

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrícia Condé de Lima

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DO TEOR DE RIFAMPICINA, ISONIAZIDA, PIRAZINAMIDA E
ETAMBUTOL EM COMPRIMIDOS 4 EM 1 UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE**

Rio de Janeiro

2014

Patrícia Condé de Lima

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DO TEOR DE RIFAMPICINA, ISONIAZIDA, PIRAZINAMIDA E
ETAMBUTOL EM COMPRIMIDOS 4 EM 1 UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Kátia Christina Leandro

Orientador: Dr. André Luiz Mazzei Albert

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Lima, Patrícia Condé de

Desenvolvimento de um método de análise para a determinação simultânea do teor de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol em comprimidos 4 em 1 utilizados no tratamento da tuberculose. / Patrícia Condé de Lima. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

114 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2014.

Orientadores: Kátia Christina Leandro e André Luiz Mazzei Albert

1. Antituberculosos. 2. Isoniazida. 3. Pirazinamida. 4. Etambutol. 5. Rifampicina. 6. Cromatografia Líquida. 7. Controle de Qualidade. I. Título

Development of analytical method for simultaneous determination of Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide and Ethambutol in fixed-dose combination tablets used in tuberculosis treatment

Patrícia Condé de Lima

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DO TEOR DE RIFAMPICINA, ISONIAZIDA, PIRAZINAMIDA E
ETAMBUTOL EM COMPRIMIDOS 4 EM 1 UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA
TUBERCULOSE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: 24 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Silvana do Souto Jacob
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr^a Rosangela Sabbatini
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr^a Bernardete Spisso
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr^a Kátia Christina Leandro - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dr André Luis Mazzei Albert - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

AGRADECIMENTOS

A Deus e à espiritualidade, por me dar forças e nunca me abandonarem, mesmo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Angela e Edmundo, por sempre me darem apoio e muito amor em todos momentos da minha vida.

Ao meu irmão Rodrigo, meu grande fã, por me incentivar e me ter como referência.

À minha grande amiga e companheira Vânia Chaves, pela paciência, compreensão e apoio aos quais eu não conseguiria chegar até aqui.

Aos meus grandes amigos e mentores Eduardo Sousa e Mychelle Alves, por todo apoio, companheirismo e puxões de orelha, sem eles eu não teria crescido, amo vocês.

Às amigas de estudo, aflições convividas juntas e conquistas juntas, Juliana Bastos e Rafaela da Costa, nós sabemos o quanto foi bom, legal e difícil, e quanto uma nova amizade pode nos dar forças para irmos em frente.

À minha orientadora Kátia Christina, pelo apoio, incentivo e pelas palavras certas nos momentos certos.

Ao meu orientador André Mazzei, pelas ideias, paciência e por ter sido um grande pai para mim.

Aos amigos do grupo de química, Rosana Ferreira, Rosana Santos, Mararlene, Christina, Amanda, Renata pelas palavras de apoio em momentos de desespero.

Às minhas amigas Nadja Helena, Andrea Castro e Jaqueline Rodrigues, desculpe pela ausência e obrigada pelo apoio.

Ao meu mais novo amigo Rene, por me ajudar com os complexos, com minhas estruturas e pelos momentos de descontração que passamos juntos.

Ao Alexandre Medeiros, da biblioteca do INCQS, por toda atenção e paciência.

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e pelas sugestões que contribuíram para a qualidade deste trabalho.

Ao chefe de departamento Filipe Quirino, agradeço pelo apoio.

A direção do INCQS por dar a oportunidade de realização deste curso.

Não desanime,
em razão da crítica.
Se a censura é serviço cabível a qualquer um,
a realização elevada é obra de poucos.

Chico Xavier

RESUMO

Os comprimidos utilizados no tratamento da tuberculose possuem quatro fármacos associados, Isoniazida (INH), Pirazinamida (PYA), Etambutol (EMB) e Rifampicina (RMP) e são distribuídos gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde. Até o momento, os métodos analíticos oficiais para a análise dos teores dos fármacos presentes neste medicamento de dose fixa combinada são aqueles especificados na Farmacopeia Americana 36^a edição e na Farmacopeia Internacional 4^a edição. Porém, nenhum destes compêndios oficiais possui monografias para a análise simultânea dos quatro fármacos. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar simultaneamente as concentrações dos quatro fármacos em comprimidos dose fixa combinada é de grande importância para o controle da qualidade do medicamento em questão. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método analítico para determinar simultaneamente todos os princípios ativos do comprimido para o tratamento da tuberculose por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível. O método desenvolvido utilizou uma coluna cromatográfica com fase estacionária octadecilsilano, 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro e 5 µm de tamanho de partícula e fase móvel constituída de uma fase aquosa (85% tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15% metanol e 0,005 mol/L de Cu^{2+} ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e fase orgânica (metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico). O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min e comprimento de onda 265 nm, quando o software do equipamento permitiu, para a INH, PYA e o EMB um comprimento de onda de 265 e de 335 nm para a RMP. Este estudo demonstrou que o método desenvolvido apresentou linearidade entre 0,05 a 0,10 mg/mL para INH, 0,27 a 0,52 mg/mL para PYA, 0,19 a 0,36 mg/mL para EMB e 0,05 a 0,1 mg/mL para RMP e mostrou-se satisfatório quanto ao parâmetro de precisão, com desvio padrão relativo inferior a 2,0% para os quatro fármacos estudados.

Palavras-chave: Isoniazida. Pirazinamida. Etambutol. Rifampicina. CLAE.

ABSTRACT

Tablets used to treat tuberculosis contain four drugs, isoniazid (INH), pyrazinamide (PYA), ethambutol (EMB) and rifampicin (RMP) and are freely distributed by the National Health System. So far, the official analytical methods for testing the amount of the ingredients present in the fixed-dose combination tablet are those described in the 36th edition of U.S. Pharmacopeia and in the 4th edition of International Pharmacopoeia. However, none of these official compendium present monographs for the simultaneous analysis of the four drugs. The development of suitable analytical methods for simultaneously determining the concentrations of the four drugs in fixed-dose combination tablets is of great importance to the quality control of the medicinal product concerned. The aim of this study was to develop an analytical method to simultaneously determine all the active ingredients of the tablet for tuberculosis treatment by high-performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detector. The developed method used a chromatographic column with octadecylsilane stationary phase, with 250 mm length, 4,6 mm diameter and 5 μ m particle size. The mobile phase was aqueous (85% ammonium formate buffer 0,3 mol/L pH 5, 15% methanol and 0,005 mol/L of Cu^{2+} or 250 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), and the organic phase (methanol, 0,1% triethylamine and 0,2 % formic acid). The used flow was 1,0 mL/min, at a wavelength of 265 nm or when the equipment allowed a wavelength of 265 nm for INH, EMB, and PYA and 335 nm for RMP. This study showed that the developed method was linear from 0,05 to 0,10 mg/mL for INH, 0,27 to 0,52 mg/mL for PYA, 0,19 to 0,36 mg/mL for EMB and 0,05 to 0,1 mg/mL for RMP and was satisfactory regarding the precision parameter, with relative standard deviation lower than 2,0 % for the four studied drugs.

Keywords: Isoniazid. Pyrazinamide. Ethambutol. Rifampicin. HPLC.

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
As	Fator de Assimetria do Pico
BCG	Bacilo Calmette Guérin
BK	Bacilo de Koch
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CHCl ₃	Tricloro metano
CH ₂ Cl ₂	Dicloro metano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de variação
DFC	Dose Fixa Combinada
DOTS	Direct Observed Treatment Strategy
DMSO	Sulfóxido de dimetila
DAD	Detectores de Arranjo de Diodos
DPR	Desvio Padrão Relativo
EMB	Etambutol
FB	Farmacopeia Brasileira
Fc	Fator de cauda
INH	Isoniazida
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade Industrial e Tecnologia
K	Fator de retenção ou fator de capacidade
Lacen	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MRC	Material de Referência Certificado
MS	Ministério da Saúde
N	Número de pratos teóricos ou Eficiência

NIRS	Espectroscopia por Infravermelho Próximo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
PE	Ponto de Ebulição
PF	Ponto de Fusão
PYA	Pirazinamida
Ph. Int.	Farmacopeia Internacional
RMP	Rifampicina
RP-HPTLC	Cromatografia de Alta Performace de Camada Fina em Fase Reversa
RP-LC	Cromatografia a Líquido em Fase Reversa
R	Resolução
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
USP	Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível
V_i	Volume interno
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
V_0	Volume morto
α	Fator de Seletividade ou Fator de Separação

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -	Determinação do Fator de retenção ou fator de capacidade (K) ..	40
Equação 2 -	Determinação do volume interno da coluna vazia (V_i)	41
Equação 3 -	Determinação do volume da coluna e o diâmetro da partícula de seu preenchimento (V_0)	41
Equação 4 -	Determinação do número de pratos teóricos	41
Equação 5 -	Determinação do número de pratos teóricos à meia altura do pico	42
Equação 6 -	Determinação do Fator de seletividade ou fator de separação	42
Equação 7 -	Determinação da resolução da coluna	43
Equação 8 -	Determinação da resolução da coluna a partir das larguras dos picos na meia altura	43
Equação 9 -	Determinação do fator de cauda	44
Equação 10 -	Determinação do desvio padrão relativo	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da Rifampicina	27
Figura 2 -	Estrutura da rifampicina quinona	28
Figura 3 -	Estrutura da 3- formilrifampicina	28
Figura 4 -	Estrutura da 25-desacetil-rifampina	29
Figura 5 -	Estrutura da 25-desacetil-23-acetil-rifampicina	29
Figura 6 -	Estrutura da 25-desacetil-21-acetil-rifampicina	30
Figura 7 -	Estrutura da Isomiazida	31
Figura 8 -	Estrutura do ácido isonicotínico	31
Figura 9 -	Estrutura da isonicotinamida	32
Figura 10 -	Estrutura da Pirazinamida	33
Figura 11 -	Estrutura do Etambutol	33
Figura 12 -	Cromatógrafo líquido, fabricante Shimadzu com detector UV-VIS e conjunto de fotodiodos usado nas etapas da avaliação	47
Figura 13 -	Cromatógrafo líquido, fabricante Gilson com detector ultravioleta-visível usado nas etapas de desenvolvimento.....	48
Figura 14 -	Comprimento de onda de absorção máxima da INH 265 nm	58
Figura 15 -	Comprimento de onda de absorção máxima da PYA 269 e 312 nm	58
Figura 16 -	Comprimento de onda de absorção máxima da RMP 231, 263, 335 nm	58
Figura 17 -	Cromatograma com as quatro substâncias relacionadas, RQ, SV, RNO e 3-FR, em 238 nm	59
Figura 18 -	Cromatograma com as quatro substâncias relacionadas, RQ, SV, RNO e 3-FR, em 335 nm	59
Figura 19 -	Cromatograma com essas quatro substâncias relacionadas, RQ, SV, RNO e 3-FR, em 335 nm no detector CORONA CAD	60
Figura 20 -	Especificação da USP do tempo de uso da solução padrão e da amostra	61
Figura 21 -	Espectro do EMB no UV	61
Figura 22 -	Especificação da Ph. Int. do tempo de uso da solução padrão e da amostra	62

Figura 23 -	Cromatograma da solução de INH, PYA e EBM segundo a técnica da Ph. Int.	63
Figura 24 -	Cromatograma da solução de INH, PYA e EBM segundo a técnica da Ph. Int.	64
Figura 25 -	Ilustração da explicação do colapso fase cromatografia de fase reversa, (a) em misturas de água-metanol e (b) em 100% de água	64
Figura 26 -	Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente USP	66
Figura 27 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente USP	67
Figura 28 -	Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente CCl ₄	68
Figura 29 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente CCl ₄	69
Figura 30 -	Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente metanol	69
Figura 31 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente metanol	70
Figura 32 -	Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente acetonitrila	70
Figura 33 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente acetonitrila	71
Figura 34 -	Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente acetonitrila e água	73
Figura 35 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente acetonitrila e água	74
Figura 36 -	Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente água, acetonitrila e tampão	75
Figura 37 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água, acetonitrila e tampão	75
Figura 38 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água e acetonitrila com 0,03 mg/mL de citrato	76

Figura 39 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água e acetonitrila com 0,075 mg/mL de citrato	76
Figura 40 -	Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água e metanol a 4°C	77
Figura 41 -	Espectro do complexo (Cu ²⁺ com EMB) em solução tampão acetato pH 4	79
Figura 42 -	Espectro do complexo (Cu ²⁺ com EMB) em solução tampão acetato pH 6	79
Figura 43 -	Gráfico da variação da concentração do EMB em relação a concentração fixa do Cu ²⁺	80
Figura 44 -	Estrutura mais provável da formação do complexo de Cu ²⁺ com EMB ([Cu(EMB) ₂] ²⁺)	81
Figura 45 -	Soluções da PYA, RMP, INH e EMB com solução de sulfato de cobre.....	82
Figura 46 -	Solução de RMP com sulfato de cobre após algumas horas com precipitado	82
Figura 47 -	Cromatograma da INH, PYA e complexo com formiato 0,1 mol/L na fase móvel	84
Figura 48 -	Cromatograma da INH, PYA e complexo com formiato 0,3 mol/L na fase móvel	84
Figura 49 -	Cromatograma da INH, PYA e complexo com formiato 0,5 mol/L na fase móvel	84
Figura 50 -	Cromatograma dos quatro fármacos com aumento da fase orgânica	85
Figura 51 -	Cromatograma do comprimido com a fase móvel com adição de trietilamina e ácido fórmico	86
Figura 52 -	Cromatograma do diluente com a fase móvel com adição de trietilamina e ácido fórmico	87
Figura 53 -	Tabela com os parâmetros de adequação do sistema do cromatograma da figura 51	87
Figura 54 -	Tabela das condições do método de controle com troca de comprimento de onda	88

Figura 55 -	Cromatograma do comprimido somente no comprimento de onda em 265 nm	88
Figura 56 -	Gráfico da curva de calibração da INH na faixa de concentração 0,05 a 0,10 mg/mL	91
Figura 57 -	Gráfico da curva de calibração da PYA na faixa de concentração 0,27 a 0,52 mg/mL	92
Figura 58 -	Gráfico da curva de calibração do EMB na faixa de concentração 0,19 a 0,36 mg/mL	92
Figura 59 -	Gráfico da curva de calibração da RPM na faixa de concentração 0,05 a 0,1 mg/mL	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Taxas de incidência e mortalidade de TB por região e estados do Brasil	23
Quadro 2 -	Esquema básico para o tratamento da TB para adultos e adolescentes	25
Quadro 3 -	Métodos de análise para RMP, INH, PYA E EMB apresentados nas Farmacopeias Americana e Internacional	35
Quadro 4 -	Crítérios de aceitabilidade para os parâmetros de adequação da separação cromatográfica segundo a Farmacopeia Americana	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Rampa de programação do modo gradiente para análise da RMP	50
Tabela 2 -	Concentração do íon metálico e do EMB	51
Tabela 3 -	Rampa de programação do modo gradiente para análise da INH, PYA, EMB e RMP.....	52
Tabela 4 -	Rampa de programação do modo gradiente para análise da INH, PYA, EMB e RMP com trietilamina e ácido fórmico na fase orgânica	52
Tabela 5 -	Valores de pKa dos grupos ionizáveis e dissociáveis dos fármacos.....	68
Tabela 6 -	Condições finais do método desenvolvido para análise do comprimido 4 em 1	89
Tabela 7 -	Concentração das soluções de trabalho da curva de calibração da INH (mg/mL)	90
Tabela 8 -	Concentração das soluções de trabalho da curva de calibração da PYA (mg/mL)	90
Tabela 9 -	Concentração das soluções de trabalho da curva de calibração da EMB (mg/mL)	90
Tabela 10 -	Concentração das soluções de trabalho da curva de calibração da RMP (mg/mL)	90
Tabela 11 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão da INH no fabricante 1	93
Tabela 12 -	Valores de repetibilidade da INH através do DPR no fabricante 1.....	94
Tabela 13 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão da INH no fabricante 2	94
Tabela 14 -	Valores de repetibilidade da INH através do DPR no fabricante 2.....	94
Tabela 15 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão da PYA no fabricante 1	95

Tabela 16 -	Valores de repetibilidade da PYA através do DPR no fabricante 1.....	95
Tabela 17 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão da PYA no fabricante 2	95
Tabela 18 -	Valores de repetibilidade da PYA através do DPR no fabricante 2.....	96
Tabela 19 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão do EMB no fabricante 1	96
Tabela 20 -	Valores de repetibilidade do EMB através do DPR no fabricante 1.....	96
Tabela 21 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão do EMB no fabricante 2	97
Tabela 22 -	Valores de repetibilidade do EMB através do DPR no fabricante 2.....	97
Tabela 23 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão da RMP no fabricante 1	97
Tabela 24 -	Valores de repetibilidade da RMP através do DPR no fabricante 1.....	98
Tabela 25 -	Concentração das soluções de trabalho da precisão da RMP no fabricante 2	98
Tabela 26 -	Valores de repetibilidade da RMP através do DPR no fabricante 2.....	98

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. TUBERCULOSE	19
1.2. O CONTROLE DA TUBERCULOSE	20
1.3. O TRATAMENTO	24
1.4. FÁRMACOS DO COMPRIMIDO DFC	26
1.4.1. Rifampicina	26
1.4.2. Isoniazida	30
1.4.3. Pirazinamida	32
1.4.4. Etambutol	33
1.5. ANÁLISE DO COMPRIMIDO DFC	34
1.5.1. Metodologias analíticas de compêndios oficiais	34
1.5.2. Metodologias analíticas encontradas na literatura científica	36
1.6. CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	36
1.6.1. Adequação do sistema por CLAE	39
1.6.1.1. <i>Fator de retenção ou Fator de capacidade (K)</i>	40
1.6.1.2. <i>Número de pratos teóricos ou eficiência (N)</i>	41
1.6.1.3. <i>Fator de seletividade ou fator de separação (α)</i>	42
1.6.1.4. <i>Resolução (R)</i>	43
1.6.1.5. <i>Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria do pico (As)</i>	44
1.6.1.6. <i>Desvio padrão relativo (DPR)</i>	44
2. OBJETIVOS	46
2.1. OBJETIVO GERAL	46
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. METODOLOGIA	47
3.1. AMOSTRAGEM	47
3.2. EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES	47
3.2.1. Equipamentos	47
3.2.2. Materiais e reagentes	48
3.3. OTIMIZAÇÃO DO DILUENTE DA RIFAMPICINA	49
3.4. FORMAÇÃO COMPLEXO METAL-ETAMBUTOL E SUA ABSORÇÃO NO UV	50

3.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO	51
3.5.1. Verificação da Adequação do Sistema Cromatográfico	53
3.6. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO	53
3.6.1. Determinação da Linearidade	54
3.6.1.1. <i>Preparo da curva de calibração</i>	54
3.6.1.2. <i>Preparo da solução estoque de INH, PYA, RMP e EMB</i>	54
3.6.1.3. <i>Preparo da solução de trabalho de INH, PYA, RMP e EMB</i>	55
3.6.1.4. <i>Avaliação da curva de calibração</i>	55
3.6.2. Determinação da Precisão	55
3.6.2.1. <i>Determinação da Repetibilidade</i>	56
3.6.2.2. <i>Preparo da solução de trabalho do comprimido</i>	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. ANÁLISE CRÍTICA DAS METODOLOGIAS OFICIAIS	57
4.2. CONTROLE DA ESTABILIDADE DA RMP	65
4.3. FORMAÇÃO COMPLEXO METAL-ETAMBUTOL E SUA ABSORÇÃO NO UV	78
4.4. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA	82
4.5. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO	89
4.5.1. Determinação da Linearidade	89
4.5.1.1. <i>Avaliação da curva de calibração da INH</i>	91
4.5.1.2. <i>Avaliação da curva de calibração da PYA</i>	91
4.5.1.3. <i>Avaliação da curva de calibração da EMB</i>	92
4.5.1.4. <i>Avaliação da curva de calibração da RMP</i>	92
4.5.2. Determinação da Precisão	93
4.5.2.1. <i>Determinação da Repetibilidade</i>	93
5. CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS	101
APÊNCICE A	106
APÊNCICE B	107
APÊNCICE C	108
APÊNCICE D	109

1. INTRODUÇÃO

1.1. TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta principalmente os pulmões, podendo também atingir outros órgãos do corpo, como os rins, meninges (membranas que envolvem o cérebro), gânglios, intestinos, ossos, ou outros locais do organismo. É causada por uma bactéria em forma de pequenos bastões cujo nome científico é *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK), em homenagem ao seu descobridor, o cientista alemão Robert Koch. Outras espécies de micobactérias também podem causar a tuberculose, são elas: *Mycobacterium bovis*, *M. africanum* e *M. microti* (BASTOS, 2006; BRASIL, 2002; REDE TB, 2012).

A transmissão direta ocorre através do ar quando uma pessoa inala pequenas gotas de saliva, contendo o BK, expelidas por um indivíduo acometido pela TB pulmonar ao falar, tossir ou espirrar. A transmissão da doença só ocorre pelo ar, não se transmite TB pelo uso comum de pratos, talheres, roupas de cama, toalhas e vaso sanitário, nem pelo contato com o sangue ou secreções sexuais. Contudo, a má alimentação, falta de higiene, tabagismo, alcoolismo, pessoas imunodepressivas, como portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), diabetes, insuficiência renal crônica, favorece o estabelecimento da doença (FURTADO, 2010; BRASIL, 2002; SECRETARIA DA SAÚDE, 2010; REDE TB, 2012).

Normalmente, a doença se manifesta através dos seguintes sintomas: inicialmente tosse seca contínua, seguida de tosse com secreção por mais de quatro semanas, transformando-se, na maioria das vezes, em tosse com pus ou sangue; fadiga excessiva; febre baixa geralmente à tarde; sudorese noturna; falta de apetite; palidez; emagrecimento acentuado; rouquidão; fraqueza; e prostração. Nos casos graves, ocorre dificuldade na respiração, eliminação de grande quantidade de sangue, colapso do pulmão e acúmulo de pus na pleura (membrana que reveste o pulmão), caso haja comprometimento dessa membrana, pode ocorrer dor torácica (BRASIL, 2005; REDE TB, 2012).

Para a prevenção da doença devem-se evitar aglomerações, especialmente em ambientes fechados, mal ventilados e sem iluminação solar, além da imunização

das crianças de 0 a 4 anos, obrigatoriamente as menores de 1 ano, com a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin). Para as crianças que chegam aos postos de atendimento ainda não vacinadas, a vacina está contraindicada na existência de sintomas ou sinais de imunodeficiência (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2012).

Com a evolução do estudo da doença, as nações desenvolvidas acreditavam que no final do século XX a TB estaria erradicada ou confinada aos países pobres. Entretanto, com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em 1981, ocorreu um aumento no número de casos notificados de TB em pessoas infectadas pelo VIH. Além disso, os intensos movimentos migratórios populacionais, o desmantelamento dos sistemas de saúde pública, a crise social/financeira mundial, o empobrecimento da população, a urbanização caótica e a ausência de controle social vêm dificultando o controle da doença (CONDE, SOUZA, KRITSKI, 2002; SECRETARIA DA SAÚDE, 2010).

A TB continua sendo um importante problema de saúde mundial, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle, considerando os aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública, merecendo atenção dos profissionais de saúde e da sociedade como um todo (BRASIL, 2011).

1.2. O CONTROLE DA TUBERCULOSE

A manutenção da tuberculose como um problema de saúde pública faz com que novas respostas devam ser pensadas no sentido de promover a igualdade, garantindo o acesso aos pacientes, visando não apenas o seu atendimento e bem-estar, mas, em sentido mais amplo, a consolidação do Sistema Único de Saúde (SUS) em suas diretrizes (BRASIL, 2011). A integralidade no SUS, em especial a garantia ao acesso, é assegurada pela Constituição Federal, no artigo 196:

“a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação”.

A criação da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) na atual estrutura do Ministério da Saúde (MS) vem reestruturar o combate à TB uma vez que une todas as ações de vigilância, controle e prevenção, possibilitando a integração entre vários programas.

O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) está integrado na rede de Serviços de Saúde. É desenvolvido por intermédio de um programa unificado, executado em conjunto pelas esferas federal, estadual e municipal. Está subordinado a uma política de programação das suas ações com padrões técnicos e assistenciais bem definidos, garantindo desde a distribuição gratuita de medicamentos e outros insumos necessários até ações preventivas e de controle do agravo. Isto permite o acesso universal da população às suas ações (BRASIL, 2002a).

Em 1993, a OMS declarou a TB como uma emergência global de saúde pública e passou a recomendar a Estratégia de Tratamento Diretamente Observado (DOTS-*Direct Observed Treatment Strategy*) para o controle da doença. Em 1996, o MS lançou o Plano Emergencial para o Controle da Tuberculose, recomendando a implantação do DOTS para o controle da doença no Brasil, sendo oficializado em 1999 através do PNCT. Esta estratégia pode ser entendida como um conjunto de boas práticas para o controle da doença e está fundamentada nos componentes a seguir (BRASIL, 2012, WHO, 2009):

- Compromisso político com fortalecimento de recursos humanos e garantia de recursos financeiros, elaboração de planos de ação (com definição de atividades, metas, prazos e responsabilidades) e mobilização social;
- Diagnóstico de casos por meio de exames bacteriológicos de qualidade;
- Tratamento padronizado com a supervisão da tomada da medicação e apoio ao paciente;
- Fornecimento e gestão eficaz de medicamentos;
- Sistema de monitoramento e avaliação ágil que possibilite o monitoramento dos casos, desde a notificação até o encerramento do caso.

O DOTS constitui uma mudança na forma de administrar os medicamentos, porém sem mudanças no esquema terapêutico: o profissional treinado passa a supervisionar a ingestão do medicamento que deverá ser diária ou três vezes na semana, desde o início do tratamento até a sua cura. O paciente poderá tomar a medicação na unidade de saúde, na residência ou no trabalho. Estas escolhas deverão ser decididas pelo próprio e pela equipe de saúde. O uso de incentivos (lanche, auxílio-alimentação e outros) e facilitadores de acesso (vale-transporte) está recomendado como motivação para o tratamento. Para definir se o tratamento foi

observado, o paciente deverá ter tido no mínimo 24 ingestões observadas na fase de ataque e 48 ingestões observadas na fase de manutenção ao final do tratamento (BRASIL, 2011).

Esta estratégia continua sendo uma das prioridades para que o país atinja a meta de curar 85% dos doentes até 2015, diminuindo a taxa de abandono a menos de 5%, evitando o surgimento de bacilos resistentes e possibilitando um efetivo controle da TB (BRASIL, 2012).

Segundo o Boletim Epidemiológico (2013), em 2012 foram notificados 70.047 novos casos da doença, a taxa de incidência foi de 36,1 em 100 mil habitantes. Em 2010, foram 4,6 mil casos de morte ou 2,4 em cada 100 mil habitantes. Houve uma redução global do número de casos e de óbitos por TB, nas duas últimas décadas. De 2010 para 2011, a queda do coeficiente de incidência foi de 2,2% e o de mortalidade caiu 41% desde 1990 mesmo tendo ocorrido uma queda nos indicadores de mortalidade e de incidência, o Brasil não conseguiu alcançar a meta de cura, que foi de 71,6%. Esses indicadores colocam o Brasil em 17º lugar num ranking de 22 nações consideradas de grande circulação da doença.

No Brasil, a região norte possui a maior taxa de incidência de TB em 2012, tendo o estado do Amazonas a maior taxa. A região nordeste possui a maior taxa de mortalidade da doença, o Rio de Janeiro é o estado que possui a segunda maior taxa de incidência da doença e a maior taxa de mortalidade. As taxas de incidência e mortalidade, por região e estados, estão descritas no quadro 1 (BRASIL, 2013a).

O controle da TB é baseado na busca de casos, no diagnóstico precoce e adequado e seu tratamento até a cura, com o objetivo de interromper a cadeia de transmissão e evitar possíveis adoecimentos. Uma vez iniciado o tratamento, ele não deve ser interrompido, salvo após uma rigorosa revisão clínica e laboratorial que determine mudanças de diagnóstico (BRASIL, 2011; LOPES, 2006).

Quadro 1 - Taxas de incidência e mortalidade de TB por região e estados do Brasil.

Região e Unidade Federada	Taxa de incidência de TB em 2012 (%)	Taxa de mortalidade de TB em 2011 (%)
NORTE	45,0	2,6
Rondônia	34,5	1,6
Acre	45,5	2,4
Amazonas	67,3	3,6
Roraima	24,9	1,5
Pará	45,1	2,8
Amapá	29,2	2,3
Tocantins	13,5	1,6
NORDESTE	35,8	2,7
Maranhão	28,8	2,7
Piauí	23,6	1,7
Ceará	40,3	2,8
Rio Grande do Norte	30,4	2,3
Paraíba	29,8	2,1
Pernambuco	49,8	4,0
Alagoas	34,5	2,9
Sergipe	24,4	2,2
Bahia	35,0	2,6
SUDESTE	39,3	2,5
Minas Gerais	19,0	1,4
Espírito Santo	35,2	1,7
Rio de Janeiro	67,0	5,3
São Paulo	38,6	2,0
SUL	32,3	1,6
Paraná	20,9	1,2
Santa Catarina	29,2	1,0
Rio Grande do Sul	45,4	2,4
CENTRO-OESTE	24,6	1,4
Mato Grosso do Sul	37,7	2,3
Mato Grosso	42,3	2,0
Goiás	15,0	1,0
Distrito Federal	13,5	0,7
BRASIL	36,7	2,4

Fonte: BRASIL, 2013a.

