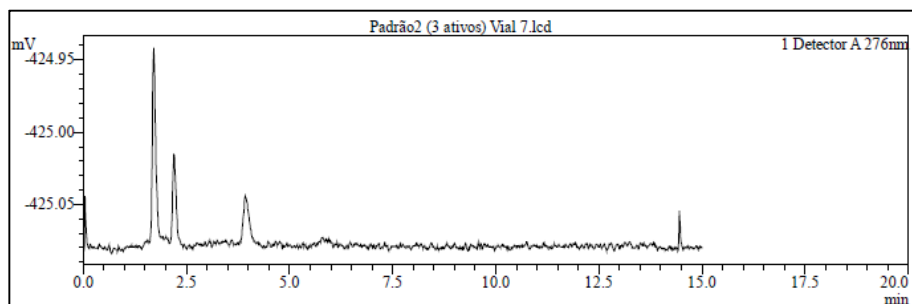


Figura 288: Padrão2 (3 ativos) Vial 7

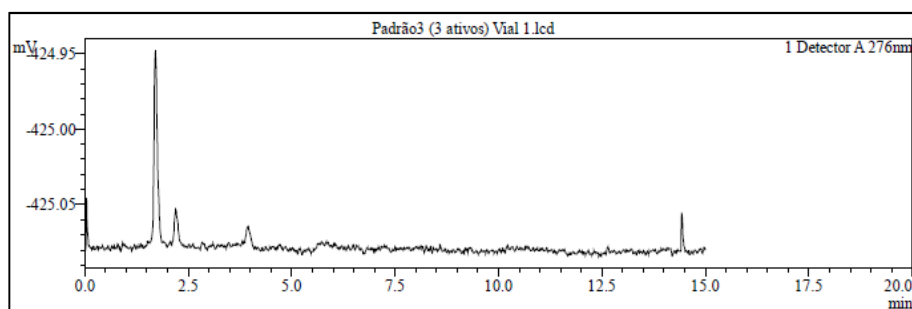


Figura 289: Padrão3 (3 ativos) Vial 1

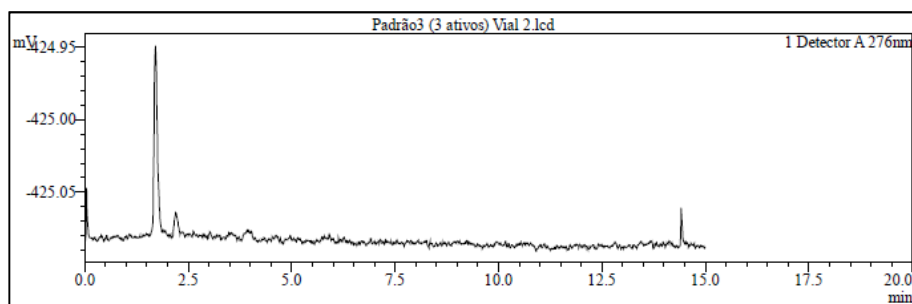


Figura 290: Padrão3 (3 ativos) Vial 2

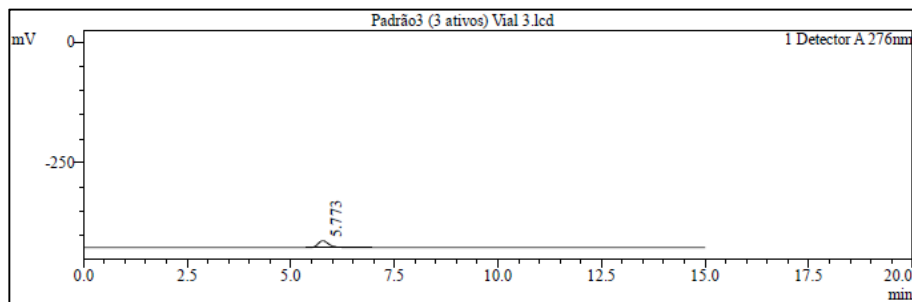


Figura 291: Padrão3 (3 ativos) Vial 3

