

Fernanda Alves Botelho

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a
determinação de tuberculostáticos de dose fixa combinada
(FDC) e suas substâncias relacionadas**

Rio de Janeiro
2013

Fernanda Alves Botelho

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a
determinação de tuberculostáticos de dose fixa combinada (FDC) e suas
substâncias relacionadas**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Co-orientadora: Dr^a Laís Bastos da Fonseca

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Medicamentos e
Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

B748d Botelho, Fernanda Alves

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de tuberculostáticos de dose fixa combinada (FDC) e suas substâncias relacionadas. / Fernanda Alves Botelho - Rio de Janeiro, 2013.

xxi, 121f. : il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Lucchetti Caetano da Silva

Co-orientadora: Dr^a Laís Bastos da Fonseca

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2013.

Bibliografia: f. 136-142

1. Dose fixa combinada. 2. CLAE. 3. Isoniazida. 4. Validação Analítica. 5. Rifampicina. 6. Tuberculose. 7. CLUE. I. Título.

CDD 658. 562

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.



Assinatura

26/03/2013

Data

Fernanda Alves Botelho

**Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a
determinação de tuberculostáticos de dose fixa combinada (FDC) e suas
substâncias relacionadas**

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em 26 de março de 2013.

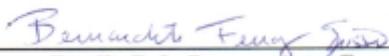
Banca Examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Erika Martins de Carvalho
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (Presidente da Banca)



Prof. Dr. Marcelo Raul Romero Tappin
Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ



Prof^ª. Dr^ª. Bernardete Ferraz Spisso
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2013

Aos meus pais, Edna e Geraldo e
ao meu marido, Francisco, que são o
meu TUDO, a razão de toda a minha
felicidade e realizações.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me dar forças e calma para prosseguir e não desistir nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Edna e Geraldo, meus exemplos de vida! Não há palavras para descrever o amor que sinto por vocês! Muito obrigada por me fazerem sentir tão amada, por me ensinarem os valores mais importantes da vida, por me apoiarem nas minhas escolhas e por celebrarem comigo em todas as conquistas. Muito obrigada por todos os esforços realizados para que eu chegasse até aqui! Esta vitória é de vocês!

Ao meu marido Francisco, pelas palavras sinceras nos momentos certos, por me encorajar e incentivar sempre a buscar a realização dos nossos sonhos. Pela paciência, apoio, amor e por estar sempre ao meu lado. Eu te amo!

A minha irmã-amiga Renata pela sua palavra amiga de sempre, e também ao André, Davi e Arthur pela torcida, pelo amor e carinho de todas as horas.

Aos meus familiares: avó, tias, tios e primos pelo carinho, acolhida e apoio de sempre.

Ao meu orientador, Prof Dr Leonardo Lucchetti Caetano da Silva, pela oportunidade de poder realizar esse trabalho e pela sua sempre disponibilidade.

A Laís, meu grande exemplo profissional, pela amizade e carinho, por todas as oportunidades proporcionadas, pelas orientações, ensinamentos, apoio e disponibilidade. Meu eterno “muito obrigada”.

À Dr^a Tereza Santos, à Graça Guerra e a Adelaine Terra, por proporcionarem a oportunidade de realizar os experimentos desta dissertação no LDVA/Farmanguinhos.

A todos os amigos do LDVA, Ivone, Lucia, Kazu, Rosemberg, Vera, Luciana, Erica, Nelson, Gisele, Karley, Diogo, Flávia, Dina, Míria e Felipe, pelo carinho de sempre nesses anos de convívio e pelas ajudas de todas as horas.

Agradeço em especial ao Kazu por executar os testes de analista B durante os estudos de validação e pelo seu valiosíssimo apoio sempre que precisei.

A Tailane, que me acompanhou e me ajudou muito no início desse projeto. Obrigada também pela ajuda nas análises estatísticas e pelo seu constante incentivo nessa jornada. Por me fazer acreditar que isto era possível.

A Janine que foi a minha companheira de estudos, cafezinhos, descontrações e angústias durante o mestrado.

Aos colegas que fiz durante esse curso: Ana Paula, André, Diva, Érika, Fábio, Fernando, Lyca, Leandro, Leonardo, Marcelo, Simone e Vitor, por tornarem as quintas-feiras sempre dias agradáveis.

Às minhas amigas de todas as horas, Paula, Maria Thereza, Michelle, Monalyza, Priscila, Paulinha, Fabiana, por todos os momentos felizes e de descontração durante as horas livres.

“Nesta vida, não podemos realizar grandes coisas.
Podemos apenas fazer pequenas coisas com
um grande amor.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

BOTELHO, F.A. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de tuberculostáticos de dose fixa combinada (FDC) e suas substâncias relacionadas. 2013. 141 f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

O crescimento do número de casos de tuberculose no Brasil fez com que o Governo Federal desenvolvesse uma política nacional de controle da tuberculose que possibilitasse melhorar e prolongar a qualidade de vida dos indivíduos infectados. Esta política inclui, entre várias outras iniciativas, o aumento na adesão de pacientes com um tratamento terapêutico adequado utilizando Formulações de Doses Fixas Combinadas (FDC), contendo os fármacos aos quais o bacilo de Koch é mais sensível. Um dos pontos críticos para o desenvolvimento de tuberculostáticos é o desenvolvimento de metodologias analíticas para seu controle que sejam viáveis, eficazes e robustas, uma vez que a rifampicina – um dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) da associação – apresenta características peculiares como a sua baixa estabilidade em solução, o que pode levar à formação de muitos produtos de degradação. O presente estudo tem por objetivo otimizar e validar uma metodologia analítica que seja adequada à rotina de um laboratório de controle de qualidade para a determinação dos fármacos isoniazida e rifampicina (ambos IFAs da formulação) e suas substâncias relacionadas, associados em comprimidos de dose fixa combinada para serem utilizados no tratamento dos casos da tuberculose e serem distribuídos pelo Sistema Único de Saúde. Para tanto, foi otimizada e validada uma metodologia analítica utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) capaz de determinar não só o teor dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) presentes na formulação, mas também de quantificar as suas substâncias relacionadas. Um estudo de estabilidade de longa e acelerada durações também foi conduzido e a metodologia analítica otimizada e validada foi usada para avaliação dos comprimidos, mostrando sua capacidade de detectar o esperado decaimento do teor dos IFAs e o aumento no teor de suas substâncias relacionadas. Posteriormente, houve a transferência do método para a técnica de cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE), visando uma análise cromatográfica em tempo mais curto e uma maior sensibilidade do método. Essa metodologia utilizando a técnica de CLUE também foi validada.

Palavras-chave: Dose Fixa Combinada. CLAE. Isoniazida. Validação Analítica. Rifampicina. Tuberculose. CLUE.