1.3. O TRATAMENTO

O tratamento da TB é feito através do uso de antibióticos e é 100% eficaz, se realizado por um período mínimo de seis meses sem interrupção, pois os sintomas voltam e o bacilo, por sua vez, torna-se resistente aos medicamentos utilizados (BRASIL, 2002).

A melhor forma de assegurar a cura do paciente é a utilização dos princípios básicos para o tratamento, que são: associação medicamentosa adequada, doses corretas e uso por tempo suficiente, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos (BRASIL, 2011).

A resistência bacteriana em indivíduos portadores de TB surge por meio da seleção de bacilos mutantes, primariamente resistentes em um grupo. Cada grupo de bactérias tem diferentes proporções de bacilos com resistência natural aos diferentes medicamentos antiTB. A utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos simultaneamente é uma forma de se evitar a seleção de bacilos resistentes, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro (BRASIL, 2011a).

Em 2009, o PNCT junto com o seu comitê técnico assessor, reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil. Os resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos antiTB conduzido em 2007-2008, mostraram um aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4% para 6,0%) e da resistência primária a isoniazida associada a rifampicina (de 1,1 para 1,4%), quando comparadas com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado em 1995-1997. Com base nestes resultados, recomendou a inclusão do etambutol como o quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do Esquema básico, a fim de aumentar o sucesso terapêutico e evitar o aumento da multirresistência. Acrescentou ainda a apresentação de comprimidos em doses fixas combinando (DFC) os quatro fármacos (4 em 1), nas seguintes dosagens: Rifampicina 150 mg, Isoniazida 75 mg, Pirazinamida 400 mg e Etambutol 275 mg, conforme descrito no quadro 2 (BRASIL, 2008, BRASIL, 2011).

O esquema básico com quatro fármacos é indicado pela OMS, e mundialmente utilizado, apresentando excelentes resultados quanto à efetividade, em particular pela maior adesão ao tratamento. Os comprimidos de DFC possuem diversas vantagens sobre os fármacos utilizados isoladamente (monoterapia), dentre

elas, destaca-se a diminuição dos erros de prescrição porque as doses recomendadas são padronizadas pela OMS; a quantidade de comprimidos ingeridos é menor, dando maior conforto e favorecendo a adesão do paciente ao tratamento e, havendo esquecimento na ingestão do comprimido de DFC, os pacientes não podem escolher qual fármaco irão ingerir evitando assim o risco da monoterapia e o consequente desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos (o BK rapidamente se torna resistente aos fármacos quando eles são utilizados separadamente) (WHO, 2009).

Quadro 2 - Esquema básico para o tratamento da TB para adultos e adolescentes.

Fase	Fármacos	Faixa de peso	Unidade/dose
Fase intensiva 2 meses	Comprimido em dose fixa combinada (Rifampicina 150 mg, Isoniazida 75 mg, Pirazinamida 400 mg e Etambutol 275 mg)	20Kg a 35Kg 36Kg a 50Kg > 50Kg	2 comprimidos 3 comprimidos 4 comprimidos
Fase de manutenção 4 meses	Rifampicina e Isoniazida Comprimido ou cápsula de 300/200 mg ou de 150/100 mg ou comprimidos de 150/75 mg	20Kg a 35Kg	1 comprimido ou cápsula de 300/200 mg ou 2 comprimidos de 150/75 mg
		36Kg a 50Kg	1 comprimido ou cápsula de 300/200 mg + 1 comprimido ou cápsula de 150/100 mg ou 3 comprimidos de 150/75 mg
		> 50Kg	2 comprimidos ou cápsulas de 300/200 mg ou 4 comprimidos de 150/75 mg

Fonte: BRASIL, 2011.

O medicamento disponibilizado pelo MS para o tratamento da TB e distribuído pelo SUS é o comprimido de DFC de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, chamado COXCIP-4. Atualmente a produção, distribuição e

comercialização de medicamentos no país são reguladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) que tem por finalidade institucional promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos e dos insumos e das tecnologias a eles relacionadas, bem como o controle de portos, aeroportos e de fronteiras, pela Lei nº 9782 de 1999 definindo o SNVS que ainda apresenta-se em vigor (BRASIL, 1999; BUENO, 2005).

O controle sanitário dos medicamentos após a comercialização, desempenhado pela agência, conta com as vigilâncias estaduais e municipais e com o auxílio dos Laboratórios Centrais (LACEN) e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que têm como uma de suas funções a avaliação analítica de alimentos, produtos biológicos, medicamentos e produtos para saúde, para fornecer subsídios e elucidar dúvidas quanto à qualidade mínima dos produtos sujeitos à vigilância sanitária, e vem ao longo dos anos comprovando a possível ineficácia terapêutica de muitos medicamentos, levando ao recolhimento destes do mercado (SOUZA, 2011).

1.4. FÁRMACOS DO COMPRIMIDO DFC

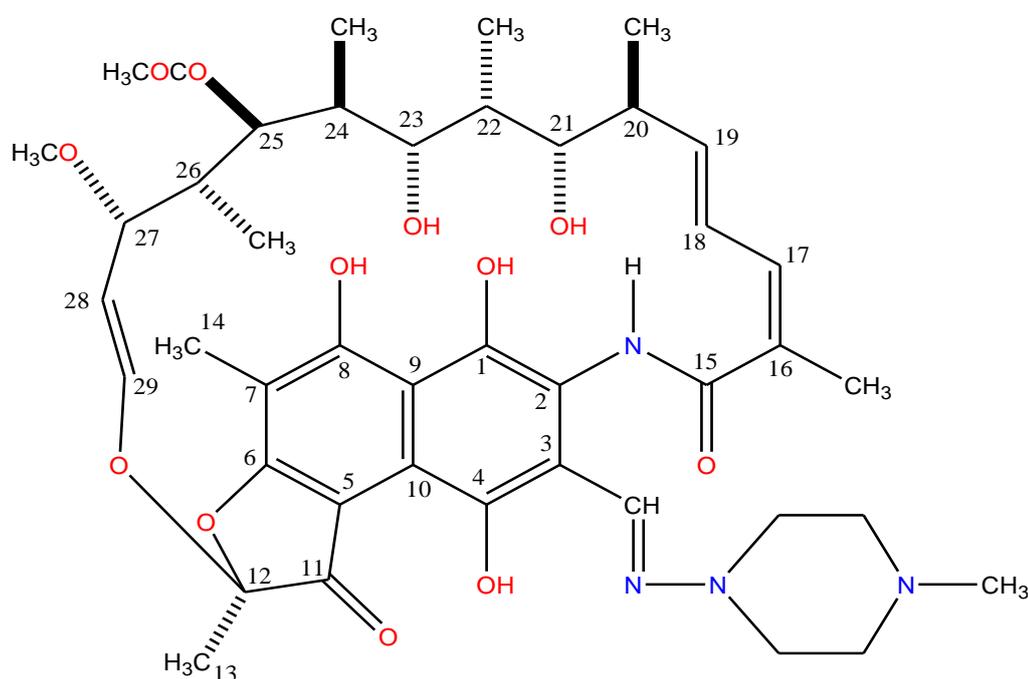
1.4.1. Rifampicina

A Rifampicina (RMP) é um antibiótico bactericida e um dos tuberculostáticos ativos mais conhecidos. É um composto semissintético produzido a partir da RMP B, obtida pela fermentação da *Streptomyces mediterranei*. A partir da sua utilização em 1966, a RMP vem sendo utilizada como um fármaco essencial no tratamento da TB, apresentando um sucesso terapêutico da ordem de 95%. O impacto e a eficácia desse fármaco no combate à TB podem ser observados pela redução do tratamento de doze para seis meses, quando combinada com a isoniazida e pirazinamida (SOUZA, 2005).

A RMP apresenta fórmula molecular $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ e massa molar de 822,94 g/mol e sua estrutura química está representada na figura 1. É um pó cristalino de cor marrom avermelhado, possui ponto de ebulição (PE) de 183 a 188°C, com decomposição. É levemente solúvel em água, etanol, acetona e solúvel em metanol e tetrahidrofurano e facilmente solúvel em clorofórmio e sulfóxido de dimetila

(DMSO). Apresenta características anfóteras com pka de 1,7 referente à hidroxila na posição 4 e pka 7,9 em função do nitrogênio no grupo piperazina. Sua solubilidade e estabilidade variam de acordo com o pH, devido à sua natureza anfótera. A máxima estabilidade da RMP é verificada em soluções com pH próximo da neutralidade. A adição de ácido ascórbico à solução aumenta a solubilidade da RMP e diminui a sua oxidação (GALLO, RADAELLI, 1976; CONNORS, AMIDON, STELLA, 1986).

Figura 1 - Estrutura da Rifampicina.



Em solução alcalina, com presença de oxigênio à temperatura ambiente, a RMP se oxida e se transforma em rifampicina quinona (RQ), representada na figura 2. Sano e colaboradores (1970) realizaram um estudo com solução de RMP em diferentes valores de pH, onde verificaram que ela se decompõe rapidamente tanto em meio alcalino quanto em meio ácido, à temperatura ambiente. E em meio neutro ela se decompõe lentamente. Em meio ácido o produto de decomposição da RMP é a 3-formilrifampicina (3-RF), sua estrutura está representada na figura 3 (GALLO, RADAELLI, 1976).

Figura 2 – Estrutura da rifampicina quinona.

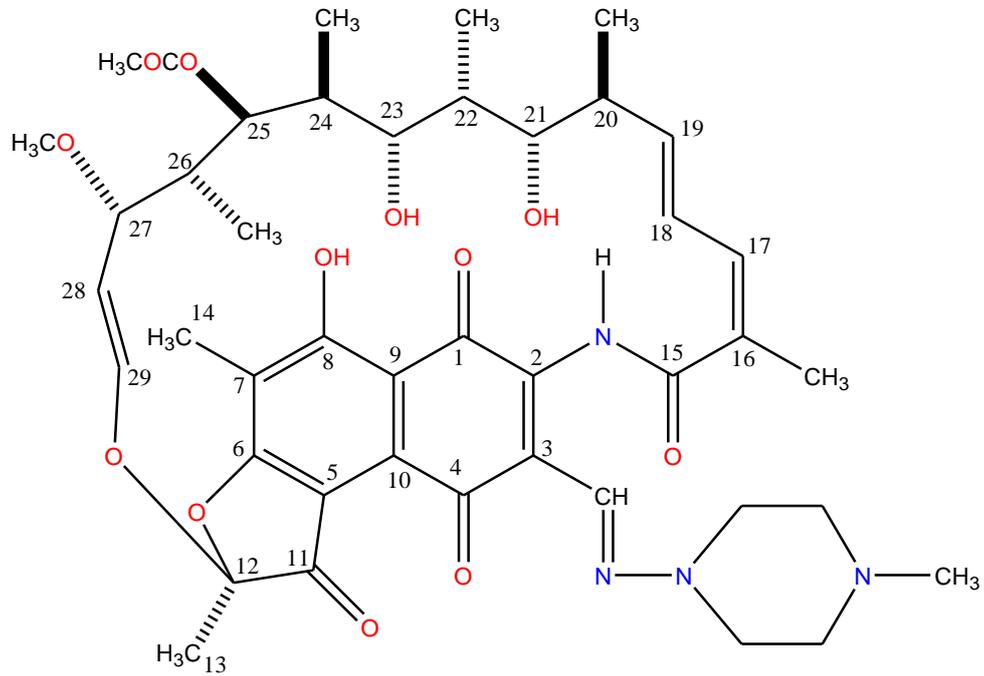
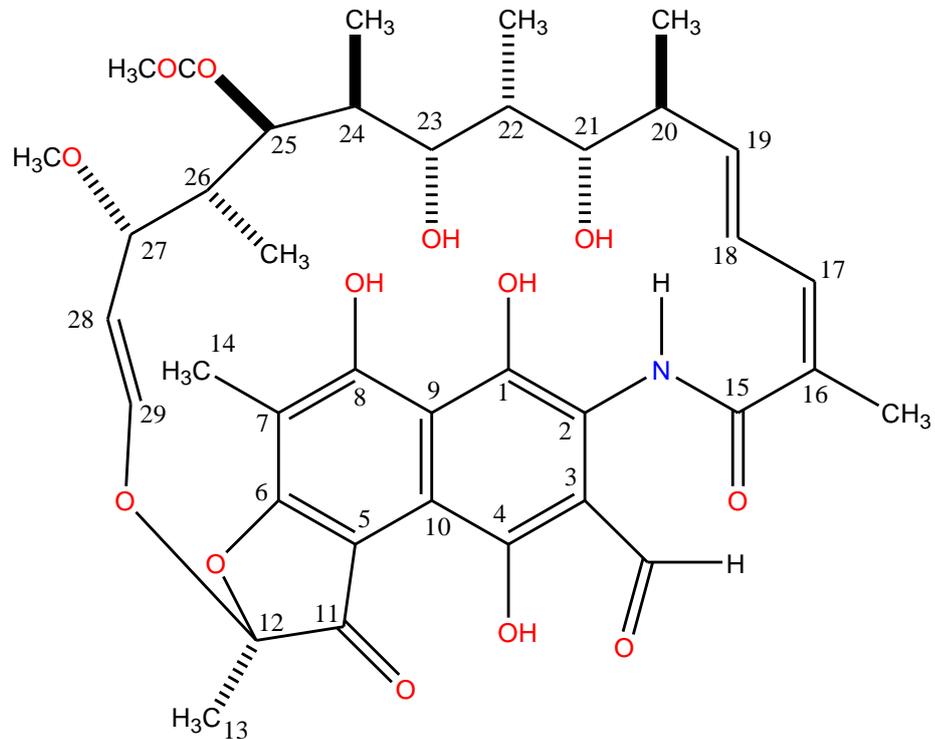


Figura 3 – Estrutura da 3- formilrifampicina.



Em meio alcalino, com temperaturas de 60 a 70 °C, a RMP se degrada formando a 25-desacetil-rifampicina (figura 4), podendo ainda se transformar em 25-desacetil-23-acetil-rifampicina (figura 5) e em 25-desacetil-21-acetil-rifampicina (figura 6) (GALLO, RADAELLI, 1976).

Figura 4 – Estrutura da 25-desacetil-rifampicina.

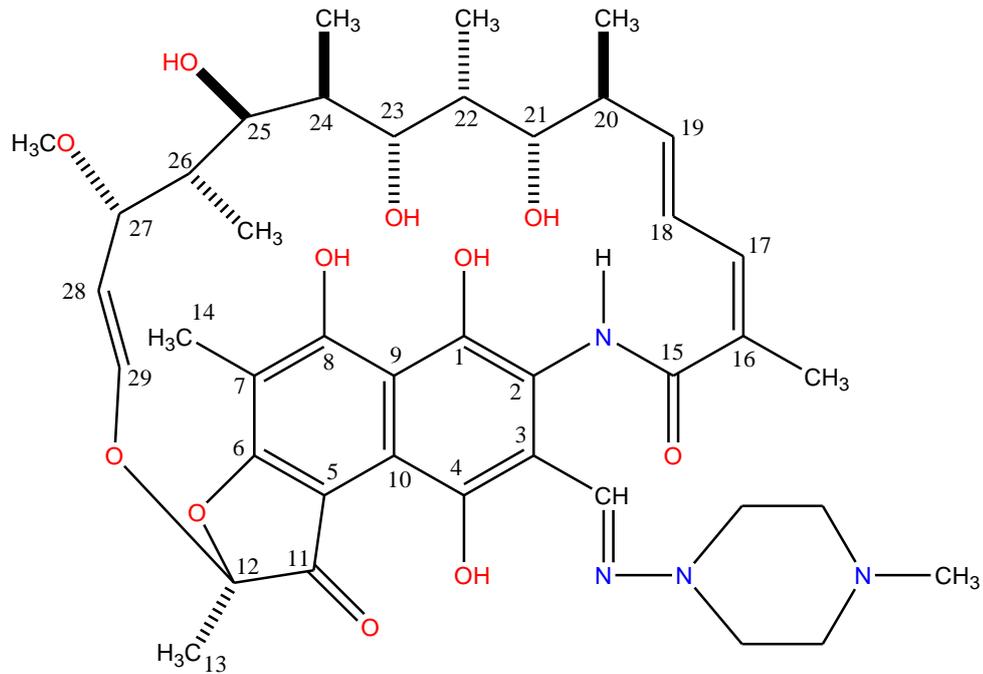


Figura 5 – Estrutura da 25-desacetil-23-acetil-rifampicina.

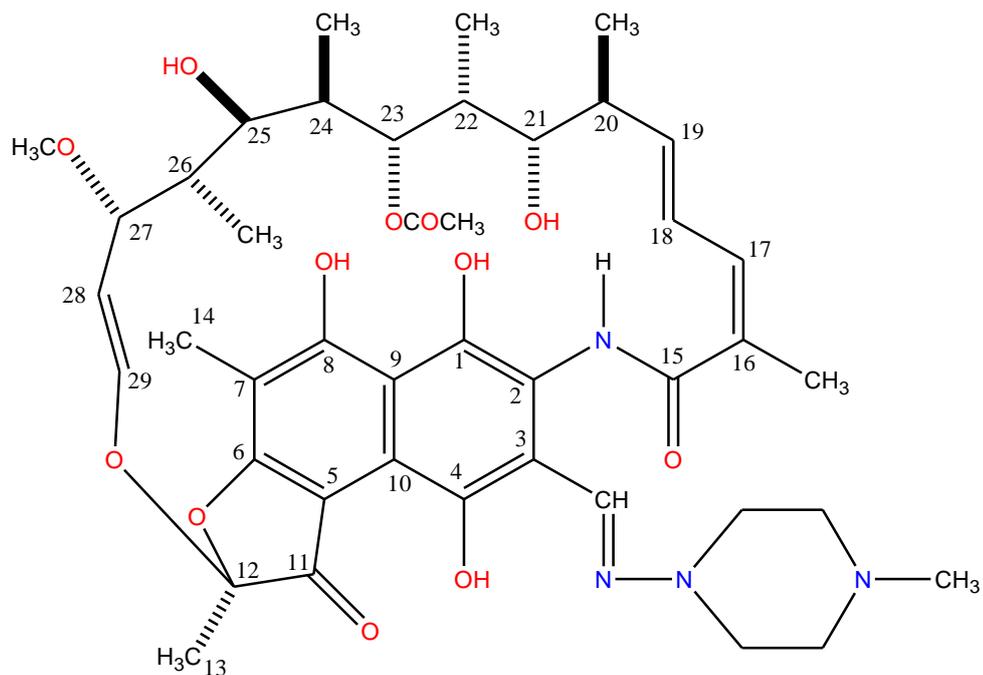
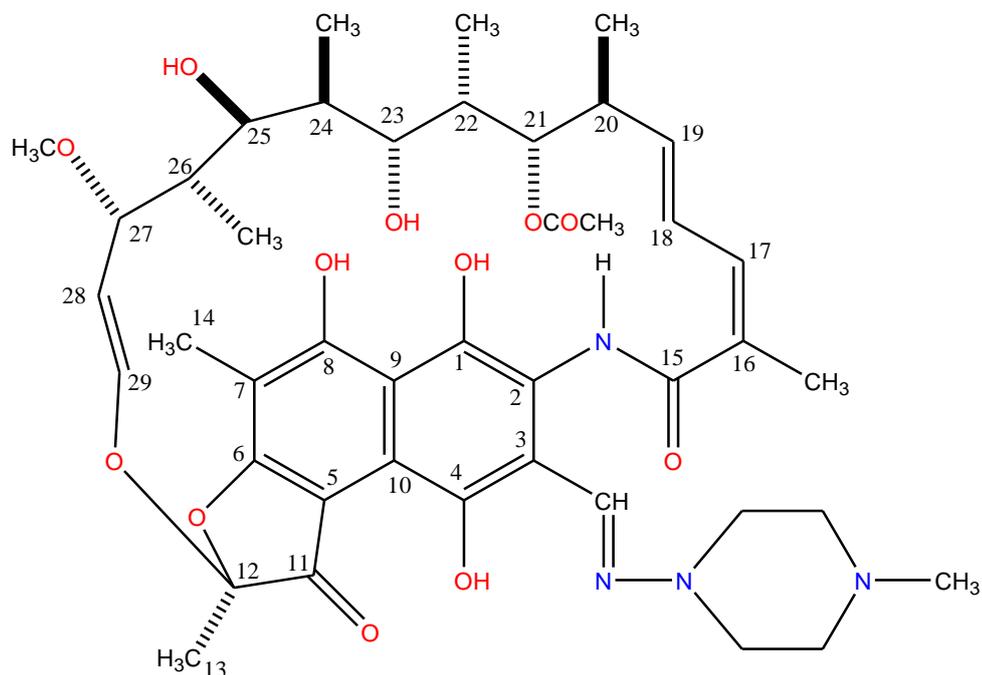


Figura 6 – Estrutura da 25-desacetil-21-acetil-rifampicina.

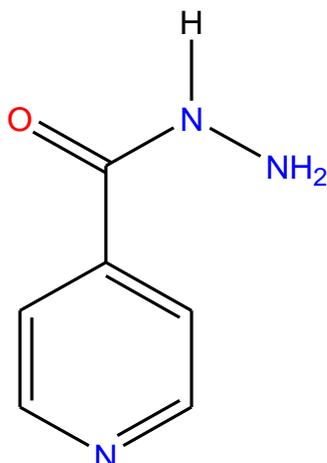


1.4.2. Isoniazida

A Isoniazida (INH) é um derivado sintético do ácido isonicotínico. Possui ação bacteriostática, nos bacilos em repouso, e bactericida, para microrganismos em rápida divisão, como nos bacilos intracelulares (BASTOS, 2006). É considerado um fármaco de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de tuberculose. Devido à sua resistência, deve estar associada simultaneamente com outros tuberculostáticos. Se não houver contra-indicação ou resistência ao medicamento, ela é incluída em todos os esquemas terapêuticos (KATZUNG, 2005).

Sua estrutura química ($C_6H_7N_3O$) está representada na figura 7 e apresenta massa molar de 137,14 g/mol. É um pó cristalino branco ou incolor, possui um PE de 170 a 174°C. É facilmente solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol, pouco solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em éter. Seus valores de pka são 2,0 e 3,5 (BREWER, 1977; MERCK, 2006).

Figura 7 - Estrutura da Isoniazida.



A estabilidade da INH foi estudada extensivamente em solução e em várias preparações farmacêuticas. Poole e Meyer (1960 apud BREWER, 1977), relataram que a INH é estável durante várias semanas em soluções aquosas tamponadas a valores de pH abaixo de 8.

Segundo Bhutani e colaboradores (2007), a INH é um fármaco termicamente estável, pouco instável à fotólise e oxidação, porém quando submetida a uma hidrólise energética forma seus produtos de degradação principais, que são o ácido isonicotínico (figura 8) e a isonicotinamida (figura 9). A degradação de INH em meio ácido (HCl 0,1%) acarreta na geração de ácido isonicotínico. Tanto o aquecimento em água, quanto a adição de peróxido de hidrogênio resultam na formação de ácido isonicotínico e isonicotinamida.

Figura 8 – Estrutura do ácido isonicotínico.

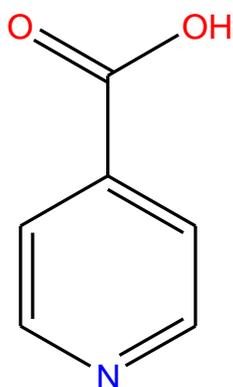
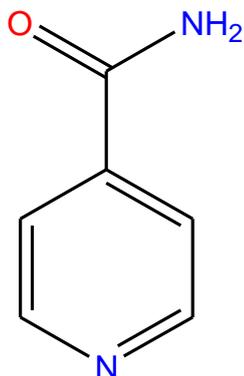


Figura 9 – Estrutura da isonicotinamida.



Lewin e Hirsch (1955 apud BREWER, 1977) notaram que os íons Mn^{2+} e Cu^{2+} aceleram a degradação de isoniazida, na presença de peróxido de hidrogênio.

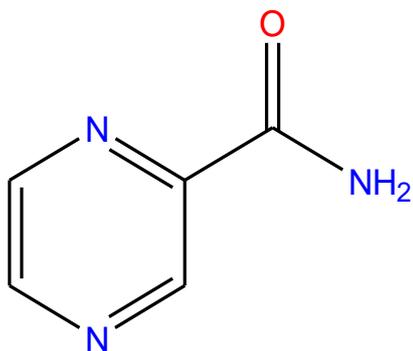
Inoue e Ono estabeleceram a cinética da degradação da isoniazida na presença de Mn^{+2} . Inoue demonstrou o efeito da presença de íons de Cu^{2+} sobre a taxa de oxidação de INH em solução. Os produtos da reação foram o ácido isonicotínico, isonicotinamida, 1,2-diisonicotinoílo hidrazona, isonicotine-carboxaldeído e isonicotinoílo hidrazona (1971 apud BREWER, 1977).

1.4.3. Pirazinamida

A Pirazinamida (PYA) é uma amida primária derivada do ácido pirazinóico e sua síntese foi descrita pela primeira vez em 1936. A introdução da PYA no esquema terapêutico possibilitou a redução do tempo de tratamento de doze para seis meses. Por isso, é considerada o terceiro fármaco mais importante no tratamento da TB (LIMA; BISPO; SOUZA, 2011).

É um antibiótico bactericida, com fórmula molecular $C_5H_5N_3O$, massa molar de 123,1 g/mol e sua estrutura está representada na figura 10. É um pó cristalino branco ou quase branco, possui um PE de 189 a 191°C. É ligeiramente solúvel em água e pouco solúvel em etanol, éter e clorofórmio. Seu valor de pka é de 0,5 (LOUTFY; ABOUL-ENEIN, 1983; MERCK, 2006).

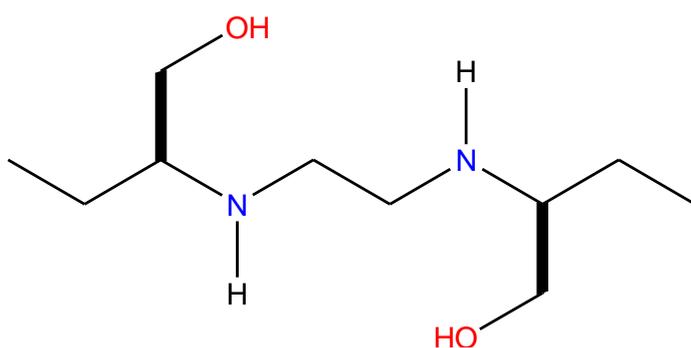
Figura 10 - Estrutura da Pirazinamida.



1.4.4. Etambutol

O Etambutol (EMB) é utilizado no comprimido na forma de cloridrato de etambutol. É um antibiótico bactericida, com fórmula molecular $C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$, massa molar de 277,2 g/mol e sua estrutura está representada na figura 11. É um pó cristalino branco, higroscópico e inodoro, possui um ponto de fusão (PF) de 199 a 204°C. É facilmente solúvel em água, solúvel em etanol e metanol, pouco solúvel em clorofórmio e praticamente insolúvel em éter etílico (LEE, BENET, 1976).

Figura 11 - Estrutura do Etambutol.



1.5. ANÁLISE DO COMPRIMIDO DE DFC

1.5.1. Metodologias analíticas de compêndios oficiais

As farmacopeias que apresentam metodologias de análise para dosagem dos quatro fármacos presentes no comprimido de DFC são a Farmacopeia Americana (USP) 36^a edição (2013) e a Farmacopeia Internacional (Ph. Int.) 4^a edição (2011). A Farmacopeia Brasileira (FB) 5^a edição (2010) possui metodologia para análise dos fármacos individualmente. Portanto, nenhum destes compêndios possui metodologias para análise simultânea dos quatro fármacos.

A USP recomenda o uso de uma metodologia para a dosagem dos fármacos nos comprimidos 4 em 1 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de Ultravioleta (UV), onde a determinação do teor de RMP, INH, PYA é realizada separadamente da determinação do EMB. Na Ph. Int. a metodologia para a determinação do teor de INH, PYA e EMB é realizada separadamente da determinação da RMP. Os diluentes para a análise de RMP só diferem nas proporções: o diluente da USP usa 96:4 e o da Ph. Int. usa 60:40 da mistura tampão fosfato pH ~ 7 e metanol, respectivamente.

A técnica de análise da RMP, INH e da PYA na USP baseia-se em uma eluição por gradiente utilizando duas misturas nas proporções de tampão fosfato, pH 6,8 e metanol em fase octadecilsilano. A análise do EMB é realizada numa coluna propilamina, utiliza-se um método isocrático com fase móvel contendo uma mistura de acetonitrila e solução de trietilamina pH 7,0 (50:50). A leitura é efetuada em um comprimento de onda de 200 nm (USP 36-NF31, 2013).

Na Ph. Int., o método de análise da INH, PYA e EMB utiliza-se fase móvel contendo uma solução de acetato de amônio e acetato de cobre pH 5,0 e metanol (94:6) em um método isocrático em fase de octadecilsilano, a leitura é efetuada em um comprimento de onda de 270 nm. Já a análise da RMP é realizada em um comprimento de onda de 254 nm, em fase de sílica, com 5 µm de diâmetro de partícula, derivatizada com octadecilsilil, com o método isocrático (FARMACOPEIA INTERNACIONAL, 2011).

As diferentes características instrumentais entre estas metodologias estão descritas para melhor entendimento no quadro 3.

Quadro 3 – Métodos de análise para RMP, INH, PYA e EMB apresentados nas Farmacopeias Americana e Internacional.