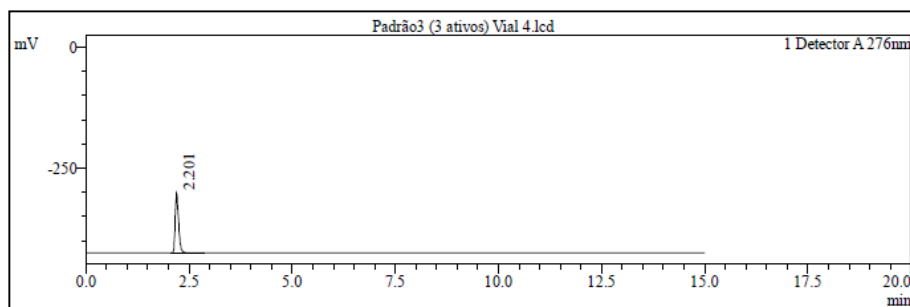


Figura 292: Padrão3 (3 ativos) Vial 4

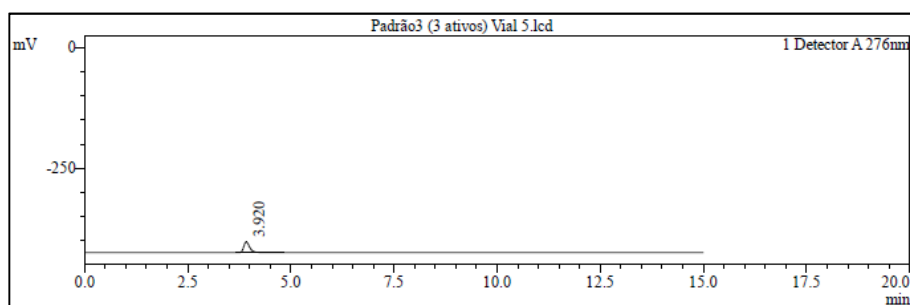


Figura 293: Padrão3 (3 ativos) Vial 5

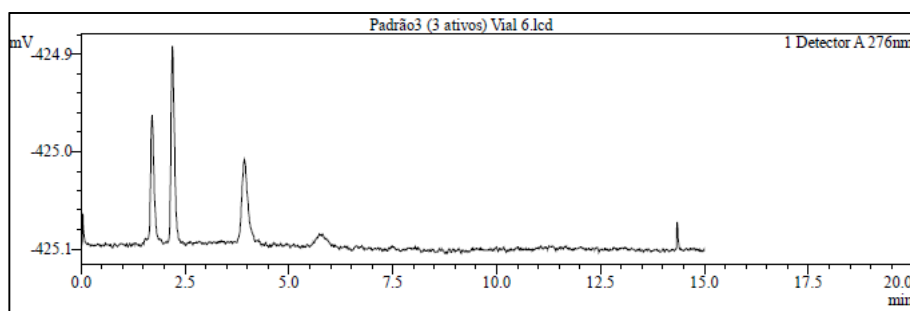


Figura 294: Padrão3 (3 ativos) Vial 6

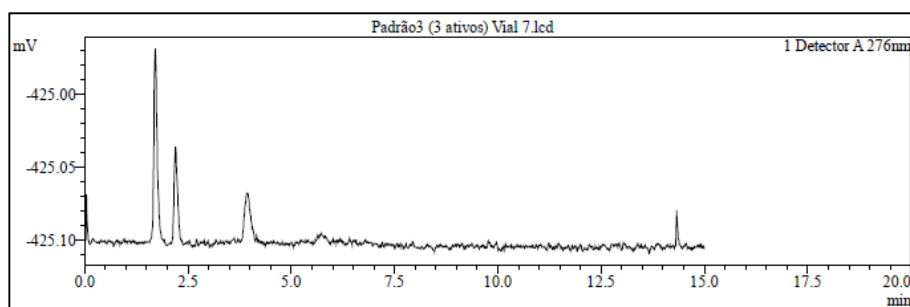