ABSTRACT

BOTELHO, F.A. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de tuberculostáticos de dose fixa combinada (FDC) e suas substâncias relacionadas. 2013. 141 f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

As the number of tuberculosis (TB) cases in Brazil is rising, the Brazilian Government implemented a national policy for TB control that would enable to improve and endure the quality of life in infected individuals. This policy includes, among many actions, the increase of the patient's adherence by a therapeutic treatment using suitable formulations of Fixed Dose Combination (FDC) including drugs to which *M. tuberculosis* is more sensitive. One critical point for FDC formulation development is the establishment of viable, effective and robust analytical methods for its quality control, since rifampicin – one of the formulation's active pharmaceutical ingredient (API) – has particular characteristics such as its low stability in aqueous solution, which can lead to formation of many degradation products. This study aims to optimize and validate an analytical methodology for the determination of isoniazid and rifampicin (both APIs in the formulation) and their related substances in tablets with fixed dose. These medicines will be distributed by the national health system for the treatment of tuberculosis patients. Therefore, an analytical method was optimized and validated using the technique of high performance liquid chromatography (HPLC) that can evaluate not only the dosage of APIs in the formulation, but also to determine their related substances. A stability study of accelerated and long durations was also conducted and the optimized analytical method was used to evaluate the tablet, showing its ability to detect the expected reduction of API dosage and the increase in the amount of its related products. Later, an upgrade of the optimized and validated method to ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) was successfully performed, with the reduced chromatographic analysis time and increased sensitivity. This UPLC methodology has also been validated.

Key words: Fixed Dose Combination. HPLC. Isoniazid. Analytical Validation. Rifampin. Tuberculosis. UPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microscopia do Bacilo de Koch	25
Figura 2	Incidência estimada de TB em 2010 por 100 mil habitantes	29
Figura 3	Distribuição da tuberculose no Brasil, segundo formas clínicas	30
Figura 4	Estrutura química da molécula de isoniazida	34
Figura 5	Estrutura química da molécula do ácido isonicotínico	36
Figura 6	Estrutura química da molécula da isonicotinamida	36
Figura 7	Estrutura química da molécula de rifampicina	37
Figura 8	Estrutura química das moléculas de substâncias relacionadas à rifampicina: 3-formil-rifapicina, rifampicina-quinona, rifampicina-N-óxido e isonicotinil hidrazona	39
Figura 9	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina utilizando metodologia analítica proposta na USP 34	76
Figura 10	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina utilizando metodologia analítica proposta por Wollinger (2008)	76
Figura 11	Destaque do cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina entre 15 e 20 minutos de corrida cromatográfica utilizando metodologia analítica proposta por Wollinger (2008)	77
Figura 12	Destaque do cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina entre 15 e 20 minutos utilizando coluna C18 µbondapack [®] 250 x 4,6 mm usada em mais de 150 corridas	78
Figura 13	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C3	79
Figura 14	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C4	80
Figura 15	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C5	81
Figura 16	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C6	81
Figura 17	Pureza Cromatográfica da isoniazida obtida pela razão cromatográfica	86
Figura 18	Pureza Cromatográfica da rifampicina obtida pela razão cromatográfica	86
Figura 19	Cromatograma referente a uma amostra de isoniazida +	106

	rifampicina em CLUE (condição C1)	
Figura 20	Cromatograma referente a uma amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE (condição C2)	107
Figura 21	Cromatograma referente a uma amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE utilizando uma coluna ACE [®] (condição C3)	108
Figura 22	Cromatograma referente à solução de 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona em CLUE, utilizando uma coluna Acquity [®] (condição C3)	109
Figura 23	Cromatograma referente à solução de 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona em CLUE, utilizando uma coluna ACE [®] (condição C3)	109
Figura 24	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina com fase móvel modificada com tampão acetato de amônio pH 4,0	111
Figura 25	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina com fase móvel modificada com tampão acetato de amônio pH 5,5	111
Figura 26	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina com fase móvel modificada com tampão acetato de amônio pH 6,0	111
Figura 27	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE (Condição C4)	113
Figura 28	Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE (Condição C5)	114
Figura 29	Sobreposição de cromatogramas nas condições C4 e C5	115
Figura 30	Cromatograma referente à solução padrão de rifampicina-N-óxido sob a condição C5	115
Figura 31	Cromatograma referente à solução padrão de 3-formil-rifampicina sob a condição C5	116
Figura 32	Cromatograma referente à solução padrão de rifampicina-quinona sob a condição C5	116
Figura 33	Cromatogramas de placebo, amostra de isoniazida + rifampicina, rifampicina, rifampicina-quinona, 3-formil-rifampicina e placebo fortificado em CLUE	129
Figura 34	Cromatogramas de isoniazida, branco e rifampicina-N-óxido em CLUE	130

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de linearidade para isoniazida elaborada a partir dos dados relacionados na Tabela 11	90
Gráfico 2	Curva de linearidade para rifampicina elaborada a partir dos dados obtidos na Tabela 12	90
Gráfico 3	Comportamento de teor de isoniazida e rifampicina durante o estudo de estabilidade de longa duração	102
Gráfico 4	Comportamento de teor de isoniazida e rifampicina durante o estudo de estabilidade duração acelerada	103
Gráfico 5	Curva de linearidade para isoniazida a partir dos dados obtidos na Tabela 25	119
Gráfico 6	Curva de linearidade para rifampicina partir dos dados obtidos na Tabela 26	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Esquema terapêutico para tratamento de tuberculose atualmente adotado pelo Ministério da Saúde para casos novos em adultos e adolescentes	33
Tabela 2	Classificação dos testes analíticos, segundo sua finalidade	47
Tabela 3	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	48
Tabela 4	Condições cromatográficas experimentadas para metodologias utilizando CLAE	58
Tabela 5	Quantidades de placebo e IFAs pesados no ensaio linearidade	62
Tabela 6	Condições cromatográficas experimentadas para metodologias utilizando CLUE	65
Tabela 7	Esquema com diluições em cada nível de concentração estudado	69
Tabela 8	Quantidades de IFAs e placebo pesadas em cada nível estudado na exatidão	70
Tabela 9	Comparação entre as metodologias da USP XXXIV e de Wollinger, 2008 (adaptado de Wollinger, 2008)	75
Tabela 10	Programação do gradiente de eluição final para CLAE	82
Tabela 11	Áreas obtidas para isoniazida na avaliação da linearidade	88
Tabela 12	Áreas obtidas para rifampicina na avaliação da linearidade	89
Tabela 13	Análise de variância (ANOVA) para isoniazida	91
Tabela 14	Análise de variância (ANOVA) para rifampicina	91
Tabela 15	Dados obtidos na avaliação da repetibilidade para o IFA isoniazida	93
Tabela 16	Dados obtidos na avaliação da repetibilidade para o IFA rifampicina	94
Tabela 17	Dados obtidos na avaliação da precisão intermediária para o IFA isoniazida	96
Tabela 18	Dados obtidos na avaliação da precisão intermediária para o IFA rifampicina	97
Tabela 19	Resultado dos limites de quantificação e detecção obtidos a partir das curvas analíticas	99
Tabela 20	Resultados obtidos em análises de estudo de estabilidade de comprimidos revestidos de FDC de isoniazida + rifampicina	101