	SUBSTÂNCIAS	ENSAIO	SUBSTÂNCIAS	ENSAIO
FARMACOPEIA AMERICANA (USP 36 – NF31, 2013)	Rifampicina	Coluna: C18 25cm x 4,6mm x 5µm	Etambutol	Coluna: Propilamina 15cm x 4,6mm x 5µm
		Detector: UV (238 nm)		Detector: UV (200 nm)
		Fluxo: 1,5 mL/min		Fluxo: 1,0 mL/min
		Volume de injeção: 20µL		Volume de injeção: 100µL
	Isoniazida	Diluyente: 96% tampão fostato (pH=6,8) + 4% metanol		Diluyente: tampão fostato pH=6,8
		Fases Móveis: A) tampão fostato pH=6,8:acetonitrila (96:4); B) acetonitrila:tampão fostato pH=6,8 (55:45)		Fases Móveis: acetonitrila + solução de trietilamina pH=7,0 (50:50)
Pirazinamida	Gradiente de eluição: Tempo Solução A Solução B 0 min 100% 0% 5 min 100% 0% 6 min 0% 100% 15 min 0% 100%	Método de eluição: isocrático		
FARMACOPEIA INTERNACIONAL (4ª Edição, 2011)	Isoniazida	Coluna: C18 15cm x 4,6mm x 5µm	Rifampicina	Coluna: C18 25cm x 4,6mm x 5µm
		Detector: UV (270 nm)		Detector: UV (254 nm)
		Fluxo: 2,0 mL/min		Fluxo: 1,0 mL/min
		Volume de injeção: 20µL		Volume de injeção: 20µL
	Pirazinamida	Diluyente: água		Diluyente: metanol:tampão fostato pH=7,0 (4:6)
		Fase Móvel: solução de acetato de amônio e acetato de cobre pH=5,0:metanol (94:6)		Fase Móvel: metanol + tampão fostato pH=7,0
Etambutol	Método de eluição: isocrático	Método de eluição: isocrático		

1.5.2. Metodologias analíticas encontradas na literatura científica

Foi feita uma busca em artigos e dissertações com o objetivo de fazer uma revisão bibliográfica para encontrar metodologias de análise para os quatro fármacos simultaneamente. Não foi encontrada nenhuma metodologia que permitisse a determinação simultânea dos quatro princípios ativos.

Heyden e colaboradores (2012) otimizaram um método de análise por cromatografia de alta performance de camada fina em fase reversa (RP-HPTLC). Este método consiste em duas etapas, na primeira foram analisadas a PYA, INH e a RMP por UV em um comprimento de onda de 280 nm. Já na segunda etapa, o EMB foi derivatizado com Ninhidrina, e a leitura desta solução foi realizada no Visível a 450 nm. Neste trabalho, foram testadas várias fases móveis com água e álcool (metanol, etanol e propan-1-ol), onde a fase móvel que obteve uma boa eluição dos picos foi: etanol, água, ácido acético e amônia na proporção 70:30:5:1 v/v. Apesar da boa eluição dos picos concluiu-se que seria necessário definir a melhor proporção do etanol na fase móvel, assim como as melhores condições cromatográficas a serem utilizadas durante a fase de validação.

Lima e colaboradores (2011) realizaram a análise de dissolução dos quatro fármacos através da técnica por espectroscopia por infravermelho próximo (NIRS). O método proposto foi eficaz e não destrutivo além de alternativo à técnica de cromatografia, a mais usual para esta finalidade.

Calleri e colaboradores (2001) validaram um método de análise para a INH, PYA e RMP por cromatografia a líquido de fase reversa (RP-LC) em comprimidos de doses combinadas para tuberculose. Foi utilizada uma coluna C18 de fase reversa com detector de arranjo de diodos com fase móvel gradiente.

1.6. CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE surgiu como uma alternativa para a cromatografia líquida tradicional, pois possibilitou a redução do tempo de análise através de colunas com micropartículas de propriedades controladas de pureza, área superficial, distribuição de tamanho e poro. As principais características da CLAE são o alto

poder de resolução, separações rápidas, monitoramento contínuo do eluente, acurácia das medidas quantitativas (SKOOG, 2002).

A CLAE é uma técnica de separação dos componentes de uma mistura entre duas fases: a fase móvel, líquida e a fase estacionária, sólida. As separações são feitas por partição, adsorção ou processos de troca iônica, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição e devem ocorrer em um tempo curto de análise. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, os quais dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e vazão da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de impulsionar a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um *software*, integrador ou registrador. Além de receber e enviar informações para o detector, *softwares* são utilizados para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística de análise (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Após dissolver a amostra na fase móvel ou em outro solvente adequado, a solução é injetada no sistema cromatográfico, de forma manual, utilizando seringa apropriada, ou por meio de um injetor ou amostrador automático (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os analitos da amostra são retidos, seletivamente, na fase estacionária resultando em migrações em tempos diferentes, definidas pela maior ou menor afinidade da amostra com a fase móvel ou com a fase estacionária. Sistemas que consistem de fases estacionárias polares e fases móveis apolares são definidos como cromatografia em fase normal, enquanto o oposto, fases móveis polares e fases estacionárias apolares, são denominados de cromatografia em fase reversa (VOGEL, 2002).

A separação ocorre na coluna cromatográfica que, normalmente, é feita de aço inoxidável com dimensões variadas de comprimento e diâmetro interno, tendo

sua durabilidade de aplicação aumentada através da utilização de pré-colunas específicas que removem materiais particulados e contaminantes. A fase estacionária se encontra acondicionada dentro da coluna, o diâmetro das partículas é de 3 μm a 10 μm . Quanto menor o diâmetro da partícula, mais rápida e eficiente será a transferência das substâncias entre as fases estacionárias e móveis. A polaridade da coluna depende dos grupos funcionais presentes, sendo os mais comuns os grupos apolares octil, octadecil, fenil, cianopropil e polar, nitrila. As colunas usadas para separações analíticas têm diâmetros internos de 1 mm a 5 mm. Essas podem ser aquecidas, proporcionando separações mais eficientes, mas só raramente são utilizadas temperaturas superiores a 60°C, devido ao potencial de degradação da fase estacionária ou à volatilidade da fase móvel (VOGEL, 2002; LANÇAS, 2009; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Os componentes da amostra eluídos na coluna são detectados para poderem ser identificados e quantificados. O detector emite sinal informativo a ser descrito pelo registrador, integrador, ou também chamado, sistema de aquisição de dados, e que também controla as condições cromatográficas. Existem diferentes tipos de detectores com aplicações distintas em cromatografia líquida e são exemplos o detector de ultravioleta-visível (UV-VIS), o detector de fluorescência, o detector de arranjo de diodos e o detector de índice de refração (LANÇAS, 2009; VOGEL, 2002).

Os detectores UV-VIS são utilizados para detectar compostos com grupamento cromóforo. Tais detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta atravessa, constantemente, a célula de fluxo e é recebida no detector. Com o sistema em funcionamento, as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de detector e absorvem a radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia. Esses detectores podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, tipicamente 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Aqueles com comprimento de onda variável contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio de alta pressão, e um monocromador ou um filtro de interferência, de modo a gerar radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo, ainda, ser

programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1.6.1. Adequação do sistema por CLAE

Uma separação cromatográfica é otimizada com a variação das condições experimentais até que os componentes de uma mistura sejam claramente separados com consumo mínimo de tempo. Os parâmetros de otimização visam à redução do alargamento de zona ou alteração das velocidades relativas de migração dos componentes (SKOOG, 2002).

Os testes de adequabilidade do sistema são parte integrante dos métodos de cromatografia líquida. São aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas. Os principais parâmetros necessários para a verificação de adequabilidade do sistema são: fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de seletividade, resolução, fator de cauda e desvio padrão relativo entre as replicatas. Estes testes são baseados no conceito de que os equipamentos, as operações analíticas e as amostras para análise constituem um sistema integral que devem ser avaliados como um todo (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; USP36 NF31, 2013).

Os parâmetros e seus limites recomendados para garantir a adequação do sistema cromatográfico conforme a Farmacopeia Americana encontram-se apresentados no quadro 4.

Quadro 4 - Critérios de aceitabilidade para os parâmetros de adequação da separação cromatográfica segundo a USP.

Parâmetros de adequação	Critério de aceitabilidade
Fator de retenção (k)	$K > 2$
Nº de pratos teóricos (N)	Em geral $N > 2000$
Resolução (R)	$R > 2,0$
Fator de cauda (FC)	$FC < 2$
Repetibilidade (DPR)	DPR $< 2\%$ (para $n \geq 5$)

Fonte: USP, 2013.

1.6.1.1. Fator de retenção ou fator de capacidade (K)

O fator de retenção ou fator de capacidade (K) é um parâmetro importante, amplamente utilizado para descrever as velocidades de migração dos solutos nas colunas. É a razão entre a quantidade do soluto com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel. Quanto maior a afinidade do soluto pela fase estacionária, maior a sua retenção, sendo numericamente definido pela equação 1 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

$$K = \frac{V_r - V_0}{V_0} \quad \text{ou} \quad K = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Sendo:

V_r = volume do analito

V_0 = volume morto

t_r = tempo de retenção do analito

t_0 = tempo morto ou tempo de permanência do analito na fase móvel

Para determinar o fator de retenção faz-se necessário calcular o volume “morto” (V_0) referente à coluna, que é o volume compreendido entre o injetor e o detector incluindo a coluna. As equações 2 e 3 correlacionam o volume interno da coluna vazia (V_i) com o V_0 da coluna e o diâmetro da partícula de seu preenchimento (RIO, 2011).

$$V_i = \pi R^2 C \quad (2)$$

$$V_0 = (0,5 \text{ ou } 0,7) \times V_i \quad (3)$$

Sendo:

$$\pi = 3,14159\dots$$

R = raio interno da coluna

C = comprimento da coluna

0,5 e 0,7 são fatores matemáticos para tamanho de partícula igual a 5 μ m e 10 μ m, respectivamente.

Devem-se evitar valores de retenção (K) próximos ao V_0 pois, neste caso, ocorrerá pouca interação do composto analisado com a fase estacionária podendo ocorrer a coeluição com um outro componente da amostra. Da mesma forma, não se deve trabalhar com valores excessivamente altos de retenção, porque isto fará com que ocorra o alargamento dos picos. Idealmente, o valor de (K) deveria variar entre 1 e 20 (RIO, 2011).

Na cromatografia líquida, os fatores de retenção podem ser manipulados para fornecer melhores separações por meio da variação da composição das fase móvel e fase estacionária (SKOOG, 2002).

1.6.1.2. *Número de pratos teóricos ou eficiência (N)*

Número de prato teórico é definido como um equilíbrio de distribuição do soluto entre as duas fases. Dois termos são largamente utilizados para expressar a eficiência de uma coluna cromatográfica: altura equivalente a um prato teórico (H) e números de pratos teóricos (N), estes termos estão relacionados na equação 4:

$$N = \frac{L}{H} \quad (4)$$

Sendo:

L é o comprimento da coluna.

A equação 5 também é usada para o cálculo do número de pratos teóricos. Os cálculos que usam a largura à meia altura do pico são mais confiáveis, já que o erro na medida da largura do pico na meia altura é menor que a medida da largura do pico na linha de base (RIO, 2011).

$$N = 16(Vn/W)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54(Vn/W^{1/2})^2 \quad (5)$$

Sendo:

V_n = Volume de eluição do pico

W = Largura do pico na linha de base

$W^{1/2}$ = Largura do pico na meia altura

O número de pratos teóricos será maior à medida que se diminui a altura de um prato teórico. Quanto maior for o número de pratos teóricos, maior será a eficiência da coluna, melhor será a separação (LANÇAS, 2009; SKOOG, 2002).

1.6.1.3. Fator de seletividade ou fator de separação (α)

O fator de seletividade (α) é a relação existente entre o tempo que dois solutos passam pela fase líquida. O fator de seletividade de uma coluna para as duas espécies A e B é expresso pela equação 6.

$$(\alpha) = \frac{K_B}{K_A} \quad (6)$$

Sendo:

K_B é a constante de distribuição da espécie mais retida (B)

K_A é a constante de distribuição da espécie menos retida (A), ou que elui mais rapidamente.

Quanto maior o valor de α , mais seletiva será a fase líquida e, portanto, uma melhor separação das espécies será alcançada (SKOOG, 2002; LANÇAS, 2009).

1.6.1.4. Resolução (R)

A resolução da coluna é uma medida quantitativa da separação de dois picos consecutivos, determinada por dois fatores: a distância entre seus tempos de retenção e a largura da base, conforme a equação 7 (LANÇAS, 2009).

$$R = \frac{2 (Tr)_A - (Tr)_B}{(W_A + W_B)} \quad (7)$$

Sendo:

Tr_A é o tempo de retenção da espécie A

Tr_B é o tempo de retenção da espécie B

W_A é a largura da base da espécie A

W_B é a largura da base da espécie B.

A resolução também pode ser calculada a partir das larguras dos picos na meia altura e seus respectivos tempo de retenção, pela equação (8) abaixo:

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2} (W_1 + W_2)} \quad (8)$$

Sendo:

t_2 e t_1 = tempo de retenção de dois picos

W_2 e W_1 = Largura dos picos na meia altura

Uma resolução de 1,5 permite a separação quase completa de dois componentes, a sobreposição dos sinais cromatográficos nestes casos é de aproximadamente 0,1%. Alongar a coluna pode ser uma saída para melhorar a resolução, pois aumentaria o número de pratos teóricos, porém, a adição de pratos teóricos aumentaria o tempo necessário para a separação, o que não é desejável (SKOOG, 2002).

1.6.1.5. Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria do pico (As)

Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria (As) do pico indica a assimetria do pico. À medida que a assimetria do pico aumenta, a integração e a precisão se tornam menos confiáveis. O fator de cauda é calculado a 5% da altura do pico, conforme a equação 9 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

$$FC = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (9)$$

Sendo:

$W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura

f = distância da linha vertical do sinal máximo até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a cinco por cento da altura.

1.6.1.6. Desvio padrão relativo (DPR)

O desvio padrão relativo das replicatas (DPR) é o parâmetro da adequação do sistema que mede a repetibilidade do método analítico entre as injeções da mesma amostra contida no mesmo frasco, podendo ser calculado conforme a equação 10.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (10)$$

Sendo:

DPR = desvio padrão relativo

DP = desvio padrão das replicatas

CMD = concentração média determinada

O medicamento usado no tratamento da TB é distribuído gratuitamente pelo SUS, portanto, do ponto de vista da Vigilância Sanitária é importante que o monitoramento desses medicamentos seja feito de forma rápida, segura e confiável através do emprego de métodos analíticos adequados e validados para a garantia da qualidade destes fármacos.

Devido à falta de um método de análise simultânea dos quatro fármacos do comprimido utilizado no tratamento da TB, tanto em compêndios oficiais quanto em metodologias da literatura científica, este estudo propõe o desenvolvimento de um único método analítico que avalie simultaneamente os quatro fármacos, que será de grande valia para o controle da qualidade deste produto devido à redução do tempo de análise e dos gastos com solventes e conseqüentemente da redução do custo da análise.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método de análise para a determinação simultânea do teor de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol em comprimidos 4 em 1, utilizados no tratamento da TB.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise crítica das metodologias oficiais;
- Otimizar a solução diluente para obter maior estabilidade da rifampicina;
- Formar complexo metal-etambutol alterando as propriedades da absorção do etambutol na região UV;
- Determinar e avaliar os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico no desenvolvimento do método;
- Avaliar os parâmetros linearidade e precisão (repetibilidade) do método desenvolvido de acordo com os critérios e normas sobre validação analítica da Anvisa e do Inmetro.

3. METODOLOGIA

3.1. AMOSTRAGEM

Os medicamentos na forma de comprimidos 4 em 1 (INH, PYA, EMB e RMP) foram doados por dois fabricantes diferentes (fabricante 1 e 2).

Foi realizado um pool de cada medicamento para realização dos ensaios neste estudo. Transferiu-se o equivalente a 20 comprimidos de cada um dos 2 medicamentos para frascos individualmente identificados e com tampa. Estes foram guardados em local seco e ao abrigo da luz.

3.2. EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES

3.2.1. Equipamentos

- Balança analítica com resolução de 0,01 mg, fabricante OHAUS, modelo AV264CP.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Shimadzu com detector UV-VIS com conjunto de fotodiodos SPD-M10A, forno CTO-10A, bomba LC-10AD e injetor automático SIL-10AF. Programa usado para aquisição de dados Class-
vp®.

Figura 12 - Cromatógrafo líquido, fabricante Shimadzu com detector UV-VIS e conjunto de fotodiodos usado nas etapas da avaliação.



– Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Gilson com detector UV-VIS 152, forno Shimadzu modelo CTO-6A, bomba binária 321 e injetor automático 235p. Programa usado para aquisição de dados Unipoint®. A maior parte dos experimentos foi realizada nesse sistema (figura 13).

Figura 13 - Cromatógrafo líquido, fabricante Gilson com detector ultravioleta-visível usado nas etapas de desenvolvimento.



- Espectrofotômetro, fabricante Varian modelo Cary 50 Conc UV-Visível.
- Banho ultrassônico, fabricante Unique modelo UltraSonic Cleaner.
- Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Milipore modelo Direct-Q.

3.2.2. Materiais e Reagentes

- Coluna Luna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μ m. Fabricante: Phenomenex®. Lote: 5291-82.
- Coluna Nova-Pak® C18 (150x 3,9) mm, 4 μ m. Fabricante: Waters. Lote: W03551M035.
- Coluna Acclaim™ 120 C18 (150 x 2,1) mm, 3 μ m. Fabricante: Thermo Scientific. Lote: 018-01-153.

- Os reagentes utilizados foram grau P.A. e solventes grau CLAE.
- Padrão secundário cloridrato de etambutol, teor 100,0%. Reg: 03651. Fornecedor Farmanguinhos.
- Padrão secundário isoniazida, teor 100,8%. Reg.: 32488. Fornecedor Farmanguinhos.
- Padrão secundário pirazinamida, teor 99,09%. Reg.: 32592. Fornecedor Farmanguinhos.
- Padrão secundário rifampicina, teor 100,0%. Reg.: 29038. Fornecedor Farmanguinhos.

3.3. OTIMIZAÇÃO DO DILUENTE DA RIFAMPICINA

O objetivo da otimização do diluente da RMP está em apresentar alguma alternativa viável para impedir a sua degradação durante a análise quantitativa.

Primeiramente foi testado o diluente preconizado pela USP: solução 96% tampão fosfato pH 6,8 com 4% metanol. Depois foi testado os solventes apolares (tetracloreto de carbono), polares próticos (metanol) e polares apróticos (acetonitrila).

Com o intuito de utilizar somente um diluente para os quatro princípios ativos durante a análise, sabendo-se que o EMB está presente no comprimido 4 em 1 como cloridrato, portanto, insolúvel em solventes orgânicos, foram feitas misturas na proporção 10% de água e 90% de solvente orgânico (acetonitrila ou metanol), suficiente para promover a dissolução do EMB, sem provocar alterações estruturais na RMP.

Após estes resultados, foram testados os diluentes com um aumento na proporção da água e acrescentou-se um antioxidante à solução. Foram preparados três soluções de diluente com 50% de água e 50% de acetonitrila, contendo 0,03, 0,075 e 0,15 mg/mL de tampão citrato respectivamente.

Estes diluentes foram testados em soluções de RMP de 200 µg/mL, tanto no padrão como na amostra (comprimido). As soluções foram analisadas no cromatógrafo Gilson com detector ultravioleta-visível e as condições cromatográficas foram: fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de 95% de água e 5% de metanol, em modo gradiente (tabela 1) com tempo de corrida de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Tabela 1 – Rampa de programação do modo gradiente para análise da RMP.

Tempo	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0	95	5
0 - 15	0	100
15 - 15,5	95	5
15,5 - 25	95	5

3.4. FORMAÇÃO COMPLEXO METAL-ETAMBUTOL E SUA ABSORÇÃO NO UV

O EMB não absorve na região do UV e por isso, foram realizados experimentos (variando-se os valores do pH e vários íons com o EMB) visando a formação de complexos metal-EMB para que absorvam na região do UV.

Primeiro foi testado uma solução padrão de EMB 100 µg/mL com soluções de mesma concentração com íons metálicos de Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ e Cu²⁺, diluídos em tampão acetato e tampão fosfato variando o pH (4,0 – 7,0). Após realizar leituras das soluções no espectrofotômetro, observou-se os íons que complexaram com o EMB e absorveram no UV.

Após decidir qual o melhor metal a complexar o EMB, realizou-se um teste para descobrir a estequiometria do complexo, variando a concentração do EMB em relação a uma concentração fixa de Cu²⁺ por espectrofotometria UV, em 265 nm.

Para este teste, preparou-se uma solução de 10 µg/mL de Cu²⁺ e uma solução mãe de EMB de concentração 32 µg/mL. A partir da solução mãe de EMB, variou-se a concentração de EMB e misturou-se com a solução de Cu²⁺, conforme tabela 2 abaixo, para obter a estequiometria do complexo (EMB e Cu²⁺).

Tabela 2 – Concentração do íon metálico e do EMB.

Número de mols de Cu^{2+}	Número de mols de EMB
1	0,5
1	1
1	1,5
1	2
1	2,5
1	3
1	3,5

3.5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

O método foi desenvolvido pela técnica de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária octadecilsilano. Foi utilizado o cromatógrafo fabricante Gilson com detector por absorção molecular na região do ultravioleta-visível.

Após definição do melhor diluente a ser utilizado para que não ocorresse a degradação rápida da RMP e o metal a formar complexo com EMB, além de definir a estequiometria do metal com complexante, foram feitos testes para análise dos quatro fármacos simultaneamente na mesma corrida cromatográfica.

Neste estudo, duas fases móveis foram usadas para verificar em qual os analitos teriam melhor eluição. Foi testada uma fase com tampão acetato de amônio pH 6-7 e outra com tampão formiato de amônio pH 4-5. As condições cromatográficas foram iguais para as duas fases aquosas. Foi preparada uma solução de padrão secundário de INH, PYA e EMB com concentração aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$ e foi analisada no cromatógrafo Gilson, coluna C18 *endcapped* (250 x 4,6) mm, 5 μm . com fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 265 nm, com fase móvel: 85% tampão, 15% de metanol e 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), em modo isocrático com tempo de análise de 40 min.

Depois foi feito um teste variando a concentração de tampão formiato de amônio de 0,1 a 0,5 mol/L na fase aquosa e analisando com as mesmas condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$ de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm com fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 μL ,

comprimento de onda de 265 nm, fase móvel: 85% tampão formiato de amônio pH 5, 15% de metanol e 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) em modo isocrático.

Em seguida, variou-se a quantidade de fase orgânica, conforme uma programação de gradiente, para que as eluições da RMP e dos seus relacionados fossem observadas sem sobreposição dos sinais. A análise foi feita em uma solução de padrão secundário de INH, PYA, EMB e RMP com concentração aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$ e foi analisada no cromatógrafo Gilson, coluna C18 *endcapped* (250 x 4,6) mm, 5 μm . com fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 265 nm e 335 nm, com fase aquosa (solução A) tampão formiato de amônio pH 5 e 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e fase orgânica (solução B) metanol, em modo gradiente conforme a tabela 3.

Tabela 3 – Rampa de programação do modo gradiente para análise da INH, PYA, EMB e RMP.

Tempo	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0 - 10	100	0
10-30	0	100
30-40	100	0

Para melhorar o perfil cromatográfico da análise dentro dos parâmetros de simetria, foi adicionado à fase orgânica trietilamina e ácido fórmico. Foi preparada uma solução de padrão secundário de INH, PYA, EMB e RMP com concentração aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$ e foi analisada no cromatógrafo Gilson, coluna C18 *endcapped* (250 x 4,6) mm, 5 μm . com fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 265 nm e 335 nm, com fase aquosa (solução A) 85% tampão formiato de amônio pH 5, 15% de metanol e 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e fase orgânica (solução B) metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico, em modo gradiente conforme a tabela 4.

Tabela 4 – Rampa de programação do modo gradiente para análise da INH, PYA, EMB e RMP com trietilamina e ácido fórmico na fase orgânica.

Tempo	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0 - 10	100	0
10-20	0	100
20-35	100	0

3.5.1. Verificação da Adequação do Sistema Cromatográfico

Após definir as condições analíticas a serem usadas, foram obtidos os parâmetros de adequação do sistema cromatográfico considerando que equipamento, partes eletrônicas, operações analíticas e amostras constituem um sistema integral que pode ser avaliado como um todo.

O teste de verificação da adequação do sistema foi executado para assegurar a performance do sistema cromatográfico no início e durante a realização das análises, provendo assim dados de qualidade aceitável. Foram avaliados os seguintes parâmetros: fator de cauda, resolução, número de pratos teóricos e fator de capacidade.

Foi preparada solução dos quatro fármacos na concentração 0,075 mg/mL de INH, 0,4 mg/mL de PYA, 0,275 mg/mL de EMB e 0,150 mg/mL de RMP usando como diluente 90% de metanol e 10% de água e auxílio do ultrassom por 2 minutos; então, foram executadas injeções desta solução no cromatógrafo Gilson, coluna C18 *endcapped* (250 x 4,6) mm, 5 µm com fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 265 nm e 335 nm, com fase aquosa (solução A) 85% tampão formiato de amônio pH 5, 15% de metanol e 0,005 mol/L de Cu²⁺ (ou 250 mg/L de CuSO₄.5H₂O) e fase orgânica (solução B) metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico, em modo gradiente conforme a tabela 4.

3.6. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO

Definidas as condições analíticas que apresentaram os melhores resultados em relação aos parâmetros de adequação do sistema, com o diluente mais estável para a RMP e escolhido o metal a complexar o EMB, o método foi submetido à alguns parâmetros de avaliação.

Os parâmetros avaliados foram os seguintes: linearidade e precisão. Estes parâmetros de avaliação são baseados no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, da Anvisa, e Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, do Inmetro (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

3.6.1. Determinação da Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico em emitir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A linearidade pode ser observada por meio da curva analítica com no mínimo cinco concentrações diferentes, e é avaliada por intermédio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear mínimo da curva deve ser 0,99 (ANVISA, 2003).

O INMETRO (2011) pede outras avaliações como verificar a homocedasticidade dos dados e o cálculo dos resíduos e sugere que a curva analítica seja elaborada com no mínimo cinco pontos e com um número de replicatas em cada nível de concentração que expresse a realidade empregada no laboratório.

Os limites percentuais que devem estar contidos no intervalo de linearidade para os ensaios de teor são de 80% a 120% da concentração teórica do teste (ANVISA, 2003).

3.6.1.1. *Preparo da curva de calibração*

Definida a faixa de concentração de interesse, a linearidade foi determinada preparando-se curvas de calibração para cada padrão dos quatro fármacos. Cada um dos sete níveis de concentração das curvas foi preparado igualmente espaçado e injetado no cromatógrafo em triplicatas de cada.

3.6.1.2. *Preparo da solução estoque de INH, PYA, RMP e EMB*

Pesou-se individualmente massas com cerca de 39,0 mg do padrão secundário de INH, 200,0 mg do padrão secundário de PYA, 138,0 mg do padrão secundário de cloridrato de EMB e 75,0 mg do padrão secundário de RMP para balão volumétrico de 50 mL. Estas massas foram dissolvidas usando como diluente 90% de metanol e 10% de água e auxílio do ultrassom por 2 minutos.

3.6.1.3. Preparo das soluções de trabalho de INH, PYA, RMP e EMB

Foram tomadas alíquotas de 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2 e 1,3 mL da solução estoque de INH, PYA, RMP e EMB para o preparo das soluções de trabalho. Todas as alíquotas foram retiradas com pipetas Eppendorf e transferidas individualmente para balões volumétricos de 10 mL, previamente identificados, os quais foram completados com o diluente 90% de metanol e 10% de água e homogenizados. As soluções preparadas foram analisadas no cromatógrafo Shimadzu.

3.6.1.4. Avaliação da curva de calibração

Após a aquisição dos dados experimentais (cromatogramas), foi realizada uma inspeção visual dos dados no gráfico x-y referente às respostas das áreas *versus* as concentrações do analito.

Utilizando planilha de cálculo em Excel de Bazílio *et al.* (2011) adaptada de Souza e Junqueira (2005), foi realizada a avaliação da linearidade pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), incluindo a estimativa dos parâmetros da regressão linear e o tratamento dos valores extremos:

- i) estimativa da inclinação, interseção e coeficiente de correlação r ;
- ii) investigação e exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados por Jackknife (SOUZA, 2007).

A verificação ao modelo linear foi avaliada através da:

- i) verificação da significância da regressão (ANOVA) e avaliação do coeficiente de correlação (SOUZA, 2007).

3.6.2. Determinação da Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, sendo usualmente expressas pelo DPR ou coeficiente de variação (CV%). As formas mais comuns de expressá-la

são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e a reprodutibilidade (LEITE, 2008; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A repetibilidade é expressa pela dispersão entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito no menor espaço de tempo possível, nas mesmas condições de análise, ou seja, o mesmo procedimento de medição, mesmo analista, instrumento e local. Devem ser feitas nove determinações contemplando a faixa linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, ou no mínimo, seis determinações a 100% da concentração do fármaco (ANVISA, 2003).

A determinação da precisão foi realizada por meio da repetibilidade, os valores dos respectivos desvios padrão não devem ultrapassar 2,0%.

3.6.2.1. Determinação da Repetibilidade

Neste estudo, a repetibilidade foi avaliada pelo DPR por meio da análise de 9 determinações com triplicatas de injeção a três concentrações, baixa, média e alta da concentração de trabalho e foi determinada para cada um dos 2 diferentes fabricantes segundo a equação 10 (página 44).