Figura 295: Padrão3 (3 ativos) Vial 7

## AMOSTRA - MÉTODO B

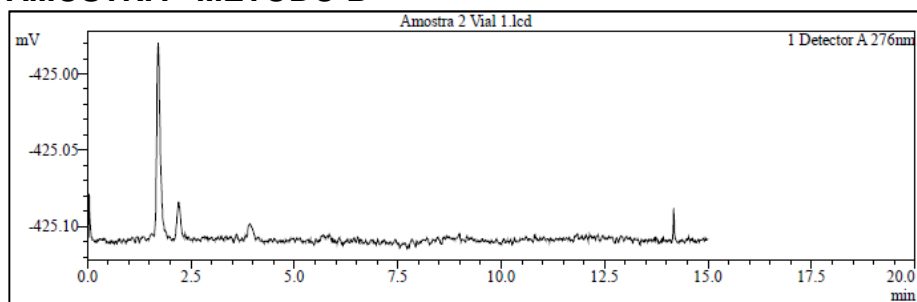


Figura 296: Amostra 2 Vial 1

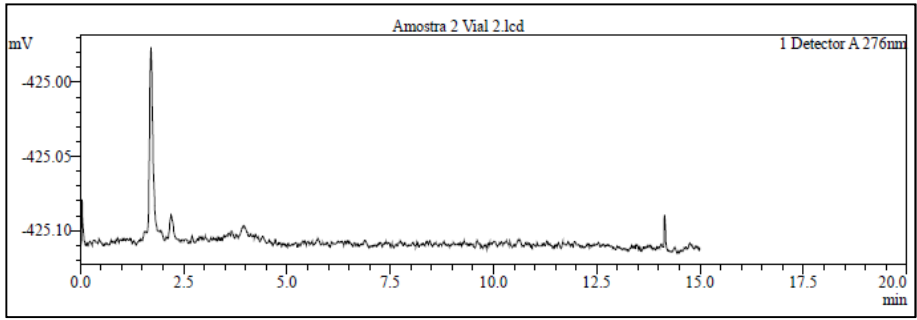


Figura 297: Amostra 2 Vial 2

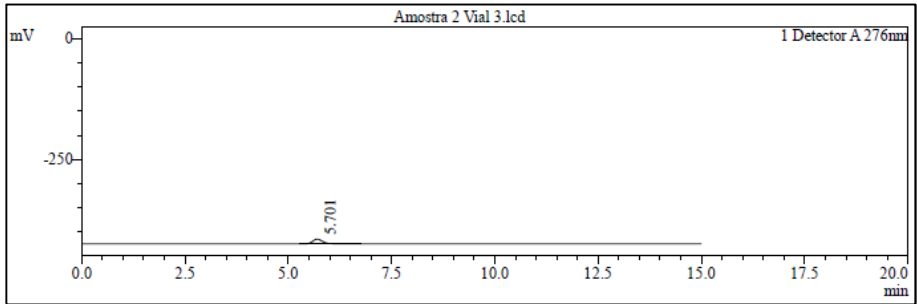


Figura 298: Amostra 2 Vial 3

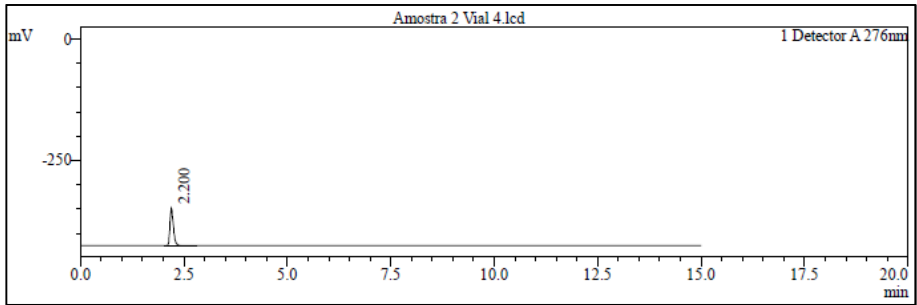