(150 + 300) mg

Tabela 21	Gradiente de eluição proposto para a condição C1 em CLUE	105
Tabela 22	Gradiente de eluição proposto para a condição C2 em CLUE	107
Tabela 23	Gradiente de eluição proposto para a Condição C4 em CLUE	112
Tabela 24	Gradiente de eluição proposto para a Condição C5 em CLUE	114
Tabela 25	Áreas obtidas para isoniazida na avaliação da linearidade	118
Tabela 26	Áreas obtidas para rifampicina na avaliação da linearidade	118
Tabela 27	Análise de variância (ANOVA) para isoniazida	120
Tabela 28	Análise de variância (ANOVA) para rifampicina	120
Tabela 29	Taxa de recuperação de isoniazida no teste de exatidão	122
Tabela 30	Taxa de recuperação de rifampicina no teste de exatidão	123
Tabela 31	Dados obtidos na avaliação da precisão intermediária para o IFA isoniazida	126
Tabela 32	Dados obtidos na avaliação da precisão intermediária para o IFA rifampicina	127
Tabela 33	Registro de áreas de isoniazida e rifampicina em solução padrão antes e depois de filtração com membrana 0,22 µm	131
Tabela 34	Resultado dos limites de quantificação e detecção obtidos a partir das curvas analíticas.	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AIDS	Síndrome da imuno-deficiência adquirida (<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ANOVA	Análise de variância
BCG	bacilo Calmette-Guerin
BK	Bacilo de Koch
BP	Farmacopeia britânica (<i>British pharmacopea</i>)
CAPS	Cápsulas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
CLUE	Cromatografia líquida de ultra-eficiência (<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>)
COMP	Comprimidos
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos (<i>Diode array detector</i>)
DMSO	Sulfóxido de dimetila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTS	Estratégia do tratamento diretamente observado (<i>Directly observed treatment strategy</i>)
DPR	Desvio padrão relativo
E	Etambutol
EM	Espectrometria de massas
FDC	Dose fixa combinada (<i>Fixed dose combination</i>)
FE	Fase estacionária
FM	Fase Móvel
H	Isoniazida

HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human immunodeficiency virus</i>)
IFA	Ingrediente farmacêutico ativo
IUATLD	União internacional contra tuberculose e doenças pulmonares (<i>International union against tuberculosis and lung diseases</i>)
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MDR-TB	Tuberculose multirresistente (<i>Multi-drug resistant tuberculosis</i>)
MR	Multirresistência
MS	Ministério da Saúde
NOX	Rifampicina-N-óxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação de ácidos
PNCT	Programa nacional de controle da tuberculose
PPD	Derivado proteico purificado
Q	Rifampicina-quinona
R	Rifampicina
RE	Resolução
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Fase reversa (<i>Reversed phase</i>)
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
SR	Substâncias relacionadas
SUS	Sistema Único de Saúde

TB	Tuberculose
tr	Tempo de retenção
USP	Farmacopeia americana (<i>The United States pharmacopea</i>)
Z	Pirazinamida
3F	3-formil-rifampicina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	A tuberculose	25
2.2.	Tuberculose no Brasil e no mundo	27
2.3.	Tratamento da tuberculose	31
2.4.	Fármacos tuberculostáticos alvo do trabalho	34
2.4.1.	<u>Isoniazida</u>	34
2.4.1.1.	Mecanismo de ação	35
2.4.1.2.	Farmacocinética	35
2.4.1.3.	Substâncias relacionadas à isoniazida	36
2.4.2.	<u>Rifampicina</u>	37
2.4.2.1.	Mecanismo de ação	37
2.4.2.2.	Farmacocinética	38
2.4.2.3.	Substâncias relacionadas à rifampicina	38
2.5.	Metodologias analíticas	40
2.5.1.	<u>Metodologias analíticas de compêndios oficiais</u>	40
2.5.2.	<u>Metodologias analíticas descritas na literatura</u>	41
2.6.	Cromatografia líquida	44
2.6.1.	<u>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)</u>	44
2.6.2.	<u>Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)</u>	45
2.7.	Validação de métodos analíticos	47
2.7.1.	<u>Seletividade</u>	49
2.7.2.	<u>Linearidade</u>	49
2.7.3.	<u>Intervalo</u>	50
2.7.4.	<u>Precisão</u>	50
2.7.5.	<u>Exatidão</u>	50
2.7.6.	<u>Robustez</u>	51
2.7.7.	<u>Limite de detecção (LD)</u>	51
2.7.8.	<u>Limite de quantificação (LQ)</u>	51
2.8.	Justificativa do trabalho	52
3.	OBJETIVO	53

3.1	Objetivo geral	53
3.2	Objetivos específicos	53
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1.	Materiais	55
4.1.1.	<u>Padrões e amostras</u>	55
4.1.2.	<u>Reagentes</u>	56
4.1.3.	<u>Equipamentos</u>	56
4.2.	Metodologia analítica e parâmetros cromatográficos	57
4.2.1.	<u>Preparo de soluções e fase móvel para CLAE</u>	58
4.2.1.1.	Preparo da solução tampão fosfato de sódio dibásico 0,01 M pH 6,8	58
4.2.1.2.	Preparo das fases móveis para metodologia em CLAE	59
4.2.1.3.	Preparo de solução padrão de isoniazida e rifampicina para metodologia em CLAE	59
4.2.1.4.	Preparo da solução amostra para metodologia em CLAE	60
4.2.1.5.	Preparo da solução placebo para metodologia em CLAE	60
4.3.	Validação da metodologia utilizando a técnica de CLAE	61
4.3.1.	<u>Seletividade</u>	61
4.3.2.	<u>Linearidade</u>	61
4.3.3.	<u>Precisão e Exatidão</u>	62
4.3.4.	<u>Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)</u>	62
4.4.	Estudo de estabilidade de comprimidos revestidos de isoniazida + rifampicina (150 + 300) mg	63
4.5.	Transferência da metodologia analítica de CLAE para CLUE	64
4.5.1.	<u>Preparo de soluções e fases móveis para análises em CLUE</u>	66
4.5.1.1.	Preparo da solução de acetato de amônio 0,01 M	66
4.5.1.2.	Preparo das fases móveis para análises utilizando a técnica de CLUE	66
4.5.1.3.	Preparo da solução padrão para metodologia utilizando CLUE	67
4.5.1.4.	Preparo da solução amostra para metodologia utilizando a técnica de CLUE	67
4.5.1.5.	Preparo da solução placebo para metodologia utilizando a	68

técnica de CLUE	
4.6. Validação da metodologia utilizando a técnica de CLUE	69
4.6.1. <u>Linearidade</u>	69
4.6.2. <u>Exatidão</u>	70
4.6.3. <u>Precisão</u>	71
4.6.3.1. Repetibilidade	71
4.6.3.2. Precisão intermediária	71
4.6.4. <u>Seletividade</u>	71
4.6.4.1. Avaliação da interferência cromatográfica	72
4.6.4.2. Avaliação da filtração	72
4.6.4.3. Avaliação do efeito memória	72
4.6.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)	73
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1. Otimização da metodologia analítica utilizando CLAE	74
5.2. Validação da metodologia analítica utilizando CLAE	83
5.2.1. <u>Seletividade</u>	85
5.2.2. <u>Linearidade</u>	87
5.2.3. <u>Precisão</u>	92
5.2.3.1. Repetibilidade	92
5.2.3.2. Precisão intermediária	95
5.2.4. <u>Exatidão</u>	98
5.2.5. <u>Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)</u>	98
5.2.6. <u>Verificações de desempenho de sistema</u>	99
5.2.7. <u>Robustez</u>	99
5.3. Estudo de estabilidade	100
5.4. Migração da metodologia analítica de CLAE para CLUE	103
5.5. Validação da metodologia analítica por CLUE	117
5.5.1. <u>Linearidade</u>	117
5.5.2. <u>Exatidão</u>	121
5.5.3. <u>Precisão</u>	124
5.5.3.1. Repetibilidade	124
5.5.3.2. Precisão intermediária	125

