



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ANNA CAROLINA TEIXEIRA MESQUITA

***AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA TURBIDIMÉTRICA PARA
QUANTIFICAÇÃO DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO
PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS***

Recife-PE
Novembro, 2016

ANNA CAROLINA TEIXEIRA MESQUITA

***AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA TURBIDIMÉTRICA PARA
QUANTIFICAÇÃO DE HEPARINA DE BAIXO PESO MOLECULAR UTILIZANDO
PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção de grau de mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador(a): Profa. Dra. Mônica Felts De La Rocca Soares

Recife-PE

Novembro, 2016

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mesquita, Anna Carolina Teixeira

Avaliação e otimização de metodologia turbidimétrica para quantificação de heparina de baixo peso molecular utilizando planejamento de experimentos / Anna Carolina Teixeira Mesquita. – Recife, 2016.

85 f.: il.

Orientadora: Mônica Felts de la Rocca Soares
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências

1. Heparina 2. Anticoagulantes (Medicina) 3. Trombose I. Soares, Mônica Felts de la Rocca I. (orient.) II. Título.

616.157

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-404



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Recife, 30 de novembro de 2016

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA** em 30 de novembro de 2016, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Mônica Felts de La Roca Soares
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira
(Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

*Dedico esta dissertação ao meu Deus:
pela capacitação, perseverança e a fé
mesmo no que está invisível aos meus
olhos; aos meus pais e família: pelo
exemplo de determinação, disciplina e
força; e ao meu marido pelo
companheirismo, incentivo, dedicação
e amor incondicional sempre.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela confiança, força, honra e capacidade que me foi concedida para realização deste trabalho e, principalmente, por sempre estar ao meu lado, me guiando pelas veredas mesmo quando o caminho parece ser tortuoso;

À minha querida e amada família (Aymar, Isany, Victor, Vanessa, Rafael, meu pequenino sobrinho Bernardo) pelo amor, carinho, compreensão, doação, força, união, ensinamentos e apoio em todos os momentos felizes e difíceis. Sou grata por ter aprendido e vivido o verdadeiro significado de família e por todos os valores puros que formaram o meu caráter.

Ao meu amado marido Igor Negreiros, pelo amor incondicional, companheirismo e incentivo nas noites e dias sem fim em frente aos livros e computador. Por ser exatamente aquilo que Deus preparou para mim. E claro à Gina e Fredinho por todas as demonstrações de carinho nos “lambeijos” diários.

À minha segunda querida família (família Negreiros) pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida desde os meus 14 anos de idade.

À Prof^a Dr^a Mônica Felts de La Rocca Soares e Prof Dr José Lamartine Soares Sobrinho por terem me recebido de portas abertas, pela confiança para o desenvolvimento deste trabalho e por todos os ensinamentos acadêmicos, sempre serei grata por terem me acolhido!

À Prof^a Dr^a Maria Fernanda Pimentel pela colaboração fundamental para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao mestrando Lucas Danda pelos auxílios em vários momentos desta longa trajetória, pelo apoio e colaboração, muito obrigado por tudo!

À mestre Janira Bezerra e mestranda Thaisa Cardoso pelos “desabafos”, companheirismo e esforço nas etapas de desenvolvimento deste trabalho;

A todos os amigos e colegas do grupo de pesquisa Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos – NCQMC pela amizade e convívio durante o período de mestrado;

À indústria farmacêutica CRISTÁLIA pela doação da enoxaparina sódica, matéria-prima fundamental para realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro durante o curso deste trabalho.

A todos os colegas e amigos que de forma indireta ou direta contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Dentre os métodos para quantificação de heparinas têm-se que o método turbidimétrico utiliza as condições de 37 °C, pH reacional de 4,4 e tempo de reação de 1 hora. Através da ferramenta estatística de planejamento de experimentos uma nova condição reacional foi obtida, garantindo o conhecimento da influência de cada fator sobre a metodologia.

No comprimento de 500nm foi realizado um planejamento fatorial com ponto central 2^3 . Em seguida foi realizada a expansão deste planejamento com a adição dos níveis axiais com o objetivo de obtenção da superfície ótima do estudo das variáveis investigadas neste trabalho. Na literatura, é possível também encontrar a utilização de um comprimento de onda menor (290nm) para quantificação de complexos contendo concentrações menores de HBPM. Assim como em 500nm, também foi realizado um estudo de avaliação da influência destes fatores para o comprimento de onda de 290nm, cuja abordagem foi através do planejamento fatorial com ponto central 2^3 e em seguida um 2^2 .

Os modelos construídos revelaram que mais de metade das variações (> 60%) puderam ser explicadas pelas variáveis investigadas nestes planejamentos em 500nm e 290nm. Então foram determinadas as novas condições para leituras obtidas em 500nm, sendo a temperatura em 37 °C, pH reacional de 5,4 e tempo de reação em 45 minutos. E para 290nm foram estabelecidas as condições experimentais de temperatura em 37°C, pH reacional de 5,4 e o tempo de reação de 20 minutos. Sobre a influência destes parâmetros na resposta do método foi comprovado que a temperatura reacional do meio, tanto para as respostas em 500nm, como em 290nm, não modifica a resposta. No entanto, o pH reacional para as leituras em 500nm produzem modificações consistentes no desempenho do método. O tempo de reação foi um ponto importante avaliado por este trabalho para ambos comprimentos de onda. Houve uma compreensão deste parâmetro frente as concentrações de HBPM que antes não tinha sido relatada em outro trabalho científico. Assim o tempo de reação para 500nm pôde ser modificado para 45 minutos. E para 290nm para 20 minutos.

Após esta etapa de planejamento de experimentos, o método turbidimétrico foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pelos guias do ICH para validação de procedimentos analíticos para a quantificação de diferentes concentrações de HBPM. A realização do estudo da curva de calibração demonstrou que o limite de quantificação para o comprimento de 500nm, com precisão e exatidão, foi até 20µg/mL. Sendo assim, a faixa de linearidade para o comprimento de 500nm foi de 20 – 200µg/mL e devido à presença de heterocedasticidade dos dados a equação de regressão obtida pelo método dos mínimos quadrados ponderados foi $y = -0,03421 + 0,00340C$. Já para o comprimento de 290nm a faixa de linearidade foi de 3 - 20µg/mL e a equação da regressão obtida pelo método dos mínimos quadrados ordinários foi $y = -0,00921 + 0,00583C$. A partir da aprovação do método para os demais parâmetros da validação o método foi robusto para variações de temperatura, preciso e exato para ambos comprimentos de onda.

Palavras-chave: Turbidimetria. Heparina de Baixo Peso Molecular. Planejamento de Experimentos.

ABSTRACT

Among the methods for the quantification of heparins have that the method turbidimétrico uses the conditions of 37° C, pH of reaction mass of 4,4 and reaction time of 1 hour. Through the statistical tool of design of experiments a new condition, a reaction mass was obtained, ensuring the knowledge of the influence of each factor on the methodology. At the length of 500nm was performed a factorial planning with central point 2³. Then was held the expansion of this planning with the addition of levels axial with the goal of obtaining the surface great the study of the variables investigated in this work. In the literature, it is possible to also find the use of a shorter wavelength (290nm) for the quantification of complexes containing lower concentrations of HBPM. As well as 500nm, there was also performed an assessment study of the influence of these factors to the wavelength of 290nm, whose approach has been through the factorial planning with central point 2³ and then one 2². The models constructed revealed that more than half of the variation (> 60%) could be explained by the variables investigated in these plans at 500nm and 290nm. Then there were certain new conditions to the readings obtained in 500nm, the temperature at 37°C , pH of reaction of 5,4 and reaction time in 45 minutes. And for 290nm were established the experimental conditions of temperature at 37°C, pH, reaction 5,4 and the reaction time of 20minutes. About the influence of these parameters on the response of the method has been proven that the temperature reaction of the medium, both for the answers at 500nm, as in 290nm, does not modify the response. However, the pH of reaction for the readings at 500nm to produce changes consistent the performance of the method. The reaction time was an important point evaluated by this work for both wavelengths. There was an understanding of this parameter front the concentrations of HBPM that had not previously been reported in other scientific work. Thus the reaction time to 500nm could be modified for 45minutes. And for 290nm for 20minutes. After this step of the planning of experiments, the method turbidimétrico was validated according to the parameters established by the guides ICH for validation of analytical procedures for the quantification of different concentrations of HBPM. The study of the calibration curve showed that the limit of quantification for the length of 500nm, with precision and accuracy, was up to 20µg/mL. Thus, the range of linearity for the length of 500nm was 20 – 200µg/mL, and due to the presence of heterocedasticidade of the data the regression equation obtained by the method of least squares weighted was $y = -0,03421 + 0,00340C$. As for the length of 290nm in the range of linearity was 3 - 20µg/mL and the regression equation obtained by the method of ols was $y = -0,00921 + 0,00583C$. with The approval of the method for the other parameters of the validation the method was robust to variations of temperature, precise and accurate for both wavelengths.

Keywords: Turbidimetry. Heparin Low Molecular Weight. Design of Experiments.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Trombose Venosa Profunda	15
3.1.1 Epidemiologia e etiologia da doença.....	15
3.1.2 Tratamento e atuais limitações	18
3.2 Heparina e heparina de baixo peso molecular	21
3.3 Alternativas promissoras de formulações contendo HBPM	25
3.4 Metodologia analítica para quantificação de hbpm: enfoque em metodologia turbidimétrica	27
3.5 Planejamento de experimentos: enfoque em metodologia de superfície de resposta (MSR)	30
3.6 Validação de métodos analíticos: enfoque em construção da curva de calibração da linearidade	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Experimental	35
4.1.1 Equipamentos.....	35
4.1.2 Matéria prima e reagentes	35
4.2 Avaliação do método	35
4.3 Planejamento de experimentos	37
4.3.1 Planejamento Fatorial e Metodologia de Superfície de Resposta para comprimento de onda em 500nm.....	37
4.3.2 Planejamento Fatorial para comprimento de onda em 290nm	39
4.4 Preparação das soluções padrão de HBPM no planejamento de experimentos	41
4.5 Validação de métodos analíticos	41
4.5.1 Linearidade.....	41
4.5.2 Especificidade.....	42
4.5.3 Precisão	42
4.5.4 Exatidão	43
4.5.5 Limites de detecção e quantificação	43
4.5.6 Robustez.....	44

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Planejamento experimental para respostas em 500nm	45
5.2	Validação analítica para respostas em 500nm	54
5.2.1	Estudo para construção da curva de calibração da Linearidade	54
5.2.2	Especificidade	61
5.2.3	Precisão	62
5.2.4	Limite de quantificação	62
5.2.5	Exatidão	63
5.3	Planejamento experimental para respostas em 290nm	64
5.4	Validação analítica para respostas em 290nm	68
5.4.1	Estudo para construção da curva de calibração da linearidade	68
5.4.2	Especificidade	73
5.4.3	Precisão	73
5.4.4	Limite de quantificação	74
5.4.5	Exatidão	74
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

A trombose venosa profunda é caracterizada pela obstrução total ou parcial das vias sanguíneas ocasionada pela produção desordenada de trombos. Esta é uma das doenças que mais atinge a população mundial, e o não tratamento contribui para o desenvolvimento da forma mais grave e fatal da doença, a embolia pulmonar (WADAJKAR et al., 2013).

Apesar da diversidade de fármacos utilizados no tratamento da trombose, a administração destes agentes geralmente é realizada pelas vias intravenosas, o que muitas vezes dificulta a aceitação da terapia pelo paciente, além dos inúmeros efeitos adversos e interações provocadas por esses agentes. A indicação terapêutica mais frequente são os agentes anticoagulantes pelos inúmeros benefícios, como por exemplo, a redução no desenvolvimento dos trombos e o risco de hemorragia reduzido (MOTLEKAR; YOUAN, 2006).

As heparinas são os agentes anticoagulantes mais utilizados. Em virtude desta importância muitos pesquisadores se debruçam na busca por diferentes formas de administração destes fármacos com o intuito principal de promover e facilitar a adesão do paciente ao tratamento (SCALA-BERTOLA et al., 2009; PALIWAL et al., 2012; PATEL; GUPTA; AHSAN, 2012; BAGRE; JAIN; JAIN, 2013; JOGALA; RACHAMALLA; AUKUNURU, 2015).

Estes agentes biológicos possuem uma estrutura química heterogênea constituída de muitas moléculas sulfatadas, que prejudicam a separação por cromatografia líquida e por este motivo análises de quantificação constituem um desafio. Nos compêndios oficiais é comum encontrar a possibilidade de avaliação dessas moléculas através da sua atividade biológica. No entanto, tais procedimentos enzimáticos são considerados demorados e de alto custo para a pesquisa. Sob este aspecto, a utilização de uma metodologia de baixo custo, simples e com rápida resposta para quantificação dessas estruturas em, por exemplo, estudos de dissolução constitui uma alternativa promissora (ROSITO; SILVA; RIBEIRO, 2001; MOTLEKAR; YOUAN, 2006; WADAJKAR et al., 2013; INGLE; AGARWAL, 2014).

A metodologia turbidimétrica tem sido muito utilizada para quantificação deste fármaco em diferentes formulações farmacêuticas. A facilidade de execução por ser simples e rápida são algumas vantagens deste método. No entanto, por se tratar de uma reação de complexação, a técnica sofre com a interferência de fatores que influenciam diretamente na resposta analítica, como o pH, a temperatura e o tempo do meio reacional da solução e o

tamanho das partículas dispersas. Para a quantificação das Heparinas de Baixo Peso Molecular (HBPM) a utilização do método turbidimétrico limita-se as mesmas condições reacionais de 37°C, pH de 4,4 e tempo de reação de 1 hora (JAVOT ET AL, 2009; SCALABERTOLA ET AL, 2009; OLIVEIRA et al., 2011; LOIRA - PASTORIZA ET AL, 2012; HALES ET AL., 2015; JOGALA; RACHAMALLA; AUKUNURU, 2015). Para todos esses autores citados anteriormente as amostras devem ser analisadas utilizando o comprimento de onda de 500nm. No entanto, Oliveira e colaboradores (2011) relataram a utilização de um comprimento de onda de 290nm para amostras com menor concentração de fármaco. Porém em nenhum destes estudos ficou descrito a influência dos fatores que podem de fato produzir mudanças substanciais na medida turbidimétrica para quantificação de HBPM. Alcançar, portanto, um conhecimento aprofundado destes fatores minimizando a influência das variáveis relevantes é um problema crítico desta metodologia que pode trazer à luz do conhecimento fatores que de fato influenciem a quantificação de HBPM. (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2006; SILVEIRA; TARLEY., 2008; OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011; LIMA et al., 2012; CURBETE; SALGADO, 2016).

A utilização de planejamento de experimentos para avaliação das variáveis é uma ferramenta que permite compreender os efeitos individuais e associados, que os fatores reacionais exercem sobre a resposta analítica de uma determinada pesquisa. Permite ainda que a qualidade das respostas seja determinada considerando os parâmetros críticos para a metodologia estudada. Assim, a incorporação desta abordagem associada à técnica turbidimétrica e interpretação dos resultados com definição dos erros experimentais permite estabelecer um grau de confiança associada à informação de que se dispõe.

A validação analítica de um método pode ser considerada como parte fundamental para demonstrar o desempenho, confiabilidade e consistência dos resultados obtidos a partir deste. Assim, com o objetivo de demonstrar que o método é adequado para a finalidade proposta os parâmetros de especificidade, limite de quantificação e detecção, exatidão, precisão, robustez e principalmente a linearidade precisam ser avaliados. No entanto, o estudo para a construção da curva de calibração ou linearidade configura como parte primordial para uma validação analítica, uma vez que quaisquer previsões realizadas a partir de um modelo cujas flutuações de respostas não estejam devidamente previstas podem afetar a capacidade preditiva do método e subestimar a regressão existente entre a concentração e a resposta do método. A compreensão acerca dos resíduos gerados pela regressão, bem como da presença ou ausência de homocedasticidade dos dados e de *outliers*, influentes ou não, são premissas que devem ser avaliadas e consideradas para o ajuste de um modelo de regressão

(PIMENTEL; NETO, 1996; NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; RAPOSO, 2016).

Neste contexto, este trabalho busca a compreensão da metodologia turbidimétrica para quantificação de HBPM através da implementação da ferramenta de planejamento de experimentos e a validação analítica dos resultados com o conhecimento acerca dos resíduos gerados pela análise da regressão, bem como as faixas de concentração pertinentes a cada comprimento de onda com o objetivo de facilitar e garantir que esta metodologia possa ser utilizada com segurança e eficiência para quantificação de HBPM em formulações farmacêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi realizar avaliar e otimizar através de ferramentas estatísticas de planejamento de experimentos a técnica turbidimétrica utilizada para quantificação de Heparina de Baixo Peso Molecular.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar as variáveis significantes para o método turbidimétrico utilizado como referência para quantificação de HBPM em formulações farmacêuticas;
- b) Otimizar a metodologia turbidimétrica aplicando a ferramenta de planejamento de experimentos e metodologia de superfície de resposta considerando os resultados obtidos nesta etapa do trabalho;
- c) Validar as novas condições obtidas da etapa de planejamento de experimentos para a construção de uma faixa de identificação de HBPM em formulações farmacêuticas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Trombose Venosa Profunda

3.1.1 Epidemiologia e etiologia da doença

Segundo a Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular (SBACV), a trombose venosa profunda (TVP) e o agravamento do quadro clínico para o desenvolvimento da embolia pulmonar (EP) são responsáveis por aproximadamente 1 milhão de óbitos. Devido à elevada incidência da TVP no Brasil e no Mundo, configura-se como uma importante questão de saúde pública, uma vez que anualmente a sua ocorrência causa mais mortes que a AIDS e outras doenças no mundo (ENGELHORN et al., 2002; SILVA, 2002; IBOPE, 2010; TOMA et al., 2013). O desconhecimento e muitas vezes a confusão em relação aos sintomas contribuem para que se caracterize como “doença silenciosa”. No Brasil, este quadro perfaz um índice de mortalidade que corresponde a aproximadamente um terço das doenças com maiores índices de mortalidade do país, ficando atrás somente do câncer e do infarto (IBOPE, 2010; TOMA et al., 2013).

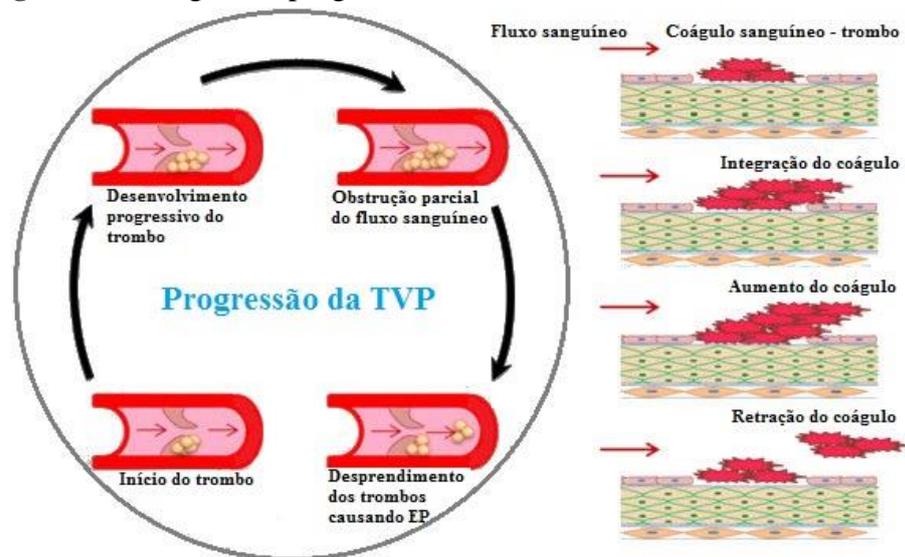
Basicamente, os fatores etiológicos que contribuem para o desenvolvimento da TVP estão associados tanto às complicações plasmáticas de causa hereditária, quanto às complicações vasculares adquiridas, para o caso de cirurgias, trauma, tabagismo e gravidez. O envelhecimento é outro importante fator que contribui para o desenvolvimento desta enfermidade. Estima-se que após os 40 anos de idade há um aumento exponencial da ocorrência desta enfermidade em detrimento do aumento da idade. A diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo devida à perda da propriedade de resistência da parede venosa pode estar associada ao aumento à predisposição de desenvolvimento da doença (<http://www.sbacv.com.br/index.php/imprensa/estimativas.html>).

Na história, os primeiros relatos desta patogenicidade ocorreram por volta de 1860, e foram descritas pelo médico patologista Virchow, que por sua vez ficou conhecida como a tríade de Virchow. Segundo este importante pesquisador, as principais causas envolvidas no desenvolvimento e progressão da trombose venosa são a lesão da parede do vaso sanguíneo, a

elevada coagulabilidade do sangue e estase venosa. Esta última é caracterizada pelo fluxo sanguíneo gradual ocasionado por longos períodos de imobilidade (MEIS; LEVY, 2007).

A doença é caracterizada pela formação de trombos no sistema venoso profundo que são formados por camadas de elementos figurados do sangue, como fibrina, plaquetas e fatores de coagulação. Como já citado anteriormente, o aparecimento de trombos pode estar diretamente associado à presença de lesão no vaso sanguíneo, como também pelo desencadeamento de algum processo patológico. O aumento de tamanho pode ocasionar obstrução total ou parcial em veias de pequeno e grande calibre, e ainda podem se desprender do local de origem alcançando outros órgãos e tecidos (Figura 1). A presença de trombos em órgãos como coração e cérebro, podem ser a causa de doenças como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, respectivamente (HAMERSCHLAK; ROSENFELD, 1996; MEIS; LEVY, 2007; WADAJKAR et al., 2013).