Figura 299: Amostra 2 Vial 4

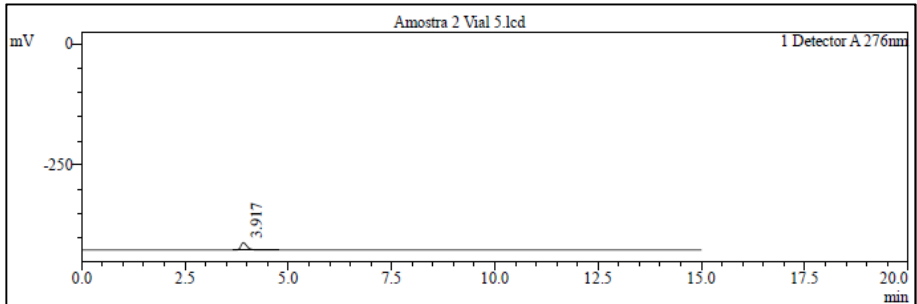


Figura 300: Amostra 2 Vial 5

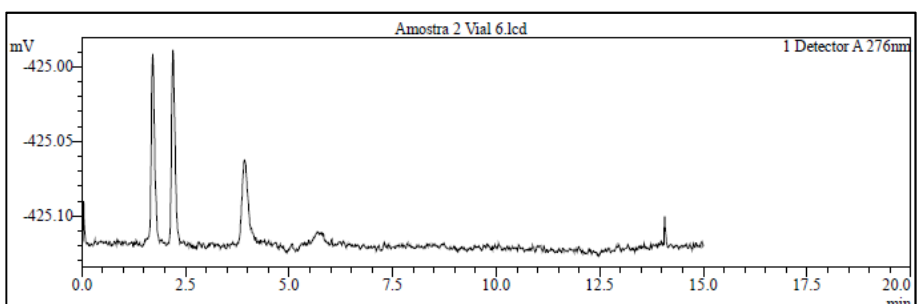


Figura 301: Amostra 2 Vial 6

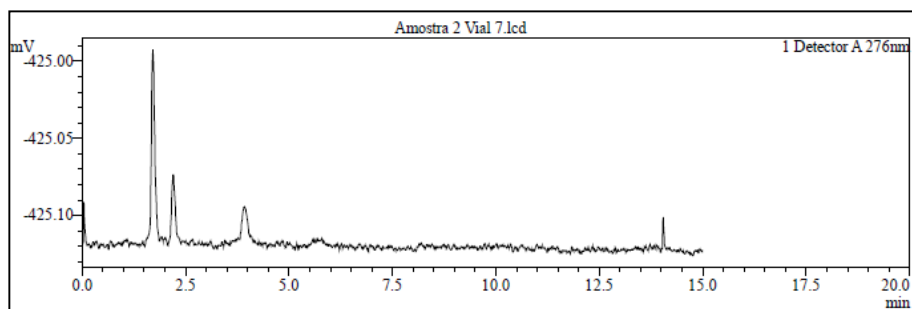


Figura 302: Amostra 2 Vial 7

## STRESS TESTING

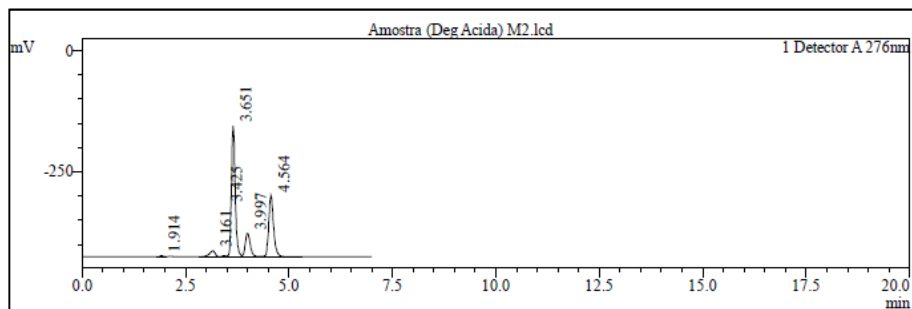