5.5.4.	<u>Especificidade</u>	128
5.5.4.1.	Avaliação da interferência cromatográfica	128
5.5.4.2	Avaliação da filtração	131
5.5.4.3.	Avaliação do efeito memória	132
5.5.4.4.	<u>Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)</u>	132
5.5.5.	<u>Robustez</u>	133
6.	CONCLUSÃO	134
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que atinge, anualmente, 7 a 8 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável por milhões de mortes a cada ano, configurando-se assim um importante problema de saúde pública mundial. É considerada uma doença negligenciada e isso é corroborado pelo fato de sua maior prevalência ser em populações de regiões em desenvolvimento em que não há atrativos econômicos diretos para o desenvolvimento de fármacos. Os principais fatores atribuídos ao seu ressurgimento no mundo são o avanço da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS); a falta de políticas de saúde pública eficazes; a miséria e o crescimento desordenado dos grandes centros urbanos; e o surgimento de cepas multi-drogas resistentes (OMS, 2011a).

A tuberculose é uma doença grave, porém curável em 100% dos casos tratados desde o início. Entretanto, o tratamento da TB é demorado, exclusivamente feito por quimioterápicos, durando no mínimo seis meses a no máximo dois anos, dificultando assim sua adesão e proporcionando a resistência ao bacilo (OMS, 2011b).

Os fármacos de primeira linha para o combate à TB são a isoniazida (H), a rifampicina (R), a pirazinamida (Z) e o etambutol (E). Contudo, para se combater a resistência dos bacilos e para facilitar a adesão do paciente ao tratamento da TB, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda combinações de doses fixas (FDC) contendo diferentes fármacos em um único produto como uma maneira de garantir tratamento adequado aos pacientes com tuberculose (OMS, 2011b).

A formulação de dose fixa combinada de isoniazida + rifampicina (FDC) é a primeira escolha utilizada no combate à doença e apresenta diversas vantagens frente à monoterapia (OMS, 2011b).

A associação dos fármacos em doses fixas combinadas traz vantagens terapêuticas, mas gera novos desafios para a indústria farmacêutica. Como a qualidade dos medicamentos tuberculostáticos é parte essencial do controle da

TB, fatores como a estabilidade dos fármacos na associação e a dificuldade analítica para quantificação dos mesmos dificultam o desenvolvimento analítico desse tipo de medicamento. Surge, assim, a necessidade de métodos capazes de quantificar os fármacos, em formas farmacêuticas compostas (associação de dois ou mais fármacos).

Portanto, um ponto crítico para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas contendo tuberculostáticos é o desenvolvimento de metodologias analíticas viáveis, eficazes e robustas, considerando que a rifampicina apresenta características peculiares como, por exemplo, a sua baixa estabilidade em solução. Bhutani e colaboradores relatam que o fármaco possui características de se hidrolisar, oxidar e ser fotossensibilizante ocasionando a formação de produtos de degradação (BHUTANI *et. al.*, 2007; WOLLINGER, 2008).

As monografias contidas nos compêndios oficiais, as farmacopeias, trazem metodologias de difícil execução na rotina de um laboratório de controle de qualidade visto que não apresentam robustez necessária, a sua reprodução é crítica e a corrida cromatográfica é longa, exigindo preparo da amostra momentos antes de sua injeção (impossibilitando a automação do processo analítico), em função da rápida degradação da rifampicina em solução. Essa problemática ocorre para análises de teor e de substâncias relacionadas de associações 2 em 1 TB (isoniazida + rifampicina). Além disso, dependendo da formulação da amostra, não se consegue quantificar as substâncias relacionadas e impurezas presentes uma vez que, as mesmas eluem junto com alguns componentes da formulação. Assim, as análises baseadas apenas nas monografias de compêndios oficiais muitas vezes não se aplicam aos produtos farmacêuticos existentes.

Nesse sentido, faz-se necessária a otimização da metodologia cromatográfica não só no que diz respeito à estabilização da rifampicina em solução, mas também à diminuição do tempo de análise e ao aumento da robustez do método. A separação e quantificação das substâncias relacionadas à rifampicina também é desejável.

A validação de métodos analíticos é fundamental para assegurar que qualquer metodologia analítica desenvolvida produza resultados confiáveis, garantindo assim a qualidade dos produtos analisados. Portanto, esse assunto também será discutido nesse trabalho, tendo como base a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 2003).

A proposta deste trabalho é desenvolver e validar um método analítico quantitativo para a isoniazida e rifampicina aplicável também na quantificação de suas substâncias relacionadas, visando facilidade operacional e diminuição de custo e tempo de análise.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* e é a principal causa de morte por doença infecciosa no mundo. O *Mycobacterium tuberculosis* foi descoberto e identificado em 1882 por Robert Koch e, em sua homenagem, também é chamado de bacilo de Koch (BK) (Figura 1). O BK é uma bactéria anaeróbica que se aloja principalmente nos pulmões, possui um envelope celular altamente hidrofílico e produz enzimas hidrolíticas ou enzimas modificadoras como as beta-lactamases e as acetil transferases que lhe conferem extrema resistência aos fármacos utilizados no seu combate (ROSSETI *et al.*, 2002).

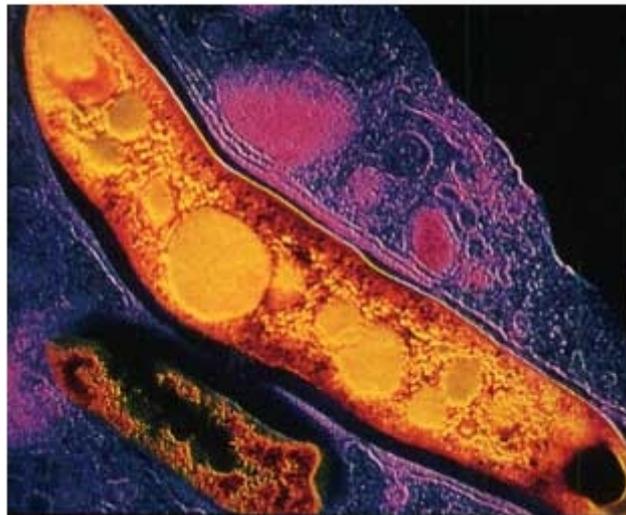


Figura 1: Microscopia do Bacilo de Koch (REDE TB, 2013)

O homem é o principal reservatório do bacilo. Entretanto, em algumas regiões, o gado bovino doente pode também servir de fonte de infecção. Raramente primatas, aves e outros mamíferos exercem papel de reservatório.

De maneira geral, a fonte de infecção é o indivíduo com a forma pulmonar da doença, que elimina bacilos para o exterior ao falar, tossir ou espirrar. Estima-se que a pessoa que apresenta esse quadro, se não tratada, pode infectar de 10 a 15 pessoas da sua comunidade num período de um ano (JOKLIK *et.al.*, 1992).