Figura 1 – Estágios da progressão da Trombose Venosa Profunda.



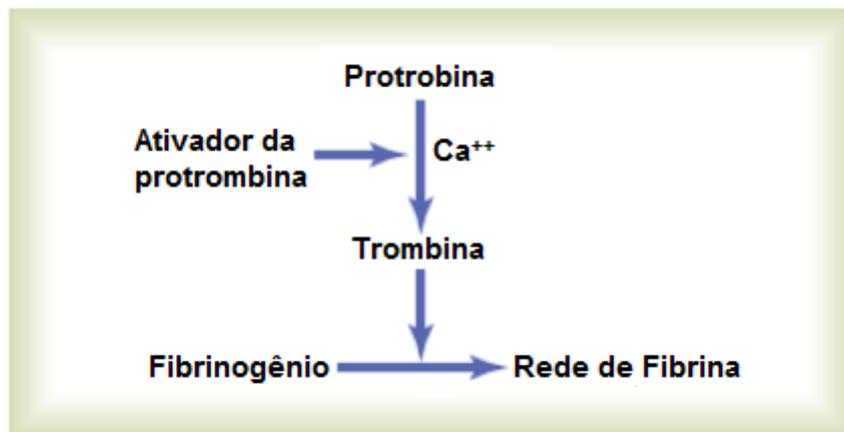
Fonte: Adaptado de WADAJKAR et al., 2013.

De forma geral, quando há a lesão na parede do vaso sanguíneo, o processo de cessação da perda de sangue é chamado de hemostasia. Para que este processo ocorra normalmente, o sangue deve estar e permanecer líquido nos vasos sanguíneos, e deve coagular rapidamente quando houver qualquer injúria. A hemostasia pode ser caracterizada pelo equilíbrio entre o sistema de pré-coagulação e o sistema anticoagulante. Na etapa de pré-coagulação há a formação do trombo intravascular responsável pela inibição de possíveis processos hemorrágicos. Já o sistema anticoagulante pode ser caracterizado pela liberação de proteínas de coagulação, considerados verdadeiros agentes anticoagulantes naturais. Estes são

responsáveis pela inativação dos fatores envolvidos na transformação da protrombina em trombina (formação do trombo), como também pelo sistema fibrinolítico, responsável pela destruição da fibrina e restauração da fluidez sanguínea. Assim, o complemento e equilíbrio desses dois sistemas, pré-coagulante e anticoagulante, são responsáveis pela disseminação da ativação da coagulação sanguínea desordenada (FERREIRA et al., 2010).

A trombina age como agonista plaquetário amplificando a ativação e a agregação plaquetária através da conversão de fibrinogênio à fibrina, como ilustrado na figura 2. Os anticoagulantes endógenos naturais intervêm limitando o processo de coagulação somente no sítio da lesão, a fim de evitar a formação de um coágulo que seja a causa da obstrução total ou parcial do vaso sanguíneo.

Figura 2 – Conversão da protrombina em trombina e da formação da rede de fibrina através da conversão do fibrinogênio



Fonte: Adaptado de <http://www.cardiol.br>.

Como já citado anteriormente, dentre os mecanismos destes agentes anticoagulantes endógenos naturais têm-se a Antitrombina (AT) (Tabela 1), glicoproteína de importância particular, pois tem a capacidade de bloquear de forma progressiva e irreversível, principalmente a atividade da trombina, e em menor proporção, os outros fatores de coagulação. De forma geral, a interação entre a AT e a trombina ocorre através da formação de um complexo enzimático, cuja ligação dá-se pelo sítio ativo da trombina e o centro reativo da AT (FERREIRA et al., 2010).

Tabela 1 – Mecanismos dos agentes antitrombóticos/anticoagulantes endógenos naturais.

Mecanismo de ação	Agentes Anticoagulantes/Antitrombóticos
Regulação da cascata de coagulação	Fator residual via inibidor Antitrombina/AT Proteína C/Proteína S
Modulação da reatividade de vasos sanguíneos e plaquetas	Prostaciclina Óxido nítrico
Inibição do recrutamento das plaquetas	Ecto-ADpase (CD39)
Remoção do coágulo de fibrina	Fibrinólise

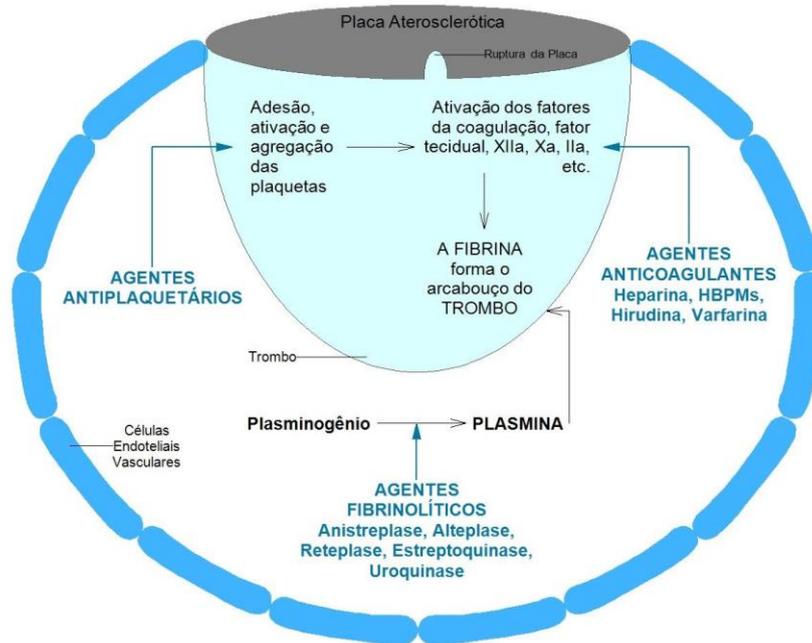
Fonte: O Autor.

A produção da AT é realizada no fígado. No entanto, a secreção pelas células hepáticas não acontece de forma rápida, enquanto que o processo de hemostasia, e consequentemente a produção do tampão hemostático, acontece em questão de segundos, contribuindo para um quadro clínico em que o excesso de fibrina (formação do trombo) nos vasos sanguíneos promove a oclusão parcial ou total destas vias, sendo a causa principal de doenças já mencionadas nesta seção. Então surge a necessidade de agentes que auxiliem este processo natural de coagulação ou inibam os fatores responsáveis pela ativação da coagulação (MEIS; LEVY, 2007).

3.1.2 Tratamento e atuais limitações

A SBACV e o IBOPE afirmam que o diagnóstico precoce da doença possibilita um tratamento terapêutico apropriado, eficaz, e ainda contribui para um quadro clínico de alívio da dor, diminuição dos problemas decorrentes da doença e de estabilidade hemodinâmica. Os objetivos do tratamento da TVP seriam a completa remoção dos trombos obstrutivos, a profilaxia sem uma subsequente recidiva e a prevenção de morte. Com este propósito, a associação medicamentosa adequada é uma estratégia fundamental para o sucesso da terapêutica (OKUHARA et al., 2014). As principais classes utilizadas agem em diferentes etapas do processo de coagulação, como ilustrado na figura 3.

Figura 3 – Diferentes locais de ação dos fármacos utilizados no tratamento da TVP.



Fonte: Adaptado de WADAJKAR et al., 2013.

De modo geral, os agentes antiplaquetários e anticoagulantes são utilizados tanto para o tratamento, quanto para a profilaxia da doença. Basicamente, os agentes antiplaquetários agem inibindo a adesão e agregação plaquetária durante a etapa de acúmulo destes elementos para a então formação do trombo. Já os agentes anticoagulantes têm por objetivo inibir os fatores de coagulação responsáveis pela conversão da protrombina em trombina. Os agentes fibrinolíticos ativam a conversão do plasminogênio para plasmina, estas têm a capacidade de dissolver as redes de fibrina (constituíntes do trombo). Estes agentes são geralmente utilizados em situações clínicas em que o trombo obstrutivo já está formado e instalado (BADIMON; VILAHUR, 2013). Na tabela 2, estão demonstrados as principais classes e fármacos utilizados para a profilaxia e tratamento da TVP.

Tabela 2 – Fármacos utilizados no tratamento da trombose venosa profunda.

Classes	Fármacos	Mecanismos de Ação	Via de Administração	Efeitos Adversos
Antiplaquetários	Ácido acetilsalicílico Triflusal	Inibem enzima ciclo-oxigenase/COX-1, e conseqüentemente a síntese de tromboxano A2/TXA2. Bloqueiam a agregação plaquetária induzida pela trombina.	Oral	Trombocitopenias severas
	Clopidogrel Ticlopidina Cangrelor Ticagrelor Prasugrel Elinogrel	Antagonistas de receptores ADP (agonistas responsáveis pelo recrutamento das plaquetas e disseminação dos trombos nas artérias).		
	Abciximab Eptifibatida Tirofiban Lamifiban	Antagonistas das glicoproteínas GPIIb/IIIa que são secretadas durante o processo de ativação das plaquetas.		
Anticoagulantes	Heparinas	Inibem a trombina e o fator de coagulação Xa.	Intravenosa	Sangramentos Hemorragias Segurança na gravidez
	Heparinas de Baixo Peso Molecular	Inibem o fator de coagulação Xa.		
Anticoagulantes Cumarínicos	Hirudinas Lepirudinas	Antagonistas diretos da trombina.	Intravenosa	Sangramentos Hemorragias Interações severas com alimentos e medicamentos contraindicados na gravidez
	Warfarina	Antagonistas diretos da vitamina K	Oral	
Fibrinolíticos	Estreptoquinase Ateplase Duteplase	É convertido em o ácido pirazinóico (APZ) por pirazinamidases.	Intravenoso	Hemorragias Febre Reações anafiláticas

Fonte: HIRSH; RASCHKE, 2004; IBOPE, 2010; PALIWAL et al., 2012; BADIMON; VILAHUR, 2013.

Dentre as classes apresentadas para o tratamento da TVP, a abordagem terapêutica mais indicada, frequente e de comprovada eficácia são os fármacos anticoagulantes porque mantêm o sangue num estado de hipocoabilidade, onde é possível observar uma parada no crescimento do trombo. Ainda são classificados como fármacos mais seguros, pois os riscos de hemorragia são menores em relação às outras classes também utilizadas para o tratamento da doença. Porém devido as contraindicações clínicas, interações medicamentosas indesejáveis, a necessidade de monitoramento laboratorial e de um profissional de saúde (para administração intravenosa) é observada uma insatisfatória adesão do paciente aos esquemas terapêuticos de tratamento. Assim as taxas de cura permanecem baixas contribuindo para que

a doença seja classificada como um problema de saúde pública mundial (PEREIRA et al., 2008; OKUHARA et al., 2014).

Apesar da diversidade de drogas utilizadas no tratamento da TVP e diante das dificuldades previamente expostas, pesquisadores têm convergido esforços na tentativa de desenvolver novos medicamentos, novas formas de administração dos fármacos já disponíveis comercialmente, com o objetivo de promover primordialmente a melhora da eficácia terapêutica (aceitação da terapia pelo paciente) e a biodisponibilidade destes medicamentos (JIAO et al., 2002; JAVOT et al., 2009; SCALA-BERTOLA et al., 2009; PATEL; GUPTA; AHSAN, 2012; BAGRE; JAIN; JAIN, 2013; JOGALA; RACHAMALLA; AUKUNURU, 2015).

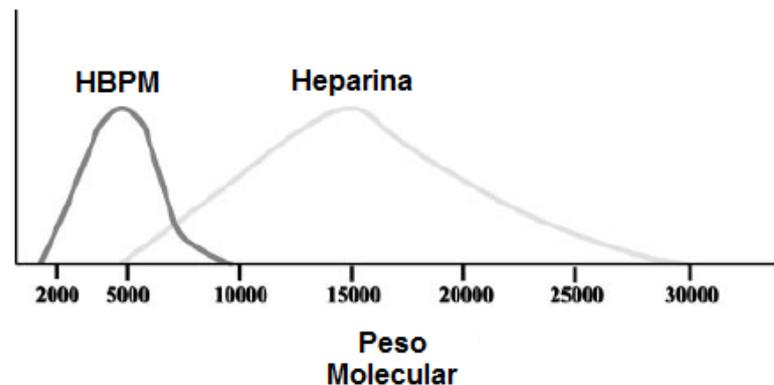
3.2 Heparina e heparina de baixo peso molecular

Dentre os anticoagulantes utilizados para o tratamento da TVP, as heparinas são sem sombra de dúvidas, os fármacos mais estudados, indicados, seguros e utilizados desde 1936 (HIRSH; RASCHKE, 2004). Estas têm papel importante na coagulação sanguínea devido às interações com proteínas solúveis do sangue e ainda com as células presentes na parede dos vasos sanguíneos. É um polissacarídeo de cadeia linear, sulfatado, pertencente à família dos Glicosaminoglicanos. São provenientes dos mastócitos presentes na mucosa intestinal suína ou pulmonar bovina. Por se tratar de uma molécula biológica, o peso molecular e consequentemente a estrutura química pode variar conforme o método de isolamento e extração (VACCARI et al., 2003; JUNQUEIRA et al., 2011).

Em relação as suas características físico-químicas, a heparina apresenta-se como uma molécula biológica heterogênea, composta de uma unidade estrutural básica predominante, um hexassacarídeo octasulfatado e unidades repetidas dos dissacarídeos, trissulfato e dissulfato, onde ligações glicosídicas ocorrem e formam polímeros de diferentes tamanhos. A presença dos grupamentos aniônicos, sulfato e carboxilato, caracterizam-na como estrutura de densidade de carga negativa mais alta entre todas as moléculas biológicas conhecidas (PATEL; GUPTA; AHSAN, 2012). Tais estruturas sulfatadas são responsáveis por sua atividade biológica. Além disso, dependendo do tecido do qual é extraída e dos diferentes processos de isolamento e obtenção da heparina, o peso molecular pode variar de 3kDa a

30kDa, como demonstrado na figura 4, o que influencia diretamente na atividade biológica do fármaco. Sabe-se também que quando submetidas a condições fisiológicas ocorre à desprotonação dos grupos éster e amida presentes na sua estrutura tornando-a mais susceptível a complexação iônica para grupamentos positivos, ocorrendo mais comumente para os sais de sódio, cálcio e a formação do sal de heparina (HAMERSCHLAK; ROSENFELD, 1996; VACCARI et al., 2003).

Figura 4 – Distribuição do peso molecular da Heparina e HBPM.



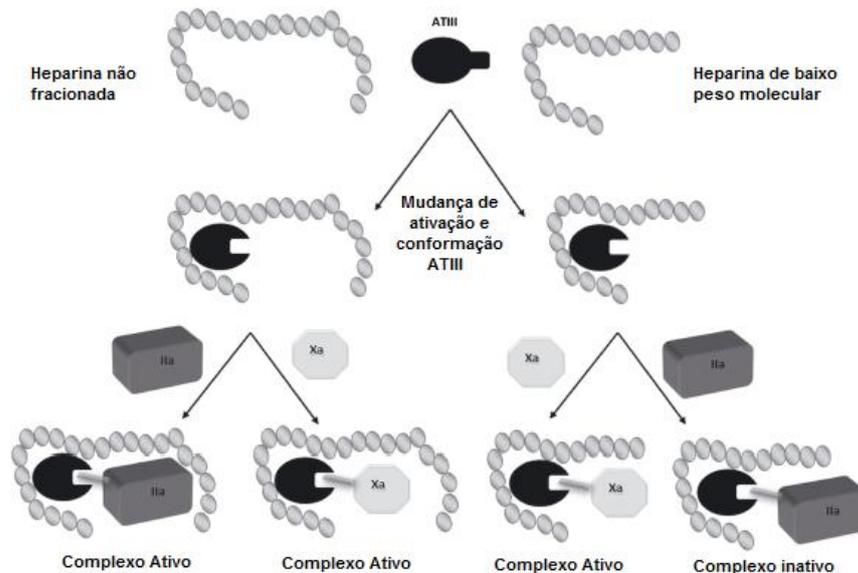
Fonte: Adaptado de HIRSH; RASCHKE, 2004.

A heparina é conhecida mundialmente por sua atividade anticoagulante, no entanto há também relatado na literatura, a atividade antitumoral (PALIWAL et al., 2012) e antiinflamatória (LUO et al., 2011). Dentre tais atividades, são ainda descritas na literatura a utilização da molécula para a interação com fatores de crescimento vascular endotelial e de fibroblastos, auxiliando na estabilização e promovendo a reestruturação do tecido injuriado por causa da capacidade de produzir fortes interações eletrostáticas (CHUNG; TAE; YUK, 2006; ZIA et al., 2016).

Em 1970, foram elucidados por Damus e colaboradores os possíveis mecanismos de interação entre a heparina e a AT. Este estudo concluiu que a interação entre a heparina e AT ocorre nos locais onde a lisina estava presente na molécula de AT produzindo uma alteração conformacional que acelera a inibição da trombina. Em 2012, Paliwal e colaboradores, elucidaram ilustrativamente, que enquanto o mecanismo de ação da Heparina Não Fracionada (HNF) consiste principalmente na formação de um complexo com a molécula de AT (potencializando a ação deste endógeno), que resulta em uma inibição indireta na produção de trombina, o mecanismo de ação da HBPM, no entanto, consiste na inibição do fator de coagulação que é responsável pela conversão da protrombina em trombina (formação do

trombo), ou seja, a HBPM tem ação em uma etapa anterior à formação da trombina. Na figura 5 é possível observar como se dá a formação do complexo HNF e HBPM com a AT (DAMUS; HICKS; ROSENBERG, 1973; PALIWAL et al., 2012).

Figura 5 – Mecanismo de ação da HNF e HBPM



Fonte: Adaptado de Paliwal et al., 2012.

Dentre as atividades farmacológicas da heparina, a anticoagulante é sem dúvida a que merece destaque. As primeiras avaliações sobre sua ação anticoagulante datam do ano de 1930, e investigações nos últimos anos têm ampliado o conhecimento das interações desse metabólito biológico, para a promoção do efeito anticoagulante. Entretanto, devido aos efeitos secundários, como a anticoagulação sistêmica, juntamente com a trombocitopenia induzida pela heparina, o tratamento tem sido contraindicado para pacientes que apresentem alto risco de hemorragias. Além disso, em relação às HNF, as HBPM são seguras para o uso na gravidez e apresentam-se como melhores opções também com relação aos parâmetros farmacocinéticos, pois devido à ligação às proteínas plasmáticas ser reduzida apresentam melhor biodisponibilidade intravenosa, tempo de meia-vida e esquema terapêutico. Nesse contexto tem sido relatada a utilização de heparinas de baixo peso molecular (HBPM) para a substituição no tratamento de doenças vasculares. A tabela 3 demonstra as principais diferenças quanto às características físico-químicas e biológicas das HBPM e HNF (PALIWAL et al., 2012).

Tabela 3 – Principais diferenças entre a HBPM e a HNF.

Fatores	HNF	HBPM
Peso Molecular	4 – 30kDa	4- 6kDa
Número de unidades de dissacarídeos	45	18
Biodisponibilidade intravenosa	30%	90-100%
Tempo de meia – vida	1h	3 – 4h
Posologia	I.V a cada 6h ou infusão contínua	I.V ou via subcutânea uma ou duas vezes ao dia
Atividade ATIII	+++	++
Atividade Fator Xa	+++	+++++
Xa:IIa	1 : 1	1,9 – 4,0 : 1
Risco de hemorragias	+++	+/-
Trombocitopenia induzida	++	+/-
Gravidez	+	++

Legenda: HNF (heparina não fracionada); HBPM (heparina de baixo peso molecular)

Fonte: Adaptado de PALIWAL et al., 2012.

Várias técnicas utilizadas nos processos de obtenção das heparinas de baixo peso molecular, contudo os diferentes procedimentos empregados influenciam nas características biológicas e no tipo de HBPM produzida. Por este motivo podem ser encontrados diferentes tipos de HBPM disponíveis comercialmente. No Brasil é possível encontrar as seguintes: Ardeparina sódica, Enoxaparina, Dalteparina sódica, Nadroparina cálcica. No entanto, dentre todas as alternativas comercializadas, a utilização da enoxaparina ainda continua sendo a mais indicada e segura, pois apresenta uma melhor atividade anticoagulante, sendo indicada com segurança para utilização na gravidez e por ainda possuir a protamina, substância capaz de reverter os efeitos anticoagulantes da heparina (TOMA et al., 2013). A tabela 4 demonstra as principais diferenças biológicas entre as HBPM comercializadas atualmente no Brasil.

Tabela 4 – HBPM comercializadas no Brasil.

HBPM	Nome Comercial	Fator Xa:IIa	Meia-vida (h)	Peso Molecular (kDa)	Fabricado
Ardeparina	Normiflo	2,0:1	1,2h – 3,3h	5,6 – 6,5	Wyeth – Ayerst
	Lovenox				Rhone-Poulenc Rorer
Enoxaparina	Clexane	2,7:1	4,5h	4,5	
	Endocris				Cristália
Dalteparina	Fragmin	2,0:1	2h – 4h	4,0 – 6,0	Kabi Pharmacia
Nadroparina	Fraxiparin	2,0:4,1	3,5h	4,0 – 6,0	Sanofi

Fonte: Adaptado de JUNQUEIRA et al., 2011.