Figura 303: Amostra (Deg.Acida) M2

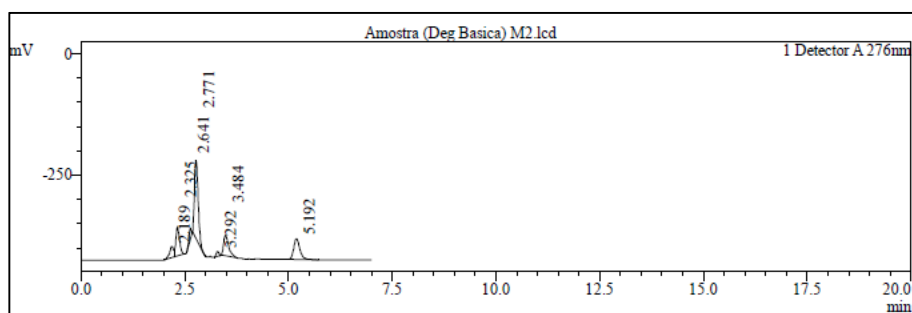


Figura 304: Amostra (Deg.Basica) M2

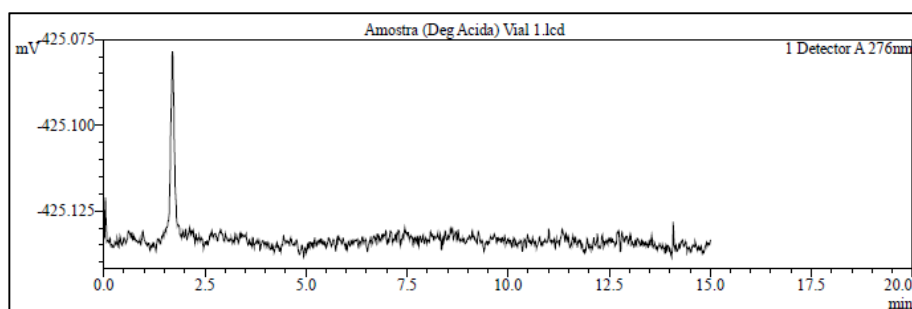


Figura 305: Amostra (Deg.Acida) Vial 1

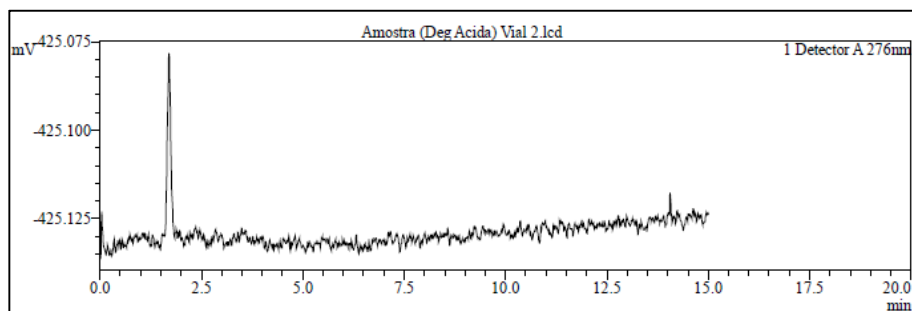


Figura 306: Amostra (Deg.Acida) Vial 2



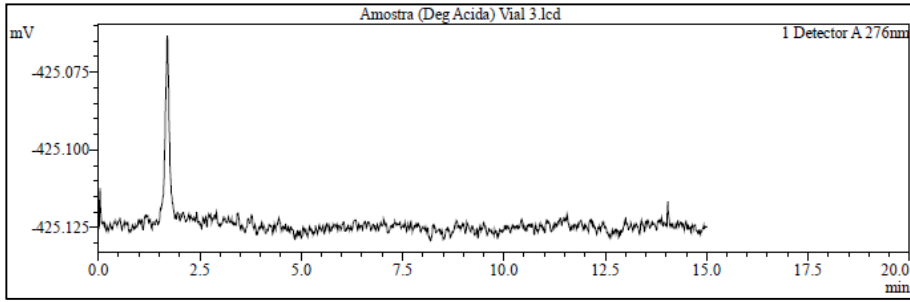