3.6.2.2. Preparo das soluções de trabalho do comprimido

Pesou-se individualmente massas com cerca de 80%, 100% e 120% do peso médio do comprimido para balão volumétrico de 100 mL. Estas massas foram dissolvidas usando como diluente 90% de metanol e 10% de água e auxílio do ultrassom por 2 minutos.

Foram tomadas alíquotas de 1,0 mL da solução para cada nível da solução. Todas as alíquotas foram retiradas com pipetas Eppendorf e transferidas individualmente para balões volumétricos de 10 mL, previamente identificados, os quais foram completados com o diluente 90% de metanol e 10% de água e homogenizados. As soluções preparadas foram analisadas no cromatógrafo Shimadzu.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE CRÍTICA DAS METODOLOGIAS OFICIAIS

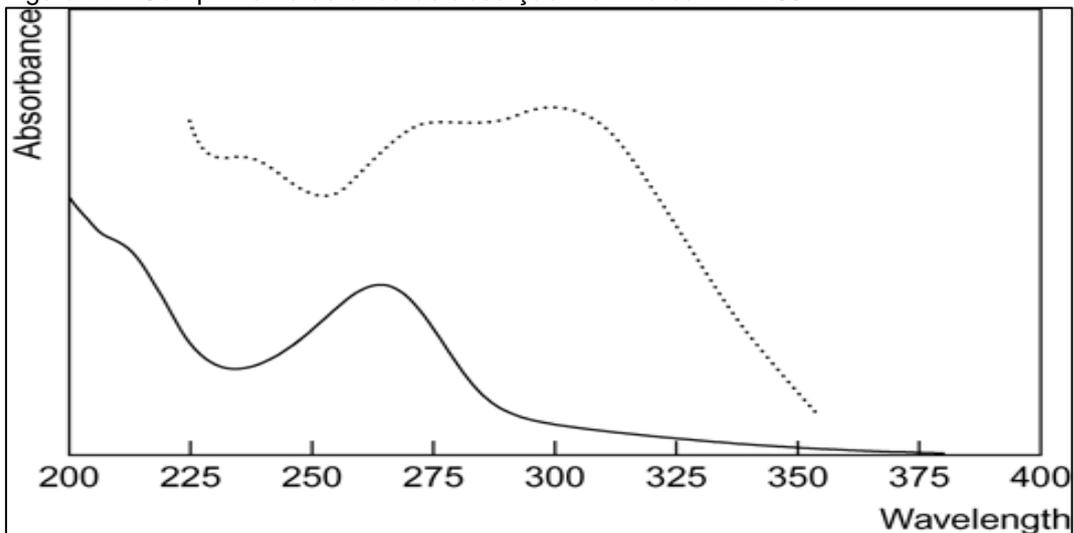
Não há monografia para determinação simultânea dos quatro fármacos na FB e em outras farmacopeias. Os métodos validados propostos nas principais farmacopeias, tais como a USP e a Ph. Int. foram previamente reproduzidos seguindo exatamente o que está descrito. Os resultados obtidos possibilitaram fazer alguns destaques e comentários pertinentes.

Além de utilizarem diluentes que degradam a RMP, os métodos propostos na USP e na Ph. Int. não permitem a análise simultânea dos quatro princípios ativos dos medicamentos tuberculostáticos, na mesma corrida cromatográfica. Seus diluentes para a análise de RMP só diferem nas proporções: o diluente USP usa 96:4 e o da Ph. Int., 60:40 da mistura tampão fosfato pH ~ 7 e metanol, respectivamente. O diluente da Ph. Int. dissolve melhor a RMP, ao contrário do diluente USP, de dissolução lenta, devido à sua baixa solubilidade em água.

A USP utiliza um método para a determinação de PYA, INH e RMP e outro para o EMB. A técnica de análise dos três primeiros se baseia numa eluição por gradiente utilizando duas misturas nas proporções de 96:4 e 55:45 de tampão fosfato, pH 6,8 e metanol em fase octadecilsilano. No compêndio *Chromatography column USP* está indicada a coluna LUNA C18 (4,6 x 250) mm.

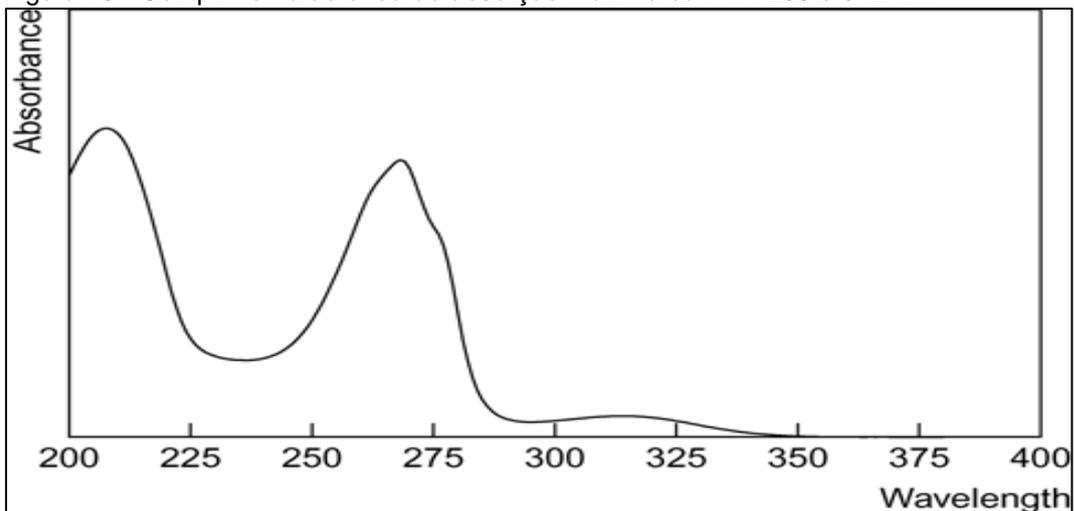
Os sinais são monitorados em 238 nm, inclusive os sinais das substâncias relacionadas da RMP, que segundo as farmacopeias seriam: RQ, rifamicina sv (SV), rifampicina N-óxido (RNO) e 3-FR. Não se conseguiu chegar a uma conclusão do motivo da escolha de visualização em 238 nm, pois esse comprimento de onda não coincide com o comprimento de onda de absorção máxima de nenhuma das três substâncias, a saber: INH 265 nm (figura 14), PYA 269 e 312 nm (figura 15) e RMP 231, 263, 335 nm (figura 16), em meio aquoso (GALLO, RADAELLI, 1976; BREWER, 1977; LOUTFY; ABOUL-ENEIN, 1983; LEE, BENET, 1976).

Figura 14 - Comprimento de onda de absorção máxima da INH 265 nm.



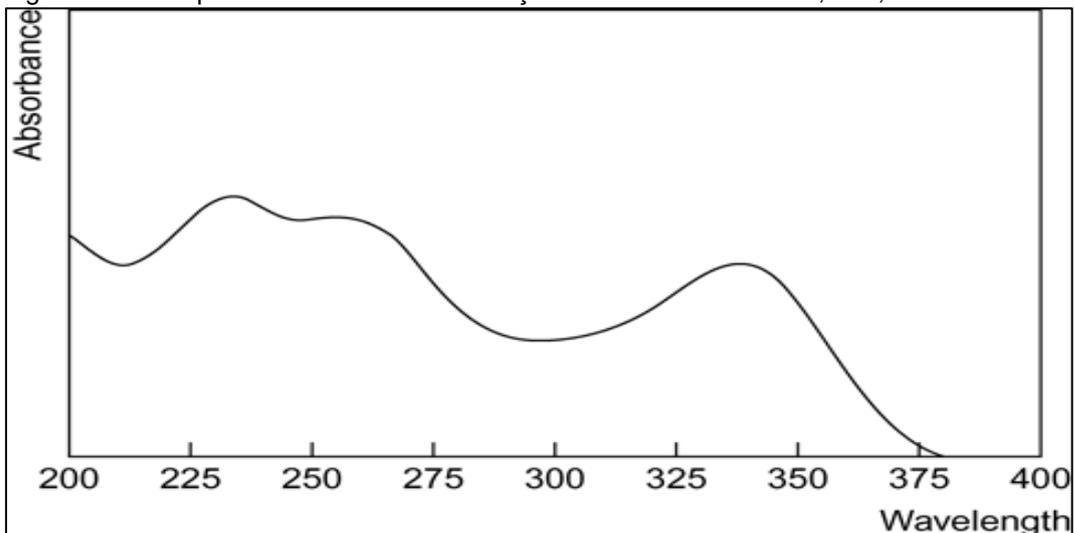
Fonte: MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004.

Figura 15 - Comprimento de onda de absorção máxima da PYA 269 e 312 nm.



Fonte: MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004.

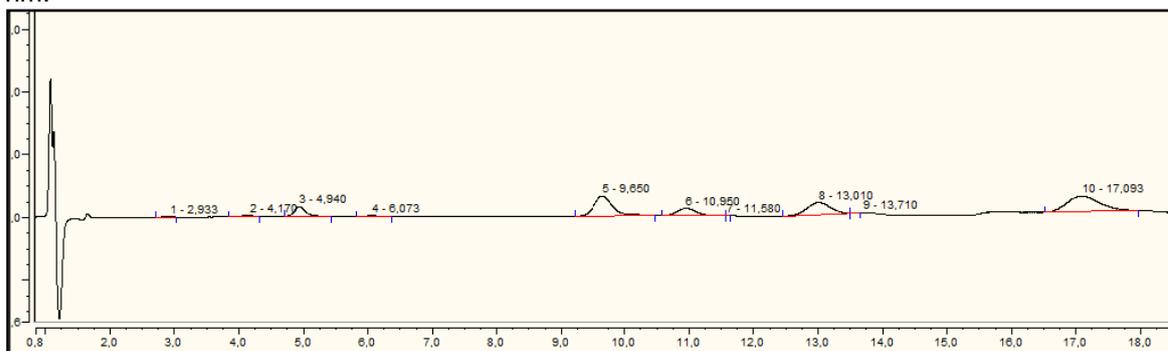
Figura 16 - Comprimento de onda de absorção máxima da RMP 231, 263, 335 nm.



Fonte: MOFFAT, OSSELTON, WIDDOP, 2004.

Foi realizada análise de uma matéria prima da RMP e de suas substâncias relacionadas (RQ, SV, RNO e 3-FR), de acordo com o método de análise para matéria prima da USP (2013), monitorada a 238 nm (figura 17). As substâncias relacionadas não foram identificadas pois não tinha padrão para identifica-las.

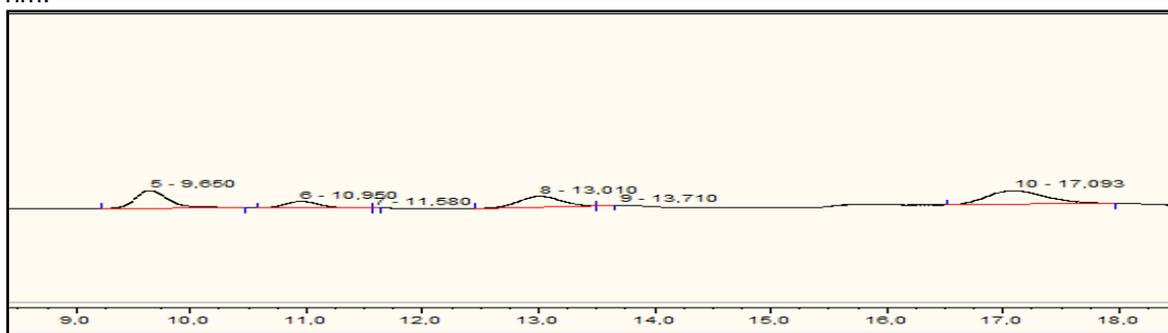
Figura 17 - Cromatograma com as quatro substâncias relacionadas, RQ, SV, RNO e 3-FR, em 238 nm.



Condições experimentais: matéria-prima de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1,5 mL/min., volume de injeção de 50 µL, comprimento de onda de 238 nm, fase móvel de água, acetonitrila, fosfato de potássio dibásico 1 mol/L, fosfato de potássio monobásico 1 mol/L e ácido cítrico 1 mol/L (64:25:77:23:10) e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

E como o detector é dual, foi alterado o comprimento de onda para 335 nm (figura 18), porque é o comprimento de onda mais seletivo para a visualização dos compostos que possuem o cromóforo naftohidroquinona da RMP.

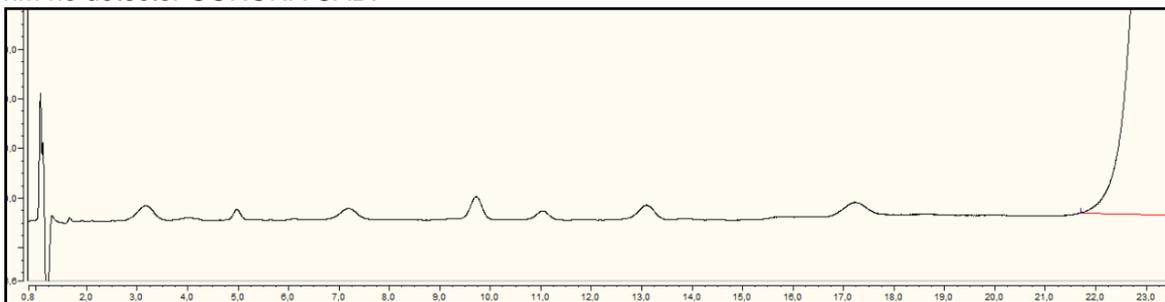
Figura 18 - Cromatograma com as quatro substâncias relacionadas, RQ, SV, RNO e 3-FR, em 335 nm.



Condições experimentais: matéria-prima de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1,5 mL/min., volume de injeção de 50 µL, comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água, acetonitrila, fosfato de potássio dibásico 1 mol/L, fosfato de potássio monobásico 1 mol/L e ácido cítrico 1 mol/L (64:25:77:23:10) e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Entretanto, foi realizada a mesma análise de substâncias relacionadas utilizando-se um detector universal (figura 19), como o detector de aerossol carregado por efeito corona (CORONA CAD). O detector de aerossol carregado detecta quaisquer analitos não voláteis ou semi-voláteis, com ou sem um cromóforo, onde a detecção é feita através da quantidade de analito na sua amostra proporcional à massa.

Figura 19 - Cromatograma com as quatro substâncias relacionadas, RQ, SV, RNO e 3-FR, em 335 nm no detector CORONA CAD.



Condições experimentais: matéria-prima de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector CORONA CAD, fluxo de 1,5 mL/min., volume de injeção de 50 µL, comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água, acetonitrila, fosfato de potássio dibásico 1 mol/L, fosfato de potássio monobásico 1 mol/L e ácido cítrico 1 mol/L (64:25:77:23:10) e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Além dos quatro picos, outros sinais de degradações e impurezas foram observados com maiores intensidades comparado com o detector UV utilizado na técnica da USP. Isso, em princípio, colocaria sob suspeita esses ensaios de substâncias relacionadas da RMP das farmacopeias, uma vez que, nos ensaios limites são medidas as razões entre as soma das áreas destes picos em relação à área da RMP. Nesse caso a utilização do detector UV para este fim não seria indicada, já que ele não absorve todas as impurezas.

Outro ponto destacado foi o tratamento distinto em termos de tempo de uso da solução padrão e da solução amostra na USP (figura 20). Entre o preparo e a injeção, a solução do padrão de RMP teria que ser injetada em até 10 minutos, enquanto que a solução amostra poderia esperar até 2 horas (120 minutos) para ser analisada. O procedimento da preparação das soluções permitiu concluir que, segundo a USP, a solução do comprimido 4 em 1 resistiria 110 minutos sem degradação significativa.

Figura 20 – Especificação da USP do tempo de uso da solução padrão e da amostra.

Standard preparation- Dissolve accurately weighed quantities of [USP Rifampin RS](#), [USP Isoniazid RS](#), and [USP Pyrazinamide RS](#) in a mixture of *Buffer solution* and methanol (96:4) to obtain a solution having known concentrations of about 0.16 mg per mL, 0.08 mg per mL, and 0.43 mg per mL, respectively. [NOTE- Use this solution within 10 minutes.]

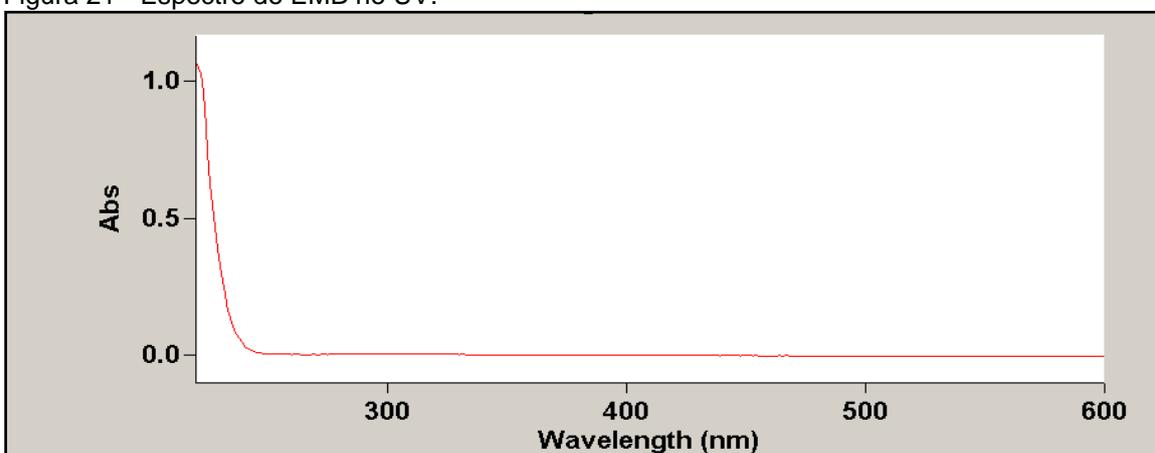
Assay preparation- Weigh and finely powder not fewer than 20 Tablets. Transfer an accurately weighed quantity of the powder, equivalent to about 8 mg of isoniazid, to a 100-mL volumetric flask, and add about 90 mL of *Buffer solution*. Sonicate for about 10 minutes, allow to equilibrate to room temperature, dilute with *Buffer solution* to volume, and mix. [NOTE- Use this solution within 2 hours.]

Fonte: USP 36, 2013.

Isto contrastou com os resultados obtidos posteriormente. Os testes de estabilidade mostraram que o diluente USP degradou 7,5% da RMP pura e 17,5% da RMP combinada no comprimido 4 em 1, em 12 horas (720 minutos). Considerando o decaimento linear, se o analista adotasse a conduta de injetar a solução padrão em 3 injeções de 40 minutos, por exemplo, perfazendo os 120 minutos, já com a solução da amostra preparada para ser injetada na sequência, haveria uma perda em torno de 3%. Injetar em tempos desiguais implicaria em resultados não fidedignos por erro grave de método.

Na técnica de análise do EMB, a fase móvel é uma solução a 0,1% v/v trietilamina, com pH ajustado para 7,0 com ácido fosfórico. A coluna preconizada é a Zorbax SB CN (4,6 x 150) mm. O sinal do EMB é monitorado em 200 nm. A USP tem que utilizar esse comprimento de onda porque ele não absorve em regiões mais nobres ou seletivas do espectro UV, somente na faixa entre 190 – 200 nm, a de maior ruído espectral (figura 21).

Figura 21 - Espectro do EMB no UV.



Condições experimentais: espectro de varredura de uma solução de padrão secundário de EMB concentração aproximadamente 10 µg/mL.

Já a Ph. Int. indica, também, dois métodos de análise, tal como a USP. Um analisa o EMB, a PYA e a INH e, o outro, somente a RMP.

Sobre o tempo de uso após preparo das soluções padrão e amostra (figura 22), a indicação é o uso imediato, sem demora. Com isso a farmacopeia confirma que seu diluente causa degradação.

Figura 22 – Especificação da Ph. Int. do tempo de uso da solução padrão e da amostra.

B. **For rifampicin.** Prepare fresh solutions and perform the assay without delay. Low-actinic glassware is recommended.

Determine by [1.14.4 High-performance liquid chromatography](#), using a stainless steel column (25 cm x 4.6 mm) packed with particles of silica gel, the surface of which has been modified with chemically bonded octadecylsilyl groups, (5 µm). As the mobile phase, use a mixture of 6 volumes of methanol R and 4 volumes of phosphate buffer pH 7.0 (potassium dihydrogen phosphate R (0.01 mol/l), adjusted with sodium hydroxide (0.1 mol/l) VS).

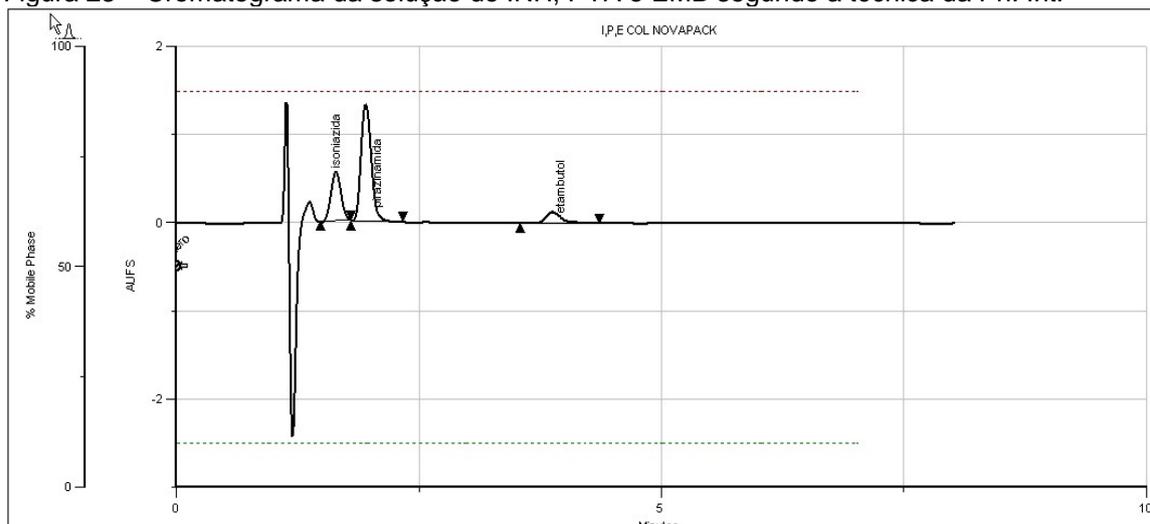
Fonte: Ph. Int., 2011.

A respeito do tipo de coluna a ser usada, a Ph. Int. generaliza bastante, não particulariza um tipo de coluna ou um fabricante. Somente informa que a fase deve ser sílica, com 5 µm de diâmetro de partícula, derivatizada com octadecilsilil. A coluna deve ser de aço inoxidável, nas dimensões (150 x 4,6) mm.

Uma solução contendo 100 µg/mL de INH, PYA e EMB foi analisada por esta técnica com injeções sucessivas (figura 23), utilizando-se uma coluna C18 Nova-Pak®, (3,9 x 150) mm, 4 µm, pois não havia disponível uma coluna (4,6 x 150) mm, 5 µm. Foi utilizado um fluxo de 1 mL/minuto, metade do indicado na monografia, uma vez que, com 4 µm de diâmetro de partícula, considerou-se desnecessário uma pressão tão alta no sistema, que já estava em torno de 2100 psi.

Essas alterações feitas nas dimensões e no fluxo estavam em conformidade com o preconizado pela USP (2013) no capítulo sobre cromatografia (621), na seção *system suitability*, a saber: o fluxo pode ser alterado, o diâmetro de partícula pode ser reduzido, no máximo, em 50%, o diâmetro interno da coluna pode ser alterado em 25% e o fluxo em ± 50%. Na Ph. Int. (2011), esses ditames são menos rígidos.

Figura 23 – Cromatograma da solução de INH, PYA e EMB segundo a técnica da Ph. Int.



	Inj. Number	Peak Name	R. Time	Back Resolution	Front Resolution	Sample Descrip.	Peak asymmetry	Capacity (k')
1	2.00	*1	2.03	1.07	** N/A **	Novapack 3,9 x 150 4 um 1	1.04	-1.00
2	2.00	*2	2.62	5.33	1.07	Novapack 3,9 x 150 4 um 1	1.22	-1.00
3	2.00	*3	6.79	** N/A **	5.33	Novapack 3,9 x 150 4 um 1	1.45	-1.00

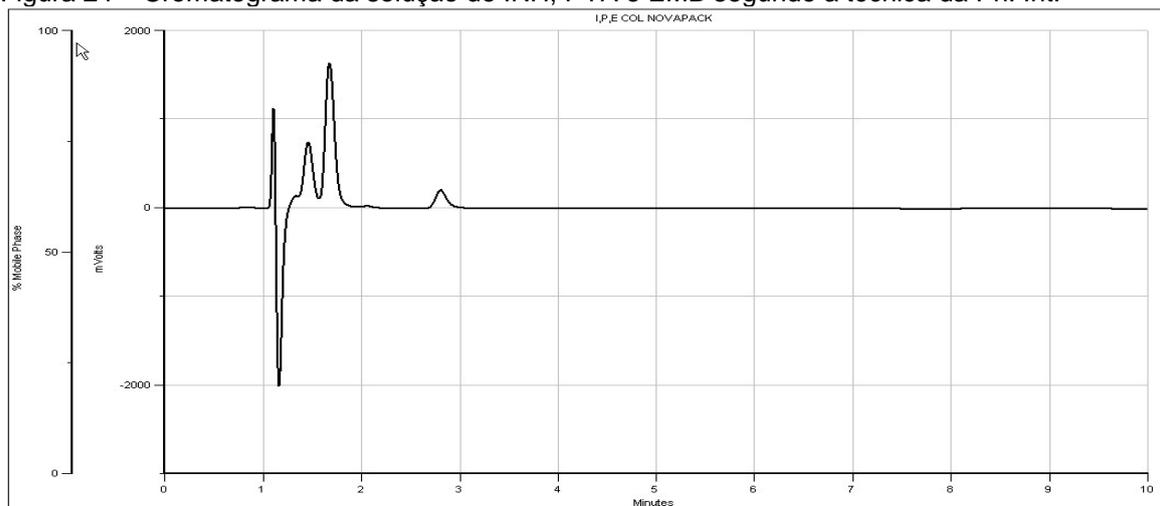
Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de 270 nm, fase móvel de 94% de solução de acetato de amônio e acetato de cobre pH=5,0 e 6% de metanol, em modo isocrático e coluna C18 (150 x 3,9) mm, 4 µm.

Pelo cromatograma e parâmetros de adequação do sistema obtidos, particularmente no tocante à resolução de 1,1, entre a INH (pico 1) e PYA (pico 2), ela não se apresentou em conformidade com o mínimo permitido, $R \geq 2$.

Além da coluna não ter apresentado uma resolução ideal, esta poderia ser ajustada através da proporção de solventes na fase móvel, mas não havia margem para esta correção. A fase móvel da Ph. Int. é composta de 94% de fase aquosa e somente 6% de modificador orgânico, metanol. A quantidade de metanol é muito pequena e já está abaixo do recomendado para colunas de sílica. Tecnicamente, não se deve trabalhar com menos de 5% em regime isocrático, segundo a maioria dos fabricantes de colunas de base sílica. Exceto para colunas preparadas para trabalhar com 100% de fase aquosa (PRZYBYCIEL, MAJORS, 2002).

Após algumas injeções foi observada uma diminuição significativa nos tempos de retenção e a sequência foi interrompida para não inutilizar a coluna cromatográfica por completo (figura 24).

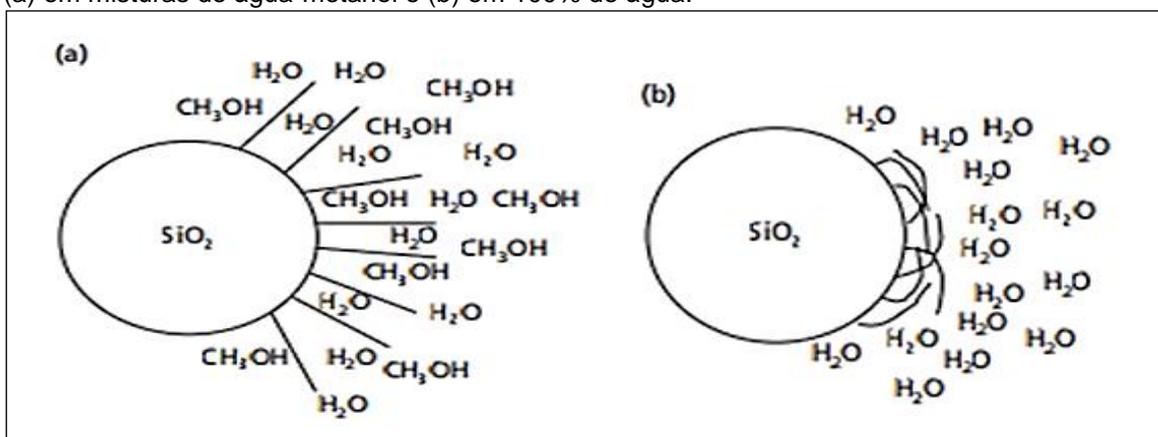
Figura 24 – Cromatograma da solução de INH, PYA e EMB segundo a técnica da Ph. Int.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 20 µL, comprimento de onda de 270 nm, fase móvel de 94% de solução de acetato de amônio e acetato de cobre pH=5,0 e 6% de metanol, em modo isocrático e coluna C18 (150 x 3,9) mm, 4 µm.