Em virtude da importância das HBPM para o tratamento da TVP, diversos estudos têm apresentado o desenvolvimento de diferentes formulações, seja para administração oral, tópica ou ainda pulmonar deste fármaco, com o intuito principal de facilitar a adesão ao tratamento, visando o bem-estar do paciente através da otimização da via de administração,

sem qualquer prejuízo dos benefícios da utilização deste fármaco na terapêutica em questão (MOTLEKAR; YOUAN, 2006).

3.3 Alternativas promissoras de formulações contendo HBPM

A necessidade de novas ferramentas que auxiliem na luta contra a TVP tem forçado a busca por novas estratégias que melhorem principalmente a biodisponibilidade terapêutica dos agentes utilizados no tratamento. Até o momento, as terapias convencionais para o tratamento da TVP têm sido exploradas por diversas rotas de administração, oral, intravenosa, subcutânea e dérmica. Com relação à utilização das heparinas de baixo peso molecular, as vias de administração continuam sendo exclusivamente pelas vias endovenosas, seja subcutânea ou intravenosa. A busca por formulações que possam otimizar a dosagem terapêutica facilitando a posologia medicamentosa, assim como por novas vias de administração que venham a proporcionar ao paciente uma maior aceitabilidade do tratamento, figuram dentre os objetivos principais de estudo de diversos grupos de pesquisa (SCALA-BERTOLA et al., 2009; JUN-YONG et al., 2011; LOIRA-PASTORIZA et al., 2012; BAGRE; JAIN; JAIN, 2013; GAMBOA; LEONG, 2013).

Diante deste contexto, é possível ressaltar alguns trabalhos muito promissores contendo HBPM como alternativas para o tratamento da TVP. Em 2002, Jiao e colaboradores realizaram um trabalho no qual nanoestruturas contendo heparina não fracionada (HNF) foram administradas oralmente em coelhos, sendo realizada uma avaliação tanto *in vitro*, quanto *in vivo* dessas formulações. Uma maior sobrevivência dos animais tratados com a suspensão administrada pela via oral, e ainda uma melhor biodisponibilidade oral da HNF pôde ser observada, comprovando desta forma que as nanoestruturas desenvolvidas no estudo foram capazes de proteger o fármaco da degradação enzimática ao qual são susceptíveis. Também relataram que os animais tratados com o fármaco envolvido na malha polimérica de nanopartículas tiveram a atividade anticoagulante da HNF prolongada quando comparada com a administração pela via intravenosa (JIAO et al., 2002).

Resultados semelhantes, porém utilizando HBPM foram observados em 2006 por Hoffart e colaboradores, em que também confirmaram através de formulações para administração oral de heparina de baixo peso molecular (HBPM), que houve uma melhora na biodisponibilidade do fármaco, uma vez que realizaram o encapsulamento da molécula em

nanoestrutura que foi capaz de resistir e proteger o fármaco da ação de enzimas proteolíticas presentes no trato gastrointestinal (TGI), e ainda prolongar a atividade anticoagulante da molécula a tempos semelhantes aos observados na administração pela via intravenosa. Ainda comprovaram que o peso molecular da heparina utilizada para o estudo influencia diretamente na absorção molecular, e conseqüentemente na biodisponibilidade da estrutura, o que confirma mais uma vez a escolha da HBPM para o desenvolvimento dos estudos relatados posteriormente (HOFFART et al., 2006).

Em outro estudo, Scala-bertola e colaboradores (2009) também desenvolveram uma alternativa de formulação para via oral contendo outro tipo de HBPM. Neste caso, os pesquisadores mostraram que diferentes modificações na proporção dos polímeros catiônicos utilizados nos grânulos melhoraram a permeabilidade do fármaco, relatando então, um prolongamento da atividade anticoagulante da molécula (SCALA-BERTOLA et al., 2009). Em 2012, Loira-pastoriza e colaboradores, divulgaram resultados referentes ao desenvolvimento de formulação em gel para aplicação tópica contendo diferentes tipos de heparinas de baixo peso molecular, cujos resultados permitiram concluir que esta classe de agentes anticoagulantes poderia ser disponibilizada também para o tratamento local dos hematomas provenientes das injeções subcutâneas de HBPM (LOIRA-PASTORIZA et al., 2012).

Diante do exposto, os trabalhos citados anteriormente, e outros que serão citados posteriormente, tiveram em comum o desenvolvimento de formulações com diferentes propostas de administração de heparina não fracionada e heparina de baixo peso molecular. A busca por novas alternativas de entrega destes agentes anticoagulantes é objeto de grande interesse de estudo, visto que tais estruturas têm apresentado eficácia superior quando comparados ao uso do fármaco livre em formulações intravenosas.

Apesar da importância fundamental da HBPM para o tratamento da trombose e dos inúmeros estudos promissores, a análise qualitativa e quantitativa da macromolécula constitui um desafio devido à complexidade da sua estrutura química. Muitos esforços foram realizados na busca por técnicas que sejam seguras e eficazes na quantificação dessas biomacromoléculas, como discutiremos na seção a seguir. Sob este aspecto, várias metodologias, biológicas ou químicas, são propostas a fim de determinar quantitativamente e qualitativamente as heparinas em fluidos biológicos, como sangue, soluções injetáveis e ainda em outros tipos de formulações farmacêuticas (ROSITO et al., 2001; MOTLEKAR; YOUAN, 2006; INGLE; AGARWAL, 2014; WADAJKAR et al., 2013).

3.4 Metodologia analítica para quantificação de hbpm: enfoque em metodologia turbidimétrica

Em se tratando de um heteropolissacarídeo sulfatado, a análise qualitativa e quantitativa da macromolécula constitui um desafio devido à complexidade da sua estrutura química. Dentre as técnicas já relatadas na literatura para a análise quantitativa de HNF e HBPM em preparações farmacêuticas, observa-se que a utilização de metodologias convencionais, como a cromatografia líquida e espectrofotometria, são ineficazes para separá-las e identificá-las, pois não possuem grupamentos cromóforos para serem absorvidos ou são técnicas que possuem características muito específicas, laboriosas e de alto custo para o desenvolvimento da pesquisa (THANAWIROON; LINHARDT, 2003; MOURIER; VISKOV, 2004; ABBALLE et al., 2008; VOLPI; BUZZEGA, 2012; WANG et al., 2014).

Além disso, há uma busca constante por técnicas analíticas que utilizem cada vez menos materiais tóxicos, seja para o meio ambiente ou para o ser humano, e que ainda representem menor custo econômico quanto ao processo analítico, como exemplo, ao substituir ou encontrar alternativas que utilizem menores quantidades de solventes sem interferir na qualidade da resposta analítica. Desta forma, o desenvolvimento de novas metodologias, ou o aperfeiçoamento de metodologias já existentes são estratégias promissoras e importantes, com o intuito de estimular o setor da pesquisa científica na busca por novas alternativas de administração destes fármacos.

Sob este aspecto, a utilização de metodologias analíticas em diferentes formulações configura-se como passo importante e fundamental na condução a conclusões seguras na quantificação do analito. Contudo, não há na literatura muitos detalhes desses estudos para quantificação das HBPM nestas formulações propostas, embora para a maioria delas seja utilizada a técnica turbidimétrica. Assim, a técnica turbidimétrica apresenta-se como uma alternativa para a quantificação dessas biomacromoléculas e tem sido bastante explorada por ser uma metodologia com uma série de benefícios, como ser de fácil execução, rapidez, baixo custo, além de produzir menos resíduos tóxicos. Basicamente, a compreensão da técnica turbidimétrica consiste em uma relação linear entre a turbidez quantificada e a concentração do composto na amostra. Segundo Morais e colaboradores (2006), esta técnica trata da dispersão da radiação que pode ser observada através de uma solução contendo material disperso, onde a diminuição da intensidade de radiação incidente pode ser interpretada pelo

aumento de materiais dispersos em uma determinada solução (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2006).

Estudos relatam a utilização com sucesso desta metodologia para a quantificação de fármacos em diferentes formas farmacêuticas, como em Curbete et al., que relata a utilização da técnica para quantificação de ácido fusídico em preparações dermatológicas. Tem-se ainda Silveira e Tarley (2008), que utilizaram a técnica para determinação de um fármaco antidepressivo em comprimidos e Lima et al., (2012) utilizando a metodologia para quantificação de taninos em preparações de chá. Há inclusive para a quantificação de HBPM, como no caso dos estudos de Lamprecht; Eidi e colaboradores (2007), que desenvolvem formulações nanoestruturadas, respectivamente, contendo um tipo de HBPM e fazendo uso da técnica turbidimétrica para quantificação do fármaco (LAMPRECHT; UBRICH; MAINCENT, 2007; SILVEIRA; TARLEY., 2008; EIDI et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; YANG et al., 2011; LIMA et al., 2012; BAGRE; JAIN; JAIN, 2013; JOGALA; RACHAMALLA; AUKUNURU, 2015; CURBETE; SALGADO, 2016).

Basicamente, a metodologia turbidimétrica aplicada a HBPM trata-se de uma reação de precipitação estequiométrica, sob condições de pH ácido, entre os grupamentos sulfatados, carregados negativamente, presentes na molécula da HBPM, e os grupamentos de amônio quaternário, carregados positivamente, contidos na estrutura química do reagente utilizado na reação, o cloreto de cetilpiridínio, cuja reação produz um composto que apresenta características insolúveis em água e precipita, tornando o meio reacional turvo, cuja concentração de HBPM medida é diretamente proporcional a turbidez do meio (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2006; LOIRA - PASTORIZA et al., 2012; RAZA; ANSARI, 2015).

Entretanto, como já relatado por Morais (2006), devido à elevada sensibilidade da metodologia, fatores como o pH, a concentração dos reagentes, ordem de preparação da amostra, tempo de reação anterior e posterior às leituras e temperatura, precisam ser rigorosamente controlados a fim de que as respostas analíticas não sejam afetadas por variações nestes parâmetros. Na tabela 5 é possível observar alguns trabalhos que são encontrados na literatura utilizando a metodologia turbidimétrica e em alguns casos o método nefelométrico para quantificação de HBPM em diferentes tipos de formulações farmacêuticas. Tal fato é ocasionado pela semelhança existente entre as duas técnicas. Pois tratam de medidas que estão relacionadas com a dispersão da radiação incidente através de um material com partículas suspensas no meio. A diminuição da radiação incidente é característica da metodologia turbidimétrica e é mais indicada para soluções em que há uma quantidade maior de partículas suspensas no meio, já a nefelometria trata da medição da radiação que se

dispersa no meio. A partir destes trabalhos é possível demonstrar a importância da utilização deste método dada utilização ao longo dos anos. Ainda sobre esta tabela é possível notar que todos os trabalhos utilizam a metodologia com as mesmas condições reacionais. Assim, por se tratar de um método indireto sujeito a muitos interferentes a aplicação de uma ferramenta analítica de planejamento de experimentos perfaz uma abordagem interessante para avaliação dos parâmetros reacionais do método (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2006; OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011).

Na literatura é possível encontrar alguns estudos como o de Abballe e colaboradores (2008) que ressaltam a necessidade da obtenção de métodos que sejam passíveis de serem utilizados para quantificação de HBPM em formulações farmacêuticas. Este estudo também relata que foram utilizadas faixas de concentrações de 2,3 a 273 $\mu\text{g/mL}$ para quantificação de HBPM em comprimidos utilizando cromatografia de troca iônica acompanhada de detecção por condutividade suprimida. Em outro estudo, Oliveira; Marchetti, 2011 também relatam a utilização de faixas de concentração de 5 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (ABBALLE et al., 2008; OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011). Desta forma, as faixas de concentrações avaliadas por estes trabalhos contemplam toda a gama de concentrações avaliada no desenvolvimento deste trabalho de 20 a 200 $\mu\text{g/mL}$, e com isso também torna útil o desenvolvimento e estudo das análises turbidimétricas.

Tabela 5 – Trabalhos utilizando a técnica turbidimétrica para quantificação de HBPM.

Referências	HBPM	Formulação	Aplicação	Tempo	pH	Temperatura	λ (nm)	Quantificação
HOFFART ET AL, 2002	Tinzaparina	Nanoparticulas	Oral	1 hora	5,0	37°C	500	Nefelométrico
HOFFART ET AL, 2003	Tinzaparina	Microparticulas	Oral	1 hora	5,0	37°C	500	Nefelométrico
HOFFART ET AL, 2006	Tinzaparina	Nanoparticulas	Oral	1 hora	5,0	37°C	500	Nefelométrico
EIDI ET AL, 2010	Bemiparina	X	X	1 hora	5,2 5	37°C	500	Nefelométrico
OLIVEIRA et al., 2011	Enoxaparina	Microparticulas	Oral	1 hora	4,4	37°C	500 290	Turbidimétrico
SCALA-BERTOLA ET AL, 2009	Enoxaparina Bemiparina	Grânulos	Oral	1 hora	4,4	37°C	500	Turbidimétrico
LAMPRECHT; UBRICH; MAINCENT, 2007	Tinzaparina	Microparticulas	Oral	1 hora	4,4	37°C	500	Nefelométrico
LOIRA - PASTORIZA ET AL, 2012	Bemiparina Enoxaparina Nadroparina Tinzaparina	Nanoparticulas	Tópico	1 hora	5,0	37°C	500	Turbidimétrico
JAVOT ET AL, 2009	Nadroparina Tinzaparina	Microparticulas	Oral	1 hora	5,0	37°C	500	Turbidimétrico
Referências	HBPM	Formulação	Aplicação	Tempo	pH	Temperatura	λ (nm)	Quantificação
JOGALA; RACHAMALLA; AUKUNURU, 2015	Enoxaparina	Nanoparticulas	Subcutânea	1 hora	5,0	37°C	500	Turbidimétrico
HALES ET AL., 2015	Enoxaparina	Microparticulas	Oral	1 hora	5,0	37°C	500	Turbidimétrico

Fonte: O Autor.

3.5 Planejamento de experimentos: enfoque em metodologia de superfície de resposta (MSR)

A abordagem utilizando análise fatorial permite o desenvolvimento de modelos matemáticos que proporcionam uma melhor compreensão da relevância e significância estatística dos fatores estudados, bem como dos efeitos de interação entre tais fatores. Tal avaliação permite ainda que, a partir desta compreensão, se obtenha uma resposta final com qualidade, uma vez que para aquelas condições ao qual foi submetido, o melhor resultado foi encontrado. Pode-se afirmar que, primordialmente, o objetivo da ferramenta é obter o máximo de informação com o mínimo de experimentos, configurando-se como alternativa promissora e útil no emprego de estudos de pré-formulação, assim como no desenvolvimento e

aperfeiçoamento de metodologias analíticas de quantificação em diferentes formas farmacêuticas, além de representar economia de tempo e custo de processo (FURLANETTO et al., 2006; CHOPRA; PATIL; MOTWANI, 2007; CHRISTOPER et al., 2014; CABRAL et al., 2016; NALAWADE; GAJJAR, 2016).

Sendo assim, na década de 1930 alguns princípios básicos foram definidos, como a necessidade da execução aleatória dos experimentos, para que os efeitos desconhecidos das variáveis investigadas estejam diluídos no desenvolvimento desta avaliação, aumentando assim a qualidade do estudo, bem como a replicação dos experimentos, pois assim é possível observar as variações entre as repetições de um mesmo experimento, e então o erro experimental pode ser mensurado e minimizado de forma que não interfira nos resultados obtidos garantindo confiabilidade estatística. Outro ponto relevante é a necessidade de blocagem dos experimentos de forma a avaliar se as condições de interesse nos experimentos em cada bloco se comportam de forma homogênea, e ainda se a falta de homogeneidade interfere nos resultados (MONTGOMERY, 1991; RIBEIRO et al., 1999, FERREIRA et al., 2007).

Os objetivos principais do planejamento de experimentos incluem, inicialmente, o conhecimento prévio do objeto de estudo acerca do problema a ser solucionado. Em seguida, a escolha das variáveis e a definição dos níveis de estudo, geralmente definidos como nível superior e inferior, e então a etapa de escolha do tipo de planejamento experimental a ser desenvolvido. Após essas etapas e execução dos experimentos, a análise de dados deve garantir confiabilidade e validade das respostas obtidas com o planejamento de experimentos (MONTGOMERY, 2009).

Neste trabalho o tipo de planejamento experimental escolhido foi o fatorial com ponto central e o fatorial com composto central, pela possibilidade que estes modelos apresentam em realizar uma triagem completa dos fatores, como também avaliar as interações que possam existir entre estes fatores, e então mensurar quais são estatisticamente significativos e quais podem ser removidos do estudo. Além disto, esta abordagem fatorial também permite mensurar através da análise de variância, a falta de ajuste do modelo estudado pela repetição dos pontos centrais. No entanto, tal abordagem não permite identificar possíveis variações intermediárias em outros níveis. Assim, de forma complementar a etapa citada anteriormente, outra ferramenta experimental surge com o objetivo de permitir que outros níveis possam ser investigados a partir dos resultados já obtidos anteriormente, é a metodologia de superfície de resposta (MSR). Através desta técnica é possível expandir o modelo fatorial para avaliação de

novos níveis além dos investigados anteriormente (FERREIRA et al., 2007; TARLEY et al., 2009).

Otimizar refere-se a melhorar o desempenho de um sistema, um processo, ou um produto, com o objetivo de obter o máximo da resposta esperada (BAS; BOYACI, 2007; HE; ZHU; PARK, 2012). O aperfeiçoamento de um planejamento experimental através da MSR é uma abordagem adequada para avaliar a correspondência entre a resposta e as variáveis independentes em níveis antes não explorados, a fim de obter uma otimização simultânea destes níveis e alcançar um melhor desempenho do sistema. Este aperfeiçoamento baseia-se no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, de forma que este ajuste além de descrever o comportamento do conjunto de dados, possibilite previsões estatísticas do modelo (BEZERRA et al., 2008; TARLEY et al., 2009).

Segundo Box e Wilson (1951); Montgomery (2009), basicamente, o desenvolvimento de MSR corresponde a caminhar em duas etapas distintas, porém complementares, em que a primeira diz respeito à modelagem do planejamento, de forma a ajustar os modelos simples lineares às respostas obtidas nos planejamentos completos. A adequação deste modelo linear pode ser realizada utilizando a análise de variância, a fim de observar a falta de ajuste do modelo, que é descrito pela estimativa do erro e pela presença de curvatura. Uma vez identificada a presença de curvatura no modelo, isto significa que o modelo linear não descreve mais o estudo das variáveis. Então a segunda etapa corresponde ao deslocamento, em que a trajetória a ser traçada é sempre determinada pelo caminho de máxima inclinação do modelo matemático, ou seja, o caminho é determinado onde a resposta analítica apresenta maior variação. E assim, o modelo matemático, geralmente quadrático é obtido e a partir da interpretação dos coeficientes as novas condições experimentais podem ser utilizadas (BOX; WILSON, 1951; BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; MONTGOMERY, 2009).

Devido à versatilidade das técnicas citadas, é possível encontrar na literatura diferentes abordagens utilizando essas ferramentas estatísticas. Furlanetto e colaboradores (2006) utilizaram, com sucesso, o planejamento fatorial para observar as possíveis respostas no perfil de liberação produzidas a partir da variação de parâmetros como o tipo de diluente e a proporção deste em formulações de comprimidos. Mais recentemente, Nalawade e colaboradores (2016) também utilizaram a técnica no processo de desenvolvimento e otimização de microcápsulas contendo luteína, e ainda concluíram que a ferramenta produziu um guia para otimização da microencapsulação de moléculas bioativas para melhoria da biodisponibilidade e solubilidade dos polímeros utilizados na formulação. Outros estudos também relatam a utilização da ferramenta na melhoria de processos de extração e separação

de fármacos de matrizes biológicas (FURLANETTO et al., 2006; CHOPRA; PATIL; MOTWANI, 2007; CHRISTOPER et al., 2014; AKL et al., 2016; NALAWADE; GAJJAR, 2016).

Esta abordagem do planejamento fatorial associado à técnica turbidimétrica nunca foi realizada, portanto, no contexto do que já foi relatado, o objetivo deste trabalho foi selecionar e investigar as influências dos parâmetros operacionais e reacionais utilizando planejamento de experimentos e metodologia de superfície de resposta, como ferramenta para modelagem e análise dos dados seguido do procedimento de validação analítica visando o aperfeiçoamento da técnica turbidimétrica.

3.6 Validação de métodos analíticos: enfoque em construção da curva de calibração da linearidade

Como definido por Ribani e colaboradores (2004), a validação configura-se como um processo que se inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do desenvolvimento do estudo. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e demais compêndios internacionais de orientação ao desenvolvimento destes estudos, como a agência americana de regulamentação Food and Drug Administration (FDA), o objetivo primordial de uma validação é demonstrar que o método analítico possui confiabilidade para realizar determinações qualitativas e quantitativas de fármacos, ou outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

Diversos parâmetros (linearidade, precisão, exatidão, seletividade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez) devem ser considerados no processo de validação de uma metodologia analítica. Dentre estes o estudo para construção da curva de calibração ou estudo da linearidade do método pode ser considerado uma etapa fundamental para a calibração analítica. Geralmente esta etapa estabelece algum tipo de relação entre a variável dependente (concentração) e a variável independente (resposta instrumental) através de uma função matemática. A compreensão dos resultados obtidos nesta etapa é fundamental para garantir que não exista interpretações equivocadas de parâmetros como, por exemplo, o coeficiente de determinação (R^2) e a negligência de heterocedasticidade dos dados (PIMENTEL; NETO, 1996; NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002; RAPOSO, 2016).