Figura 307: Amostra (Deg.Acida) Vial 3

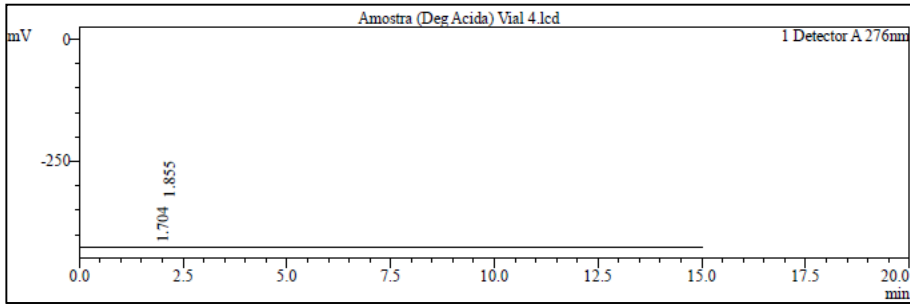


Figura 308: Amostra (Deg.Acida) Vial 4

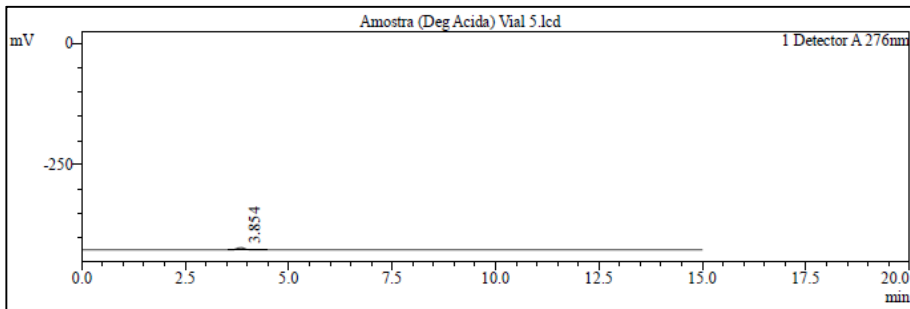


Figura 309: Amostra (Deg.Acida) Vial 5

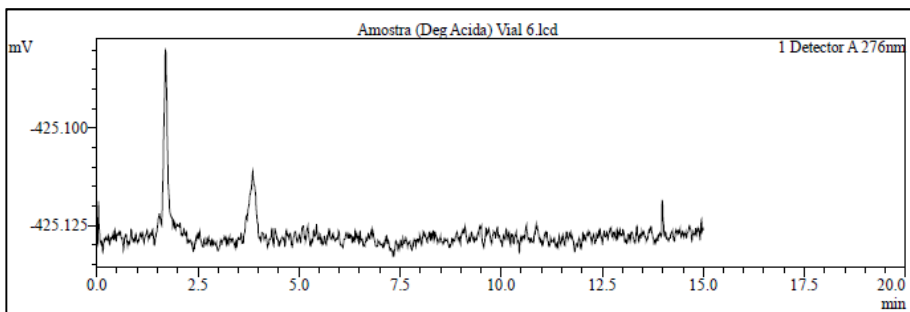


Figura 310: Amostra (Deg.Acida) Vial 6

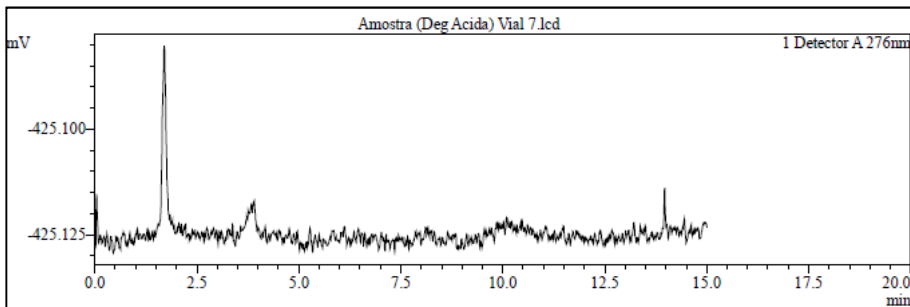