Com grande proporção de água, juntamente com a alta concentração salina utilizada na técnica (quase 0,7 mol/L), observou-se colapso (dobra) de fase (figura 25). Com a progressão do colapso são observadas perdas de retenção dos compostos e aumento de fator de cauda (assimetria) à medida que os cromatogramas vão sendo obtidos. Rapidamente, a coluna perde a capacidade de separar os picos e cada vez mais eles se aproximariam da região do V_0 . Os manuais das colunas afirmam que o colapso é um processo irreversível (PRZYBYCIEL, MAJORS, 2002).

Figura 25 - Ilustração da explicação do colapso da fase de cromatografia reversa, (a) em misturas de água-metanol e (b) em 100% de água.



Fonte: PRZYBYCIEL, MAJORS, 2002.

4.2. CONTROLE DA ESTABILIDADE DA RMP

Os primeiros experimentos sobre a estabilidade das rifamicinas em estado sólido e líquido, em meio aquoso e não aquoso, com ou sem aquecimento, datam do século passado e seus resultados já eram de conhecimento nos anos sessenta e setenta (GALLO, RADAELLI, 1976). Como a maioria das rifamicinas, a RMP só mantém a integridade estrutural no estado sólido, mesmo em temperaturas elevadas, superiores a 70°C. Em soluções aquosas, ela é mais estável em condições neutras, mesmo assim, ocorre degradação com o tempo. Este trabalho trata da estabilidade em meio líquido, na presença ou não dos princípios ativos e excipientes do medicamento vulgarmente chamado 4 em 1.

O primeiro foco deste trabalho está em apresentar alguma alternativa viável para impedir a degradação da RMP durante a análise quantitativa do teor, uniformidade de conteúdo e dissolução dos princípios ativos dos medicamentos por CLAE/UV. Conforme preconiza a RDC Nº 37 de 6 de julho de 2009, visto à falta de metodologia na FB, faz-se uso das monografias presentes nas principais farmacopeias internacionais, onde se recomenda injetar em pouco tempo após o preparo, para evitar a degradação da RMP.

Levando-se em consideração o grande número de injeções necessárias para realizar a análise dos três testes citados acima, além da curva de calibração, com pelo menos cinco níveis de soluções do padrão, conclui-se que o analista deve ficar dedicado um grande número de horas, em função das etapas de análise (preparo das soluções padrão e amostra, e suas respectivas injeções), a fim de evitar a degradação da RMP. Mesmo que o equipamento utilizado incluía um autoinjeter, isso não traria vantagem alguma, seria como se o analista operasse um injetor manual.

Para tentar solucionar este problema foi realizado um estudo de estabilidade prático, diferente dos mencionados, aplicado à rotina da cromatografia a líquido. Utilizaram-se alguns diluentes, com ou sem resfriamento da bandeja de *vials*, por um intervalo de tempo compatível com o tempo requerido para se efetuarem as análises. O objetivo foi o de encontrar as condições estáveis da RMP pura ou dela associada no comprimido e, com isso, eliminar a necessidade de injeções quase imediatas, portanto, da presença constante do

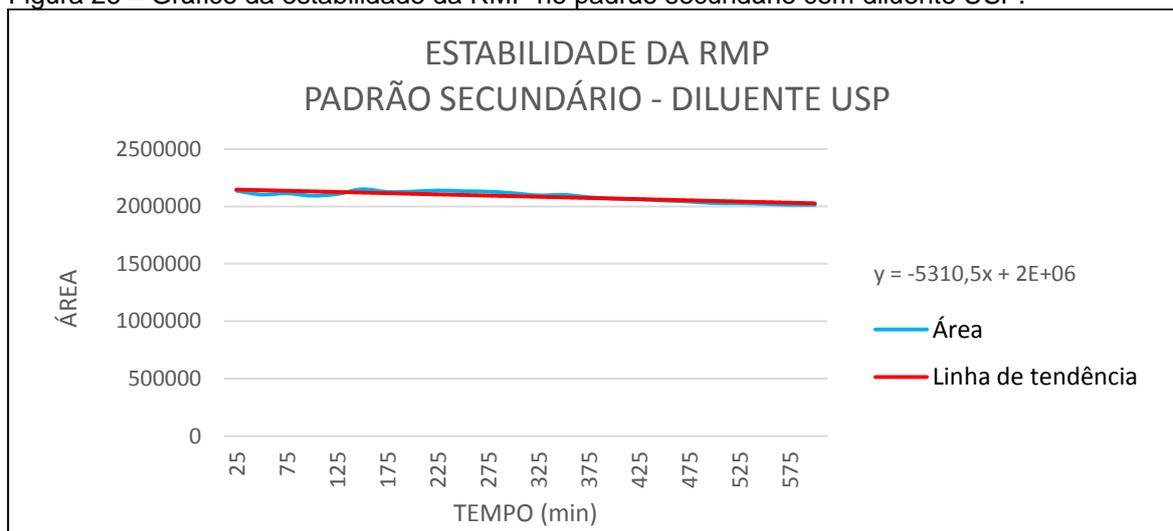
analista. Assim, todas as alíquotas poderiam ser preparadas de uma vez nos respectivos *vials* e o autoinjeter programado até o fim da sequência de injeções.

Primeiramente foi feita uma avaliação do quanto seria a degradação da RMP, através de injeções sucessivas de uma solução de RMP, usando-se o diluente indicado na técnica de análise de teor de RMP, PYA e INH da USP, por 2 horas, que é o tempo recomendado pela farmacopeia, em temperatura ambiente. O diluente USP é composto de 96% v/v de tampão fosfato pH 6,8 e 4 % v/v de metanol (MeOH).

A avaliação estatística para verificar a significância da regressão das concentrações durante o intervalo de tempo estudado foi observada pela aplicação do valor p da inclinação da regressão. Valor p maior que 0,05 (ao nível de confiança de 95%), a inclinação da regressão linear deve ser considerada insignificante (ABNT, 2012). Os resultados dos valores de p obtidos na análise do comprimido foi de 0,001742. Este valor foi usado como referência para o estudo a seguir.

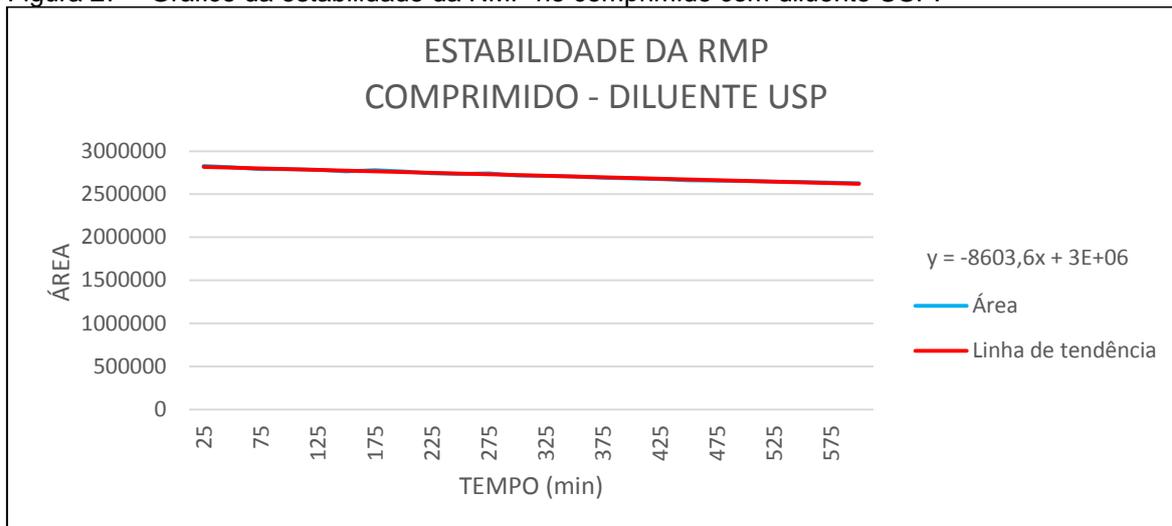
Depois foram feitos ensaios no padrão secundário (figura 26) e no comprimido 4 em 1 (figura 27) visando confrontar as inclinações das linhas de tendência, por um período de 10 horas.

Figura 26 – Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente USP.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Figura 27 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente USP.



Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Subtraindo-se o maior valor do menor valor de área da linha de tendência e dividindo-se pelo maior valor, que corresponde a 100%, ou seja, ao ponto de maior estabilidade, foi possível calcular a porcentagem de degradação da RMP em cada experimento. Os resultados para os decaimentos em 10 horas foram, respectivamente: 5,65 e 7,02%.

Isso sugere que a presença dos outros componentes da formulação fez o decaimento aumentar em 10%. E a recomendação de injeções no menor tempo possível pelas farmacopeias tem sentido, pois o diluente indicado provocou uma degradação bastante significativa, mesmo em um valor de pH perto da neutralidade, condição de maior estabilidade, segundo a literatura científica (GALLO, RADAELLI, 1976). Na análise da RMP no diluente USP no comprimido, o valor de p menor que 0,00174 foi obtido, sendo de $2,81 \times 10^{-22}$, comprovando a degradação bastante significativa.

Objetivando esclarecer a influência dos demais componentes foi obtido o pH do filtrado de uma suspensão de um comprimido em uma mistura de 96% de água (H₂O) e 4% de MeOH. O pH final foi 5,4. Esse valor de pH levemente ácido, da mistura dos princípios ativos, que contém vários grupos ionizáveis e dissociáveis (tabela 5), muito provavelmente, deve ser a causa do aumento da taxa de decaimento em relação à taxa na solução de RMP pura. Então, foi

possível concluir que o diluente USP não é apropriado para a análise de padrão secundário e para o produto acabado.

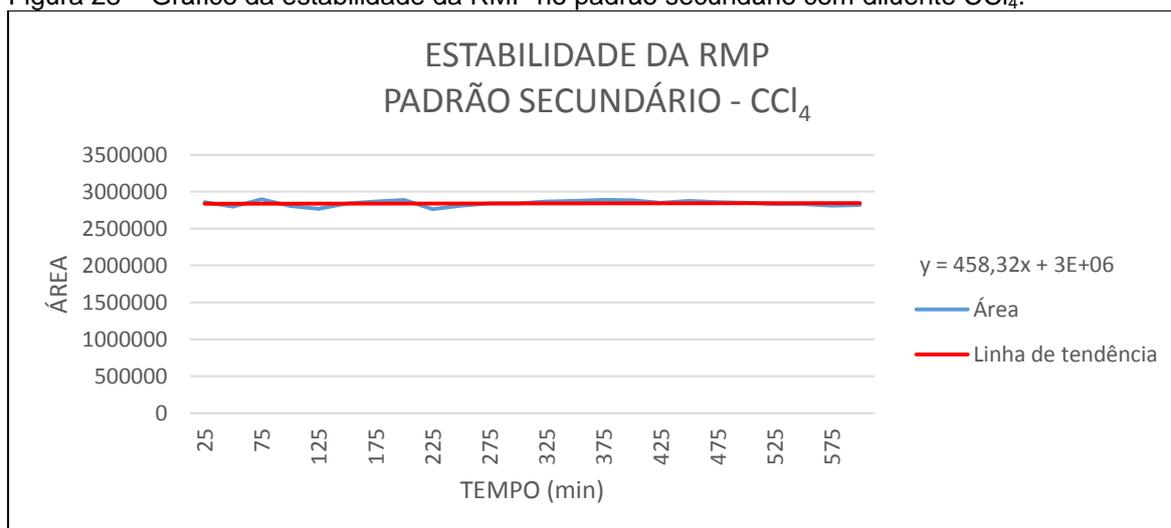
Tabela 5 – Valores de pKa dos grupos ionizáveis e dissociáveis dos fármacos.

PRINCÍPIO ATIVO	pKa 1	pKa 2	pKa 3
EMB	6,3 (hidroxila de álcool)	9,5 (amina secundária)	-
INH	1,8 (N-piridina)	3,5 (hidrazida)	10,8 (hidrazidadespronada)
PYA	0,5 (H-amida)	-	-
RMP	1,7 (4-OH)	7,9 (N -4-piperazina)	-

Fonte: (GALLO, RADAELLI, 1976; BREWER, 1977; LOUTFY; ABOUL-ENEIN, 1983; LEE, BENET, 1976).

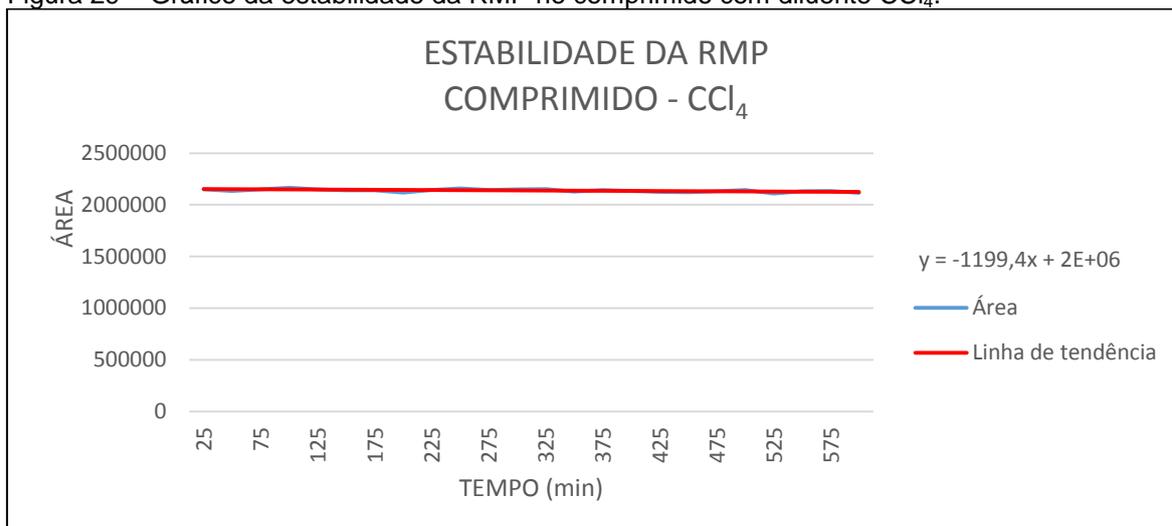
A seguir, o comportamento da RMP foi testado em meio não aquoso, usando solventes apolares, tetracloreto de carbono (CCl_4) (figuras 28 e 29), polares próticos, MeOH (figuras 30 e 31) e polares apróticos, acetonitrila (MeCN) (figuras 32 e 33), usando soluções do padrão secundário e do comprimido 4 em 1. Na ausência de água, as extensões das ionizações e dissociações estariam bastante minimizadas.

Figura 28 – Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente CCl_4 .



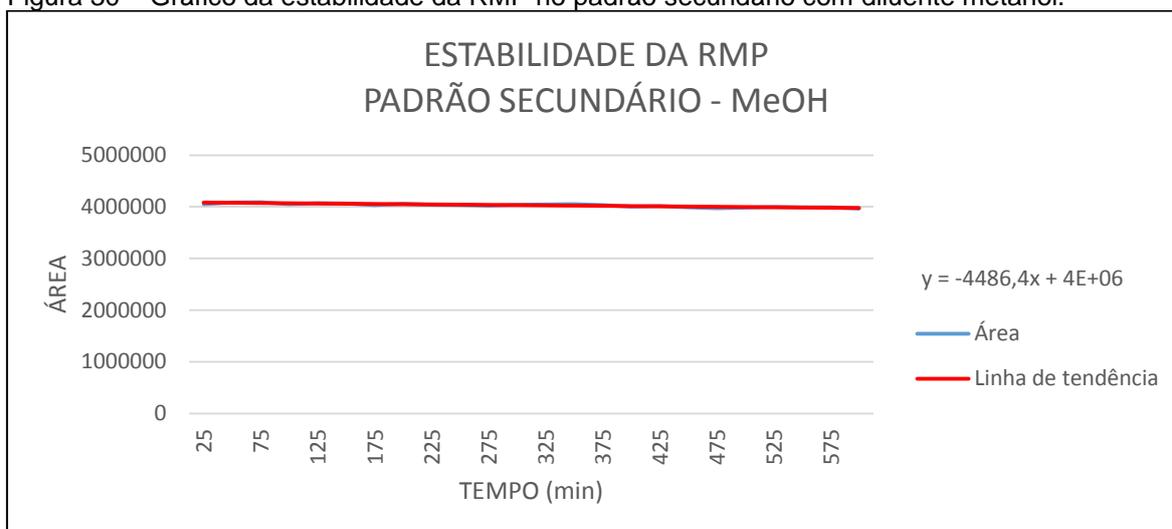
Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 200 $\mu\text{g/mL}$, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm .

Figura 29 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente CCl_4 .



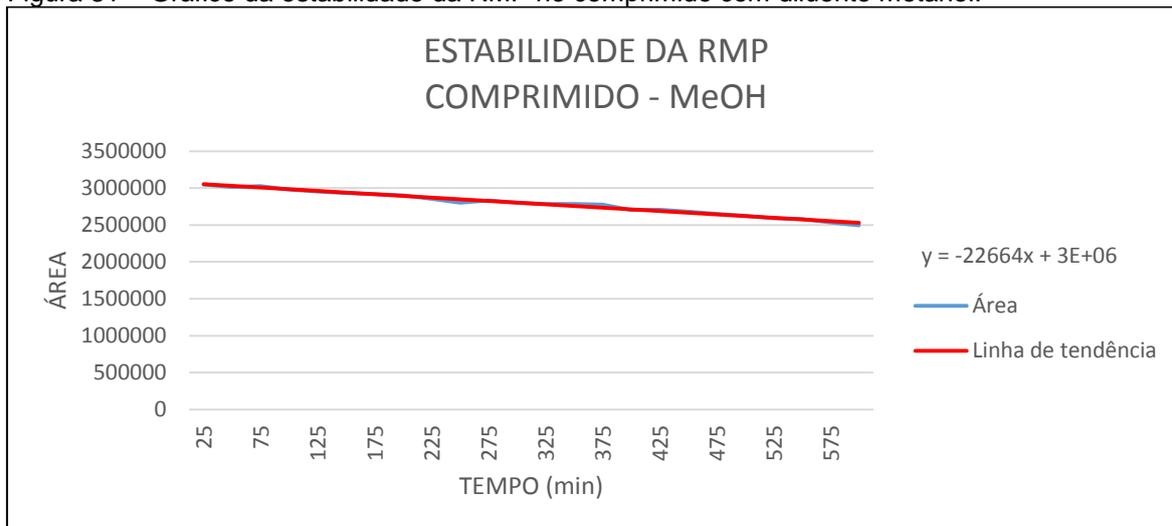
Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 $\text{mL}/\text{min.}$, volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm .

Figura 30 – Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente metanol.



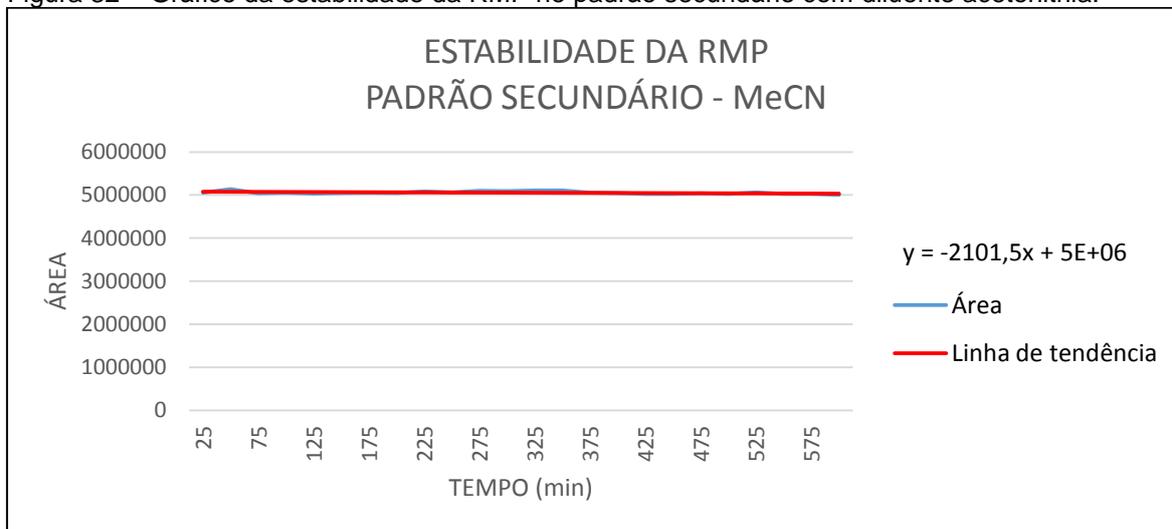
Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 $\text{mL}/\text{min.}$, volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm .

Figura 31 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente metanol.



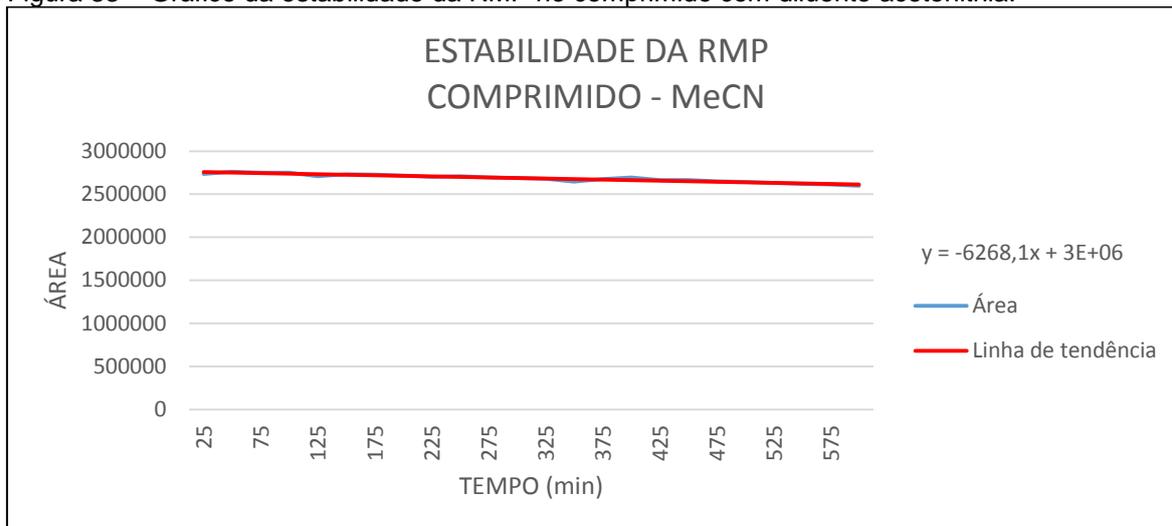
Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Figura 32 – Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente acetonitrila.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Figura 33 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente acetonitrila.



Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Os valores das inclinações das retas de tendência mostraram que a RMP tem uma estabilidade apreciável em solvente apolar como o CCl₄. O cálculo da porcentagem de decaimento para o padrão secundário foi de 1,4%, e de 1,7% utilizando-se o comprimido. Contudo, este valor está contido dentro do desvio padrão relativo máximo do autoinjeter para 10 injeções consecutivas, que deve ser no máximo 1,0% (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2013). Assim sendo, poderia haver uma tendência dos valores só aumentarem ou só diminuirerem ou alternarem com o tempo, dentro dessa faixa. Como o DPR do injetor utilizado encontrava-se acima do limite, esse teste foi repetido para melhores esclarecimentos. Após troca do selo da agulha, do selo da válvula de injeção e purga da linha, após 30 injeções, o DPR se reduziu para 0,4%. Esses resultados sugerem que a RMP pode ser considerada estável em CCl₄, tanto para dissolver o padrão secundário como dissolver a RMP no comprimido.

Utilizando o solvente CCl₄, os resultados dos valores de *p* foram iguais aos encontrados com o diluente da USP, sendo de 0,0017. Pode-se concluir que com o solvente CCl₄, a estabilidade da RMP em 10 horas de análise é considerada estável, já que a degradação foi a mesma encontrada que a da USP em 2 horas.

Um ponto desfavorável para eleger o CCl₄ como solvente ideal para a RMP é a baixa solubilidade, segundo Gallo e Radaelli (1976), por isso, alguns ensaios

de solubilidade foram realizados. Os testes revelaram ser de fácil preparo soluções de RMP em CCl_4 entre 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$, com auxílio de banho ultrassônico, por cerca de 10 minutos. A faixa de concentração usada nos métodos de análise via CLAE/UV-VIS, normalmente, não ultrapassa esse intervalo de concentração, visto que a RMP possui uma absorvidade molar muito significativa, a saber: $A^1_1 = 320a$ (231nm) e $A^1_1 = 250a$ (336nm) em meio ácido na região UV ou, na região visível: $15280 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (475nm) (GALLO, RADAELLI, 1976).

Outro ponto desfavorável para eleger o CCl_4 é a sua toxicidade. Além de ser perigoso ao ambiente, ele é tóxico se for ingerido, inalado ou absorvido pela pele, podendo causar irritação nos olhos, no trato respiratório e na pele. O solvente é suspeito de ser possível causador de câncer (o que depende do nível e duração da exposição), podendo vir a afetar o sistema nervoso central, pulmões, fígado e rins (MERCK, 2012).

Além disso, o uso do CCl_4 como solvente seria o alto valor de *cutoff* no UV em 265 nm, a exemplo de outros solventes, tais como: triclorometano (CHCl_3), diclorometano (CH_2Cl_2) e DMSO. No entanto, para a RMP há faixas mais seletivas de comprimento de onda de visualização, onde o sinal do solvente estaria atenuado ou inexistente (em 335 nm) (GALLO, RADAELLI, 1976).

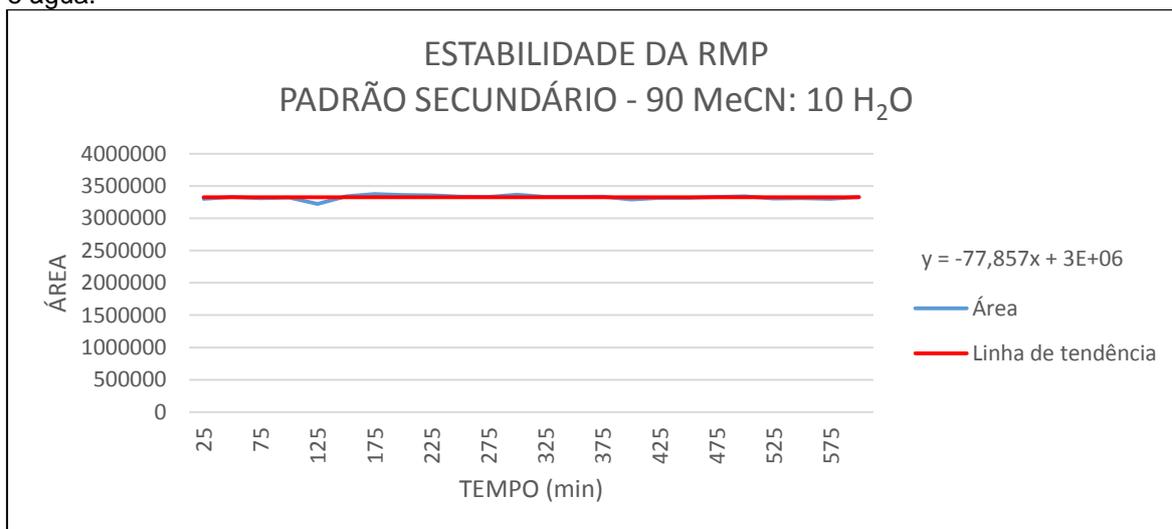
Os comportamentos dos outros solventes testados, comparados ao CCl_4 , foram bem diferentes. Em MeOH a RMP decaiu mais acentuadamente no comprimido, onde a porcentagem de degradação foi de 18,2% e no padrão foi de 2,10%. Já na MeCN, a porcentagem de degradação foi de 0,93% para o padrão e de 5,07% para o comprimido. Não parece haver evidências de alguma relação com a polaridade do solvente já que, em ordem crescente seria: CCl_4 ($\epsilon = 2,24$, $\mu = 0$) < MeOH ($\epsilon = 32,7$, $\mu = 1,7$) < MeCN ($\epsilon = 37,5$, $\mu = 3,45$). Parece haver conexão com a acidez relativa, já que em termos de valor de pKa a ordem é: MeCN (25) < H_2O (15,7) < MeOH (15,5) a 25°C (MERCK, 2006).

A análise da RMP no solvente MeOH e MeCN no comprimido 4 em 1, obteve valores de p menores que 0,0017, sendo de $6,04 \times 10^{-22}$ e de $2,56 \times 10^{-13}$, respectivamente. Tanto o MeOH, quanto a MeCN possuem uma degradação considerável em 10 horas.

Entretanto, o ideal seria utilizar um só diluente para os quatro princípios ativos durante a análise, sem provocar alterações estruturais na RMP. Era sabido que alguma proporção de água deveria entrar na composição. Isso porque o EMB está presente no comprimido 4 em 1 na forma diprotonada, como cloridrato, portanto, insolúvel em solventes orgânicos (exceto DMSO e DMF que conseguem solvatar o sal).