O estudo a cerca do processo de construção da curva de calibração analítica de um método pode ser considerado parte fundamental para garantir confiabilidade dos dados provenientes da análise da regressão. Assim dentre os muitos métodos de regressão o método dos mínimos quadrados é o mais comum de ser utilizado por apresentar a curva que melhor minimiza a soma dos quadrados dos resíduos. O modelo de regressão de mínimos quadrados linear é mais comumente encontrado na literatura por ser simples e de fácil utilização. No entanto, quando a variância do sinal analítico ou resposta não é constante ao longo da faixa de calibração, mas sim proporcional à intensidade do sinal analítico, então o método dos mínimos quadrados ordinários não deve ser utilizado porque não terão variância mínima e podem acarretar em interpretações equivocadas de amostras desconhecidas. Assim, uma vez identificado que as variâncias não são constantes, ou seja o modelo for diagnosticado como heterocedástico, o princípio da ponderação pode ser aplicado com o intuito de tornar menos evidentes as variâncias dos pontos de maior variância em relação aos demais pontos (PIMENTEL; NETO, 1996; NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Em virtude da importância de uma validação analítica em que todas as suposições de homocedasticidade dos resíduos, bem como da ausência de outliers sejam válidas esta abordagem com o método turbidimétrico para quantificação de HBPM ainda não foi relatada na literatura. Assim, o objetivo deste trabalho foi também validar as condições reacionais obtidas dos planejamentos para inicialmente em 500nm, pois nesta faixa de leitura não existem outras substâncias absorvendo pelo fenômeno da espectrometria. E posteriormente validar também para 290nm, com o objetivo de ampliar a curva de linearidade para atender concentrações que não apresentam precisão e exatidão em 500nm, mas em 290nm são aprovadas nesses quesitos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimental

4.1.1 Equipamentos

Foram utilizados espectrofotômetro UV equipado com células de quartzo de 10mm para todas as medidas de absorção. Agitador de tubos (vórtex) para homogeneização da solução de estudo (Marconi MA-162). Banho maria controlado termostaticamente (HAAKE DC10).

4.1.2 Matéria prima e reagentes

A heparina de baixo peso molecular (HBPM)) utilizada foi a ENOXAPARINA SÓDICA (Lote: 0488, CRISTÁLIA[®]). O cloreto de cetilpiridínio ($C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$ Lote: 5348) e ácido acético glacial (CH_3COOH) foram adquiridos da SIGMA ALDRICH[®]. As substâncias cloreto de sódio (NaCl) e Hidróxido de sódio (NaOH) da marca VETEC[®]. A água ultrapura utilizada para os experimentos foi obtida do sistema MILLI-Q (Smart[®], Ultra pure water system, Heal force[®]).

4.2 Avaliação do método

Neste estudo, foram avaliados os parâmetros operacionais e reacionais do método turbidimétrico. Com base nos artigos que utilizaram tal metodologia para quantificação de HBPM, as análises eram realizadas adicionando a um tubo de ensaio, 0,5mL de uma solução aquosa contendo determinada concentração de HBPM, 0,5mL de solução tampão acetato 1 mol L⁻¹ pH 4,4 e 2mL de solução aquosa de cloreto de cetilpiridínio 0,1% (m/v) e NaCl

0,94% (m/v) como demonstrado na tabela 6. Em seguida, a solução era levada para homogeneização no vórtex e então ao aquecimento a 37°C durante 1 hora. A leitura é realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 290nm e 500nm (OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011).

Tabela 6 – Condições reacionais turbidimétricas atuais (sem aperfeiçoamento).

Resposta analítica	pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)
500nm	4,4	37°C	1h
290nm	4,4	37°C	1h

Fonte: O Autor.

Segundo Morais e colaboradores (2006), a medida turbidimétrica consiste numa diminuição da intensidade de radiação devido à presença de mais partículas suspensas numa determinada solução. Os autores ainda relatam que, devido o instrumento analítico utilizado para realizar as medições ser o espectrofotômetro, a escolha do comprimento de onda deve levar em consideração uma região que não ocorra o fenômeno da absorbância de outras substâncias que não estejam complexadas. Neste sentido, as etapas posteriores de planejamento envolveram a escolha primordialmente do comprimento de onda de 500nm, e num segundo momento o de 290nm (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2006; OLIVEIRA; MARCHETTI, 2011).

Com relação à metodologia previamente citada, observou-se que não existem estudos prévios que avaliem a influência dos parâmetros físicos (temperatura e tempo de reação) e químicos (pH) do método sobre a resposta analítica utilizando ferramenta de planejamento de experimentos. Neste sentido, dada à importância e a utilização da metodologia para quantificação de HBPM em diferentes formulações, é primordial avaliar as possíveis interações entre os reagentes e os fatores físicos do método, interações estas, que podem comprometer a autenticidade das análises, de forma a maximizar ou minimizar as respostas obtidas. A escolha dos comportamentos obtidos nos planejamentos experimentais acerca dos parâmetros físicos (tempo e temperatura de reação) da metodologia turbidimétrica, terá como base de escolha a facilidade na operacionalização do processo analítico.

4.3 Planejamento de experimentos

4.3.1 Planejamento Fatorial e Metodologia de Superfície de Resposta para comprimento de onda em 500nm

Para realização da triagem das variáveis, com o objetivo de identificar variáveis estatisticamente relevantes, foram avaliadas as influências dos parâmetros analíticos através do planejamento fatorial com composto central (DDC) seguido de metodologia estatística de superfície de resposta (MSR). Inicialmente a matriz de planejamento foi desenvolvida contendo dois níveis de avaliação, superior (+1) e inferior (-1), e os pontos centrais (0). A matriz compreendeu a realização de 22 experimentos. As condições para este primeiro planejamento estão dispostas na tabela 7, que ilustra os fatores e os níveis utilizados para cada fator no planejamento.

Tabela 7 – Faixas de temperatura, pH e tempo de reação utilizadas no planejamento de experimentos 2^3 com ponto central em 500nm.

Temperatura (°C)	Ph	Tempo Reação (min)
35°C (-1)	3,4 (-1)	15 min (-1)
40°C (0)	4,4 (0)	30 min (0)
45°C (+1)	5,4 (+1)	45 min (+1)

Fonte: O Autor.

A partir das respostas obtidas na etapa de modelagem do planejamento experimental, foram definidos seis novos níveis diferentes para cada variável, com o objetivo de expandir a matriz anterior visando à construção da superfície de resposta através do planejamento ou desenho composto central (DDC). As condições experimentais estão dispostas na tabela 8 e podem ser observadas visualmente na figura 6. A matriz do delineamento fatorial completo contendo pontos axiais pode ser observada na tabela 9, onde 16 experimentos foram realizados nos níveis +1 e -1, com 4 repetições dos pontos centrais, a fim de estimar o erro experimental, e mais 12 experimentos nos pontos axiais (níveis α), totalizando 32 experimentos.

Os pontos axiais são adicionados ao planejamento de forma a garantir que em qualquer direção máxima (+1) ou mínima (-1), a partir do ponto central (0), seja possível

obter a máxima resposta analítica do método. Assim, o ponto axial foi definido através da seguinte equação:

$$\alpha = (n_f)^{1/4}$$

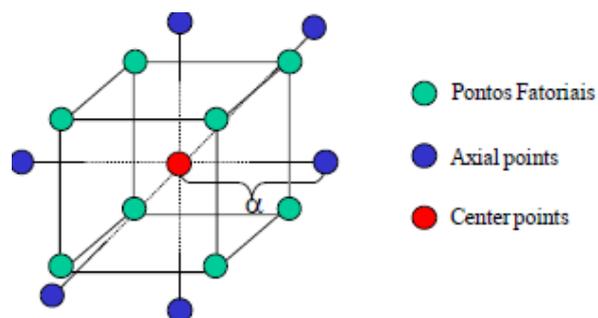
Onde n_f é o número de pontos utilizados no planejamento experimental 2^3 , sendo assim o valor de α foi de $\pm 1,68$. A variável dependente utilizada no estudo foi a resposta analítica turbidimétrica em unidades de absorbância (U.A.) para o comprimento de onda em 500nm. A análise estatística dos dados foi realizada por ANOVA e os dados foram usados para calcular superfícies de resposta com auxílio dos programas Microsoft Excel e STATISTICA 10.0 (StatSoft, EUA). Todas as análises foram realizadas de forma aleatória, a fim de minimizar os efeitos de variabilidade nas respostas ocasionados por erros sistemáticos experimentais.

Tabela 8 – Faixas de temperatura, pH e tempo de reação utilizadas no planejamento de experimentos contendo pontos axiais (níveis α) em 500nm.

Temperatura (°C)	pH	Tempo Reação (min)
32°C (α)	2,7 (α)	4,8 min (α)
35°C	3,4	15 min
40°C	4,4	30 min
45°C	5,4	45 min
48°C (α)	6,0 (α)	55 min (α)

Fonte: O Autor.

Figura 6 – Representação gráfica do plano fatorial com a presença do composto central e pontos axiais (níveis α).



Fonte: Adaptado de MONTGOMERY, 1991.

Tabela 9 – Matriz do planejamento experimental para a avaliação da resposta analítica em 500nm do método de doseamento de HBPM por turbidimetria.

Experimento	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	Temperatura	pH	Tempo Reação	Temperatura	pH	Tempo Reação
01	-1	-1	-1	35°C	3,4	15 minutos
02	-1	-1	+1	35°C	3,4	45 minutos
03	-1	+1	-1	35°C	5,4	15 minutos
04	-1	+1	+1	35°C	5,4	45 minutos
05	+1	-1	-1	45°C	3,4	15 minutos
06	+1	-1	+1	45°C	3,4	45 minutos
07	+1	+1	-1	45°C	5,4	15 minutos
08	+1	+1	+1	45°C	5,4	45 minutos
09	-α	0	0	32°C	4,4	30 minutos
10	+α	0	0	48°C	4,4	30 minutos
11	0	-α	0	40°C	2,7	30 minutos
12	0	+α	0	40°C	6,0	30 minutos
13	0	0	-α	40°C	4,4	4,8 minutos
14	0	0	+α	40°C	4,4	4,8 minutos
15	0	0	0	40°C	4,4	30 minutos
16	0	0	0	40°C	4,4	30 minutos
17	-1	-1	-1	35°C	3,4	15 minutos
18	-1	-1	+1	35°C	3,4	45 minutos
19	-1	+1	-1	35°C	5,4	15 minutos
20	-1	+1	+1	35°C	5,4	45 minutos
21	+1	-1	-1	45°C	3,4	15 minutos
22	+1	-1	+1	45°C	3,4	45 minutos
23	+1	+1	-1	45°C	5,4	15 minutos
24	+1	+1	+1	45°C	5,4	45 minutos
25	-α	0	0	32°C	4,4	30 minutos
26	+α	0	0	48°C	4,4	30 minutos
27	0	-α	0	40°C	2,7	30 minutos
28	0	+α	0	40°C	6,0	30 minutos
28	0	0	-α	40°C	4,4	4,8 minutos
30	0	0	+α	40°C	4,4	4,8 minutos
31	0	0	0	40°C	4,4	30 minutos
32	0	0	0	40°C	4,4	30 minutos

Fonte: O Autor

4.3.2 Planejamento Fatorial para comprimento de onda em 290nm

Num segundo momento, assim como para 500nm, um novo planejamento experimental com pontos centrais foi desenvolvido contendo dois níveis de avaliação, sendo (-1) e (+1) e o ponto central (0). As condições para o desenvolvimento deste planejamento estão dispostas na tabela 10.

Tabela 10 – Faixas de temperatura, pH e tempo reacionais utilizadas no planejamento de experimentos 2^3 para respostas em 290nm.

Temperatura (°C)	pH	Tempo Reação (min)
35°C (-1)	3,4 (-1)	15 min (-1)
40°C (0)	4,4 (0)	30 min (0)
45°C (+1)	5,4 (+1)	45 min (+1)

Fonte: O Autor.

A partir dos resultados obtidos na triagem das variáveis para este comprimento de onda, foi realizado um novo DCC, cujos níveis das variáveis estão dispostos na tabela 11. A matriz desenvolvida para este planejamento fatorial está demonstrada na tabela 12, que compreendeu a realização de 14 experimentos. Os dados obtidos do planejamento foram realizados por ANOVA e STATISTICA 10.0 (StatSoft, EUA).

Tabela 11 – Faixas de temperatura e tempo de reação utilizadas no planejamento de experimentos 2^2 para respostas em 290nm.

Temperatura (°C)	Tempo Reação (min)
25°C (-1)	5 min (-1)
37°C (0)	10 min (0)
40°C (+1)	20 min (+1)

Fonte: O Autor.

Tabela 12 – Matriz do planejamento experimental para a avaliação da resposta analítica em 290nm do método de doseamento de HBPM por turbidimetria.

Experimento	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	Temperatura	Tempo Reação	Temperatura	Tempo Reação
01	-1	-1	25°C	5 minutos
02	+1	-1	40°C	5 minutos
03	-1	+1	25°C	20 minutos
04	+1	+1	40°C	20 minutos
05	0	0	37°C	10 minutos
06	0	0	37°C	10 minutos
07	0	0	37°C	10 minutos
08	-1	-1	25°C	5 minutos
Experimento	Variáveis Decodificadas		Variáveis Codificadas	
	Temperatura	Tempo Reação	Experimento	Temperatura
09	+1	-1	40°C	5 minutos
10	-1	+1	25°C	20 minutos
11	+1	+1	40°C	20 minutos
12	0	0	37°C	10 minutos
13	0	0	37°C	10 minutos
14	0	0	37°C	10 minutos

Fonte: O Autor.

4.4 Preparação das soluções padrão de HBPM no planejamento de experimentos

As soluções padrão foram preparadas a partir de diluições de uma solução aquosa estoque da enoxaparina (1 mg/mL), e para obtenção de novas concentrações, esta mesma solução estoque foi submetida a novas diluições cujas concentrações para 500 nm foram de 100 mcg/mL, e para as respostas em 290 nm de 20 mcg/mL.

4.5 Validação de métodos analíticos

Após a determinação dos novos parâmetros analíticos através do planejamento experimental foi realizada a validação analítica do método de acordo com as orientações do International Conference on Harmonization (ICH) e ANVISA para avaliação de vários parâmetros que incluem linearidade, especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez (ICH, 2005; ANVISA, 2016). Os resultados obtidos nesta etapa de validação estarão dispostos em duas partes na seção posterior, onde a primeira foi realizada conforme os dados obtidos do planejamento experimental em 500nm, e a segunda parte os dados de 290nm. Porém, os parâmetros de validação serão os mesmos para ambos os planejamentos.

4.5.1 Linearidade

A linearidade do método foi analisada através de três curvas de solução contendo enoxaparina em níveis de concentração de 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/mL para as respostas em 500nm e em níveis de concentração de 1, 3, 5, 7,5, 10, 12, 15 e 20 µg/mL para as respostas em 290nm. O estudo de linearidade compreendeu a análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para as leituras em 290nm e para as leituras em 500nm foi utilizado o método dos mínimos quadrados ponderados. Para ambas as construções das curvas de calibração foram realizadas inspeções visuais dos dados experimentais com o objetivo de verificar se os dados se distribuem linearmente ao longo da

curva e também do diagrama de resíduos. Foram realizados também testes de significância estatística a cerca dos resíduos produzidos pela regressão, como o diagnóstico de homocedasticidade, com o intuito de avaliar se as variâncias produzidas por cada concentração foram semelhantes, ANOVA, testes para verificação da normalidade dos resíduos e diagnósticos da presença de outliers. Além destas avaliações também foram inclusos para o estudo da linearidade os parâmetros de precisão, expresso através do DPR% e exatidão CV% de cada concentração para a construção da curva de calibração.

4.5.2 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada a partir da obtenção de uma solução concentrada de enoxaparina com contaminação por uma solução de polímero Eudragit PO, cujas características são catiônicas e como excipiente pode produzir alguma interferência na detecção do fármaco em futuras preparações farmacêuticas. Assim, foram realizadas as preparações das soluções concentradas de enoxaparina com a presença do contaminante e sem a presença deste. As concentrações foram determinadas a partir do ponto médio do estudo de linearidade, sendo realizadas a 10 µg/mL para as leituras em 290nm e 100µg/mL para as leituras em 500nm. A especificidade foi avaliada quantitativamente através de tratamento estatístico das amostras contaminadas e sem contaminação por análise de variância, CV% e DPR%.

4.5.3 Precisão

A precisão do método foi determinada intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Foram utilizados três diferentes níveis de concentrações de enoxaparina para as leituras em 290nm, sendo de 3, 10 e 20µg/mL. E para as leituras em 500nm concentrações de 20, 100 e 200µg/mL. A repetibilidade do método foi realizada em um mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi realizada em dois dias diferentes por dois analistas diferentes. Tanto os dados obtidos da análise da repetibilidade, como da precisão intermediária foram expressos através de desvio padrão relativo (DPR%).

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas através do ANOVA e teste F. As análises foram todas realizadas em triplicatas.

4.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pela recuperação de uma quantidade conhecida de concentração de enoxaparina que pôde ser quantificada pelo método turbidimétrico. A análise deste parâmetro foi realizada conforme descrito na seção 4.2 adicionada das novas condições experimentais encontradas nos resultados dos planejamentos experimentais para leituras em 290nm e 500nm. Assim como, para a precisão, também foram utilizadas as mesmas concentrações de enoxaparina para a exatidão em 290nm e 500nm. O desvio padrão relativo foi empregado para avaliar a exatidão do método pela equação abaixo. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

4.5.5 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de forma a considerar a concentração mais baixa que apresentasse precisão ou DPR% inferior a 5% e exatidão ou CV% inferior a 15%, ou seja, dentro dos limites estabelecidos para aprovação da validação deste método. Os limites foram calculados segundo a equação abaixo:

$$\text{Limites de detecção e quantificação} = \frac{\text{Desvio padrão experimental}}{\text{Absorbância média experimental}} \times 100$$

4.5.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada através de alterações nos parâmetros reacionais do método obtidos com o desenvolvimento de planejamento fatorial com composto central para respostas obtidas em 500nm e planejamento fatorial com ponto central para as respostas em 290nm. Os resultados foram avaliados quanto a variação do pH, temperatura e tempo reacional.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Planejamento experimental para respostas em 500nm

A metodologia turbidimétrica é influenciada por uma série de fatores, como as concentrações dos reagentes, a ordem de mistura dessas soluções, o tempo de reação, o pH, a temperatura (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2006).

Considerando o mecanismo reacional envolvido entre a HBPM e o cloreto de cetilpiridínio, as condições para que a reação ocorra foram avaliadas conforme tabela 8 previamente apresentada, e as amostras da matriz do planejamento fatorial completo 2^3 foram analisadas para o comprimento de onda em 500nm. A escolha dos níveis das variáveis foi realizada através de alguns testes realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, e ainda com base na metodologia turbidimétrica originalmente utilizada pela comunidade científica para quantificação de heparinas de baixo peso molecular.

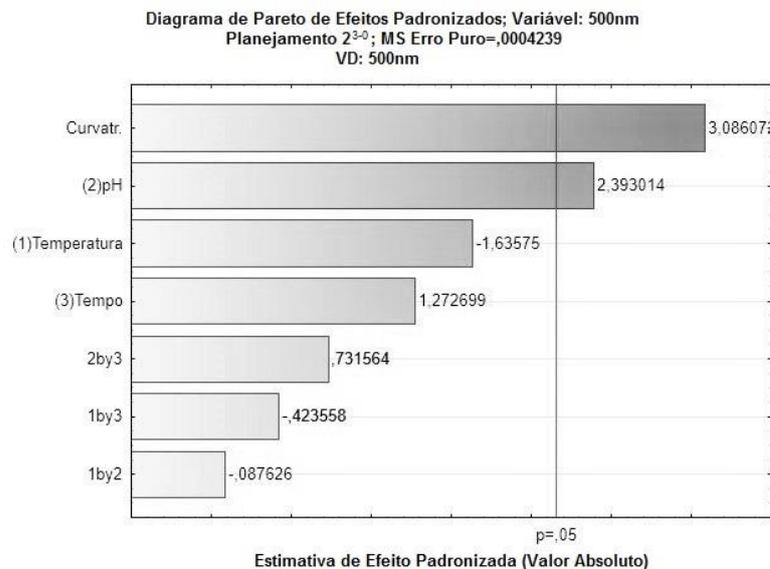
Como pode se observar visualmente no diagrama de Paretos representado na figura 7 embora a temperatura de reação, tanto avaliada individualmente, como também associada aos demais fatores (pH, tempo), tenha apresentado um comportamento inversamente proporcional à resposta do método, ou seja, quando esteve em níveis inferiores, a resposta seria maior, tal parâmetro não atingiu níveis de significância estatística pois o valor encontrado foi menor que 5% ($p < 0,05$). Um comportamento distinto foi observado em relação ao tempo de reação em que a resposta do método é maior se este é mantido em níveis +1. No entanto, assim como a temperatura, tal comportamento não é significativo, sendo possível inferir que houve uma complexação completa de todo o fármaco disponível no meio reacional com o cetilpiridínio.