Contudo, somente adquirirão a doença e transmitirão o bacilo aquelas pessoas contaminadas e que passaram por algum momento de deficiência em seu sistema imunológico. Não é sabido com precisão em que momento o paciente tratado deixa de transmitir o bacilo, mas é certamente antes que a pesquisa do microrganismo no escarro torne-se negativa. Para a prevenção do contágio, o melhor a ser feito é o início rápido do tratamento da pessoa diagnosticada com a doença, além da imunização da população com a vacina BCG (bacilo Calmette-Guerin) que é uma cepa atenuada do *Mycobacterium bovis*. Portanto, por ser um microrganismo vivo a ser inoculado, não deve ser administrado em mulheres grávidas e em pacientes imuno-deficientes ou com queimaduras graves (BATES, KUBICA e WAYNE, 1984; JOKLIK *et al.*, 1992).

O período de incubação do BK dura de 4 a 12 semanas para identificação das lesões primárias. A probabilidade de que o indivíduo infectado evolua para a doença propriamente dita depende de diferentes fatores, destacando-se, dentre estas, a idade avançada, as condições sócio-econômicas e algumas condições médicas (*diabetes mellitus*, alcoolismo, infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida etc.). De modo geral, a evolução da doença ocorre quando o sistema imune debilitado não consegue manter o bacilo sob controle (BRASIL, 2009).

Após a contaminação, os bacilos chegam aos alvéolos pulmonares, onde são fagocitados por macrófagos. A infecção latente inicia-se com uma reação inflamatória aguda e inespecífica, formando um pequeno foco de broncopneumonia, evoluindo para uma reação granulomatosa específica (2-4 semanas) que se dissemina para outras regiões do organismo, e posteriormente para a cura, que pode ser acompanhada por fibrose e calcificação, sendo que nem todos os bacilos são destruídos podendo permanecer viáveis por décadas (TIBOLA, 2009).

Após algumas semanas de infecção, a resposta imune celular e a hipersensibilidade à tuberculina (que é uma proteína específica do bacilo) estão desenvolvidas. Essa hipersensibilidade é responsável pela destruição do tecido afetado e que é característica da doença e pode ser detectada pelo teste da tuberculina (PPD), realizado na pele (BATES, KUBICA e WAYNE, 1984; JOKLIK *et al.*, 1992).

Com a resposta inflamatória inespecífica desenvolvida no primeiro momento do contágio, formam-se os tubérculos (marca característica da doença), que é a agregação dos macrófagos expandidos envolta por fibroblastos, macrófagos e linfócitos. Posteriormente, estas lesões podem ser calcificadas (JOKLIK *et al.*, 1992).

A forma mais prevalente da doença é a TB pulmonar. Entretanto, a tuberculose também pode se desenvolver, em menor número, no peritônio, trato genito-urinário, meninges, linfonodos e ossos (JOKLIK *et al.*, 1992).

Na maioria dos infectados, os sinais e sintomas mais frequentemente descritos são tosse seca contínua no início, depois com presença de secreção por mais de quatro semanas, transformando-se, na maioria das vezes, em uma tosse com pus ou sangue; cansaço excessivo; febre baixa, geralmente à tarde; sudorese noturna; falta de apetite; palidez; emagrecimento acentuado; rouquidão; fraqueza; e prostração. Os casos graves apresentam dificuldade na respiração; eliminação de grande quantidade de sangue, colapso do pulmão e acúmulo de pus na pleura (membrana que reveste o pulmão) - se houver comprometimento dessa membrana, pode ocorrer dor torácica (BRASIL 2013).

2.2. Tuberculose no Brasil e no mundo

Até a década de 80 do século passado, a TB era considerada uma enfermidade facilmente curável e prevalente apenas em países em desenvolvimento e se relacionava diretamente com a pobreza. Entretanto, com o advento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), esta doença

voltou a ser uma preocupação mundial, já que portadores do vírus HIV apresentam um risco muito superior de infecção. Aproximadamente um terço da população do globo terrestre está infectada com o BK. Este fato levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar, em 1993, a TB como caso de emergência global, propondo o emprego da estratégia do tratamento diretamente observado - DOTS (do inglês *directly observed treatment Short*) como alternativa para combater a disseminação da doença e para aumentar os níveis de detecção e taxas de cura da TB (STOP TB PARTNERSHIP, 2010).

Os cinco elementos da estratégia DOTS são: o compromisso político com a implementação e sustentabilidade do programa de controle da tuberculose; a detecção de casos, por meio de baciloscopia de escarro, entre sintomáticos respiratórios da demanda dos serviços gerais de saúde; o tratamento padronizado, de curta duração, diretamente observado e monitorado quanto à sua evolução, para todos os casos com baciloscopia de escarro positiva; a provisão regular de medicamentos tuberculostáticos e o sistema de informação que permita avaliar a detecção de casos, o resultado do tratamento de casos individuais e o desempenho do programa (BRASIL, 2013).

A tuberculose ainda é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. Está intimamente ligada à pobreza e à má distribuição de renda. O surgimento da epidemia de AIDS e o aparecimento de focos de tuberculose multirresistente agravam ainda mais o problema da doença no mundo. Dessa maneira, a África é o continente onde há maior prevalência da TB. A Ásia, a Europa, a Rússia e a América do Sul também são regiões bastante atingidas segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011a).

A figura 2 mostra a incidência estimada de TB em 2010 por 100 mil habitantes

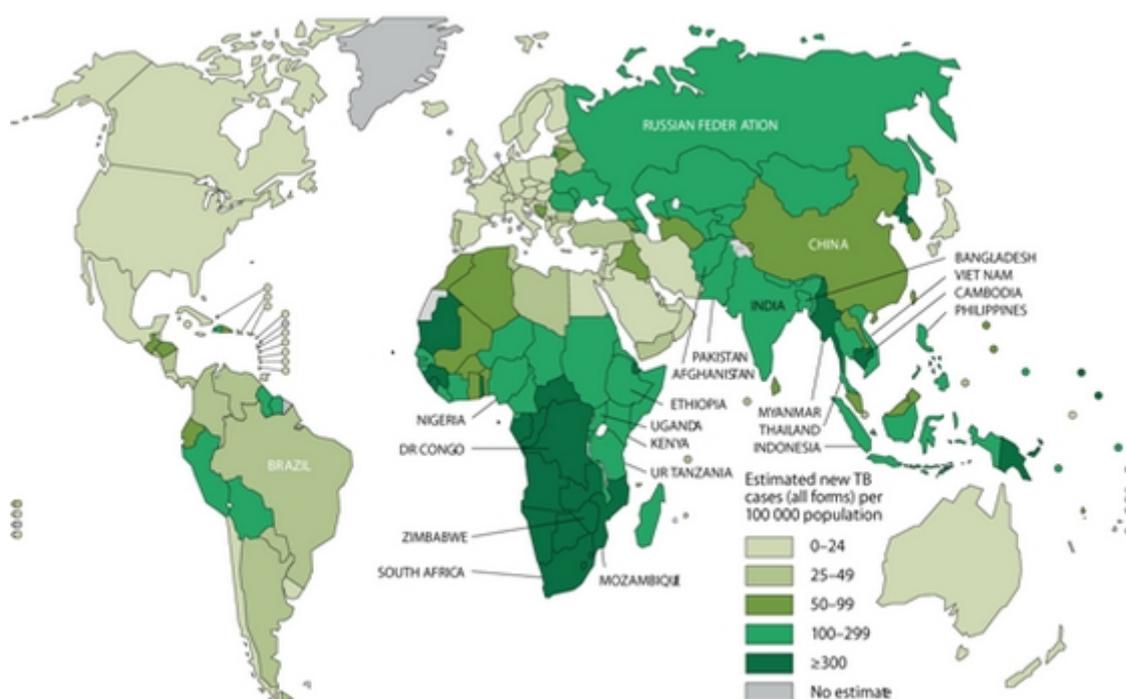


Figura 2: Incidência estimada de TB em 2010 por 100 mil habitantes (OMS, 2011a)