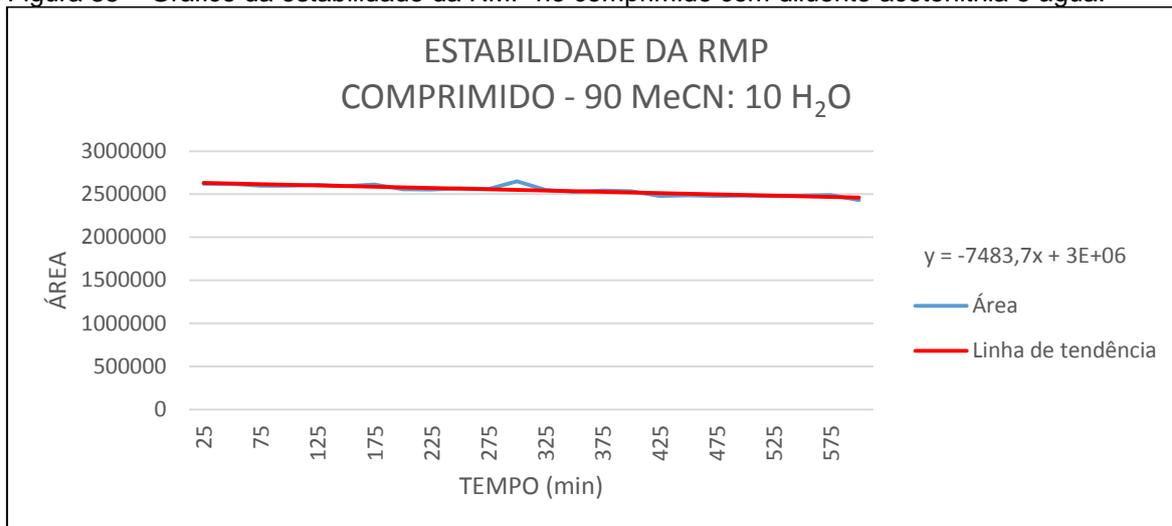
Após testar algumas proporções, foi observado que uma mistura contendo 10% de água e 90% de solvente orgânico (MeCN ou MeOH) era suficiente para promover uma dissolução imediata de todos os quatro fármacos. Em seguida, foram feitos ensaios no padrão secundário e no comprimido 4 em 1 visando confrontar as inclinações das linhas de tendência após a adição da água (figuras 34 e 35).

Figura 34 – Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente acetonitrila e água.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Figura 35 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente acetonitrila e água.



Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

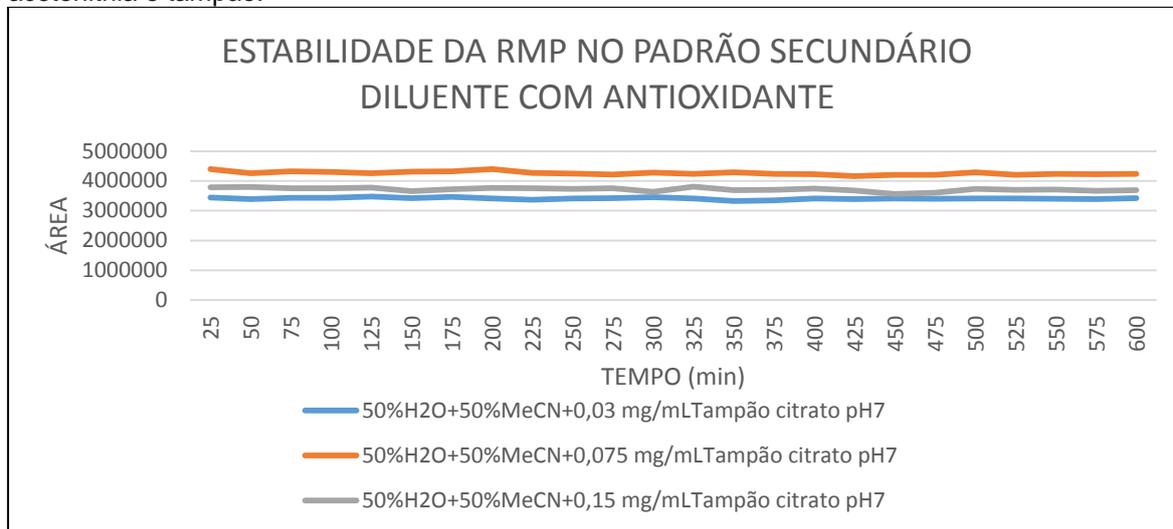
Observando o valor das áreas no gráfico (figura 35) e comparando com o gráfico em MeCN pura (figura 33), as ordens de grandeza das inclinações foram similares. Porém, muito provavelmente, a inclinação da reta de tendência foi afetada, porque houve algum problema nas injeções quase no fim da sequência, originando valores de área decrescentes e logo após crescentes. Mas, no geral, considerou-se que não houve significativas mudanças no grau de degradação devido à adição de água. Porém, foi mantida a tendência à maior degradação quando a RMP encontra-se misturada no comprimido 4 em 1, com 7,28% em 10 horas. A análise da RMP no solvente 90% MeCN: 10% H₂O no comprimido, obteve valor de p menor que 0,0017, sendo de $3,86 \times 10^{-9}$, que demonstra uma considerável degradação.

Na tentativa de diminuir esse valor de degradação foram feitas duas alterações nos ensaios: aumentou-se a quantidade de água, para diminuir a concentração hidrogeniônica (o pH da dissolução do comprimido era 5,4) e adicionou-se concentrações variadas de um antioxidante (solução tampão citrato pH 7). Foram preparados soluções de diluente com 50% de água e 50% MeCN, contendo 0,03, 0,075 e 0,15 mg/mL de tampão citrato.

Comparando-se as linhas de tendência (figuras 36 e 37), foi possível notar a diminuição do decaimento da RMP, quando em mistura no comprimido 4 em 1. A diluição e a concentração de antioxidante fizeram efeito e retardaram a cinética

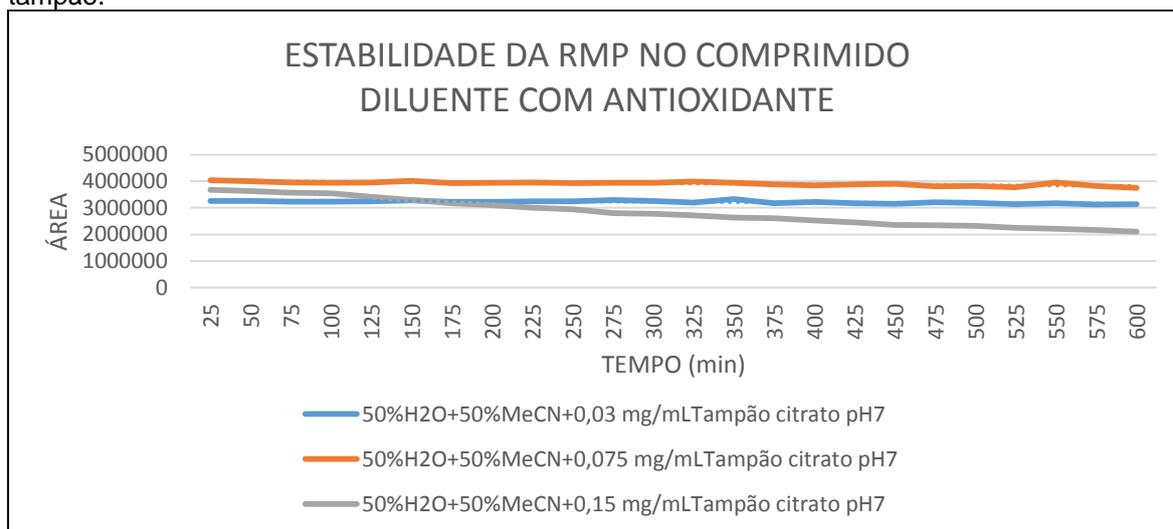
de degradação. Quanto menor a concentração de citrato, menor foi a inclinação da reta. No entanto, o comportamento anômalo com o tampão mais concentrado, deve ser motivo de estudos futuros para melhor esclarecimento.

Figura 36 – Gráfico da estabilidade da RMP no padrão secundário com diluente água, acetonitrila e tampão.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

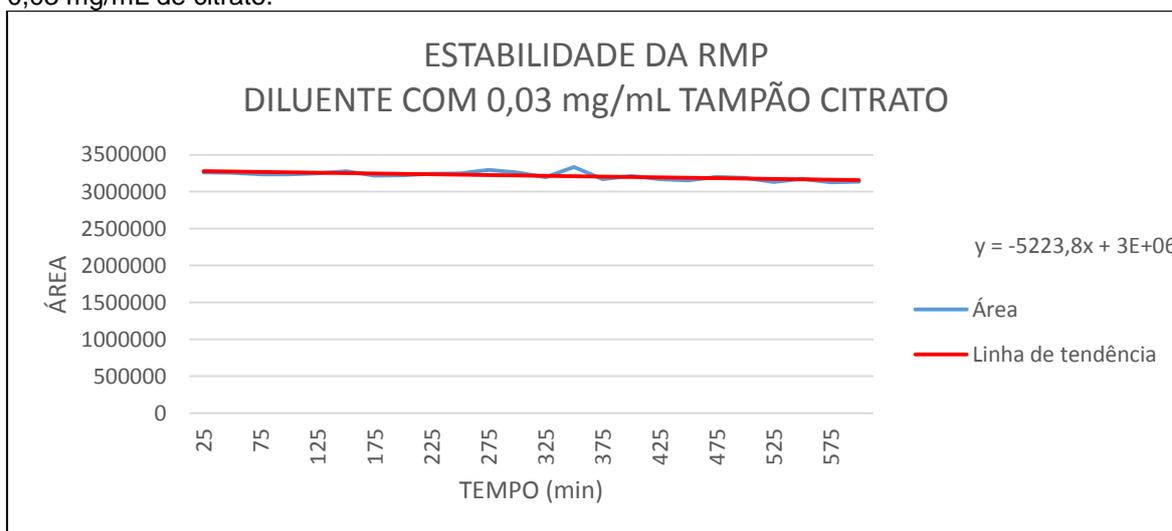
Figura 37 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água, acetonitrila e tampão.



Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

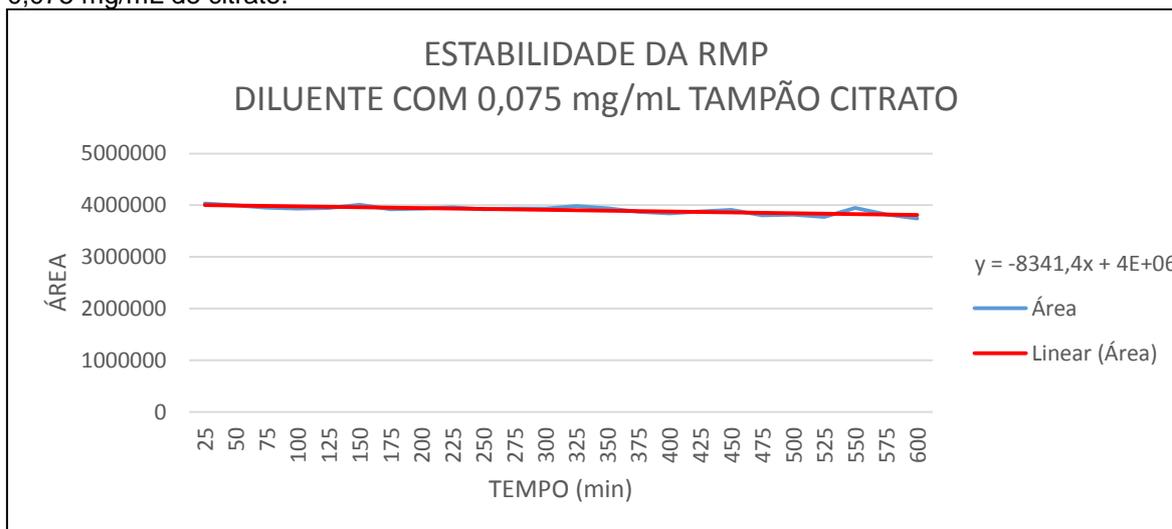
Utilizando-se o mesmo critério de cálculo, nas figuras 38 e 39, os graus de degradação foram de 3,77 e 7,12%, bem próxima no comprimido do diluente USP (7,02%), mas não insignificante para 10 horas de análise, comparando-se com o CCl_4 (1,70%).

Figura 38 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água e acetonitrila com 0,03 mg/mL de citrato.



Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 $\mu\text{g/mL}$, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm .

Figura 39 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água e acetonitrila com 0,075 mg/mL de citrato.



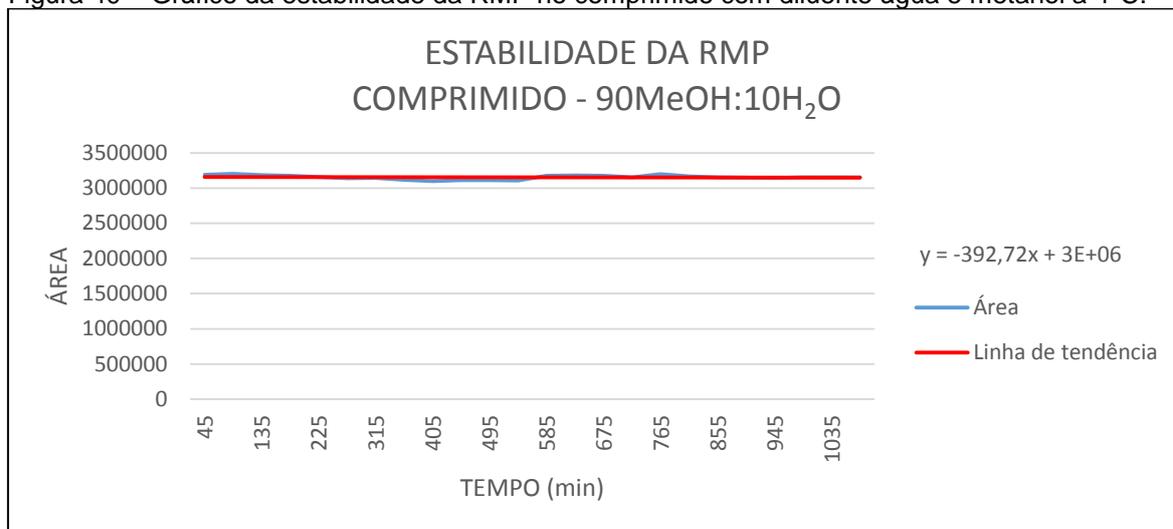
Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 $\mu\text{g/mL}$, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm .

A análise da RMP no solvente com antioxidante no comprimido, obteve valores de p menores que 0,05, sendo de 0,00017 e de $2,74 \times 10^{-6}$, respectivamente. Tanto o 0,03 mg/mL de tampão citrato, quanto 0,075 mg/mL possuem uma degradação maior que a obtida pela referência que foi da USP em 2 horas (0,0017).

Na etapa de testes seguinte, lançou-se mão de um recurso dos autoinjetores utilizados, que seria a possibilidade de resfriamento da bandeja de *vials*. Foram feitos os testes com a mistura de solventes 90% MeCN ou 90% MeOH, ambos com 10% de água e com a mistura contendo a menor concentração de tampão citrato. A bandeja com o *vial* foi resfriada a 4°C, antes do início das injeções.

Nesses ensaios o tempo da sequência de injeções foi aumentado para 18 horas. Todos os resultados foram semelhantes ao obtido na figura 40. As percentagens de decaimento foram próximas a zero, neste caso foi de 0,002%.

Figura 40 – Gráfico da estabilidade da RMP no comprimido com diluente água e metanol a 4°C.



Condições experimentais: solução do comprimido 4 em 1 de concentração aproximadamente 200 µg/mL, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 335 nm, com fase móvel de água e metanol, em modo gradiente segundo tabela 1, com tempo de análise de 25 min. e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

A análise da RMP no solvente MeOH, com temperatura de injeção a 4°C, no comprimido, obteve valores de p maiores que 0,05, sendo de 0,6629. Demonstrando uma estabilidade da solução, quando comparada com a referência que foi da USP em 2 horas (0,0017).

Os testes conduziram a duas possibilidades de solucionar o problema da degradação da RMP. O fator limitante dependerá se o laboratório dispõe ou não de injetor automático com controlador “*Peltier*”, para resfriamento da bandeja de *vials*. Se sim, basta utilizá-lo a, pelo menos a 4°C e, se não, utilizar um solvente apolar, como o CCl₄ como diluente. Neste caso haverá um aumento do número de injeções, pois a RMP será analisada em separado. Porém, em ambos os casos, não são necessárias injeções imediatas após o preparo das alíquotas.

Não houve problemas relacionados à injeção do solvente apolar CCl₄ em fase móvel polar, cuja proporção inicial continha somente 15% de MeOH. Aproximando-se do fim do gradiente, onde a proporção de MeOH atinge 100%, ocorre a eliminação do CCl₄. Os solventes são miscíveis em quaisquer proporções.

Não foi utilizado outro solvente apolar, tal como o hexano e outros hidrocarbonetos da série, porque seus usos não são indicados em fase reversa, com colunas C18 e C8, devido à forte interação entre eles. Pensou-se no uso de ciclohexano em substituição ao CCl₄, porém este solvente não estava disponível na época que estes testes foram realizados.

4.3. FORMAÇÃO COMPLEXO METAL-ETAMBUTOL E SUA ABSORÇÃO NO UV

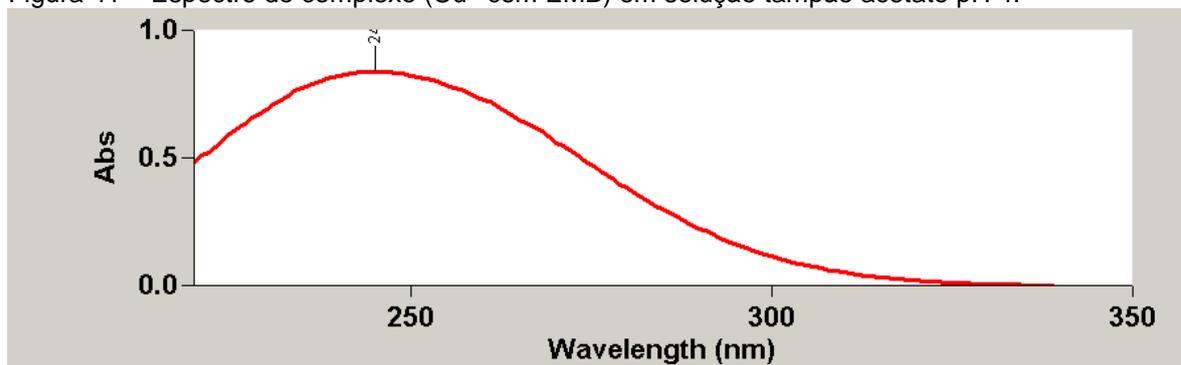
Os estudos foram direcionados visando à formação de complexos de coordenação, baseada na já conhecida propriedade das aminas em complexar os metais de transição. Foram feitas experiências com alguns cátions: Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ e Cu²⁺, com solução de EMB nas mesmas concentrações, e diluídas com soluções de tampão acetato de sódio com valores de pH entre 4 a 7. Nas cercanias do valor de pH 7, alguns desses íons começam a precipitar como hidróxido. O cátion Ag⁺ não foi testado porque precipitaria como AgCl, devido à dissociação em meio aquoso do cloridrato de EMB.

É de conhecimento na literatura técnica que esses cátions formam complexos estáveis com o amoníaco e a maioria das aminas exceto as aminas pouco nucleofílicas (FARIAS, 2005). No caso do EMB, foi observada a formação de complexo com Ni²⁺ e Cu²⁺, sendo que o complexo com o Ni²⁺ possui uma

constante de estabilidade menor que a do complexo com Cu^{2+} , sendo este último mais estável e com maior absorvidade molar.

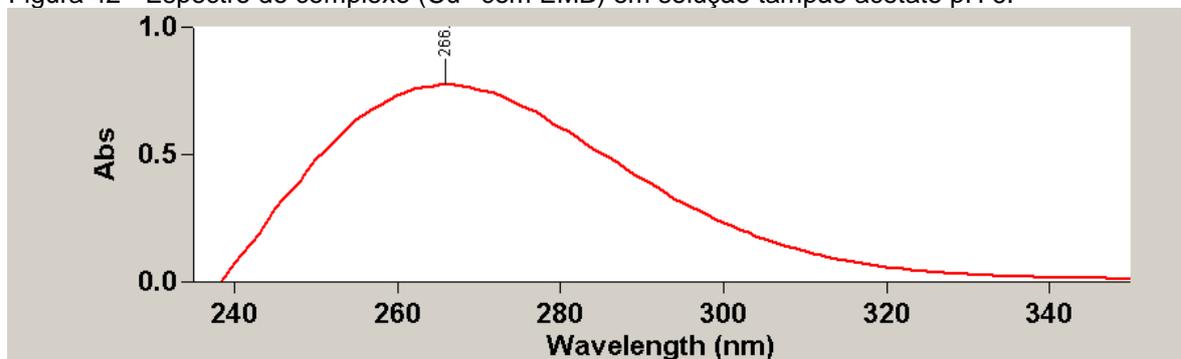
Outro fato observado é que o aumento do pH gerou um deslocamento batocrômico, deslocamento da banda de absorção para um comprimento de onda maior, no espectro UV do complexo. As figuras 41 e 42 mostram os comprimentos máximos de absorção na região UV em uma solução tampão pH 4, abaixo de 250 nm e pH 6, em 266 nm.

Figura 41 – Espectro do complexo (Cu^{2+} com EMB) em solução tampão acetato pH 4.



Condições experimentais: espectro de varredura de solução padrão secundário de concentração aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$ em tampão acetato de sódio pH 4.

Figura 42 - Espectro do complexo (Cu^{2+} com EMB) em solução tampão acetato pH 6.



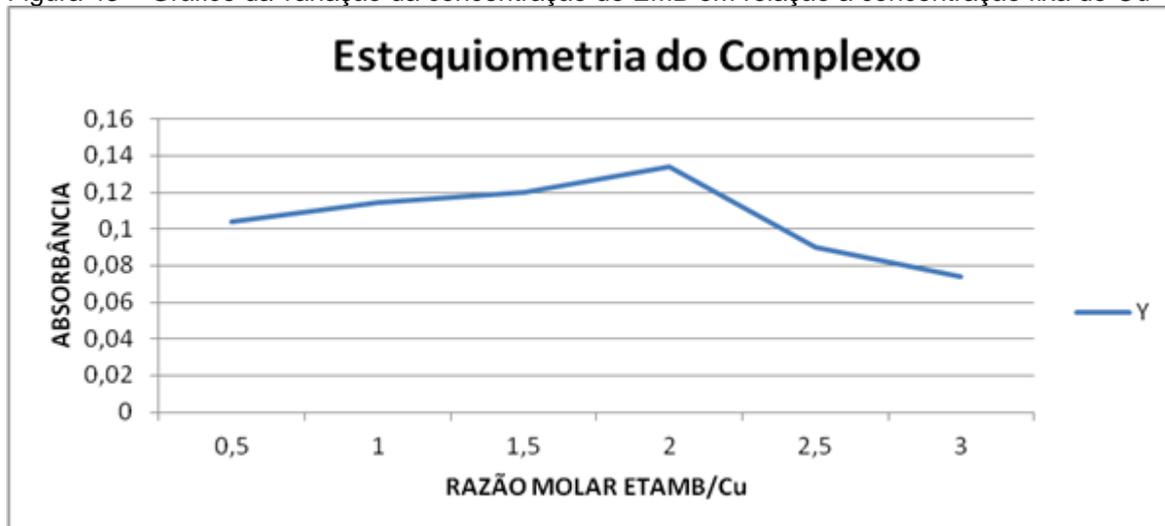
Condições experimentais: espectro de varredura de solução padrão secundário de concentração aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$ em tampão acetato de sódio pH 6.

No que se refere ao complexo formado com Cu^{+2} , muito provavelmente sua constante de estabilidade deve ser bastante alta, uma vez que a mesma solução foi analisada meses após o preparo sem nenhuma alteração espectral observável.

Com o objetivo de saber sobre o excesso de complexante necessário na fase móvel, a fórmula empírica e a estequiometria do complexo foram determinadas através da técnica de variação da concentração do EMB em

relação a uma concentração fixa de Cu^{2+} por espectrofotometria UV, em 265 nm (LIKUSSAR, BOLTZ, 1971). Através da figura 43, foi possível concluir que a estequiometria consiste de 2 mols de complexante para 1 átomo-grama de íons cúprico.

Figura 43 – Gráfico da variação da concentração do EMB em relação a concentração fixa do Cu^{2+} .

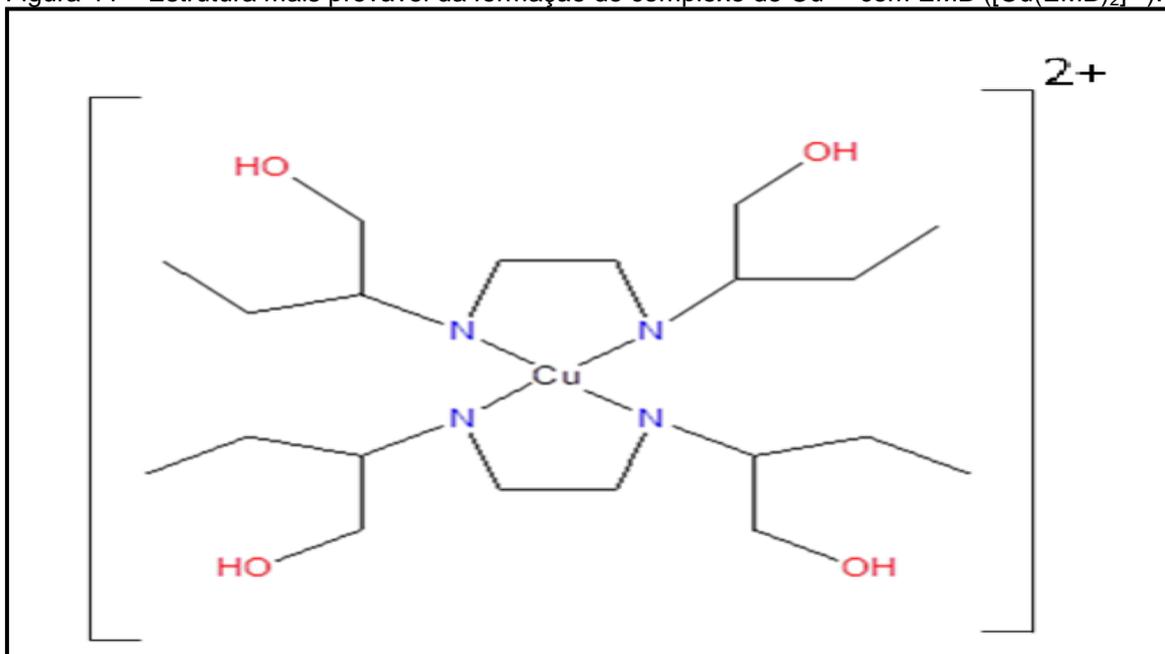


Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 32 $\mu\text{g/mL}$, concentração de Cu^{2+} aproximadamente 10 $\mu\text{g/mL}$ em tampão acetato de sódio pH 6, espectrofotômetro Varian UV-VIS com comprimento de onda de 265 nm.

A estrutura mais provável do complexo formado entre o íon cúprico e as duas moléculas do EMB é tetraédrica, conforme esquematizada na figura 44. A ligação entre o íon cúprico e a molécula do EMB se dá pelo nitrogênio dos grupamentos amino, em uma distância favorável para se formar um anel.

Não se investigou mais dados sobre a real estrutura do complexo, mas há possibilidade da água e do íon cloreto também fazerem parte do complexo, que tem cor azul e é bastante estável.

Figura 44 – Estrutura mais provável da formação do complexo de Cu^{2+} com EMB ($[\text{Cu}(\text{EMB})_2]^{2+}$).

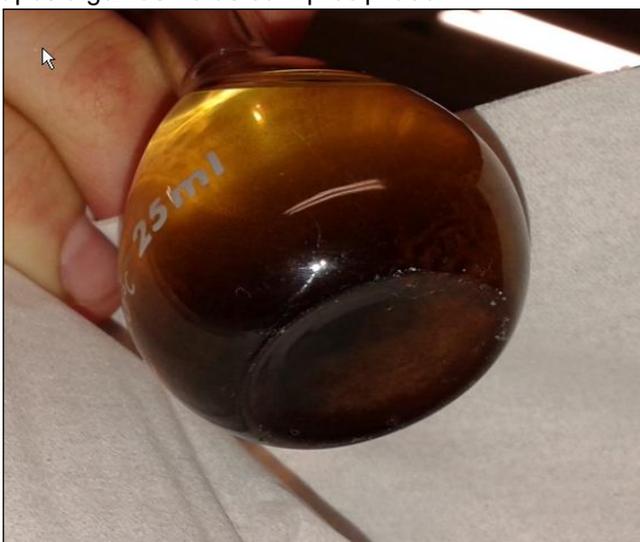


Segundo os compêndios sobre CLAE, geralmente, é indicado o uso da própria fase móvel para dissolver os analitos. Por este motivo, foram testados os outros três fármacos como complexantes, misturando-os com uma solução de sulfato de cobre (figura 45). Somente a PYA não formou complexo com o Cu^{2+} , devido às suas propriedades fortemente ácidas. Com a INH, nas primeiras horas, nada foi observado, porém, com o tempo, a solução foi se tornando amarelada. Isso sugere que a formação do complexo foi lenta. A solução de RMP mudou de cor e, após algumas horas, observou-se a formação de um precipitado escuro (figura 46). Devido à formação dos complexos e a precipitação com a INH e com a RMP, não foi usada a fase móvel com Cu^{2+} como diluente.

Figura 45 – Soluções da PYA, RMP, INH e EMB com solução de sulfato de cobre.



Figura 46 – Solução de RMP com sulfato de cobre após algumas horas com precipitado.



4.4. DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA

Com a definição do melhor diluente para a análise do comprimido, 10% de água e 90% de metanol, maior estabilidade da RMP e com a definição do complexo, os testes seguintes foram feitos para obter um cromatograma com os quatro fármacos dentro dos critérios de aceitabilidade para os parâmetros de adequação da separação cromatográfica.