Com relação ao pH do meio reacional foi possível concluir com um nível de significância estatística de 95% ($p > 0,05$), que quando em níveis superiores, esta variável foi capaz de modificar a resposta analítica do método. Assim, o método é favorecido quando o pH esteve em 5,4, provavelmente devido a melhor ionização do fármaco, que favoreceu a complexação das cadeias de amônio do reagente com as cadeias sulfatadas do fármaco. Embora esta variável tenha sido relevante quando avaliada individualmente, a sua associação com os demais fatores não demonstrou significância. Para os diagramas de paretos representados nas figuras 7 e 8, considera-se que o sinal negativo indica um efeito antagonista

sobre o fator dependente avaliado, enquanto que o sinal positivo representa um efeito sinérgico.

Embora na etapa de modelagem da MSR somente a avaliação do pH apresente relevância estatística, uma observação mais fina pode ser realizada ao observarmos o ajuste do modelo em questão. Geralmente, durante a etapa de modelagem da MSR a relação entre os fatores avaliados e a resposta do método pode ser descrita por um modelo de primeira ordem. Nesta etapa, pouca ou nenhuma curvatura da superfície é identificada, pois ainda se está afastado da região onde a maximização da resposta é obtida (BOX; DRAPER, 1987; MONTGOMERY, 2009). No entanto, ao analisarmos a presença de curvatura nos resultados obtidos na triagem das variáveis, observamos uma curvatura estatisticamente significativa ($p < 0,05$) inferindo que uma aproximação da região ótima já poderia ser considerada, e ainda que há indícios que a função não é linear (BOX; DRAPER, 1987; MONTGOMERY, 2009). Neste contexto, concluímos que o modelo de primeira ordem não satisfaz as condições operacionais das variáveis e um modelo de ordem superior foi construído a partir da expansão da matriz de experimentos através da adição dos pontos axiais, a fim de aumentarmos a região de avaliação, cujas condições experimentais estão dispostas na tabela 8 apresentada previamente.

Figura 7 – Diagrama de paretos da triagem dos fatores pH, temperatura e tempo de reação para 500nm.



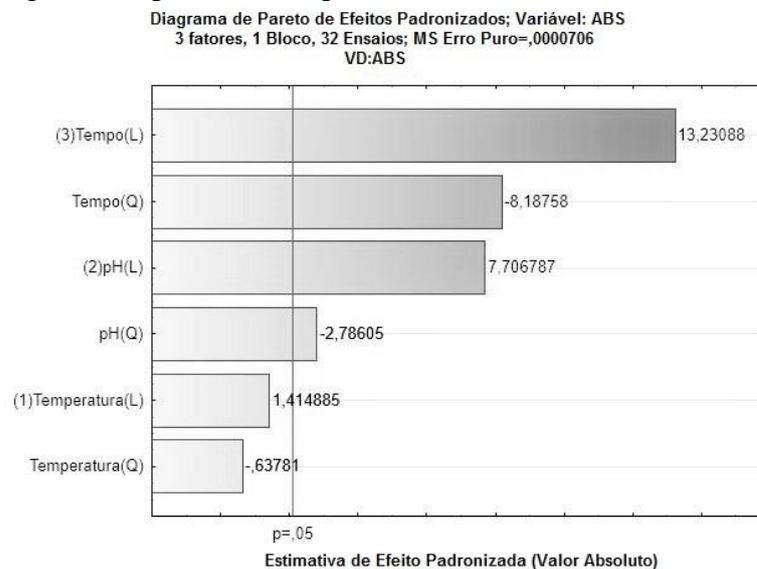
Diante das novas condições experimentais estabelecidas para o desenvolvimento desta etapa de deslocamento na superfície de resposta, foi possível observar que, assim como nos

resultados obtidos na etapa de triagem das variáveis, a temperatura de reação permaneceu sem produzir mudanças significativas na resposta do método, como demonstrado na figura 8.

Neste estudo, a temperatura foi avaliada desde o nível mais baixo do planejamento, 32 °C, até o nível mais alto, 48 °C, e neste sentido é possível afirmar que oscilações na temperatura reacional do meio ocasionadas ao acaso ou não, não interferem no rendimento do método turbidimétrico. Sendo assim, diante da não relevância do fator temperatura, esta variável foi retirada das representações gráficas de MSR que serão apresentadas posteriormente. Quanto ao tempo de reação, um comportamento distinto foi observado neste novo planejamento. Ao adicionarmos novos níveis de avaliação, sendo o nível inferior de 4,8 minutos e o nível superior de 55 minutos, foi possível observar que melhores absorvâncias são obtidas quando esta variável esteve em níveis superiores. Com relação ao pH da reação, um mesmo comportamento foi observado, onde níveis superiores demonstram melhor desempenho analítico do método.

Conforme a figura 8, observou-se que os termos linear e quadrático foram significativos, tanto para a variável pH, quanto para o tempo de reação. Neste sentido, observou-se que diferentemente da etapa de triagem das variáveis, a resposta analítica do método é influenciada tanto linearmente (L) quanto em ordem quadrática (Q) pelo tempo reacional do método, indicando que esta variável deve ser mantida nos níveis superiores de avaliação para um melhor rendimento da resposta. Com relação ao pH reacional, assim como o tempo de reação, confirma-se a influência desta variável em ambos comportamentos, linear e quadrático, e observa-se que níveis superiores influenciam significativamente a resposta.

Figura 8 – Diagrama de paretos da expansão do modelo com níveis axiais para 500nm.



Fonte: O Autor.

A análise de variância destes resultados está descrita na tabela 13 e 14. Ao analisarmos o ANOVA destes resultados observa-se que ao compararmos o percentual máximo de variação explicável, 95%, com a variação explicada pela regressão, 67%, esta discordância de 28% não é muito expressiva porque a contribuição do erro puro é relativamente pequena, 0,000071. A partir disto, infere-se também que o modelo construído do planejamento consegue ser explicável em 95% a partir das variáveis independentes investigadas (pH, tempo e temperatura) e ainda que 67% deste percentual é atribuído a relação entre a variável resposta e independentes. Além disso, este comportamento se reflete na distribuição dos resíduos demonstrada na figura 9, onde estes dados estão dispostos de forma aleatória e não com um padrão curvo que indicaria a necessidade de ajuste do modelo matemático.

O modelo de regressão tem como objetivo estabelecer uma relação que permita prever a resposta correspondente a um valor qualquer da variável independente. Com o objetivo de testar a significância estatística da regressão observou-se que a distribuição F (19,02), com intervalo de confiança de 95%, é maior que o valor de F_{tabelado} (2,95), o que descarta a hipótese nula de que não exista uma relação linear entre a variável dependente e independente. Apesar da aleatoriedade na realização dos experimentos, os resíduos entre os dados foram mínimos e a presença da falta de ajuste do planejamento para um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) não foi considerada significativa, sendo de 0,048328. Este comportamento é evidenciado também ao comparamos o valor do F observado pela falta de ajuste (2,47) e o F_{tabelado} (2,45), onde é possível inferir que a aproximação destes valores não indica uma evidência de falta de ajuste apesar do valor de p estar muito próximo de ser significativo ($p < 0,05$). É provável que esta falta de ajuste seja ocasionada pela não avaliação completa da superfície de resposta, como pode ser observado posteriormente na figura 11 (para a construção do gráfico de contornos). Sendo assim, a complementação dos resultados obtidos na análise da regressão com a distribuição aleatória dos resíduos o modelo estatístico construído foi considerado satisfatório para o prosseguimento dos estudos (PIMENTEL; NETO, 1996).

Tabela 13 – Análise de variância do planejamento contendo níveis axiais para 500nm.

Fatores	Soma Quadrado	Grau de liberdade	Quadrado médio	F ₀	Valo p
pH (A) linear	0,004192	1	0,004192	59,3946	0,000001
pH (B) Quadrático	0,000544	1	0,000544	7,7032	0,012957
Temperatura (A) Linear	0,012354	1	0,012354	175,0562	0,000000
Temperatura (B) Quadrática	0,005379	1	0,005379	76,2205	0,000000
Falta de ajuste	0,001745	10	0,000174	2,4725*	0,048328

Erro Puro	0,001200	17	0,000071
Soma Quadrática	0,024872	31	

*F_{tabelado}_{10,17} : 2,45

Fonte: O Autor.

Tabela 14 – Análise de variância do modelo de regressão do planejamento contendo níveis axiais para 500nm.

Fatores	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F ₀	Valor p
Regressão	0,016687	3	0,005562	19,02777*	0,000001
Resíduos	0,008185	28	0,000292		
Total	0,024872	31			

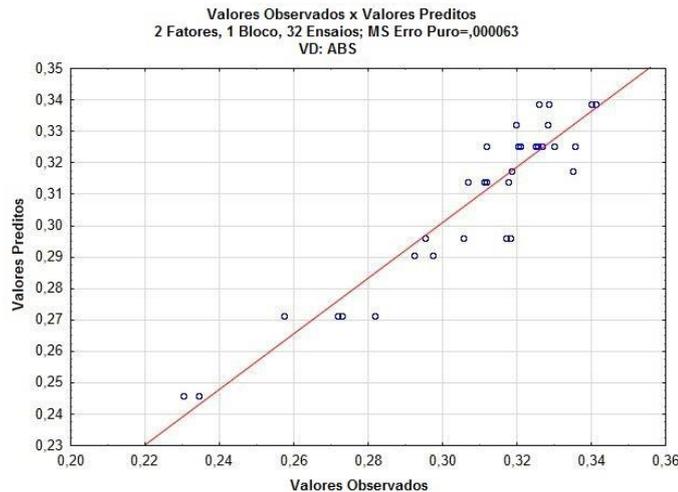
% variação explicada/determinação/regressão: 67%

% máxima de variação explicável/predito: 95%

*F_{tabelado}_{3,28} : 2,95

Fonte: O Autor.

Figura 9 – Gráfico dos valores observados e preditos do planejamento com composto central e níveis axiais em 500nm.



Fonte: O Autor.

Estes comportamentos podem ser melhor visualizados e confirmados nas figuras 10 e 11 (superfícies de resposta), que indicam as melhores condições de pH e tempo reacional. É possível afirmar, através das superfícies de resposta e curvas de contorno, que para as duas variáveis avaliadas, a faixa ótima de trabalho encontra-se em torno dos pontos superiores de avaliação, sendo pH 5,4 e o tempo de reação de 45 minutos. A figura 11 foi construída com objetivo de demonstrar as novas condições experimentais. Nestas condições a variável pH quando mantida nos níveis superiores (+1) e (+1,68), 5,4 e 6,0, respectivamente, apresentou uma melhor resposta confirmando mais uma vez que os resultados obtidos anteriormente na etapa de avaliação dos efeitos, onde observamos uma tendência do método em apresentar resultados ainda melhores com o aumento do pH. Esta tendência pode ser confirmada uma

vez que o grau de ionização da estrutura química do fármaco varia conforme o pH, como pode ser visualizado na tabela 15. Sendo assim, considerando a faixa de pH avaliada por este estudo, que ficou entre 3,4 e 6,0, a maior ionização ocorre quando este foi 5,4 e 6,0, cerca de 99,67% e 99,54%, respectivamente. Além disso, este comportamento sugere que a falta de ajuste verificada na análise da variância (0,048) seja devido a esta tendência de melhor ionização se novos valores de pH fossem investigados. Em relação ao tempo reacional, observa-se que a tendência de aumento apresentada pelo tempo é determinante para o rendimento da resposta analítica. Ainda que o pH esteja em 3,4 e 4,4 quando avaliado aos 4,8 minutos e 15 minutos de reação, as respostas foram bem inferiores aos experimentos em que o tempo de reação foi 30, 45, e 55 minutos, o que comprova a dependência da medida turbidimétrica pelo tempo de reação, independentemente do pH.

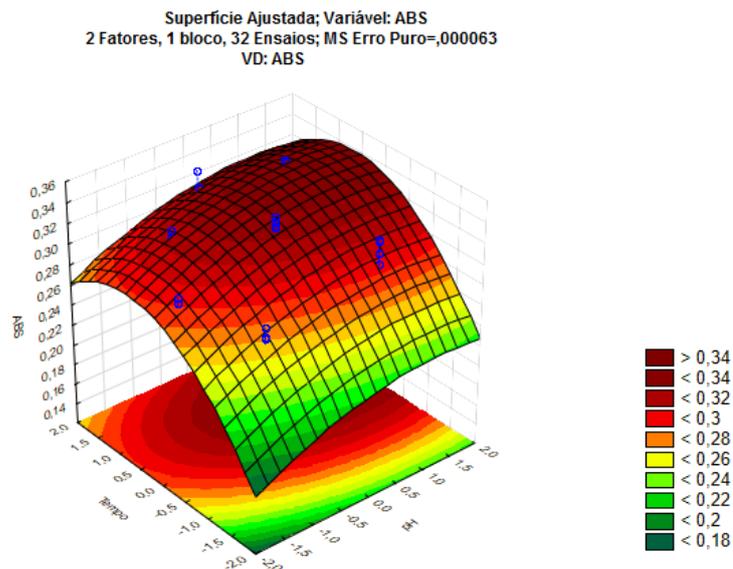
Tabela 15 – Grau de ionização da estrutura química da enoxaparina.

pH	%												
	(-15)	(-14)	(-13)	(-12)	(-11)	(-10)	(-9)	(-8)	(-7)	(-6)	(-5)	(-4)	(-3)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,36	96,31	3,22	0,1
0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,58	97,32	2,05	0,04
0,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,92	97,75	1,3	0,02
0,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,01	1,46	97,7	0,82	0,01
0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0,03	2,31	97,15	0,52	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,06	3,61	96	0,32	0
1,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,16	5,6	94,04	0,2	0
1,4	0	0	0	0	0	0	0	0	0,38	8,59	90,91	0,12	0
1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0,91	12,89	86,12	0,07	0
1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	2,11	18,76	79,09	0,04	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	4,63	26,06	69,29	0,02	0
2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	9,52	33,78	56,68	0,01	0
2,4	0	0	0	0	0	0	0	0	17,83	39,91	42,26	0,01	0
2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	29,79	42,09	28,11	0	0
2,8	0	0	0	0	0	0	0	0	44,11	39,32	16,57	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	58,41	32,85	8,74	0	0
3,2	0	0	0	0	0	0	0	0	70,7	25,09	4,21	0	0
3,4	0	0	0	0	0	0	0	0	80,15	17,95	1,9	0	0
3,6	0	0	0	0	0	0	0	0	86,9	12,28	0,82	0	0
3,8	0	0	0	0	0	0	0	0	91,5	8,16	0,34	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	94,54	5,32	0,14	0	0
4,2	0	0	0	0	0	0	0	0,01	96,51	3,42	0,06	0	0
4,4	0	0	0	0	0	0	0	0,01	97,78	2,19	0,02	0	0
4,6	0	0	0	0	0	0	0	0,02	98,58	1,39	0,01	0	0
4,8	0	0	0	0	0	0	0	0,03	99,09	0,88	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0,04	99,4	0,56	0	0	0
5,2	0	0	0	0	0	0	0	0,06	99,58	0,35	0	0	0
5,4	0	0	0	0	0	0	0	0,10	99,67	0,22	0	0	0
5,6	0	0	0	0	0	0	0	0,16	99,70	0,14	0	0	0
5,8	0	0	0	0	0	0	0	0,26	99,66	0,09	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0,40	99,54	0,06	0	0	0
6,2	0	0	0	0	0	0	0	0,64	99,32	0,04	0	0	0
6,4	0	0	0	0	0	0	0	1,01	98,97	0,02	0	0	0
6,6	0	0	0	0	0	0	0	1,59	98,39	0,01	0	0	0
6,8	0	0	0	0	0	0	0	2,5	97,49	0,01	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	3,91	96,09	0,01	0	0	0
7,2	0	0	0	0	0	0	0	6,06	93,94	0	0	0	0
7,4	0	0	0	0	0	0	0	9,27	90,73	0	0	0	0
7,6	0	0	0	0	0	0	0	13,93	86,06	0	0	0	0
7,8	0	0	0	0	0	0	0,01	20,42	79,57	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0,01	28,91	71,08	0	0	0	0
8,2	0	0	0	0	0	0	0,03	39,18	60,79	0	0	0	0
8,4	0	0	0	0	0	0	0,06	50,5	49,44	0	0	0	0
8,6	0	0	0	0	0	0	0,11	61,75	38,14	0	0	0	0
8,8	0	0	0	0	0	0	0,21	71,81	27,98	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0,36	79,97	19,66	0	0	0	0
9,2	0	0	0	0	0	0	0,62	86,03	13,35	0	0	0	0

9,4	0	0	0	0	0	0	1,03	90,14	8,82	0	0	0	0
9,6	0	0	0	0	0	0,01	1,67	92,6	5,72	0	0	0	0
9,8	0	0	0	0	0	0,02	2,68	93,64	3,65	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0,06	4,24	93,41	2,3	0	0	0	0
10,2	0	0	0	0	0	0,14	6,61	91,83	1,42	0	0	0	0
10,4	0	0	0	0	0	0,34	10,12	88,68	0,87	0	0	0	0
10,6	0	0	0	0	0,01	0,8	15,11	83,57	0,52	0	0	0	0
10,8	0	0	0	0	0,04	1,82	21,79	76,05	0,3	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0,13	3,97	29,9	65,84	0,16	0	0	0	0
11,2	0	0	0	0,01	0,43	8,05	38,27	53,17	0,08	0	0	0	0
11,4	0	0	0	0,03	1,26	14,88	44,65	39,14	0,04	0	0	0	0
11,6	0	0	0	0,13	3,28	24,51	46,4	25,66	0,02	0	0	0	0
11,8	0	0	0,01	0,47	7,47	35,25	42,10	14,69	0,01	0	0	0	0
12	0	0	0,05	1,48	14,66	43,67	32,9	7,25	0	0	0	0	0
12,2	0	0	0,19	3,92	24,61	46,24	21,98	3,05	0	0	0	0	0
12,4	0	0,01	0,68	8,88	35,15	41,68	12,5	1,1	0	0	0	0	0
12,6	0	0,06	2,07	17,06	42,59	31,86	6,03	0,33	0	0	0	0	0
12,8	0	0,24	5,33	27,68	43,61	20,58	2,46	0,09	0	0	0	0	0
13	0,01	0,84	11,56	37,87	37,64	11,21	0,84	0,02	0	0	0	0	0
13,2	0,07	2,43	21,12	43,63	27,36	5,14	0,24	0	0	0	0	0	0
13,4	0,26	5,93	32,54	42,43	16,79	1,99	0,06	0	0	0	0	0	0
13,6	0,86	12,27	42,51	34,97	8,73	0,65	0,01	0	0	0	0	0	0
13,8	2,39	21,66	47,33	24,56	3,87	0,18	0	0	0	0	0	0	0
14	5,74	32,77	45,18	14,8	1,47	0,04	0	0	0	0	0	0	0

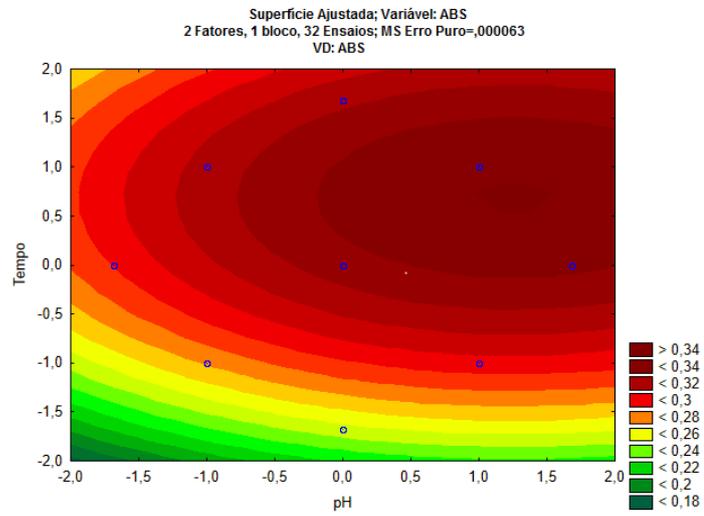
Fonte: O Autor.

Figura 10 – Gráfico de superfície de resposta apresentando parâmetros avaliados pH e tempo de reação no estudo fatorial 2^3 com níveis axiais para o comprimento de onda de **500 nm**.



Fonte: O Autor.

Figura 11 – Gráfico de contornos do estudo fatorial 2^3 com níveis axiais para o comprimento de onda de **500 nm**.



5.2 Validação analítica para respostas em 500nm

5.2.1 Estudo para construção da curva de calibração da Linearidade

Inicialmente como parte do desenvolvimento e definição de estratégia foi realizada uma curva de calibração contendo as concentrações de **10 e 15 µg/mL**. Porém, tais níveis de concentração para leituras em 500nm não foram incluídos para a construção da curva de calibração, pois não estiveram dentro dos parâmetros estabelecidos de precisão, valores de DPR% inferior a 5% e exatidão, valores de CV% inferior a 15% para aprovação do método. Os valores encontrados para estas duas concentrações foram aproximadamente de **7%** de DPR% e **20%** de CV%. Assim, a construção da curva de calibração foi realizada com as concentrações de 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/mL.