O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 82% do total de casos de tuberculose no mundo. A OMS considera que o Brasil detectou 88% de seus casos novos em 2010, segundo dados do sistema de informação de agravos de notificação do Ministério da Saúde (SINAN/MS). Anualmente notificam-se no Brasil aproximadamente 89 mil casos de TB sendo que, destes, cerca de 70 mil são casos novos. É importante também destacar que não são todos os casos que chegam ao conhecimento dos órgãos de saúde. Sendo assim, o número de notificações, apesar de oficiais, não retratam fidedignamente os números de casos de tuberculose no país. Aproximadamente 4.600 casos de TB por ano, no país, levam a óbito (BRASIL, 2013).

As maiores taxas de incidência por 100 mil habitantes estão nos estados do Rio de Janeiro (71,8), Amazonas (67,8), Pará (48,0) e Rio Grande do Sul (46,9); as menores taxas foram registradas no Distrito Federal (10,9), Goiás (14,6) e Tocantins (16,7) (BRASIL, 2011b).

O Ministério da Saúde lançou, em 1996 o plano emergencial para o controle da tuberculose, recomendando a implantação do DOTS para o controle da tuberculose no Brasil, sendo formalmente oficializado em 1999 através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). Esta estratégia continua sendo uma das prioridades para que o País atinja a meta de curar 85% dos doentes, diminuindo a taxa de abandono a menos de 5%, evitando assim o surgimento de bacilos resistentes e possibilitando um efetivo controle da tuberculose no país (BRASIL, 2013).

Desde 2003, o enfrentamento da tuberculose foi eleito como prioridade pelo Governo Federal, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle considerando aspectos humanos, sociais e econômicos (BRASIL, 2011b).

Na figura 3, o MS esquematiza o quadro de distribuição da tuberculose no Brasil, de acordo com as suas formas clínicas. Observa-se que a TB tem maior incidência (95%) entre os maiores de quinze anos e que as formas pulmonares são as que mais se manifestam, atingindo taxas de 80% para os maiores de 15 anos e 85% para os menores de 15 anos (BRASIL, 2009).

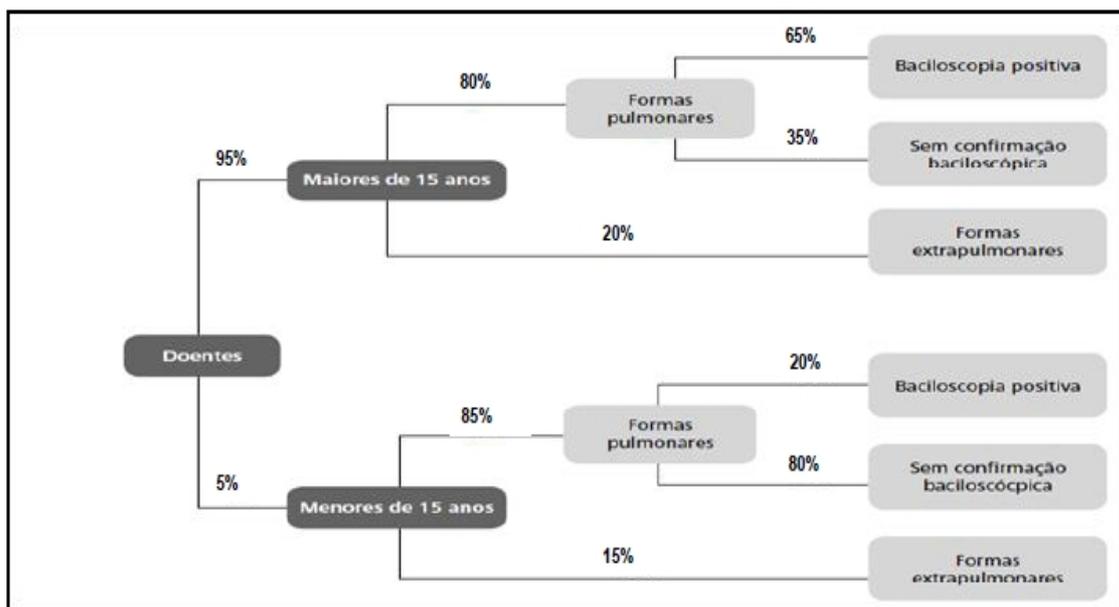


Figura 3: Distribuição da Tuberculose no Brasil, segundo formas clínicas (BRASIL – 2009).

O dia 24 de março foi instituído como o dia mundial da TB e foi lançado, em 1982, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela União Internacional Contra TB e Doenças Pulmonares (*International Union Against TB and Lung Disease* - IUATLD). A criação da data foi uma homenagem ao descobrimento do bacilo causador da tuberculose, ocorrida em 24 de março de 1882, pelo Dr. Robert Koch. Este foi um passo importante na luta pelo controle e eliminação da doença que, na época, vitimou grande parcela da população mundial. Atualmente, porém, esta data não é de comemoração, mas sim de compromisso e reafirmação política quanto ao seu efetivo controle, visto que a TB continua epidêmica em muitos países (REDE TB, 2013).

2.3. Tratamento da tuberculose

A tuberculose é uma doença curável em praticamente 100% dos casos novos, sensíveis aos medicamentos tuberculostáticos, desde que obedecidos os princípios básicos da terapia medicamentosa e a adequada operacionalização do tratamento. A associação medicamentosa adequada, as doses corretas e o uso por tempo suficiente são os princípios básicos para o adequado tratamento evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos, assegurando, assim, a cura do paciente. A esses princípios soma-se o DOTS como estratégia fundamental para o sucesso do mesmo (OMS, 2011a).

Os fármacos de primeira linha para o tratamento da TB são a isoniazida, a rifampicina, o cloridrato de etambutol e a pirazinamida. A isoniazida e rifampicina são os dois fármacos mais ativos, sendo que a combinação destes promove a cura de 95-98% dos casos de tuberculose causados por cepas susceptíveis (BRASIL, 2011b).

Nos casos em que ocorre resistência do bacilo aos fármacos de primeira linha, ou quando estes agentes têm de ser abandonados em virtude de reações indesejadas, alguns fármacos de segunda linha estão disponíveis, como a

amicacina, a estreptomicina, a etionamida, a levofloxacina e a terizidona, dentre outras (RANG, 2012).

A monoterapia (tratamento utilizando apenas um fármaco) no tratamento da tuberculose também leva a uma prevalência de resistência dos microrganismos. Portanto, para combater a resistência aos bacilos e facilitar a adesão do paciente ao tratamento da TB – que é longo e utiliza vários medicamentos – formulações de doses fixas combinadas que contêm diferentes fármacos em um único produto estão sendo recomendadas pela OMS e IUATLD (OMS, 2011b).