Como os quatro fármacos contém um ou mais grupos ácidos e/ou básicos e a retenção desses compostos em fase reversa é muito sensível à variação do

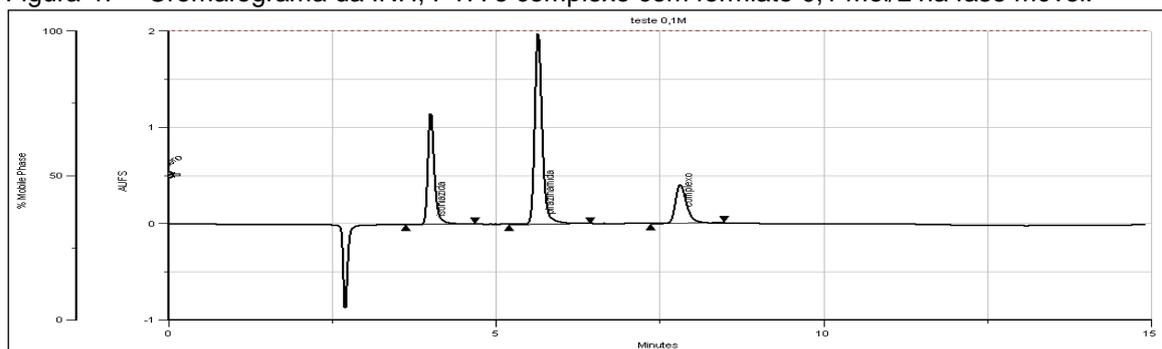
pH, foi necessário o uso de tampão na fase móvel. Foram testados o uso do acetato de amônio em pH neutro ($pK_{a_{HAC}} = 4,8$, 20°C) na faixa de 6 a 7 e formiato de amônio em pH levemente ácido, na faixa de 4 a 5 ($pK_{a_{HFO}} = 3,8$, 20°C), mesmo no limite ou extrapolando a capacidade tamponadora máxima. A utilização de tampão fosfato ($pK_{as} = 2,1; 7,2$ e $11,8$) não era indicada devido à alta insolubilidade do fosfato de cobre em meio aquoso. Optou-se pelo uso de formiato de amônio que conduziu a uma melhor simetria dos sinais e pelo fato da faixa de pH estar afastada dos valores de pK_a dos fármacos.

Foram feitos alguns ensaios preliminares com o objetivo de verificar a influência da variação da concentração de formiato de amônio na eluição da INH, PYA e do complexo. Variou-se a concentração entre 0,1 e 0,5 mol/L, na faixa de pH entre 4,5 e 5,0. Não se experimentou valores menores que 0,1 mol/L, para manter sempre alta a concentração do sal na fase móvel.

Não foram observadas variações muito pronunciadas de K para a INH e PYA. Isso está em conformidade com a literatura técnica sobre CLAE em fase reversa, que mostra que a influência da força iônica sobre o fator de capacidade não é tão significativa quanto a variação de pH, no caso de substâncias ionizáveis (LANÇAS, 2009).

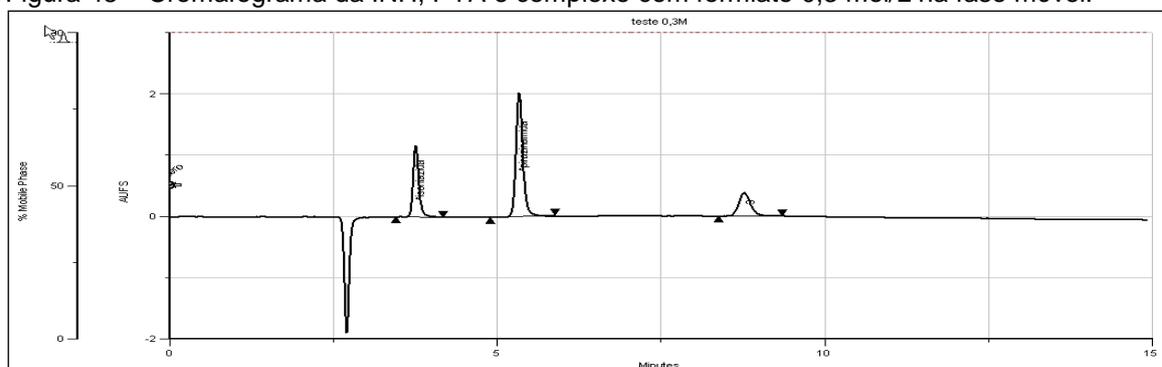
No entanto, isso não foi válido no que diz respeito à eluição do complexo (figuras 47, 48 e 49). Em princípio, este efeito foi inesperado. À medida que a concentração do sal aumentou, houve um aumento nos tempos de retenção, diminuindo a interação do complexo catiônico, duplamente carregado, com a fase móvel e aumentando as interações com a fase estacionária, que possui uma barreira apolar, o octadecilsilano, além de silanóis livres silanizados com trimetilsilil (*endcapped*). A interpretação encontrada foi que, com a maior oferta de formiato no meio, a neutralização das cargas positivas do complexo tornou-se mais efetiva. Daí o ganho de retenção na fase reversa.

Figura 47 – Cromatograma da INH, PYA e complexo com formiato 0,1 mol/L na fase móvel.



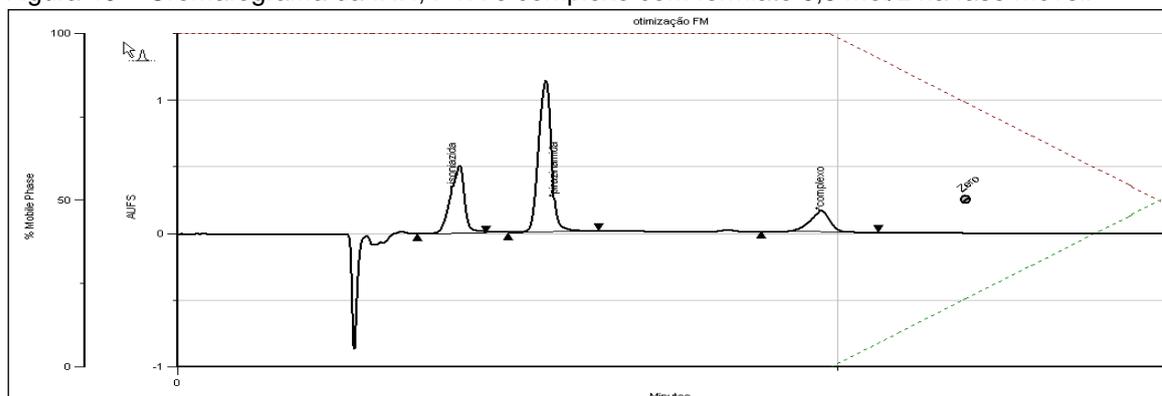
Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 265 nm, fase móvel solução A: 85% tampão formiato de amônio 0,1 mol/L pH 5, 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 15% metanol, em modo isocrático, e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Figura 48 – Cromatograma da INH, PYA e complexo com formiato 0,3 mol/L na fase móvel.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 265 nm, fase móvel solução A: 85% tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 15% metanol, em modo isocrático, e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm.

Figura 49 – Cromatograma da INH, PYA e complexo com formiato 0,5 mol/L na fase móvel.



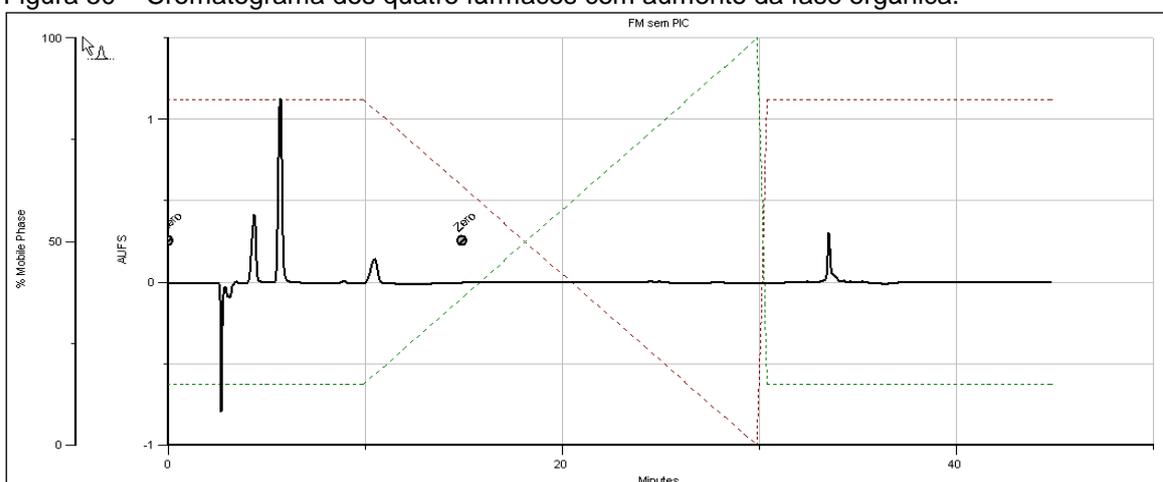
Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA e EMB, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 265 nm, fase móvel solução A: 85% tampão formiato de amônio

0,5 mol/L pH 5, 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 15% metanol, em modo isocrático, e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm .

Após esses testes preliminares, a fase móvel foi otimizada para a eluição dos três princípios ativos (INH, PYA e EMB). A composição estabelecida foi: 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 0,3 mol/L de formiato de amônio com pH dentro da faixa de 4,5 a 5,0.

Em seguida, a ideia inicial seria simplesmente aumentar a quantidade de fase orgânica (MeOH), segundo uma programação de gradiente linear, até que as eluições da RMP e dos seus relacionados fossem observadas sem sobreposição dos sinais. No entanto, o perfil do pico da RMP não foi considerado apropriado (figura 50).

Figura 50 – Cromatograma dos quatro fármacos com aumento da fase orgânica.

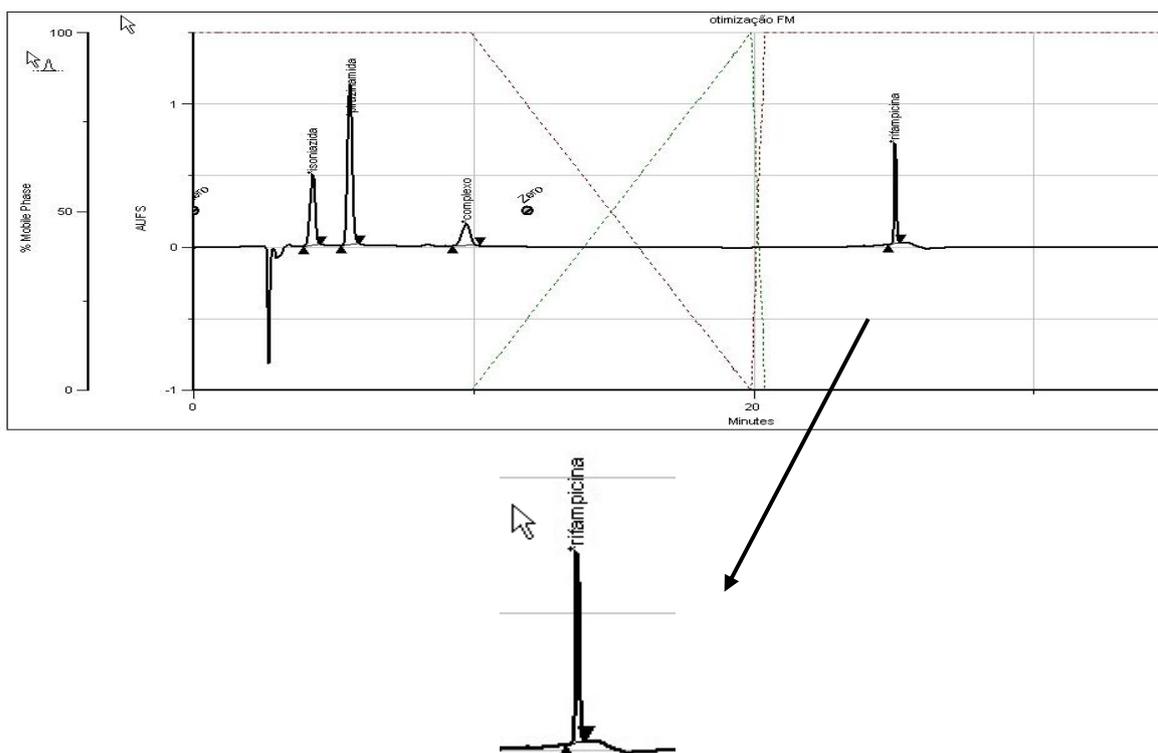


Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 $\mu\text{g/mL}$ de INH, PYA, EMB e RMP, cromatógrafo Gilson com detector UV, fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 335 nm, fase móvel solução A: tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e solução B: metanol, em modo gradiente segundo tabela 3 e coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm .

A simetria dos picos pode ser comprometida devido à forte interação do grupo silanol da fase estacionária ($\text{pK}_a \sim 3,5$) com os grupamentos básicos, principalmente da INH e da RMP. Para prevenir tal problema, foi utilizada uma coluna cuja fase estacionária era desativada (*endcapped*), bem como, foi feita a adição de uma base orgânica, a trietilamina, para competir, juntamente com o analito, o qual está em muito menor quantidade do que o aditivo, por “possíveis” sítios ativos da fase estacionária, isto é, silanoís regenerados devido à clivagem do grupamento silila ou não derivatizados.

Após a adição de trietilamina e ácido fórmico na fase orgânica, o perfil cromatográfico foi ajustado dentro dos parâmetros de simetria para a RMP, como pode ser observado no cromatograma da solução com a mistura dos fármacos (figura 51).

Figura 51 – Cromatograma do comprimido com a fase móvel com adição de trietilamina e ácido fórmico.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA, EMB e RMP, cromatógrafo Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm com fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 265 e 335 nm, fase móvel solução A: 85% tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15% metanol e 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e solução B: metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico em modo gradiente segundo tabela 4.

A deformação observada no final do pico da RMP no cromatograma da figura 51 é devido ao aumento da composição da fase móvel durante a programação do gradiente, conforme pode ser observado no cromatograma do diluente (MeOH e H_2O , 90:10%) na figura 52.

Figura 52 – Cromatograma do diluente com a fase móvel com adição de trietilamina e ácido fórmico.



Condições experimentais: diluente, cromatógrafo Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm com fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 265 e 335 nm, fase móvel solução A: 85% tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15% metanol e 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e solução B: metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico em modo gradiente segundo tabela 4.

Os valores dos parâmetros de adequação do sistema estão em conformidade com os preconizados nos compêndios internacionais, quadro 4 (página 40). Os resultados dos parâmetros obtidos no cromatograma da figura 51 estão na figura 53.

Figura 53 – Parâmetros de adequação do sistema do cromatograma da figura 51 .

	Peak Name	R. Time	Back Resolution	Front Resolution	Sample Descrip.	Peak asymmetry	Capacity (k')	Plate number	Area
1	*isoniazida	4.27	2.09	** N/A **	timização Flv	0.67	1.37	2286.54	10931838.00
2	*pirazinamida	5.58	5.61	2.09	timização Flv	1.00	2.10	4750.73	22979156.00
3	*complexo	9.76	24.56	5.61	timização Flv	0.79	4.42	4505.23	5477138.00
4	*rifampicina	25.05	** N/A **	24.56	timização Flv	1.19	12.92	503996.03	6769881.00

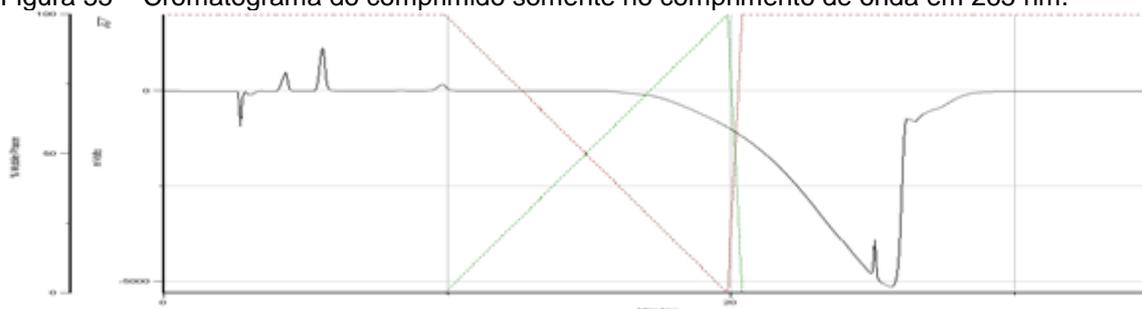
Para a obtenção do cromatograma da figura 51 foram utilizados dois comprimentos de onda: 265 nm para monitorar a INH, PYA e complexo (Cu-EMB) e 335 nm, a partir de 12 minutos, para monitorar a RMP e suas substâncias relacionadas. O software do equipamento utilizado (Unipoint®) permite a troca para um novo comprimento de onda na mesma análise cromatográfica, zera a linha de base e ajusta a sensibilidade da célula fotomultiplicadora em três comandos de tempo (figura 54).

Figura 54 – Condições do método de controle com troca de comprimento de onda.

	Time	Device(s)	Command	Comment
1	0.00	1 A aquoso / Solvent B or	1 (ml/min): 100% Solvent A aquoso, 0% Solvent B orgânico	fase móvel
2	0.01	Detector 16	Set Wavelength 265	comprimento de onda
3	0.02	Detector 16	Set Sensitivity 1 0.001	sensibilidade
4	0.03	Detector 16	Autozero Channels	autozero
5	0.04	235 partial loop injection	<start> TUBE, 15	injetar
6	0.06	System Controller	Synchronize	sincronizar
7	0.07	Data Channels	Start Chromatogram Channels	iniciar aquisição
8	10.00	1 A aquoso / Solvent B or	1 (ml/min): 100% Solvent A aquoso, 0% Solvent B orgânico	fase móvel
9	12.00	Detector 16	Set Wavelength 335	comprimento de onda
10	12.02	Detector 16	Set Sensitivity 2 0.001	sensibilidade
11	12.04	Detector 16	Autozero Channels	autozero
12	20.00	1 A aquoso / Solvent B or	1 (ml/min): 0% Solvent A aquoso, 100% Solvent B orgânico	fase móvel
13	20.50	1 A aquoso / Solvent B or	1 (ml/min): 100% Solvent A aquoso, 0% Solvent B orgânico	fase móvel
14	34.90	1 A aquoso / Solvent B or	1 (ml/min): 100% Solvent A aquoso, 0% Solvent B orgânico	fase móvel
15	35.00	Data Channels	Stop Chromatogram Channels	finalizar aquisição

No entanto, se for utilizado outro equipamento cujo software não alterne eventos durante a análise cromatográfica, todas as substâncias podem ser visualizadas em 265 nm (figura 55). Nesse caso, haverá um declínio natural da linha de base à medida que a composição da fase B (MeOH com os aditivos) aumenta durante a programação do gradiente, pois a fase A absorve muito mais que a fase B. Entretanto, conforme já citado anteriormente, o comprimento de 335 nm foi o considerado mais específico para a observação do cromóforo da RMP e de seus relacionados.

Figura 55 – Cromatograma do comprimido somente no comprimento de onda em 265 nm.



Condições experimentais: padrão secundário de concentração aproximadamente 100 µg/mL de INH, PYA, EMB e RMP, cromatógrafo Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 µm com fluxo de 1 mL/min., volume de injeção de 10 µL, comprimento de onda de 265 nm, fase móvel solução A: 85% tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15% metanol e 0,005 mol/L de Cu²⁺ (ou 250 mg/L de CuSO₄.5H₂O) e solução B: metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico em modo gradiente segundo tabela 4.

Também existem equipamentos que permitem o monitoramento em dois ou mais comprimentos de onda ao mesmo tempo, além de outros cromatógrafos

equipados com detector UV por arranjo de diodos. O método é factível, quaisquer que sejam os instrumentos.

As condições finais para análise do comprimido 4 em 1 por CLAE/UV desenvolvidas neste trabalho estão descritas na tabela 6.

Tabela 6: Condições finais do método desenvolvido para análise do comprimido 4 em 1.

MÉTODO DESENVOLVIDO		
SUBSTÂNCIAS	CONDIÇÕES	
Isoniazida	Coluna: C18 25cm x 4,6mm x 5µm	
	Detector: UV (265 nm e 335 nm)	
	Fluxo: 1,0 mL/min	
	Volume de injeção: 10µL	
	Diluyente: 90% MeOH ou MeCN + 10% água	
Pirazinamida	Fases Móveis:	
Etambutol	A) 85% tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15% metanol e 0,005 mol/L de Cu ²⁺ (ou 250 mg/L de CuSO ₄ .5H ₂ O)	
Rifampicina	B) metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico	
	Gradiente de eluição:	
	Tempo	Solução A Solução B
	0 – 10 min	100% 0%
	10 - 20 min	0% 100%
	20 - 35 min	100% 0%

4.5. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO MÉTODO

4.5.1. Determinação da linearidade

Com as condições da análise definidas, iniciou-se a avaliação da parte quantitativa do método, avaliando-se inicialmente a curva de calibração. Nas tabelas 6, 7, 8 e 9 abaixo estão descritas as concentrações dos 7 níveis das curvas analíticas para os padrões de INH, PYA, EMB e RPM, respectivamente.

Tabela 7 - Concentrações das soluções de trabalho da curva de calibração da INH (mg/mL).

	Nível 1 70%	Nível 2 80%	Nível 3 90%	Nível 4 100%	Nível 5 110%	Nível 6 120%	Nível 7 130%
<i>Isoniazida</i>							
<i>Concentração</i>	0,0546	0,0624	0,0702	0,0780	0,0858	0,0936	0,1014

Tabela 8 - Concentrações das soluções de trabalho da curva de calibração da PYA (mg/mL).

	Nível 1 70%	Nível 2 80%	Nível 3 90%	Nível 4 100%	Nível 5 110%	Nível 6 120%	Nível 7 130%
<i>Pirazinamida</i>							
<i>Concentração</i>	0,2087	0,3208	0,3609	0,401	0,4411	0,4812	0,5213

Tabela 9 - Concentrações das soluções de trabalho da curva de calibração do EMB (mg/mL).

	Nível 1 70%	Nível 2 80%	Nível 3 90%	Nível 4 100%	Nível 5 110%	Nível 6 120%	Nível 7 130%
<i>Etambutol</i>							
<i>Concentração</i>	0,1939	0,2216	0,2493	0,277	0,3047	0,3324	0,3601

Tabela 10 - Concentrações das soluções de trabalho da curva de calibração da RPM (mg/mL).

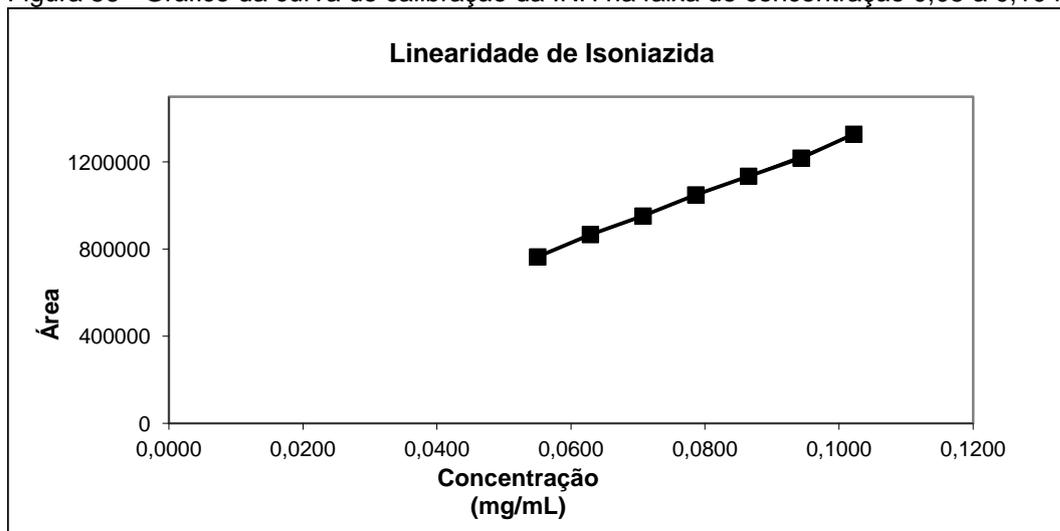
	Nível 1 70%	Nível 2 80%	Nível 3 90%	Nível 4 100%	Nível 5 110%	Nível 6 120%	Nível 7 130%
<i>Rifampicina</i>							
<i>Concentração</i>	0,10514	0,12016	0,13518	0,1502	0,16522	0,18024	0,19526

Após a aquisição dos dados experimentais (cromatogramas), foi realizada uma inspeção visual a partir da construção de um gráfico de concentração (eixo x) versus áreas obtidas após injeção das soluções (eixo y). A linearidade dos dados experimentais foi avaliada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), utilizando uma planilha de cálculo em Excel de Bazílio (2011), adaptada de Souza e Junqueira (2005). Através da planilha foi realizada a estimativa dos parâmetros (coeficiente angular, coeficiente linear e coeficiente de correlação r) e a significância da regressão linear por análise de variância (ANOVA). Além disso, foi feita a verificação da ausência de valores discrepantes pelo teste de Jackknife. A verificação das premissas do modelo não foi realizada pois não era foco do trabalho, por estes testes serem muitos criteriosos para análise de avaliação do método.

4.5.1.1. Avaliação da curva de calibração da INH

A linearidade da curva de calibração para INH na faixa de concentração de 0,05 a 0,10 mg/mL foi confirmada, conforme figura 56. Foram retirados três valores extremos pelo teste de Jacknife, marcados em vermelho na planilha (APÊNDICE A).

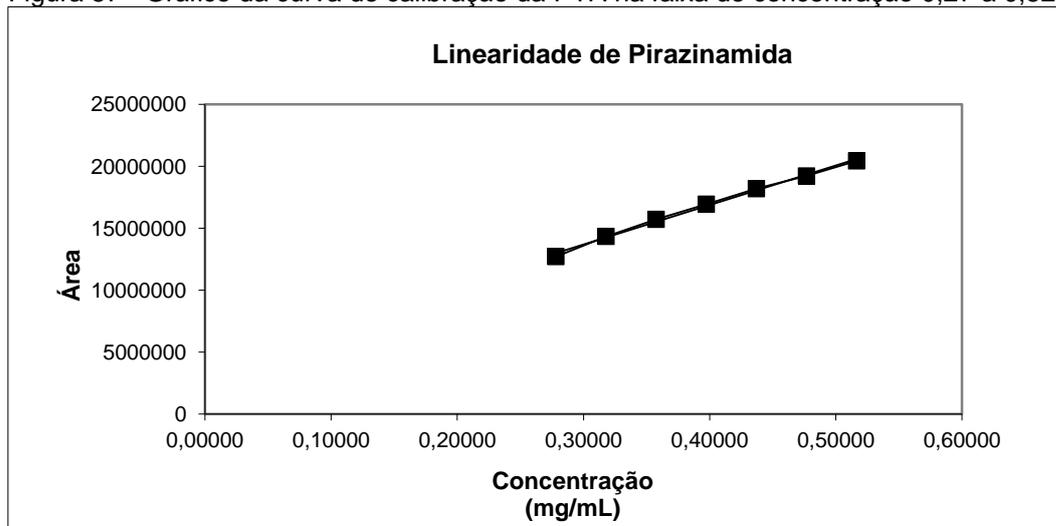
Figura 56 - Gráfico da curva de calibração da INH na faixa de concentração 0,05 a 0,10 mg/mL.



4.5.1.2. Avaliação da curva de calibração da PYA

A linearidade da curva analítica para PYA na faixa de concentração de 0,27 a 0,52 mg/mL foi confirmada, conforme figura 57. Não foram retirados valores extremos pelo teste de Jacknife na planilha (APÊNDICE B).

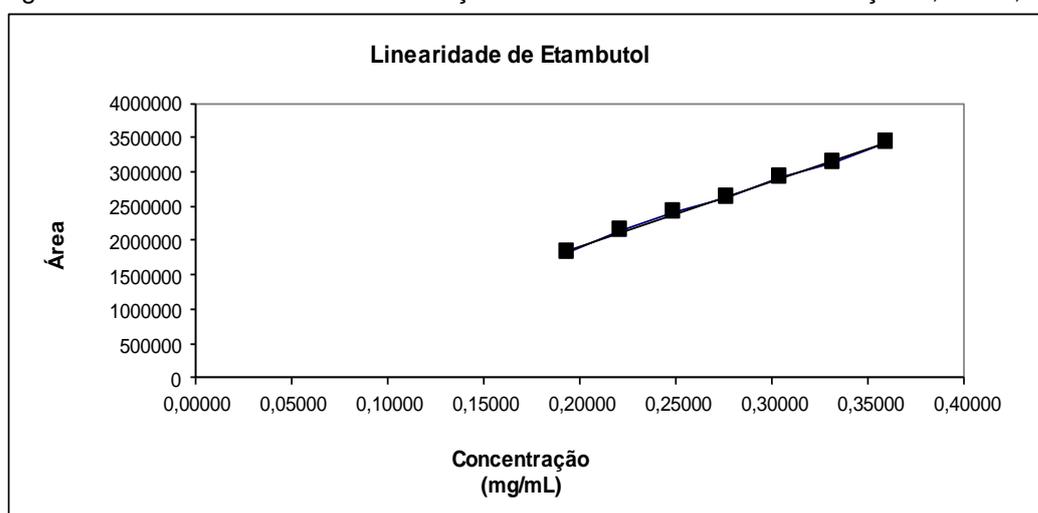
Figura 57 - Gráfico da curva de calibração da PYA na faixa de concentração 0,27 a 0,52 mg/mL.