Como já mencionado anteriormente, quando a suposição de igualdade de variâncias dos dados é violada, então a análise da regressão obtida pelo método dos mínimos quadrados ordinários não pode ser utilizada por não reproduzir respostas sem a associação do erro. E principalmente para as concentrações mais elevadas da curva de calibração. Então, a análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados foi aplicada, com o objetivo de se obter um modelo em que o erro esteja uniformemente distribuído em toda a curva de calibração. De forma que os grandes desvios presentes nas últimas concentrações sejam minimizados em relação as concentrações iniciais.

Na análise de variância da regressão demonstrada na tabela 16, observou-se que a superioridade da soma dos quadrados da variável dependente ou concentração cujo valor é de 5,074985, em relação à soma dos quadrados dos resíduos, com valor de 0,005366, já pode considerar que as médias obtidas da curva de calibração não são iguais. Ao se observar também a superioridade do valor da distribuição F, de 29317,07, em relação ao F_{tabelado} , de 4,17, do teste é possível também rejeitar a hipótese nula de que não existe diferença significativa entre as médias avaliadas. Além disto devido a inferioridade do valor de p , 1,0509E-47, ($p < 0,05$) então é possível inferir com 95% de confiança que o modelo proposto é adequado para descrever o fenômeno da regressão.

Tabela 16 – Análise de variância do modelo de regressão da validação para 500nm.

Fatores	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F ₀	Valor p
Regressão	5,074985	1	5,074985	29317,07*	1,0509E-47
Resíduos	0,005366	31	0,000173		
Total	5,080351	32			
% variação explicada/determinação/regressão: 0,99 ou 99%					
*F _{tabelado} _{1,31} : 4,17					

Fonte: O Autor.

Os testes de normalidade dos resíduos são utilizados com o objetivo de se verificar se a distribuição da probabilidade associada a um determinado conjunto de dados pode ser aproximada pela distribuição normal. Neste sentido podemos observar na tabela 17 que devido à superioridade do valor de p ($p > 0,05$) para os testes de normalidade é possível afirmar que os resíduos provêm de uma população normal e apresentam evidência da hipótese de normalidade dos resultados.

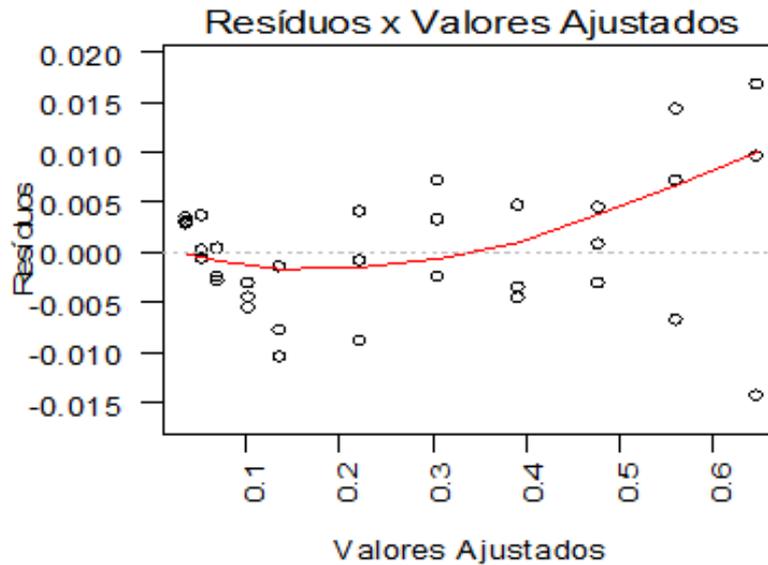
Tabela 17 – Testes de normalidade dos resíduos para 500nm.

Testes estatísticos de normalidade	Valor de p
Anderson – Darling	0,7013*
Shapiro – Wilk	0,8292*
Kolmogorov – Smirnov	0,6088*
Ryan – Joyner	0,5991*
Valor de p do teste estatístico: 0,05*	

Fonte: O Autor.

A homocedasticidade é o termo que utilizamos para designar a variância constante dos resíduos para diferentes observações. Ao analisarmos o gráfico de resíduos versus valores ajustados observamos graficamente o comportamento destes resíduos. Os pontos devem estar aleatoriamente distribuídos em torno de zero sem apresentar tendência para serem classificados como homocedásticos. Assim, ao analisarmos os resíduos observamos que as leituras se distribuem ao longo do eixo zero, no entanto à medida que as concentrações aumentam as variâncias vão assumindo um comportamento diferente como demonstrado na figura 12.

Figura 12 – Gráfico de resíduos versus valores ajustados para resíduos em 500nm.



Fonte: O Autor

Além da análise gráfica também existem testes estatísticos que tem a finalidade de testar a hipótese nula de igualdade de variâncias dos resíduos. Embora a análise gráfica dos resíduos tenha demonstrado que os resíduos das últimas concentrações tendem a serem maiores que os das concentrações iniciais da curva de calibração, a superioridade do valor de p ($p > 0,05$) dos testes estatísticos, como pode ser visto na tabela 18, confirma com 95% de significância que os resíduos foram minimizados e possuem uma variação constante dentro da faixa de estudo selecionada através da utilização dos mínimos quadrados ponderados.

Tabela 18 – Testes de homocedasticidade dos resíduos para 500nm.

Testes estatísticos de homocedasticidade	Valor de p
Breusch Pagan	0,7948*
Cochran	0,2545*

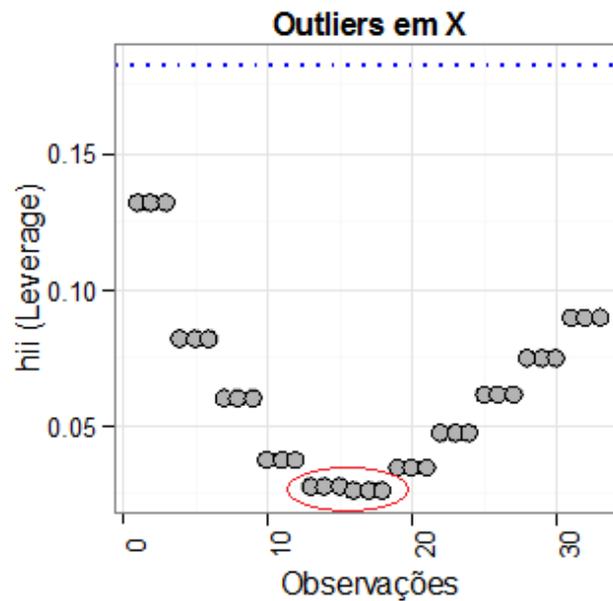
Valor de p do teste estatístico: 0,05*

Fonte: O Autor.

O diagnóstico de outliers possibilita a identificação dos pontos que influenciam se incluídos ou excluídos no ajuste da regressão, ou seja, podemos avaliar a qualidade da estimação da regressão na presença de outliers e pontos influentes (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; RAPOSO, 2016). Observamos que na figura 13 existe um comportamento diferente dos demais pontos entre as observações 10 e 20 (círculo vermelho). Esta observação está atrelada a leitura obtida da concentração de 50 μ g/mL. Neste contexto, observamos que os resíduos entre as concentrações 40 e 50 μ g/mL estão muito próximas apesar de serem concentrações

distintas. No entanto, devido à inferioridade do valor apresentado pela concentração de $50\mu\text{g/mL}$ para o teste estatístico de alavancagem/Leverage (0,0272) em relação ao critério do teste de 0,18 é possível afirmar que, apesar deste comportamento diferenciado das demais concentrações, não deve ser considerado um outlier para a concentração (X). Além disto, através da superioridade do valor de p para o teste de Bonferroni (0,8950) também podemos rejeitar a hipótese de que esta observação seja considerada um outlier.

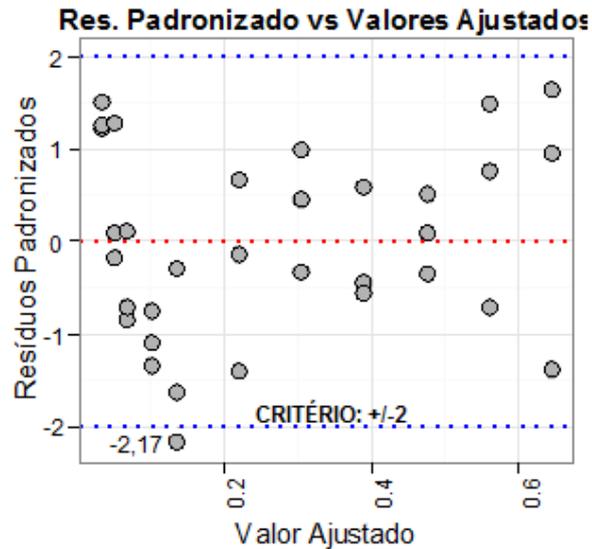
Figura 13 – Gráfico de outliers em X em 500nm.



Valor de p para o teste de Bonferroni: 0,8950
 Valor do teste de Leverage: 0,0272
 Valor do teste de Leverage critério $2 * (p + 1)/n$: 0,18
 Fonte: O Autor

Ao analisarmos a existência de outliers nas respostas (Y) observamos na figura 14, que mais uma vez a concentração de $50\mu\text{g/mL}$ está localizada abaixo do critério do teste de resíduos padronizados, ± 2 , sendo considerado, portanto um outlier em Y.

Figura 14 – Gráfico de outliers em Y em 500nm.



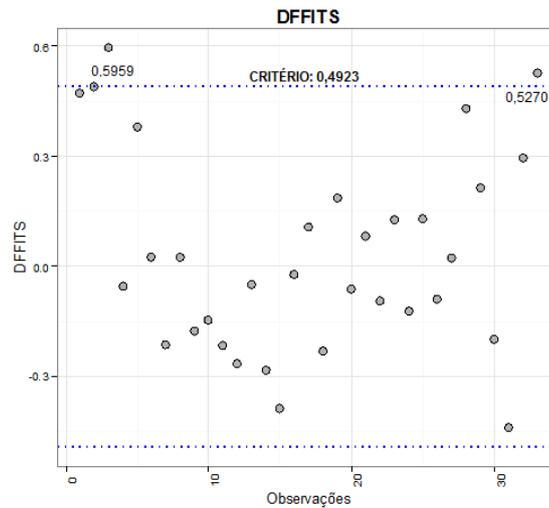
Valor do teste de resíduos padronizados para 50.3 μ g/mL: -2,17

Valor de critério do teste de resíduos padronizados: ± 2

Fonte: O Autor

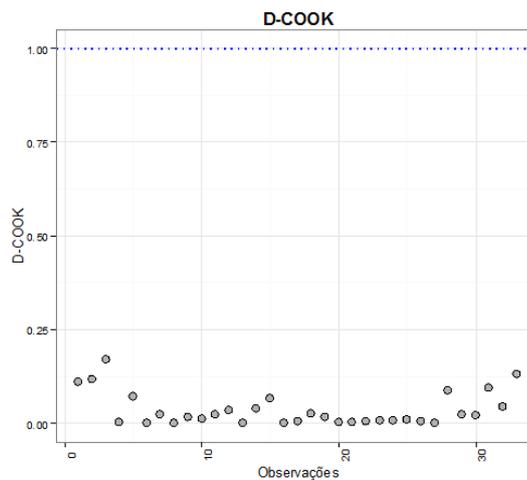
Uma vez identificada a presença de outliers se faz necessária a avaliação da influência deste para o ajuste da regressão. Sendo assim, observamos através dos testes estatísticos de influência de DFITTS, que as concentrações de 20 e 200 μ g/mL, respectivamente, 0,5959 e 0,5270, tiveram valores acima do critério do teste de 0,4923 (figura 15. a). Implicando inferir que, tais concentrações poderiam influenciar substancialmente no ajuste dos seus próprios valores preditos. No entanto, na figura 15.b observamos graficamente através do teste de DCOOK, que estes outliers não influenciam sobre o ajuste todos os valores da resposta, pois todos os valores do teste estiveram abaixo do critério do teste de DCOOK (1,0).

Figura 15.a – Gráfico de influência de outliers em Y DFITTS em 500nm.



Valor do teste de DFITTS para 20.3 μ g/mL: 0,5959
 Valor do teste de DFITTS para 200.2 μ g/mL: 0,5270
 Valor do critério do teste de DFITTS: 0,4923
 Fonte: O Autor.

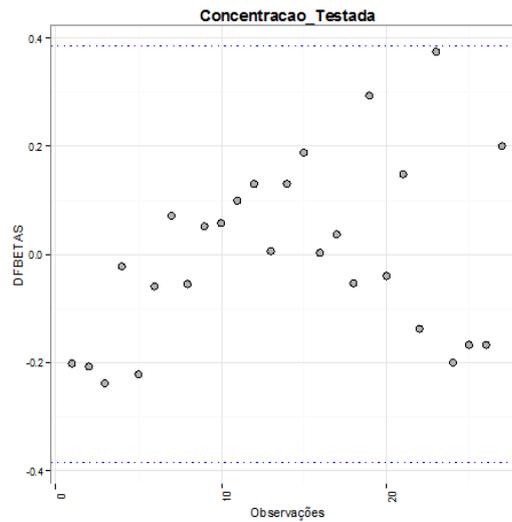
Figura 15.b – Gráfico de influência de outliers em Y DCOOK em 500nm.



Valor do critério do teste de DCOOK: 1,0
 Fonte: O Autor.

Prosseguindo com a análise de outliers ao observarmos a figura 16 temos no teste estatístico de DFBETAS que nenhuma das concentrações influenciam o coeficiente de concentração X, pois os valores estiveram inferiores ao critério (0,3481).

Figura 16 – Gráfico de influência de outliers DFBETAS em 500nm.



Valor do critério do teste de DFBETAS: 0,3481

Fonte: O Autor.

De forma geral, após a análise de outliers é possível afirmar que a concentração de $50\mu\text{g/mL}$ é um outlier proveniente, provavelmente, de um pequeno desvio no momento da construção da solução desta concentração. No entanto, devido à ausência no gráfico de DFBETAS abaixo não deve ser considerado como ponto influente para o ajuste da curva de regressão a fim de causar alguma mudança substancial no ajuste do modelo de regressão.

Assim, diante deste resultado, apesar dos resíduos serem maiores nas extremidades do final da curva de calibração, que corresponde às concentrações maiores avaliadas neste modelo é possível afirmar que nenhuma parte da estrutura sistemática dos dados não foi devidamente explicada pelo modelo desenvolvido.

As avaliações da precisão e exatidão de cada concentração para a construção da curva de calibração estão demonstradas na tabela 19. Ambos os parâmetros apresentaram valores inferiores a 15% e 5%, respectivamente, estando assim abaixo dos limites e variações determinadas para a validação do método. Sendo possível afirmar que curva de calibração do método é precisa e exata para cada concentração avaliada.

Tabela 19 – Precisão e exatidão das leituras para construção da curva de calibração 500nm.

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração calculada $\mu\text{g/mL}$	Exatidão Média Relativo (EPR%)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
20	20,91659	4,58293	1,02415
25	25,33383	1,33530	4,39792
30	29,56497	-1,45009	2,34766
40	38,71287	-3,21782	1,23603
50	48,07625	-3,84751	3,54730
75	74,45236	-0,73019	2,94335
100	100,75991	0,75991	1,56399
125	124,64827	-0,28139	1,29430
150	150,20166	0,13444	0,80721
175	176,43085	0,81763	1,89802
200	201,19090	0,59545	2,49669

Fonte: O Autor

5.2.2 Especificidade

Os resultados obtidos tanto para as soluções de enoxaparina pura quanto para as soluções contaminadas mostraram, que devido à superioridade do valor de p (0,0842), não há diferença estatística entre as amostras contaminadas e não contaminadas. Conforme a tabela 20, os DPR% também estiveram inferiores a 5%. Assim, é possível afirmar que o método apresenta especificidade.

Tabela 20 – Avaliação da especificidade do método para leituras em 500nm.

Especificidade	
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Média das concentrações ($\mu\text{g/mL}$)
Soluções pura de enoxaparina 100 $\mu\text{g/mL}$	99,7222
Soluções contaminadas de enoxaparina 100 $\mu\text{g/mL}$ e polímero 100 $\mu\text{g/mL}$	99,5416
Desvio padrão relativo(%) amostras pura: 0,1462	
Desvio padrão relativo (%) amostras contaminadas: 0,1886	

Fonte: O Autor.

5.2.3 Precisão

- Precisão intra-dia (Repetibilidade) e precisão inter-dia (Precisão intermediária)

Na tabela 21 é possível observar que os valores das concentrações obtidas a partir de três diferentes níveis de concentrações testadas (20, 100 e 200µg/mL) apresentaram DPR% abaixo do limite admitido de 5%. Assim, o método foi considerado aceito na avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 17 – Avaliação da precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária) do método para leituras em 500nm.

Precisão intra-dia (Repetibilidade)	
Concentração teórica (µg/mL)	DPR%
20	0,7480
100	0,6385
200	1,0640
Precisão inter-dia (Precisão Intermediária)	
Concentração teórica (µg/mL)	DPR%
20	5,5716
100	5,8116
200	2,3833

Valor de DPR% aceito: abaixo de 5%

Fonte: O Autor.

5.2.4 Limite de quantificação

Os resultados para a identificação do limite de quantificação do método estão dispostos na tabela 22. O limite de 20µg/mL foi estabelecido com precisão e exatidão, 1,0002 e 0,84, respectivamente, devido aos valores encontrados estarem abaixo do critério estabelecido para aprovação deste parâmetro.

Tabela 22 – Precisão e exatidão do limite de quantificação do método para leituras em 500nm.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)
20	19,7053
20	19,7053
20	19,9022
20	19,9866
20	19,8628
20	19,8272

DPR%: 1,0002

EPR%: 0,84

Fonte: O Autor.

5.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada através do percentual de recuperação de quantidades conhecidas de solução diluída de enoxaparina pelo método turbidimétrico. O método foi considerado exato de acordo com a inferioridade dos valores encontrados, conforme a tabela 23, para o percentual de variação das concentrações 20, 100 e 200 µg/mL.

Tabela 23 – Exatidão intra-dia e inter-dia do método para leituras em 500nm.

Exatidão intra-dia		
Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV%
20	19,8923	0,54
100	102,8997	2,90
200	196,1277	1,94
Exatidão inter-dia		
Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV%
20	19,0443	4,78
100	95,4636	4,54
200	189,9153	5,04

Fonte: O Autor.

Na tabela 24 é possível observar as diferenças entre a metodologia turbidimétrica comumente utilizada e relatada por Oliveira; Marcheti (2011) e as novas condições obtidas com o desenvolvimento deste trabalho. Assim, além do conhecimento a cerca da influência dos parâmetros reacionais relatados na seção 5.1.1 observou-se também que o tempo de reação do método pôde ser diminuído de 1 hora para 45 minutos, pois o grau de ionização do fármaco esteve maior no pH 5,4. Além disto, a faixa de linearidade do método pôde ser diminuída de 50 µg/mL para 20 µg/mL neste comprimento de onda com precisão, exatidão e

com a segurança de que o modelo gerado pela regressão desta curva apresenta homocedasticidade e ausência de outliers que modifiquem substancialmente a regressão desenvolvida.

Tabela 24 – Comparação entre metodologia turbidimétrica original e otimizada para 500nm.