Figura 311: Amostra (Deg.Acida) Vial 7

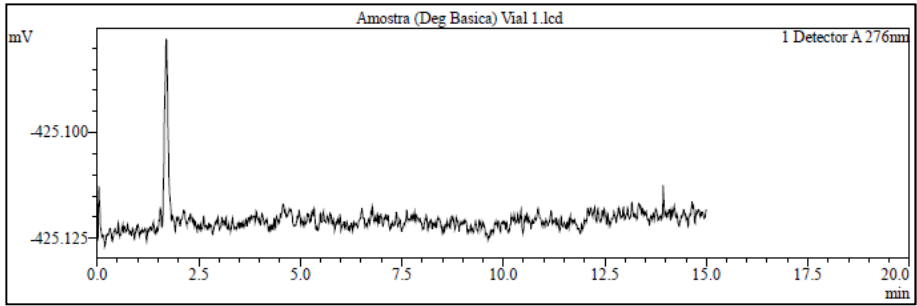


Figura 312: Amostra (Deg.Basica) Vial 1

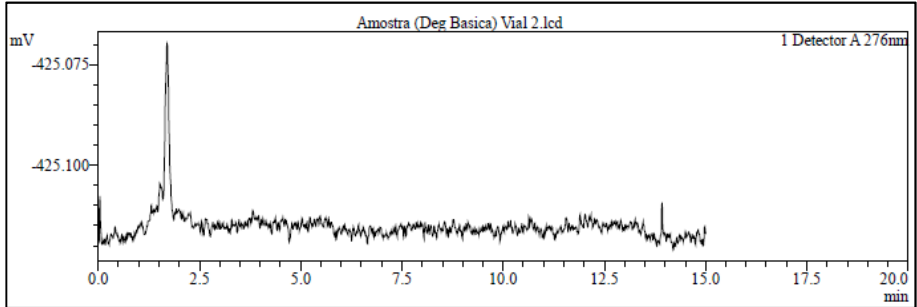


Figura 313: Amostra (Deg.Basica) Vial 2

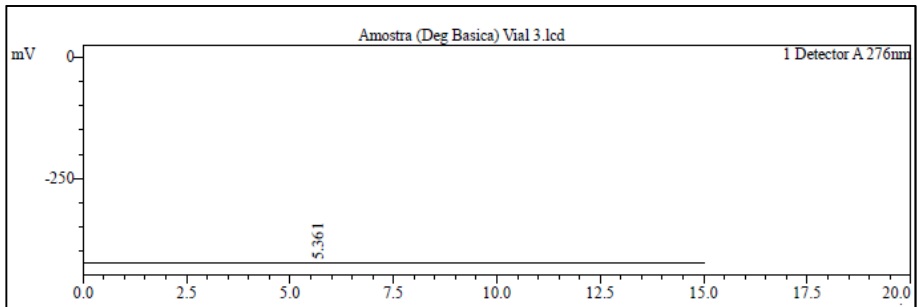


Figura 314: Amostra (Deg.Basica) Vial 3