4.5.1.3. Avaliação da curva de calibração da EMB

A linearidade da curva analítica para EMB na faixa de concentração de 0,19 a 0,36 mg/mL foi confirmada, conforme figura 58. Não foram retirados valores extremos pelo teste de Jackknife na planilha (APÊNDICE C).

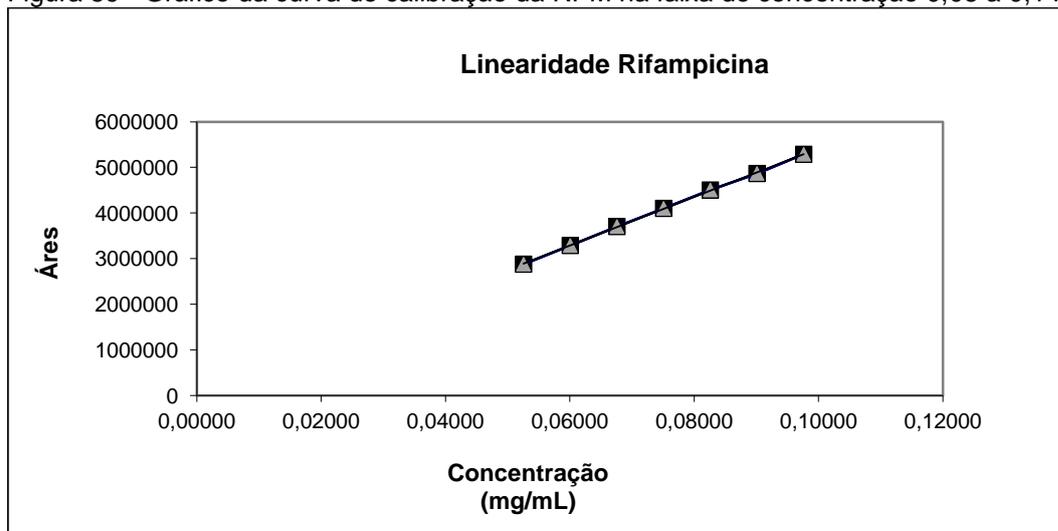
Figura 58 - Gráfico da curva de calibração do EMB na faixa de concentração 0,19 a 0,36 mg/mL.



4.5.1.4. Avaliação da curva de calibração da RPM

A linearidade da curva analítica para RPM na faixa de concentração de 0,05 a 0,1 mg/mL foi confirmada, conforme figura 59. Foi retirado um valor extremo pelo teste de Jackknife, marcado em vermelho na planilha (APÊNDICE D).

Figura 59 - Gráfico da curva de calibração da RPM na faixa de concentração 0,05 a 0,1 mg/mL.



4.5.2. Determinação da Precisão

4.5.2.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi feita contemplando a faixa linear do método, ou seja, três concentrações, baixa (80%), média (100%) e alta (120%). Os resultados das repetibilidades das análises efetuadas dos quatro fármacos foram calculados através do DPR. Os valores calculados para DPR atestam a repetibilidade do método, e não podem ultrapassar 2,0%. Todo o estudo foi realizado utilizando amostras de produtos de dois fabricantes diferentes, produto 1 e produto 2.

Nas tabelas 11, 12, 13 e 14 estão descritas as concentrações e os resultados do fármaco INH nos dois produtos.

Tabela 11 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão da INH no produto 1.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	2	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	3	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
100%	1	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	2	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	3	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
120%	1	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	2	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	3	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980

Tabela 12 – Valores de repetibilidade da INH através do DPR no produto 1.

ISONIAZIDA						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR		
80%	1	1171801	1177204	0,45	Produto 1	
	2	1182392				
	3	1177418				
100%	1	1360724	1370188	0,72		
	2	1380304				
	3	1369535				
120%	1	1655651	1649763	0,33		
	2	1644766				
	3	1648871				

Tabela 13 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão da INH no produto 2.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	2	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	3	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
100%	1	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	2	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	3	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
120%	1	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	2	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	3	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340

Tabela 14 – Valores de repetibilidade da INH através do DPR no produto 2.

ISONIAZIDA						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR		
80%	1	1230103	1229016	0,68	Produto 2	
	2	1220168				
	3	1236777				
100%	1	1447103	1452011	0,30		
	2	1455205				
	3	1453725				
120%	1	1777887	1776379	0,10		
	2	1776752				
	3	1774499				

Nas tabelas 15, 16, 17 e 18 estão descritas as concentrações e os resultados do fármaco PYA nos dois produtos.

Tabela 15 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão da PYA no produto 1.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	2	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	3	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
100%	1	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	2	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	3	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
120%	1	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	2	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	3	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980

Tabela 16 – Valores de repetibilidade da PYA através do DPR no produto 1.

PIRAZINAMIDA						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR		
80%	1	13574508	13583186	0,64	Produto 1	
	2	13501457				
	3	13673594				
100%	1	14636324	14762226	0,88		
	2	14896904				
	3	14753450				
120%	1	16536663	16435760	0,55		
	2	16365421				
	3	16405197				

Tabela 17 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão da PYA no produto 2.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	2	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	3	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
100%	1	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	2	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	3	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
120%	1	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	2	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	3	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340

Tabela 18 – Valores de repetibilidade da PYA através do DPR no produto 2.

PIRAZINAMIDA						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR		
80%	1	13770066	13734576	0,31	Produto 2	
	2	13686613				
	3	13747048				
100%	1	15335916	15376993	0,25		
	2	15411541				
	3	15383522				
120%	1	17855236	17841715	0,26		
	2	17790936				
	3	17878973				

Nas tabelas 19, 20, 21 e 22 estão descritas as concentrações e os resultados do fármaco EMB nos dois produtos.

Tabela 19 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão do EMB no produto 1.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	2	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	3	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
100%	1	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	2	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	3	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
120%	1	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	2	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	3	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980

Tabela 20 – Valores de repetibilidade do EMB através do DPR no produto 1.

ETAMBUTOL						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR		
80%	1	2610846	2625547	0,49	Produto 1	
	2	2633998				
	3	2631797				
100%	1	3173441	3196257	0,64		
	2	3213492				
	3	3201838				
120%	1	3841530	3837375	0,25		
	2	3826578				
	3	3844018				

Tabela 21 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão do EMB no produto 2.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	2	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	3	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
100%	1	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	2	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	3	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
120%	1	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	2	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	3	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340

Tabela 22 – Valores de repetibilidade do EMB através do DPR no produto 2.

ETAMBUTOL						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR	Produto 2	
80%	1	2633403	2623379	1,29		
	2	2585622				
	3	2651112				
100%	1	3065138	3068389	0,76		
	2	3046953				
	3	3093076				
120%	1	3891291	3871083	0,48		
	2	3855080				
	3	3866877				

Nas tabelas 23, 24, 25 e 26 estão descritas as concentrações e os resultados do fármaco RMP nos dois produtos.

Tabela 23 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão da RMP no produto 1.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	2	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
	3	884,80	100,0	1,0	10,0	0,88480
100%	1	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	2	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
	3	1079,30	100,0	1,0	10,0	1,07930
120%	1	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	2	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980
	3	1299,80	100,0	1,0	10,0	1,29980

Tabela 24 – Valores de repetibilidade da RMP através do DPR no produto 1.

RIFAMPICINA						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR		
80%	1	1710436	1716412	0,71	Produto 1	
	2	1708324				
	3	1730475				
100%	1	1860968	1858934	0,88		
	2	1874246				
	3	1841589				
120%	1	2050907	2044858	0,33		
	2	2037507				
	3	2046159				

Tabela 25 - Concentrações das soluções de trabalho da precisão da RMP no produto 2.

Concentração (%)	Replicata	Massa do comprimido (mg)	Volume do balão (mL)	Alíquota da diluição (mL)	Volume final da diluição (mL)	Concentração (mg/mL)
80%	1	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	2	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
	3	910,90	100,0	1,0	10,0	0,91090
100%	1	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	2	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
	3	1100,80	100,0	1,0	10,0	1,10080
120%	1	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	2	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340
	3	1363,40	100,0	1,0	10,0	1,36340

Tabela 26 – Valores de repetibilidade da RMP através do DPR no produto 2.

RIFAMPICINA						
Concentração (%)	Replicata	Área	Média (áreas)	DPR		
80%	1	1907362	1901688	0,71	Produto 2	
	2	1886197				
	3	1911505				
100%	1	2162899	2163835	0,06		
	2	2165233				
	3	2163373				
120%	1	2648646	2647380	0,08		
	2	2644993				
	3	2648501				

O método foi considerado preciso para os quatro fármacos visto que o DPR entre as áreas corrigidas das amostras foi inferior a 2,0%.

5. CONCLUSÃO

O método proposto pelo trabalho se tornou eficiente para análise simultânea do teor de INH, PYA, EMB e RMP em comprimidos 4 em 1 utilizados no tratamento da TB.

A otimização do diluente que impedisse a degradação da RMP e que solubilizasse todos os fármacos foi realizada através da variação de solventes apolares, polares próticos e polares apróticos, ou misturas de solventes polares com água. A avaliação destes testes permitiu chegar a um diluente com 90% de solvente polar (MeOH ou MeCN) e 10% de água utilizando resfriamento da bandeja de *vials* a pelo menos a 4°C, onde a estabilidade da RMP foi assegurada por um período de tempo compatível como tempo para a realização da análise quantitativa dos princípios ativos do comprimido 4 em 1.

Através dos experimentos visando à formação de complexos de coordenação metal-EMB, observou-se que com Cu^{2+} foi mais estável e com maior absorvidade molar. Em pH próximo de 7, o complexo mostrou comprimentos máximos de absorção, o que possibilitou ao EMB ser analisado no mesmo comprimento de onda dos outros fármacos, que passou a ser de 265 nm no detector de UV-VIS.

O êxito alcançado nas experiência acima, permitiu o desenvolvimento de um método de análise por CLAE/UV, capaz de realizar a análise simultânea dos quatro fármacos. O perfil cromatográfico obtido está em conformidade com o que é preconizado, em termos de parâmetros de adequação do sistema dos compêndios oficiais.

A otimização das condições analíticas do método foi realizada através da fase móvel (fase aquosa: 85% tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15% metanol e 0,005 mol/L de Cu^{2+} (ou 250 mg/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e fase orgânica: metanol, 0,1% de trietilamina e 0,2% de ácido fórmico), com a variação da proporção da fase aquosa e fase orgânica no método gradiente.

A metodologia desenvolvida apresenta vantagens em relação aos métodos oficiais contemplados neste trabalho, principalmente, quanto à análise simultânea e quanto ao controle da estabilidade da RMP. Além disso, o método desenvolvido permitiu ser empregado em equipamentos onde a análise cromatográfica dos

quatro fármacos fossem visualizadas a 265 nm, em equipamentos onde o software utilizado permitiu a troca para um novo comprimento de onda na mesma corrida cromatográfica, sendo a INH, PYA e EMB visualizados em 265 nm e a RMP em 335 nm e em equipamentos com detectores de UV de arranjo de diodos.

O método avaliado demonstrou uma resposta linear satisfatória na faixa de concentração compreendida entre 0,05 a 0,10 mg/mL para INH, 0,27 a 0,52 mg/mL para PYA, 0,19 a 0,36 mg/mL para EMB e 0,05 a 0,1 mg/mL para RMP. O método foi considerado preciso para os quatro fármacos pois o DPR foi inferior a 2,0%.

REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira De Normas Técnicas - ISO Guia 35 (2012): **Materiais de referência** – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56.

BASTOS, D. **A estrutura do *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase e os mecanismos de ação da isoniazida: um estudo para novos ligantes**. 2006. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

BAZILIO, F.S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**. [2011]. No prelo.

BHUTANI, H.; SINGH, S.; VIR, S.; BHUTANI, K. K.; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A. K.; JINDAL, K. C. LC and LC-MS study of stress decomposition behaviour of isoniazid and establishment of validated stability indicating assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Índia, v. 43, p. 1213-1220, 2007.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 out. 1988.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 27 jan. 1999. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**. Brasília, [2002]. Disponível em: <http://www.sba.com.br/comunicacao/nota_de_esclarecimentos_de_boatos_ms_24_03.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**: cadernos de atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica. 6ª ed. rev. e atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2002a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes.** Brasília, [2008]. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil.** Brasília, 2011. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_tb.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica:** protocolo de enfermagem. Brasília, 2011a. Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tdo_tb.pdf >. Acesso em: 29 jan. 2012.

BRASIL. Ministério da saúde. Portal da saúde. **Tuberculose.** Brasília,[2012]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31081>. Acesso em: 13 de fev de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Tuberculose: alinhada com o social, afinada com a tecnologia.** Brasília, 2013. Disponível em: < http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Abr/10/boletim2_2013_tb_web.pdf >. Acesso em: 29 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SINAN: Taxas de incidência e mortalidade de TB por região e estados do Brasil.** Brasília, 2013a. Disponível em: < http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/Sinan/SVS/MS_atualizado_em_maio_de_2013 >. Acesso em: 29 nov. 2013.

BREWER, G. A. Analytical Profiles of Drug Substances: **Isoniazid.** London-Chicago: Pharmaceutical Press, 1977. Vol. 6, pag. 183-258.

BUENO, E. **À Sua Saúde:** a Vigilância Sanitária na história do Brasil. 1 ed. Brasília: Editora Anvisa, 2005.

CALLERI, E. et al. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Florence, n.29, p.1089–1096, aug 2001.

CONDE, M. B.; SOUZA, G. M.; KRITSKI, A. L. **Tuberculose sem medo.** Editora Atheneu. 1ª ed. São Paulo: 2002. Rede brasileira de pesquisas em tuberculose - Rede-TB. Disponível em: < <http://redetb.org/a-historia-da-tuberculose>>. Acesso em: 13 fev 2012.

CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. **CHEMICAL STABILITY OF PHARMACEUTICALS – A HANDBOOK FOR PHARMACISTS**. Canadá: Ed. John Wiley & Sons, 1986.

CHROMATOGRAPHY. In: United States Pharmacopoeia. 34. ed. Rockville: U. S. Pharmacopeial, 2011.

DEVI, S. R. Studies on stability and configurational changes of Nickel and Copper Ethambutol Dihydrochloride and Metformin Hydrochloride in both cationic and anionic surfactants. **International Journal of Engineering Science Invention**, Berhampur, v.2, n. 4, p. 39-50, April, 2013.

FARIAS, R. F. **Química de coordenação: fundamentos e atualidades**. Campinas: Editora Átomo, 2005.

FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. 2 v.

FURTADO, A. P. A. **Avaliação da incerteza de medição do ensaio de dissolução de comprimidos de pirazinamida 500 mg**. 2010. Monografia (Especialização em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010.

GALLO, G. G.; RADAELLI, P. Analytical Profiles of Drug Substances: **Rifampin**. London-Chicago: Pharmaceutical Press, 1976. Vol. 5, pag. 467-513.

HEYDEN. Y. V. et al. Optimization of a reversed-phase-high-performance thin-layer chromatography method for the separation of isoniazid, ethambutol, rifampicin and pyrazinamide in fixed-dose combination antituberculosis tablets. **Journal of Chromatography A**, n.1260, p.232– 238, Laarbeeklaan, aug, 2012.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **POP 65.3110.034**: Qualificação/calibração de cromatógrafo líquido de alta eficiência. Rev4. Rio de Janeiro, 2013. 34 p.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: Básica & Clínica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2005.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.

LEE, C.; BENET, L. Z. Analytical Profiles of Drug Substances: Ethambutol Hydrochloride. London-Chicago: Pharmaceutical Press, 1978. Vol. 7, pag. 231-249.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.

LIKUSSAR, W.; BOLTZ, D. F. Theory of continuous variations plots and a new method for spectrophotometric determination of extraction and formation constants. **Analytical Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 1265-1272, 1971.

LIMA, C. H. S.; BISPO, M. L. F.; SOUZA, M. V. N. Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose. **Rev. Virtual Quim.** Vol. 3 (3), p. 159-180, ago. 2011.

LIMA, K. M. G. et al. Dissolution testing of isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol tablets using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Natal, n.57, p. 115– 119, aug, 2011.

LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006.

LOUTFY, M. A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Analytical Profiles of Drug Substances: Pyrazinamide. London-Chicago: Pharmaceutical Press, 1983. Vol. 12, pag. 433-462.

LUNA, A. S.; PINHO, J. S. A.; A seletividade de um método analítico. **Revista analítica**. n. 41, p.85-88, jun/jul, 2009.

MERCK. **The Index Merck**. 14. ed. Raheway, 2006.

MERCK. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ: Versão 1.4**. Cotia (SP), 2012.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 3 ed., v. 2, London-Chicago: Pharmaceutical Press, 2004.

PRZYBYCIEL, M.; MAJORS, R.E. **Phase Collapse in Reversed-Phase LC**. Column Watch, October, 2002. Disponível em: <<http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgceurope/392002/32973/article.pdf>>. Acesso em: 10 out 2013.

REDE TB. Rede brasileira de pesquisas em tuberculose: **Sobre a Tuberculose**. 2012. Disponível em < <http://redetb.org/sobre-a-tuberculose>>. Acesso em 13 de fev de 2012.

RIO, A. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral para avaliação dos enantiômeros do medicamento cloridrato de bupivacaína injetável**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado Profissional) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

SECRETARIA DA SAÚDE. Divisão de Controle da Tuberculose CVE-SES/SP. **Perguntas e respostas**. 2010. Disponível em: < <http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/>>. Acesso em: 13 fev 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. São Paulo: Boohman, 2002.

SOUZA, M. V. N. Rifampicina, um importante fármaco no combate à tuberculose. **Rev. Bras. Farm** v.86 (3), p. 92-94, jun. 2005.

SOUZA, P. R. **Desenvolvimento e Validação de Metodologias Analíticas para Determinação do Teor de Ácido Valpróico em Cápsulas de 250 mg**. 2011. 121f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.

SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos, Belo Horizonte. 2007.

THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 4. ed. 2st suppl. Geneva: WHO, 2011.

THE UNITED States Pharmacopeia 36. National Formulary 31: 2013. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2013. v.3.

VOGEL, A. J. et al. **Análise química quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos Editora S.A, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing**. Geneva, 2009.

APÊNDICE A

Ministério da Saúde		FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ		INCQS					
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde									
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA									
Dados da Curva Analítica									
Análise:	Isoniazida no comprimido 4 em 1								
Data de Confecção da Curva:	21/11/2013	Curva Nº:	1						
Replicatas por Nível (k):	3	Nº de Níveis (n):	7						
Equipamento:	CLAE Shimadzu	Responsável:	Patrícia Condé						
Tabela de dados originais									
Nível (k)	i	Conc. µg/L	Resposta Área	Avaliação de Valores Extremos (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos) Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.					
1	01	54,6	769155						
	02	54,6	759722						
	03	54,6	765563						
2	04	62,4	856825						
	05	62,4	865848						
	06	62,4	878671						
3	07	70,2	948603						
	08	70,2	944093						
	09	70,2	964310						
4	10	78	1056196						
	11	78	1051874						
	12	78	1040670						
5	13	85,8	1154489						
	14	85,8	1122250						
	15	85,8	1125515						
6	16	93,6	1253955						
	17	93,6	1206818						
	18	93,6	1204181						
7	19	101,4	1362342						
	20	101,4	1315201						
	21	101,4	1316704						
Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner)									
Req	0,98								
Rcrit (α = 0,05)	0,95								
Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson)									
d (calculado)	1,13			Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX)					
dL (Limite Inferior) α = 0,05	1,16			Coefficiente Angular (b):	1,15E+04	Coefficiente Linear (a):	1,45E+05		
dU (Limite Superior) α = 0,05	1,39			r	0,9984	R ²	0,9969		
Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe)				N	18	Graus de Liberdade	16		
Variância Combinada	3,84E+07			Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)					
t _L calculado	-7,04E-01			Limite de Detecção	2,98E+00	Limite de Quantificação	8,81E+00		
t _{tabelado} (α = 0,05)	2,12E+00			ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)					
p	4,92E-01			fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
Resumo da Avaliação				regressão	1	5,45E+11	5,45E+11	5,08E+03	1,86E-21
Homogeneidade de variância				resíduos	16	1,72E+09	1,07E+08		
Há Homocedasticidade p > 0,05				Ajuste	5	1,07E+09	2,13E+08	3,61E+00	3,55E-02
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade				erro puro	11	6,50E+08	5,91E+07		
A regressão é significativa p < 0,001				total	17	5,47E+11			
Há desvio de linearidade p < 0,05				Observações					
Há autocorrelação d < dL									
Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05)									
Teste de Normalidade (α = 0,05)									
Segue a Normal Req > Rcrit									
Responsável: _____				Data: ___/___/___		Verificado por: _____		Data: ___/___/___	
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA						Pág.:1/1			

APÊNDICE B



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Pirazinamida no comprimido 4 em 1		
Data de Confeção da Curva:	18/11/2013	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	CLAE Shimadzu	Responsável:	Patrícia Condé

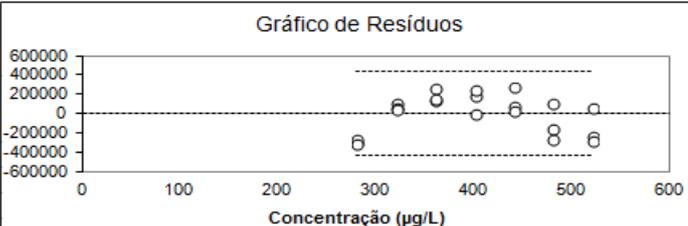
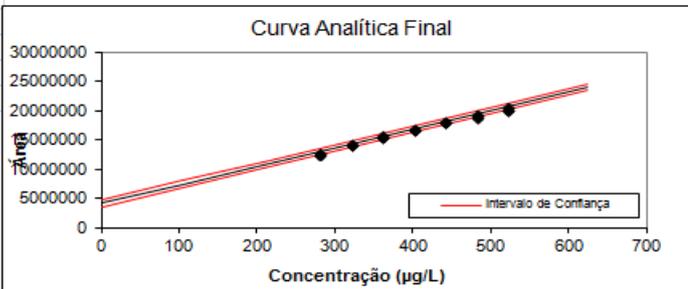
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. µg/L	Resposta Área
1	01	280,70	12703056
	02	280,70	12734397
	03	280,70	12680282
2	04	320,80	14379327
	05	320,80	14319022
	06	320,80	14310822
3	07	360,90	15664422
	08	360,90	15787714
	09	360,90	15685004
4	10	401,00	16973534
	11	401,00	16796400
	12	401,00	17036852
5	13	441,10	18327398
	14	441,10	18137573
	15	441,10	18090970
6	16	481,20	19422443
	17	481,20	19157801
	18	481,20	19049604
7	19	521,30	20640627
	20	521,30	20345837
	21	521,30	20302752

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,95
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	0,79
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,87E+10
t_L calculado	-1,12E-01
$t_{tabelado}$ ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	9,12E-01

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Há desvio de linearidade	$p < 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Há autocorrelação	$d < dL$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Não segue a normal	$Req \leq Rcrit$

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coefficiente Angular (b):	3,15E+04	Coefficiente Linear (a):	4,15E+06
r	0,9970	R ²	0,9940
N	21	Graus de Liberdade	19

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	2,06E+01	Limite de Quantificação	6,06E+01
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,34E+14	1,34E+14	3,14E+03	1,47E-22
resíduos	19	8,13E+11	4,28E+10		
Ajuste	5	5,97E+11	1,19E+11	7,71E+00	1,14E-03
erro puro	14	2,17E+11	1,55E+10		
total	20	1,35E+14			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE C



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Etambutol no comprimido 4 em 1		
Data de Confeção da Curva:	21/11/2013	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	CLAE Shimadzu	Responsável:	Patrícia Condé

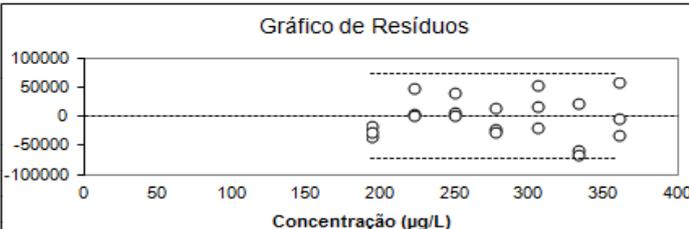
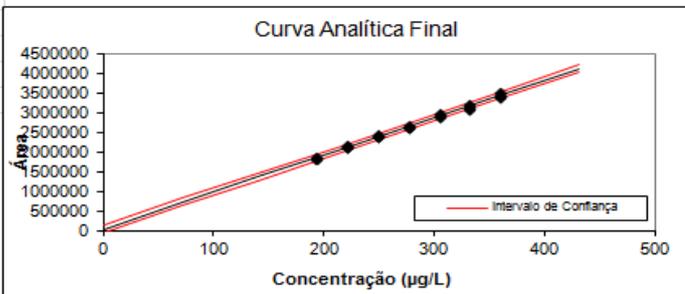
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. µg/L	Resposta Área
1	01	193,9	1846270
	02	193,9	1828119
	03	193,9	1837270
2	04	221,6	2172590
	05	221,6	2129498
	06	221,6	2126128
3	07	249,3	2392575
	08	249,3	2426640
	09	249,3	2388677
4	10	277	2624746
	11	277	2620882
	12	277	2662836
5	13	304,7	2924940
	14	304,7	2961953
	15	304,7	2888900
6	16	332,4	3192981
	17	332,4	3112799
	18	332,4	3103098
7	19	360,1	3488389
	20	360,1	3427296
	21	360,1	3397971

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,99
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	2,02
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coefficiente Angular (b):	9,43E+03	Coefficiente Linear (a):	3,41E+04
r	0,9979	R ²	0,9959
N	21	Graus de Liberdade	19

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	3,67E+08
t _L calculado	-1,88E+00
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,09E+00
p	7,55E-02

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	1,17E+01	Limite de Quantificação	3,47E+01
--------------------	----------	-------------------------	----------

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	Req > Rcrit

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	5,73E+12	5,73E+12	4,58E+03	4,08E-24
resíduos	19	2,38E+10	1,25E+09		
Ajuste	5	8,52E+09	1,70E+09	1,56E+00	2,34E-01
erro puro	14	1,52E+10	1,09E+09		
total	20	5,75E+12			

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

APÊNDICE D



Ministério da Saúde
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA

Dados da Curva Analítica

Análise:	Rifampicina no comprimido 4 em 1		
Data de Confeção da Curva:	21/11/2013	Curva N°:	1
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7
Equipamento:	CLAE Shimadzu	Responsável:	Patrícia Condé

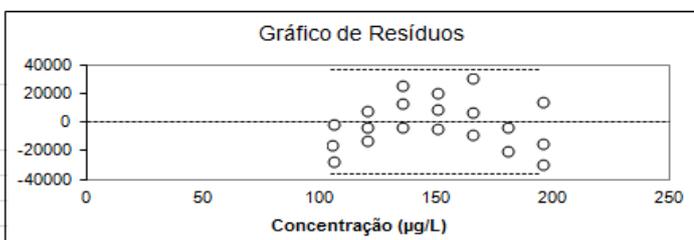
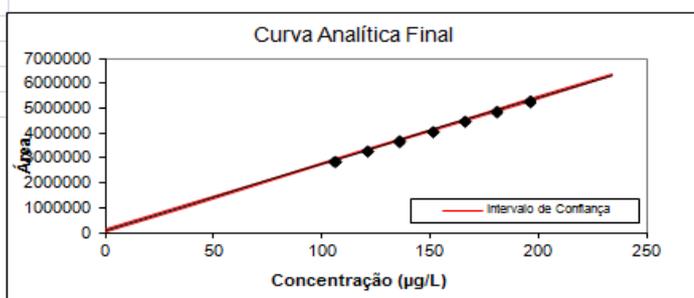
Tabela de dados originais

Nível (k)	i	Conc. µg/L	Resposta Área
1	01	105,14	2873079
	02	105,40	2895171
	03	105,40	2869271
2	04	120,16	3277936
	05	120,16	3287677
	06	120,16	3299003
3	07	135,18	3717834
	08	135,18	3705008
	09	135,18	3688485
4	10	150,20	4114103
	11	150,20	4088802
	12	150,20	4102868
5	13	165,22	4525003
	14	165,22	4485933
	15	165,22	4501799
6	16	180,24	4892947
	17	180,24	4875680
	18	180,24	4829994
7	19	195,26	5311222
	20	195,26	5282408
	21	195,26	5267922

Avaliação de Valores Extremos

(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Normalidade dos Resíduos

(Teste de Ryan-Joiner)

Req	0,99
Rcrit ($\alpha = 0,05$)	0,95

Autocorrelação dos Resíduos

(Teste de Durbin-Watson)

d (calculado)	1,55
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,20
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,41

Estatísticas da Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$)

Coefficiente Angular (b):	2,67E+04	Coefficiente Linear (a):	7,91E+04
r	0,9998	R ²	0,9996
N	20	Graus de Liberdade	18

Homogeneidade da Variância dos Resíduos

(Teste de Brown-Forsythe)

Variância Combinada	1,04E+08
t _L calculado	-7,01E-01
t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$)	2,10E+00
p	4,92E-01

Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)

Limite de Detecção	2,05E+00	Limite de Quantificação	6,12E+00
--------------------	----------	-------------------------	----------

ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	1,28E+13	1,28E+13	4,30E+04	7,27E-32
resíduos	18	5,37E+09	2,98E+08		
Ajuste	5	2,10E+09	4,21E+08	1,68E+00	2,09E-01
erro puro	13	3,26E+09	2,51E+08		
total	19	1,28E+13			

Resumo da Avaliação

Homogeneidade de variância	
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
A regressão é significativa	$p < 0,001$
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$
Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$)	
Não há autocorrelação	$d > dU$
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)	
Segue a Normal	$Req > Rcrit$

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___