OLIVEIRA; MARCHETI, 2011	Metodologia otimizada
37°C	37 °C
1 hora de reação	45 minutos
pH 4,4	pH 5,4
50 a 200 µg/ml	20 a 200 µg/mL

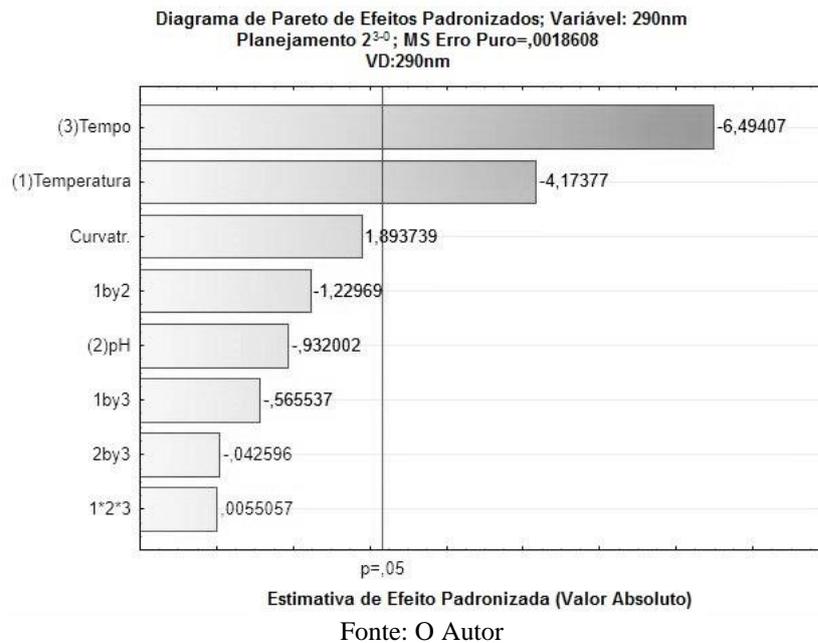
Fonte: O Autor

5.3 Planejamento experimental para respostas em 290nm

Tem-se que para a metodologia turbidimétrica, o comprimento de onda influencia significativamente na resposta analítica, de forma que o tamanho de partícula deve se ajustar ao comprimento de onda (MORAIS; TÓTH; RANGEL, 2006). Como já mencionado anteriormente, a reação entre o fármaco e o reagente forma um complexo insolúvel, que precipita, e torna o meio reacional turvo (HOFFART et al., 2006). Assim, a escolha primordialmente de 500 nm foi realizada para concentrações maiores de fármaco na solução acima de 20 µg/mL, e ainda com o objetivo de eliminar a possibilidade de outras substâncias presentes no meio reacional estejam sendo absorvidas pelo fenômeno da espectrofotometria. A partir disso, um planejamento experimental com ponto central foi desenvolvido para abordar concentrações de 20 µg/mL, cujas condições experimentais já foram apresentadas previamente na tabela 10 e para respostas obtidas em 290 nm na etapa de triagem das variáveis demonstradas na figura 17, observou-se que a variável pH não foi estatisticamente significativa para produzir qualquer variação na resposta analítica do método. No entanto, quando a temperatura foi mantida a um nível inferior, por exemplo, a 35 °C, uma melhor resposta foi verificada, indicando uma tendência do método analítico em demonstrar que temperaturas ainda menores pudessem favorecer a resposta do método turbidimétrico. Assim como a temperatura, quando realizada a avaliação do tempo de reação isoladamente, verificou-se que um tempo menor (15 minutos) produziu variações estatisticamente significativas na resposta, indicando que tempos menores de reação produzem uma maior resposta do método. Apesar da significância estatística dos parâmetros tempo e temperatura, a

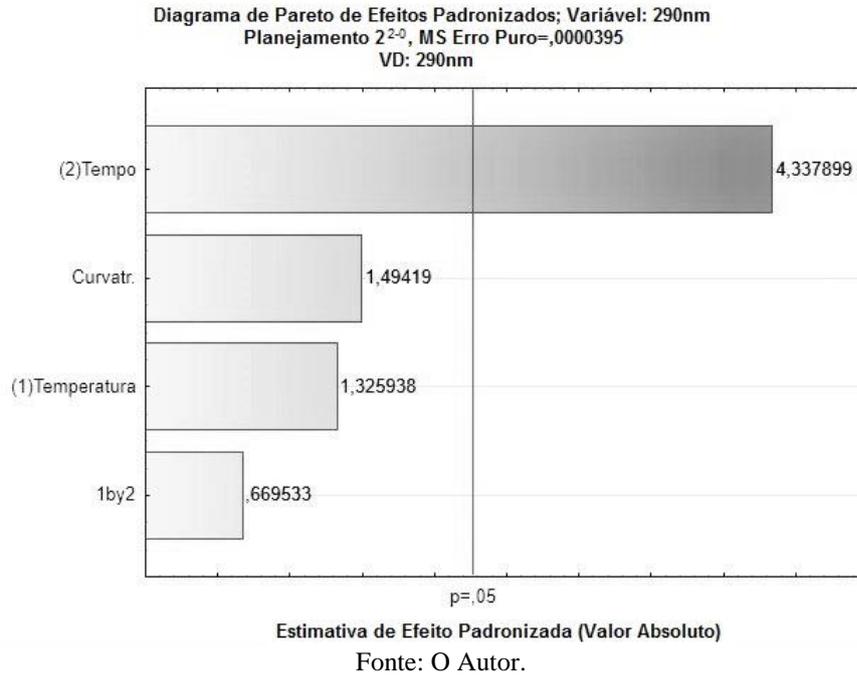
ausência significativa de curvatura nos resultados analisados indicou a necessidade de realização de um novo planejamento, modificando os parâmetros de avaliação de acordo com os resultados obtidos nesta triagem.

Figura 17 – Diagrama de paretos da triagem dos fatores pH, temperatura e tempo de reação para o planejamento 2^3 em 290nm.



As novas condições experimentais estão dispostas na tabela 11 apresentada previamente na **seção 5.2**. O pH reacional utilizado para o desenvolvimento desta etapa foi o de 5,4, ou seja o nível superior (+1) da etapa de triagem das variáveis do planejamento, com o objetivo de padronizar as condições reacionais de ambos os comprimentos de onda, 500 nm e 290 nm, uma vez que esta variável durante a triagem não apresentou relevância significativa. Então, considerando os comportamentos semelhantes apresentados pelas variáveis, temperatura e tempo de reação, esses fatores foram novamente investigados em níveis ainda mais inferiores. Nesta nova abordagem, como demonstrado na figura 18, a temperatura de reação ao ser avaliada em níveis ainda mais inferiores, 25 °C, não demonstrou significância estatística, sendo possível afirmar com segurança que esta variável não exerce mudanças na resposta do método analítico. O tempo de reação quando avaliado nos níveis 5, 10 e 20 minutos apresentou comportamento significativo sendo possível inferir que, para esta condição reacional, o método turbidimétrico necessita de um tempo mínimo para o acontecimento da reação de todo o fármaco presente no meio reacional.

Figura 18 – Diagrama de paretos da triagem dos fatores temperatura e tempo de reação para o planejamento 2² em 290 nm.



Assim como em 500 nm, foi realizada a análise da curvatura do modelo de superfície onde foi possível observar que este parâmetro não foi significativo para $p < 5\%$. Diante das novas condições experimentais estabelecidas e a comprovação da não relevância estatística deste parâmetro, o desenvolvimento de um novo estudo com o intuito de observar se o tempo de reação de fato influenciaria na resposta do método mostrou que, quando este foi de 25 e 30 minutos não houve diferenças significativas entre as respostas se comparados ao tempo utilizado para o desenvolvimento do planejamento em 20 minutos. Esta análise de variância pode ser visualizada na tabela 25, onde observamos que o valor estatístico atribuído para $F_{\text{calculado}}$ é muito inferior que o F_{tabelado} sendo possível afirmar que as médias dos resultados entre os tempos de 15, 20, 25 e 30 minutos são iguais, ou seja, não há influencia dos tempos analisados para com as respostas obtidas. Isto também se confirma pelo valor de $p > 0,05$ (0,41710512).

Tabela 25. Análise de variância dos resultados em 15, 20, 25, 30 minutos para 290nm.

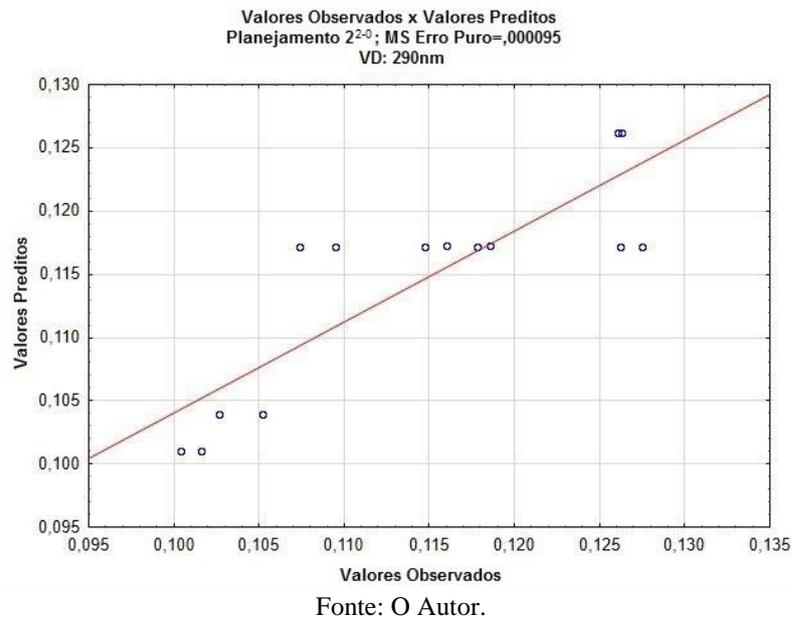
Fatores	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F ₀	Valo p
Entre grupos	0,000027365	3	9,12E-06	1,198248495*	0,41710512
Dentro dos grupos	3,045E-05	4	7,6125E-06		
Total	5,7815E-05	7			

*F_{tabelado}2,11 : 6,59

Fonte: O Autor.

A análise de variância dos dados da regressão do planejamento mostra que o percentual de máxima variação explicável pelo modelo de 72%, quando comparado com máxima variação explicada pela regressão de 63%, deixa de explicar 9% desta variação. Assim como em 500nm, o erro puro associado a esta observação é muito pequeno, 0,000039. Esta avaliação pode ser observada também na distribuição dos resíduos na figura 19, onde verificamos que alguns experimentos chegam a estar bem próximos da reta dos valores preditos e também distribuídos de forma aleatória, indicando que o modelo construído não apresenta uma tendência. Ainda sobre o gráfico de resíduos cabe ressaltar que a matriz de experimentos realizados foi menor e por este motivo os valores observados estão em menor quantidade no gráfico.

Figura 19 – Gráfico dos valores observados e preditos do planejamento com ponto central em **290nm**.



A significância estatística da regressão está demonstrada na tabela 26 e foi comprovada quando o valor do $F_{\text{calculado}}$ (9,68) foi maior que o F_{tabelado} (3,98). A partir desta verificação é possível afirmar, com segurança estatística de 95%, que as modificações observadas na resposta do método estão relacionadas às variações nas variáveis independentes. A partir da tabela 27 observa-se que apesar do valor de $F_{\text{calculado}}$ da falta de ajuste (2,25) estar abaixo do valor atribuído ao F_{tabelado} (5,12), o que indicaria uma falta de ajuste do modelo construído ao analisamos o valor de p (0,169334), observamos que não há significância estatística desta diferença ($p > 0,05$). Então sob estas considerações o modelo construído foi considerado satisfatório para a determinação das novas condições experimentais para as análises de heparina de baixo peso molecular em 290nm.

Tabela 26 – Análise de variância do planejamento fatorial com ponto central para 290nm.

Fatores	Soma Quadrado	Grau de liberdade	Quadrado médio	F ₀	Valo p
Temperatura	0,000069	1	0,000069	1,75811	0,217525
Tempo	0,000743	1	0,000743	18,8173	0,001883
Temperatura x Tempo	0,000018	1	0,000018	0,44827	0,519961
Falta de ajuste	0,000088	1	0,000088	2,23261*	0,169334
Erro Puro	0,000355	9	0,000039		
Soma Quadrática	0,001274	13			

*F_{tabelado}_{1,9} : 5,12

Tabela 27 – Análise de variância do modelo de regressão do planejamento fatorial com ponto central para 290nm.

Fatores	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F ₀	Valo p
Regressão	0,000812	2	0,000406	9,688065*	0,003747
Resíduos	0,000461	11	0,000042		
Total	0,001274	13			

% variação explicada/determinação/regressão: 63%
% máxima de variação explicável: 72%

*F_{tabelado}_{2,11} : 3,98

Fonte: O Autor.

5.4 Validação analítica para respostas em 290nm

5.4.1 Estudo para construção da curva de calibração da linearidade

Uma vez que a linearidade do método para as leituras de 500nm com precisão e exatidão só foi admitida da concentração 20 a 200 µg/mL. O comprimento de 290 nm precisou ser analisado com o objetivo de ampliar e contemplar concentrações ainda menores. Assim, para a construção da curva de calibração foram considerados como aprovados as concentrações 3, 5, 7,5, 10, 12, 15 e 20µg/mL para as respostas em 290nm. A concentração de **1µg/mL** foi retirada do estudo, pois apresentou os valores de precisão de aproximadamente **8%** e exatidão de **120%** estando, portanto, acima dos limites estabelecidos para aprovação da linearidade do método de 5% para precisão e de 15% para exatidão.

A tabela 28 mostra que o estudo para construção da curva de calibração foi realizado também através da análise de variância da regressão gerada pelo método dos mínimos

quadrados, em que a superioridade do valor da soma quadrática da regressão, 0,021269, em relação a soma quadrática dos resíduos, 0,000017, indica que a regressão é significativa. Assim, a inferioridade do valor de p , 9,45595E-31, em relação ao nível de 0,05 também confirma que as médias utilizadas para a construção do modelo são diferentes, e então rejeitamos a hipótese nula de igualdade das médias. Ao analisarmos o valor do teste F temos que a superioridade do valor de $F_{\text{calculado}}$, 22942,30, em relação ao F_{tabelado} (4,38) rejeitamos mais uma vez a hipótese nula de que não existe diferença significativa entre as médias. Então podemos inferir que o modelo analisado descreve a regressão existente entre a concentração e a resposta do método.

Tabela 28 – Análise de variância do modelo de regressão da validação para 290nm.

Fatores	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	F ₀	Valo p
Regressão	0,021269	1	0,021269	22942,30*	9,45595E-31
Resíduos	0,000017	19	0,0000009		
Total	0,021287	20			
% variação explicada/determinação/regressão: 0,99 ou 99%					
*F _{tabelado} _{1,19} : 4,38					

Fonte: O Autor.

Prosseguindo com a análise dos resíduos obtidos da regressão a normalidade dos dados pode ser confirmada pelo valor de p dos testes estatísticos estarem acima do nível de significância de 0,05, como observamos na tabela 29. Assim é possível inferir que os resíduos provêm de uma população normal e então a suposição de normalidade dos resíduos é confirmada.

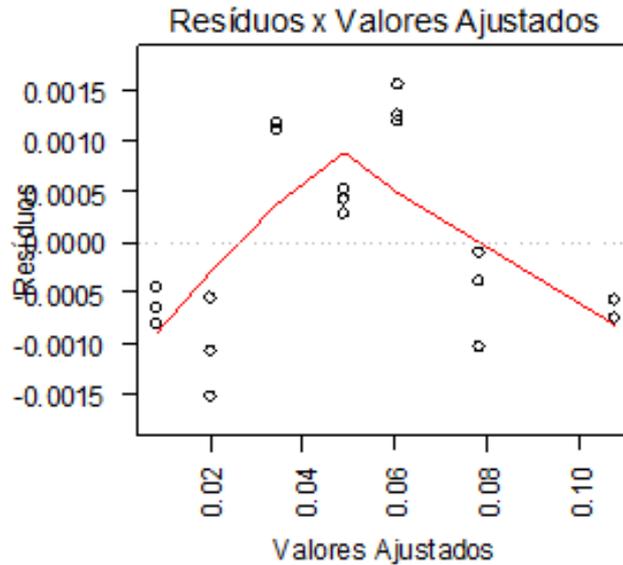
Tabela 29 – Testes de normalidade dos resíduos para 290nm.

Testes estatísticos de normalidade	Valor de p
Shapiro – Wilk	0,0641*
Kolmogorov – Smirnov	0,0705*
Ryan – Joyner	0,1133*
Valor de p do teste estatístico: 0,05*	

Fonte: O Autor.

Os testes de homocedasticidade dos resíduos foram confirmados através do gráfico de resíduos apresentado na figura 20. Neste gráfico é possível observar que, diferentemente dos resíduos apresentados na validação de 500nm, estes se encontram distribuídos aleatoriamente em torno de zero sem apresentar qualquer tendência.

Figura 20 – Gráfico de resíduos e valores ajustados para a validação dos resultados em 290nm.



Fonte: O Autor.

Além da disposição aleatória dos resíduos demonstrada visualmente na figura anterior, a homocedasticidade dos resíduos também foi confirmada pela superioridade do valor de p dos testes estatísticos apresentados na tabela 30. Então, com 95% de confiança estatística, os resíduos apresentados possuem variância constante e são considerados homocedásticos.

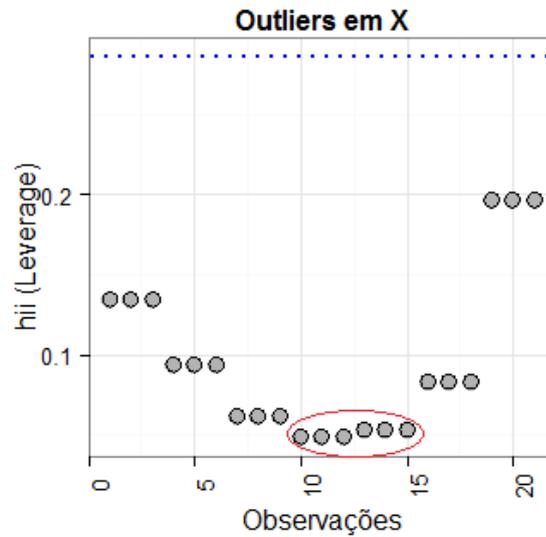
Tabela 30 – Testes de homocedasticidade dos resíduos para 290nm.

Testes estatísticos de homocedasticidade	Valor de p
Breusch Pagan	0,6768*
Cochran	0,2740*
Valor de p do teste estatístico: 0,05*	

Fonte: O Autor.

A presença de outliers pode ser verificada através de uma análise visual da figura 21. Neste sentido, é possível observar que há um comportamento diferente entre as observações 10 e 15 da figura (círculo vermelho), que corresponde as concentrações de 10 e 12 μ g/mL. Os resíduos entre essas concentrações estão muito próximos e este comportamento seria um indicativo de existência de outlier nos resultados. No entanto, devido à superioridade do valor de p do teste estatístico de Bonferroni (1,00) e ainda pela distância que os resíduos (0,0519) estão em relação ao critério do teste (0,29) é possível inferir que não existem outliers para a concentração (X).

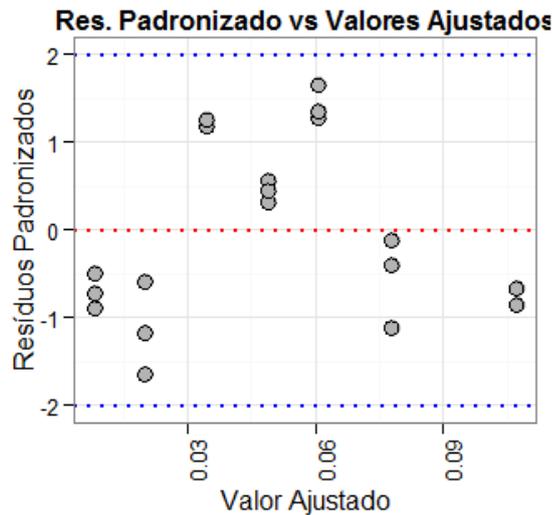
Figura 21 – Gráfico de outliers em X em 290nm.



Valor de p para o teste de Bonferroni: 1,00
 Valor do teste de Leverage: 0,0519
 Valor do teste de Leverage critério $2 * (p + 1)/n$: 0,29
 Fonte: O Autor

De acordo com a figura 22 observamos que todos os resíduos padronizados. Encontram-se dentro do critério ± 2 o que indica a inexistência de outliers nos resultados (Y).

Figura 22 – Gráfico de outliers em Y em 290nm.

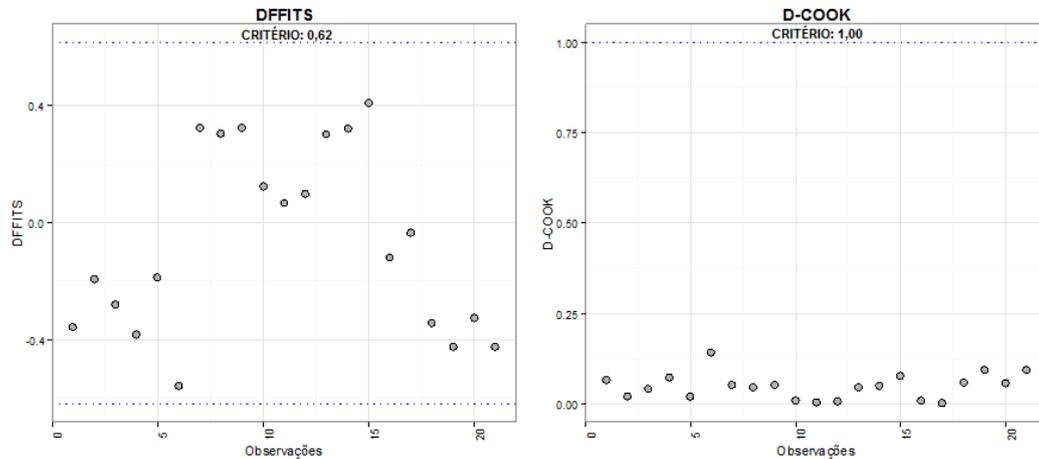


Valor de critério do teste de resíduos padronizados: ± 2
 Fonte: O Autor

Na figura 23 estão representadas o gráfico de DFITTS e distância de DCOOK. No gráfico de DFITTS mostra que nenhuma das observações encontra-se acima do critério do teste de (0,62) e ainda que todos os dados estiveram distantes do critério do teste de DCOOK

(1,00). Confirmando, portanto que não existem outliers nos resultados obtidos da análise de regressão para as leituras em 290nm.

Figura 23 – Gráfico de DFFITS e DCOOK em 290nm.



Valor de critério do teste de DFFITS: 0,62

Valor de critério do teste de DCOOK: 1,00

Fonte: O Autor

Assim como para 500nm, também foram testadas a precisão e exatidão para cada concentração presente na curva de calibração. E neste sentido todas as leituras estiveram dentro dos critérios estabelecidos para esses parâmetros de 15% para a exatidão e 5% para a precisão como demonstrado na tabela 31. A partir disto a curva construída para as leituras em 290nm foi considerada precisa e exata.

Tabela 31 – Precisão e exatidão das leituras para construção curva de calibração para 290nm.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada µg/mL)	Exatidão Média Relativo (EPR%)	Desvio Padrão Relativo (DPR%)
3	2,89100	3,633303	2,401557
5	4,82052	3,589405	2,561876
7,5	7,69672	2,623037	0,107882
10	10,07006	0,700673	0,236384
12	12,22816	1,901401	0,314461
15	14,91198	0,586769	0,618183
20	19,88152	0,592393	0,090136

Valor de DPR% aceito: abaixo de 5%

Valor de EPR% aceito: abaixo de 15%

Fonte: O Autor.