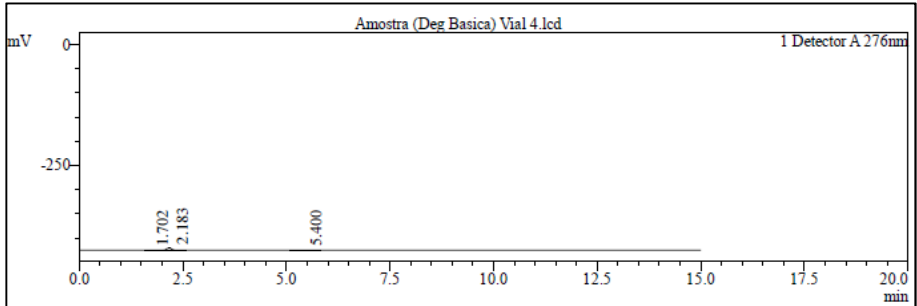


Figura 315: Amostra (Deg.Basica) Vial 4

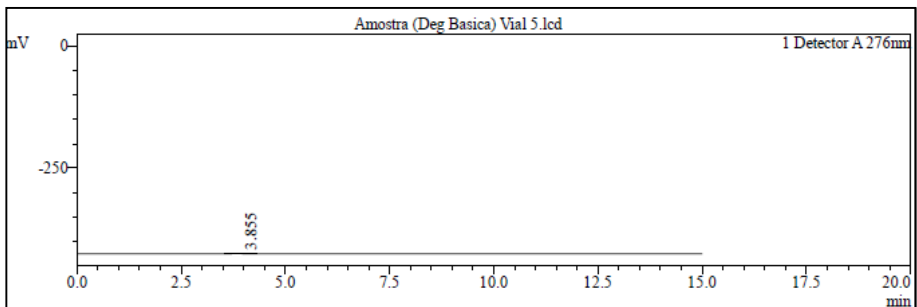


Figura 316: Amostra (Deg.Basica) Vial 5

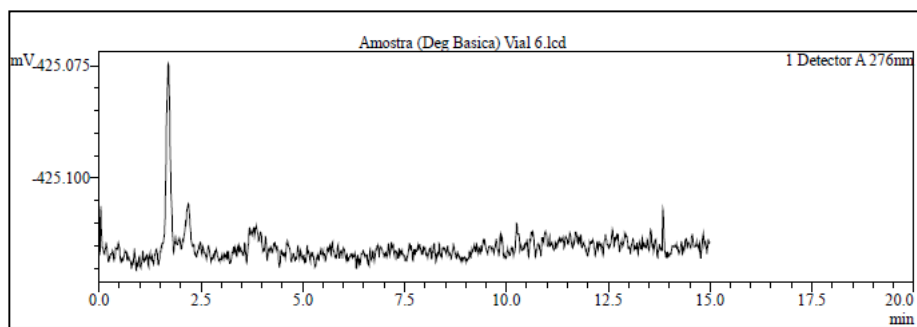


Figura 317: Amostra (Deg.Basica) Vial 6

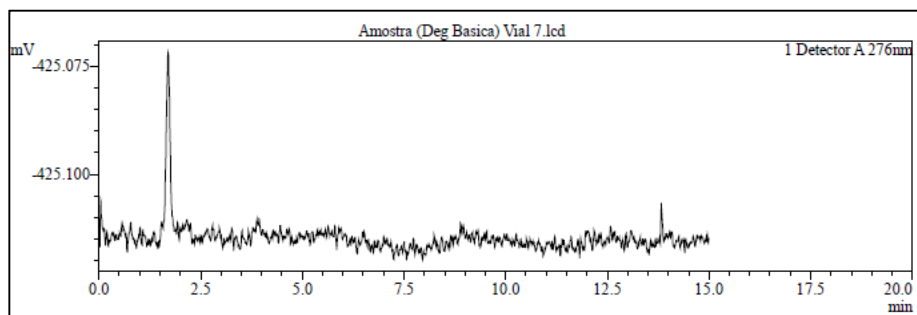


Figura 318: Amostra (Deg.Basica) Vial 7