Os comprimidos de FDC possuem diversas vantagens sobre os fármacos utilizados isoladamente (monoterapia). Dentre elas, destacam-se a diminuição dos erros de prescrição, pois as doses recomendadas são padronizadas pela OMS; a redução da quantidade de comprimidos ingeridos, fato que favorece a adesão do paciente ao tratamento; o conforto do paciente e a simplificação da gestão farmacêutica em todos os níveis (OMS, 2011b).

As FDCs de isoniazida + rifampicina são administradas durante quatro meses e visam substituir as cápsulas atualmente distribuídas pelo PNCT para melhorar a qualidade dos medicamentos fornecidos à população. Por esta razão, esforços estão sendo feitos no sentido de produzir esses medicamentos no país (BRASIL, 2009), tarefa essa que vem sendo desenvolvida nos laboratórios farmacêuticos oficiais no país.

Os problemas associados à qualidade das FDC estão atualmente em foco, principalmente os relacionados à baixa biodisponibilidade da rifampicina e instabilidade dos fármacos e da formulação (BHUTANI *et al.*, 2005).

As justificativas para estes problemas são várias: alteração da forma cristalina da rifampicina, adsorção do fármaco pelos excipientes, ordem de adição dos fármacos, além da decomposição dos fármacos na formulação e também no estômago após a administração (SINGH *et al.*, 2001).

A multirresistência aos fármacos utilizados no tratamento da TB geralmente ocorre quando o esquema prescrito não é o correto ou quando ocorre falha/interrupção no uso dos medicamentos (OMS, 2011a). Quando esta resistência se refere à isoniazida e rifampicina simultaneamente, dizemos que

a tuberculose é resistente a multifármacos (do inglês *multi-drug resistant tuberculosis* – MDR-TB), o tratamento é mais demorado e o paciente precisa fazer uso de ativos de “segunda escolha” (mais caros e com mais efeitos tóxicos) (SILVA, 2010).

Padronizado há mais de 30 anos no país, o esquema de tratamento para tuberculose com três fármacos (rifampicina, isoniazida e pirazinamida) foi modificado seguindo recomendações da OMS. O esquema anterior foi reforçado com o etambutol na sua fase de ataque, e as posologias da isoniazida e da pirazinamida foram reduzidas. Esta alteração justifica-se, entre outras razões, pelo aumento da resistência à isoniazida e da resistência primária à isoniazida associada à rifampicina (BRASIL, 2011a).

Assim, o esquema terapêutico atual (Tabela 1) para casos novos de tuberculose pulmonar e extrapulmonar em adultos e adolescentes é constituído por uma primeira fase durando cerca de dois meses (fase de ataque) e utilizando comprimidos com FDCs de rifampicina (150 mg); isoniazida (75 mg); pirazinamida (400 mg) e etambutol (275 mg). A fase de manutenção é composta por FDCs contendo apenas dois fármacos, rifampicina (300 mg) e isoniazida (150 mg), administradas durante 4 meses. Esquemas especiais também podem ser feitos com medicações em formulações individualizadas (BRASIL, 2011a).

Tabela 1: Esquema terapêutico para tratamento de tuberculose atualmente adotado pelo Ministério da Saúde para casos novos em adultos e adolescentes (BRASIL, 2011a)

Regime	Fármacos	Faixa de peso	Unidades/dose	Meses
RHZE ^{*1} Fase de ataque	RHZE	20 a 35 kg	2 comp	2
	150/75/400/275	36 a 50 kg	3 comp	
	Comprimido em dose fixa combinada	>50 kg	4 comp	
RH ^{*2} Fase de manutenção	RH 300/150 ou 300/200	20 a 35 kg	1 caps ou comp 300/150	4
		36 a 50 kg	1 caps ou comp 300/150 + 1 caps ou cp 150/75	
	Cápsula ou comprimido	>50 kg	2 caps 300/150	

^{*1} RHZE – comprimidos contendo FDCs de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol

^{*2} RH – comprimidos contendo rifampicina e isoniazida

2.4. Fármacos tuberculostáticos alvo do trabalho

A isoniazida e a rifampicina são as duas formas mais ativas e os principais fármacos do tratamento contra a tuberculose são objetos deste estudo.

2.4.1. Isoniazida

A isoniazida é uma molécula simples, com peso molecular de 137,14 g/mol que se apresenta como um pó branco cristalino, sendo livremente solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter e benzeno. Seus valores de pKa são 2,0 e 3,5 (MERCK, 2000). Possui boa absorção no sistema digestivo, podendo ocorrer significativa metabolização hepática por acetilação na primeira passagem pelo fígado. É bacteriostática para o bacilo “em repouso” e bactericida para os microrganismos em divisão. É capaz de penetrar nas células fagocitárias e, por isso, é ativa contra formas intra e extracelulares. É menos efetiva contra as espécies atípicas (KATZUNG, 2005).

A figura 4 apresenta a estrutura química da isoniazida.

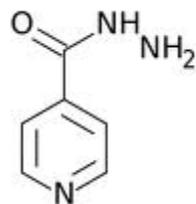


Figura 4: Estrutura química da molécula de isoniazida

2.4.1.1. Mecanismo de ação

A isoniazida inibe a síntese do ácido micólico, componente essencial da parede celular das micobactérias. Outros mecanismos de ação têm sido relatados, como a quelação de íons metálicos necessários ao metabolismo da micobactéria e interferência no metabolismo da glicose e na respiração celular destes microrganismos (KATZUNG, 2005).

2.4.1.2. Farmacocinética

A isoniazida é rapidamente absorvida após administração oral, atingindo rapidamente todos os fluidos e células. O seu pico plasmático é alcançado em uma ou duas horas. As concentrações no sistema nervoso e no líquido cefalorraquidiano variam de 20 a 100% em relação às do plasma. Sua excreção se dá primariamente na urina inalterada ou como derivado acetil ou como ácido isonicotínico. O tempo de meia-vida varia de 45 a 110 minutos nos indivíduos com acetilação lenta e de 2 a 4,5 horas em outros. A isoniazida atravessa facilmente a barreira placentária, atingindo concentrações no líquido amniótico e no feto e é excretada no leite materno (KATZUNG, 2005).

A isoniazida é utilizada para tratamento de todos os tipos de tuberculose, sendo empregada simultaneamente com outros fármacos. É sempre incluída em todos os esquemas terapêuticos, a não ser que haja contraindicação ou resistência ao medicamento. Devido à resistência, a droga deve ser sempre associada a outros tuberculostáticos. A isoniazida é também indicada, isoladamente, em situações bem determinadas com base no resultado do PPD (KATZUNG, 2005).

2.4.1.3. Substâncias relacionadas à isoniazida

A degradação dos fármacos resulta em duas consequências diretas para o medicamento. A primeira trata da diminuição do teor do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) quando se atinge um limite inferior especificado em relação à dose, o medicamento não poderá mais ser comercializado. O segundo problema é a potencial toxicidade das substâncias geradas na degradação do fármaco.

Segundo Bhutani e colaboradores (2007), a isoniazida é um fármaco termicamente estável, pouquíssimo instável à fotólise e oxidação; porém, quando submetida a uma hidrólise energética ela forma seus produtos de degradação principais. São duas as principais substâncias relacionadas à isoniazida: o ácido isonicotínico (figura 5) e a isonicotinamida (figura 6). A degradação de isoniazida 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 (BHUTANI *et. al.*, 2007).