5.4.2 Especificidade

Assim como para 500nm, devido a superioridade do valor de p (0,0624) em relação ao nível de significância de 0,05, é possível afirmar que não há diferença estatística entre as amostras contendo enoxaparina pura e contaminada com o polímero testado. Os percentuais de DPR% também estiveram abaixo do limite de 5% como demonstrado na tabela 32. Neste contexto, o método também apresentou especificidade para as leituras em 290nm.

Tabela 32 – Avaliação da especificidade do método para leituras em 290nm.

Especificidade	
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Média das concentrações ($\mu\text{g/mL}$)
Soluções pura de enoxaparina 10 $\mu\text{g/mL}$	9,1573
Soluções contaminadas de enoxaparina 10 $\mu\text{g/mL}$ e polímero 10 $\mu\text{g/mL}$	9,7940
Desvio padrão relativo (%) amostras pura: 2,7969	
Desvio padrão relativo (%) amostras contaminadas: 0,6184	

Fonte: O Autor.

5.4.3 Precisão

- Precisão intra-dia (Repetibilidade) e precisão inter-dia (Precisão intermediária)

Na tabela 33 estão demonstrados os desvios padrão relativo (DPR%) para as concentrações de 3, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com a tabela todos os valores estiveram abaixo do valor exigido de 5% e assim o método foi considerado preciso no quesito repetibilidade e também alcançou o critério da precisão intermediária.

Tabela 33 – Avaliação da precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária) do método para leituras em 290nm.

Precisão intra-dia (Repetibilidade)	
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	DPR%
3	3,6515
10	0,5345
20	0,1075
Precisão inter-dia (Precisão Intermediária)	
Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	DPR%
3	1,7677
10	0,5855
20	0,1963
Valor de DPR% aceito: abaixo de 5%	

Fonte: O Autor

5.4.4 Limite de quantificação

Os resultados para a identificação do limite de quantificação do método estão dispostos na tabela 34. O limite de 3µg/mL foi estabelecido com precisão e exatidão, 2,8568 e 3,6967, respectivamente, pois os valores encontrados estão abaixo do critério estabelecido para aprovação deste parâmetro de 5% para a precisão e de 15% para a exatidão.

Tabela 34 – Precisão e exatidão do limite de quantificação do método para leituras em 290nm.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)
3	2,8605
3	2,9233
3	2,8890
3	2,8319
3	2,9290
3	2,9005

DPR%: 2,8568

EPR%: 3,6967

Fonte: O Autor

5.4.5 Exatidão

Mais uma vez a exatidão do método foi determinada através do percentual de recuperação de quantidades conhecidas de solução diluída de enoxaparina para as leituras em 290nm. Na tabela 35 estão demonstrados os percentuais de variação para as amostras avaliadas de 3, 10 e 20µg/mL, e estes estiveram abaixo do limite permitido de 15% e assim o método foi considerado exato para este comprimento de onda.

Tabela 35 – Exatidão intra-dia e inter-dia do método para leituras em 290nm.

Exatidão intra-dia		
Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV%
3	3,0148	0,4936
10	10,0662	0,6625
20	19,9862	0,0685
Exatidão inter-dia		
Concentração teórica (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	CV%
3	2,9519	1,6015
10	9,8605	1,3945
20	20,1034	0,5171

Fonte: O Autor.

Em comparação com a metodologia utilizada e relatada por Oliveira; Marcheti (2011) a partir da tabela 36 é possível observar que o conhecimento construído a partir dos resultados obtidos da etapa de planejamento de experimentos permitiu observar que as concentrações mais baixas não necessitam de um tempo reacional de 1 hora, pois com 20 minutos de reação toda a HBPM presente no meio já está complexada com o reagente. Em relação a curva de calibração de 3 a 20 $\mu\text{g/mL}$ a regressão apresentou dados homocedásticos, ou seja as possíveis variâncias que possam ocorrer no método estão previstas pelo modelo de regressão desenvolvido e ausência de outliers influentes.

Tabela 36 – Comparação entre metodologia turbidimétrica original e otimizada para 290nm.

OLIVEIRA; MARCHETI, 2011	Metodologia otimizada
37°C	37 °C
1 hora de reação	20 minutos
pH 4,4	pH 5,4
5 a 50 $\mu\text{g/mL}$	3 a 20 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: O Autor.

6 CONCLUSÕES

Todas as considerações realizadas neste trabalho validam os resultados de uma metodologia analítica que antes era realizada aleatoriamente sem qualquer conhecimento das influências e da contribuição de cada fator para aperfeiçoar o desempenho do método analítico, bem como da utilização de dois comprimentos de onda levando em consideração a concentração de fármaco presente no meio reacional. Os resultados demonstraram que foram obtidas condições reacionais da metodologia levando em consideração a influência dos parâmetros físicos (tempo e temperatura de reação) e químico (pH).

Foi demonstrado no planejamento de experimentos que para ambos os comprimentos de onda a temperatura de reação não deve ser considerada como parâmetro capaz de influenciar nos resultados. Também foi demonstrado que para o comprimento de onda de 500nm o tempo de reação e o pH são variáveis importantes para um eficiente desempenho do método. Assim as novas condições foram pH de 5,4, temperatura de 37°C e tempo de reação de 45 minutos para respostas em 500nm, cujas faixas de concentração do fármaco foram de 20 a 200 µg/mL.

Em virtude dos resultados apresentados em 290nm considerando que as concentrações de enoxaparina eram de 3 a 20 µg/mL, ou seja, mais baixas que as concentrações em 500nm, o tempo reacional de 20 minutos pôde ser elegível como tempo máximo para o melhor desempenho analítico e as novas condições para esta resposta foram pH 5,4, temperatura de 37°C e tempo de 20 minutos.

A validação do método para ambas condições reacionais foi alcançada para ambos comprimentos de onda e torna possível a utilização deste método para análises de rotina em laboratório de pesquisa para quantificação de HBPM em preparações farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

ABBALLE, F., LOMBARDI, M., MACCONE, I., PALAZZO, G., SEVERONIA, A., TRAVAINI, S., VENTURINIB, A. New method for low molecular weight heparin quantification in tablets by suppressed conductivity detection and cryptand column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. p. 467-471, v. 48, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopéia 5º edição. Brasília. 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para realização de estudos não clínicos e clínicos para registro de heparinas como produto biológico pela via de desenvolvimento e comparabilidade. 2011.

AKL, M. A., HODZIC, A. K., OKSANEN, T., ISMAEL, H. R., AFOUNA, M. M., YLIPERTTULA, M., SAMY, A. M., VIITALA, T. Factorial design formulation optimization and *in vitro* characterization of curcumin-loaded PLGA nanoparticles for colon delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. p. 10-20, v. 32, 2016.

BADIMON, L., VILAHUR, GEMMA. Mecanismos de acción de los diferentes agentes antiplaquetários. *Revista Española de Cardiología*. p. 8-15, v. 13, 2013.

BAGRE, A. P., JAIN, K., JAIN, N. K. Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: *In vitro* and *in vivo* assessment. *International Journal of Pharmaceutics*. p. 31-40, v. 456, 2013.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Ed. Unicamp, 2001.

BAS, D. BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. p. 836-845, v. 78, 2007.

BEZERRA, M. A. SANTELLI, R. E., OLIVEIRA, E. P., VILLAR, L. S., ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. p. 965-977, v. 76, 2008.

BOX, G. E. P., WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society*. p. 1-45, v. 1, série. B, 1951.

CABRAL, R. P., SOUZA, A., SILVA, A. S., PANINHO, A. I., TEMTEM, M., COSTA, E., CASIMIRO, T., AGUIAR-RICERDO, A. Design of experiments approach on the preparation of dry inhaler chitosan composite formulations by supercritical CO₂- assisted spray-drying. *The Journal of Supercritical Fluids*. MANUSCRITO 2016.

CHOPRA, S., PATIL, G. V., MOTWANI, S. K. Release modulating hydrophilic matrix systems of losartan potassium: Optimization of formulation using statistical experimental design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. p. 73-82, v. 66, 2007.

CHOUBEY, A. K., DORA, C. P., BHATT, T. D., GILL, M. S., SURESH, S. Development and evaluation of PEGylated Enoxaparin: A novel approach for enhanced anti-Xa activity. *Bioorganic Chemistry*. p. 1-6, v. 54, 2014.

CHUNG, Y., TAE, G., YUK, S. H. A facile method to prepare heparin-functionalized nanoparticles for controlled release of growth factors. *Biomaterials*. p. 2621-2626, v. 27, 2006.

CURBETE, M. M., SALGADO, H. R. N. Rapid turbidimetric assay for quantification of fusidic acid in a dermatological cream. *Talanta*. p. 51-56, v. 153, 2016.

CHRISTOPER, G. V. P., RAGHAVAN, C. V., SIDDHARTH, K., KUMAR, M. S. S., PRASAD, R. H. Formulation and optimization of coated PLGA – Zidovudine nanoparticles using factorial design and *in vitro* in vivo evaluations to determine brain targeting efficiency. *Saudi Pharmaceutical Journal*. p. 133-140, v. 22, 2014.

DAMUS, P. S., HICKS, M., ROSENBERG, R. D. Anticoagulant action of heparin. *Nature*. p. 355-357, v. 246, 1973.

EIDI, H., JOUBERT, O., ATTIK, G., DUVAL, R. E., BOTTIN, M. C., HAMOUIA, A., MAINCENT, P., RIHN, B. H. Cytotoxicity assessment of heparin nanoparticles in NR8383 macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*. p. 156-165, v. 396, 2010.

ENGELHORN, A. L. V., GARCIA, A. C. F., CASSOU, M. F., BIRCKHOLZ, L., ENGELHORN, C. A. Profilaxia da trombose venosa profunda – estudo epidemiológico em um hospital escola. *Jornal Vascular Brasileiro*. p. 97 – 102, v. 2, 2002.

FERREIRA, C. N., SOUZA, M. O., DUSSE, L. M. S., CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. p. 416-421, v. 32, 2010.

FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., FERREIRA, H. S., MATOS, G. D., DAVID, J. M. BRANDAO, G. C., DA SILVA, E. G. P., PORTUGAL, L. A., DOS REIS, P. S., SOUZA, A. S., DOS SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*. p. 179-186, v. 597, 2007.

FURLANETTO, S., CIRRI, M., MAESTRELLI, F., CORTI, G., MURA, P. Study of formulation variables influencing the drug release rate from matrix tablets by experimental design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. p. 77-84, v. 62, 2006.

GAMBOA, J. M., LEONG, K. W. *In vitro* and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. p. 800-810, v. 65, 2013.

HALES, D., CASTERAN, M., SAPIN-MINET, A., TOMUTA, I., ACHIM, M., VLASE, L., MAINCENT, P. Development of enoxaparin sodium polymeric microparticles for colon-specific delivery. *Clujul Medical*. p. 357-365, v. 88, 2015.

HAMERSCHLAK, N., ROSENFELD, L. G. M. Utilização da Heparina e dos Anticoagulantes Orais na Prevenção e Tratamento da Trombose Venosa Profunda e da Embolia Pulmonar. *Arq Bras Cardiol*. nº. 3, v. 67, 1996.

HE, Z.; ZHU, P. F.; PARK, S. H. A robust desirability function method for multi-response surface optimization considering model uncertainty. *European Journal of Operational Research*. p. 241-247, v. 221, 2012.

HIRSH, J., RASCHKE, R. Heparin and Low-Molecular- Weight Heparin. *CHEST*. p. 188S-203S, v. 126, 2004.

HOFFART, V., UBRICH, N., SIMONIN, C., BABAK, V., VIGNERON, C., HOFFMAN, M., LECOMPTE, T., MAINCENT, P. Low Molecular Weight Heparin- loaded polymeric nanoparticles: formulation, characterization, and release characteristics. *Drug development and industrial pharmacy*. p. 1091-1099, v. 28, 2002.

HOFFART, V., UBRICH, N., LAMPRECHT, A., BACHELIER, K., VIGNERON, C., LECOMPTE, T., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. Microencapsulation of Low Molecular Weight Heparin into Polymeric Particles Designed with Biodegradable and Nonbiodegradable Polycationic Polymers. *Drug Delivery*. p. 1-7, v. 10, 2003.

HOFFART, V., LAMPRECHT, A., MAINCENT, P., LECOMPTE, T., VIGNERON, C., UBRICH, N. Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *Journal of Controlled Release*. p. 38-42, v. 113, 2006.

INGLE, R. G., AGARWAL, A. S. A world of low molecular weight heparins (LMWHs) enoxaparin as a promising moiety – A review. *Carbohydrate polymers*. p. 148-153, v. 106, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA (IBOPE). Trombose e embolia pulmonar. São Paulo. IBOPE, 2010.

JAVOT, L., LECOMPTE, T., RABISKOVA, M., MAINCENT, P. Encapsulation of low molecular weight heparins: Influence on the anti-Xa/anti-IIa ratio. *Journal of Controlled Release*. p. 8-14, v. 139, 2009.

JIAO, Y., UBRICH, N., MARCHAND-ARVIER, M., VIGNERON, C., HOFFMAN, M., LECOMPTE, T., MAINCENT, P. *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of Oral Heparin-Loaded Polymeric Nanoparticles in Rabbits. *Circulation*. p. 230-235, v. 105, 2002.

- JOGALA, S., RACHAMALLA, S. S., AUKUNURU, J. Development of subcutaneous sustained release nanoparticles encapsulating low molecular weight heparin. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. p. 58-64, v. 6, 2015.
- JUNQUEIRA, D. R. G., VIANA, T. G., PEIXOTO, E. R. M., BARROS, F. C. R., CARVALHO, M. G., PERINI, E. Farmacovigilância da heparina no Brasil. *Rev Assoc Med Bras*. p. 328-332, v. 57, 2011.
- JUN-YONG, L., ZHONG, Y., JI-CHAO, C., HUI-FEI, C. Efficacy of oral colon-specific delivery capsule of low-molecular-weight heparin on ulcerative colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. p. 111-117, v. 65, 2011.
- LAMPRECHT, A., UBRICH, N., MAINCENT, P. Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. p. 632-638, v. 67, 2007.
- LIMA, M. B., ANDRADE, S. I. E., HARDING, D. P., PISTONESI, M. F., BAND, B. S. F., ARAUJO, M. C. U. Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer. *Talanta*. p. 717-723, v. 88, 2012.
- LOIRA – PASTORIZA, C., SAPIN – MINET, A., DIAB, R., GROSSIORD, J. L., MAINCENT, P. Low molecular weight heparin gels, based on nanoparticles, for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. p. 256-262, v. 426, 2012.
- LUO, J., ZHONG, Y., CAO, J., CUI, H. Efficacy of oral colon-specific delivery capsule of low molecular weight heparin on ulcerative colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. p. 111-117, v. 65, 2011.
- MEIS, E., LEVY, R. A. Câncer e trombose: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*. p. 183-193, v. 53, 2007.
- MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. New York: John Wiley. p. 643. v. 6, 2009.
- MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. v. 5, 1991.
- MORAIS, I. P. A., TÓTH, I. V., RANGEL, A. O. S. S. Turbidimetric and nephelometric flow analysis: Concepts and Applications. *Spectroscopy Letters*. p. 547-579, v. 39, 2006.
- MOTLEKAR, N. A., YOUAN, B. B. C. The quest for non-invasive delivery of bioactive macromolecules: A focus on heparins. *Journal of Controlled Release*. p. 91-101, v. 113, 2006.
- MOURIER, P. A. J., VISKOV, C. Chromatographic analysis and sequencing approach of heparin oligosaccharides using cetyltrimethylammonium dynamically coated stationary phases. p. 299-313, v. 332, 2004.

NALAWADE, P. B., GAJJAR, A. K. Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. p. 75-87, v. 33, 2016.

OKUHARA, A., NAVARRO, T. P., PROCOPIO, R. J., BERNARDES, R. C., OLIVEIRA, L. C. C., NISHIYAMA, M. P. Incidência de trombose venosa profunda e qualidade da profilaxia para tromboembolismo venoso. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. p. 002-006, v. 41, 2014.

OLIVEIRA, S. M. M., MARCHETTI, J. M. Determinação de heparina fracionada em preparações farmacêuticas utilizando turbidimetria. *Quimica Nova*. p. 1063-1067, v. 34, 2011.

OLIVEIRA, S. M. M., OLIVEIRA, F. S., GAITANI, C. M., MARCHETTI, J. M. Microparticles as a strategy for low-molecular-weight heparin delivery. *Journal of Pharmaceutics Sciences*. p. 1783-1792, v. 100, 2011.

PALIWAL, R., PALIWAL, S. R., AGRAWAL, G. P., VYAS, S. P. Recent Advances in Search of Oral Heparin Therapeutics. *Medicinal Research Reviews*. p. 388-409, v. 32, nº. 2, 2012.

PATEL, B., GUPTA, V. AHSAN, F. *Journal of Controlled Release*. p. 1783-1792, v. 100, 2012.

PEREIRA, C. A., BRITO, S. S., MARTINS, A. S., ALMEIDA, C. M. Profilaxia da trombose venosa profunda: aplicação prática e conhecimento teórico em um hospital geral. *Jornal Vascular Brasileiro*. p. 18-27, v. 7, 2008.

PIMENTEL, M. F., NETO, B. B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. *Quimica Nova*. p. 268-277, v. 19, 1996.

NETO, B. B., PIMENTEL, M. F., ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quimica Nova*. p. 856-865, v. 25, 2002.

RAPOSO, F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. *Trends in Analytical Chemistry*. p. 167-185, v. 77, 2016.

RAZA, A., ANSARI, T. M. Development and applications of spectrophotometric methods for quantitative determination of caroverine in pharmaceutical pure and tablet formulations. *Analytical Chemistry Research*. p. 33-38, v. 4, 2015.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quimica Nova*. p. 771-780, v. 27, 2004.

RIBEIRO, J. L. D., Projeto de experimentos. Apostila do curso de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. Escola de engenharia da UFRGS, 2009.

ROSITO, G. A., SILVA O. B., RIBEIRO, J. P Evidências Farmacológico-Clínicas para o Uso das Heparinas de Baixo Peso Molecular nas Síndromes Coronarianas Agudas. *Arq Bras Cardio*. p. 184-189, v. 77, 2001.

SCALA-BERTOLA, J., RABISKOVA, M., LECOMPTE, T., BONNEAUX, F., MAINCENT, P. Granules in the improvement of oral heparin bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*. p. 12-16, v. 374, 2009.

SILVA, M. C. Epidemiologia do tromboembolismo venoso. *Jornal Vascular Brasileiro*. v. 1, nº 2, 2002.

SILVEIRA, G., TARLEY, C. R. T. Determinação turbidimétrica do antidepressivo amitriptilina em sistema fia explorando a formação do par iônico com lauril sulfato de sódio. *Quimica Nova*. p. 1653-1659, v. 31, 2008.

SOUZA, S. V. C., JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*. p. 25-35, v. 552, 2005.

STATSOFT INCORPORATION. Statistica: 5.1. Statistica for Windows. Tulsa, 1997. Disponível em: <<http://www.statsoft.com>>. Acesso em: 18 out. 2008.

TARLEY, C. R. T., SILVEIRA, G., DOS SANTOS, W. N. L., MATOS, G. D., DA SILVA, E. G. P., BEZERRA, M. A., MIRO, M., FERREIRA, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*. p. 58-67, v. 92, 2009.

THANAWIROON, C., LINHARDT, R. J. A. Separation of a complex mixture of heparin-derived oligosaccharides using reversed -phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. p. 215-223, v. 1014, 2003.

TOMA, T. S., LOUVISON, M. C. P., BERSUSA, A. A. S., BONFIM, J. R. A., PRADO, M. F. Heparinas de baixo peso molecular para profilaxia e tratamento de trombose venosa profunda na gravidez. Avaliação d tecnologias de saúde. v. 14, n 2, 2013.

VACCARI, S. F., JUNIOR, L. B., MASIERO, S. M. K., FRONZA, M., DALMORA, S. L. Avaliação comparativa da atividade biológica de heparinas não-fracionadas em produtos farmacêuticos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. p. 103-110, v. 25, 2003.

VOLPI, N., BUZZEGA, D. Agarose-gel electrophoresis for the quality assurance and purity of heparina formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. p. 144-147, v. 67-68, 2012.

WADAJKAR, A. S., SANTIMANO, S., RAHIMI, M., YUAN, B., BANERJEE, S., NGUYEN, K. T. Deep vein thrombosis: Current status and nanotechnology advances. *Biotechnology Advances*. p. 504-513, v. 31, 2013.

WANG, Z., LI, D., SUN, X., BAI, X., JIN, L., CHI, L. Liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry for compositional analysis of low molecular weight heparins. *Analytical Biochemistry*. p. 35-41, v. 451, 2014.

YANG, B., WEYERS, A., BAIK, J. Y., STERNER, E., SHARFFSTEIN, S., MOUSA, S. A., ZHANG, F., DORDICK, J. S., LINHARDT, R. J. Ultra-performance ion-pairing liquid chromatography with on-line electrospray ion trap mass spectrometry for heparin disaccharide analysis. *Analytical Biochemistry*. p. 59-66. v. 415, 2011.

ZIA, F., ZIA, K. M., ZUBER, M., TABASUM, S., REHMAN, S. Heparin based polyurethanes: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*. p. 101-111. v. 84, 2016.