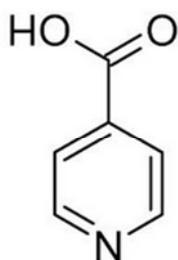


Figura 5: Estrutura química da molécula do ácido isonicotínico

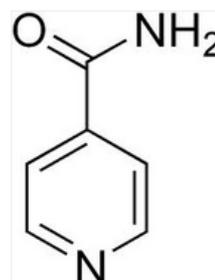


Figura 6: Estrutura química da molécula da isonicotinamida

2.4.2. Rifampicina

No combate à tuberculose, a rifampicina representa um importante fármaco no tratamento da tuberculose. Esse antibiótico semissintético da rifamicina é produzido a partir da fermentação do *Streptomyces mediterranei* com ação em diversas bactérias gram-negativas e gram-positivas.

A figura 7 mostra a estrutura química da rifampicina.

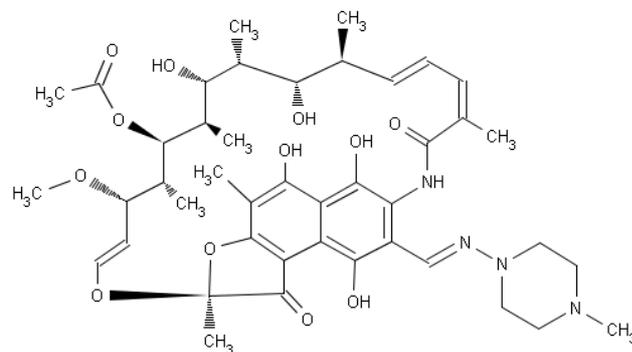


Figura 7: Estrutura química da molécula de rifampicina

A rifampicina apresenta-se como um pó cristalino de cor vermelha com peso molecular de 822,94 g/mol. Possui baixa solubilidade em água, é solúvel em metanol e tetraidrofurano 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. Uma suspensão aquosa de rifampicina 1% apresenta um pH entre 4,5 e 6,5 (MERCK, 2000).

2.4.2.1. Mecanismo de ação

O principal mecanismo de ação é a inibição da atividade RNA-polimerase DNA-dependente. Embora tenha boa ação antibacteriana, tem sido

reservado para o tratamento de hanseníase e tuberculose, em associação com outros antibacterianos (RANG, 2012).

2.4.2.2. Farmacocinética

O fármaco em questão tem boa absorção no trato gastrointestinal, sendo reduzido, no entanto, na presença de alimentos. Apresenta boa distribuição pelos líquidos corporais, atingindo também o sistema nervoso e é capaz de atravessar a barreira placentária e chegar ao leite materno. Sua metabolização se faz no fígado pela bile, e grande parte é excretada nas fezes. É possível constatar ação antibacteriana com níveis mínimos de concentração sanguínea (KATZUNG, 2005).

2.4.2.3. Substâncias relacionadas à rifampicina

Existem três substâncias relacionadas a rifampicina que são conhecidas, caracterizadas e descritas em literatura: a 3- formil-rifampicina (figura 8-a), a rifampicina-quinona (figura 8-b) e a rifampicina-N-óxido (figura 8-c) (BHUTANI *et.al.*, 2005).

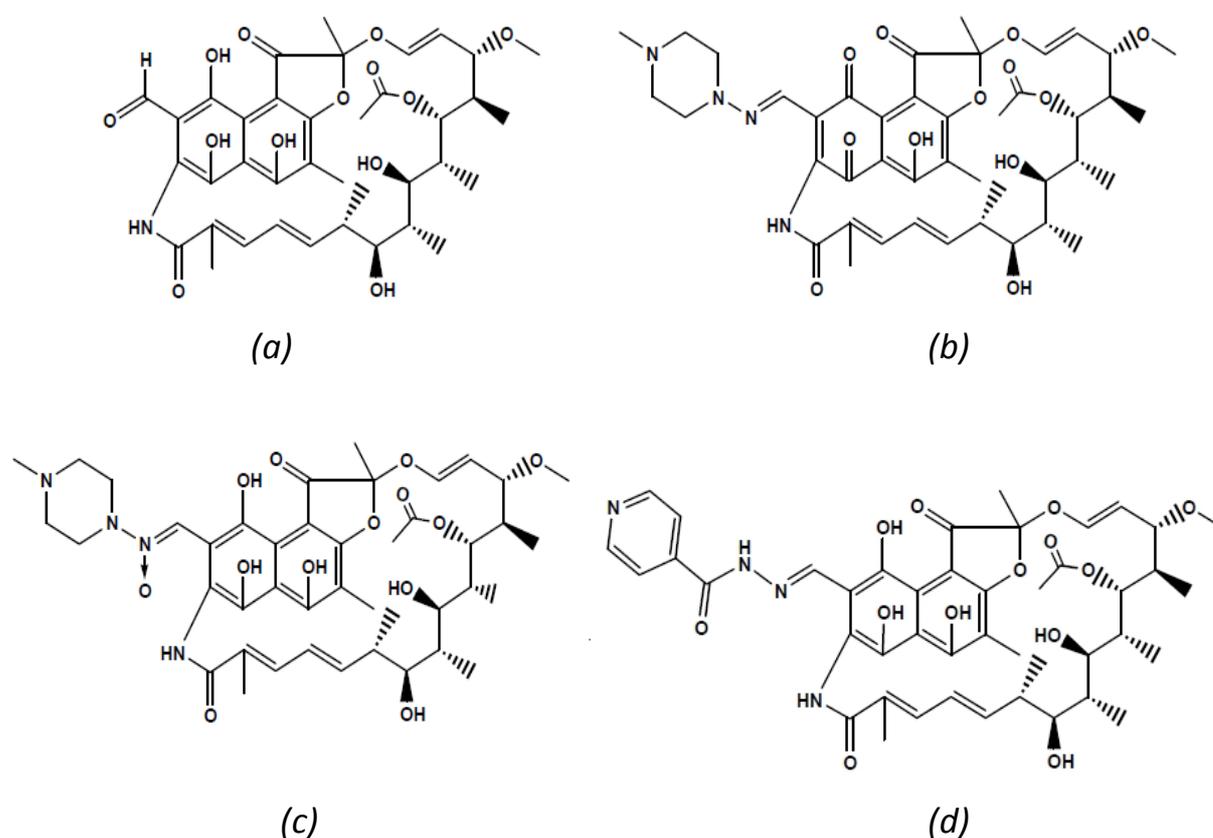


Figura 8: Estruturas químicas das moléculas de substâncias relacionadas à rifampicina: 3-formil-rifampicina (figura 8-a), rifampicina-quinona (figura 8-b), rifampicina-N-óxido (figura 8-c) e isonicotinil hidrazona (figura 8-d).

A degradação desse fármaco é dependente de pH: em meio ácido, hidrolisa formando 3-formilrifamicina, que apresenta atividade *in vitro* mas não *in vivo* e em 1-amino-4-metilpiperazina que, em contato com ar em meio alcalino, oxida a rifampicina-quinona, também inativa (SHISHOO, *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2001). A rifampicina não suporta altas temperaturas e deve ser armazenada ao abrigo da luz (MARTINDALE, 2002; WOLLINGER, 2008).

Além disso, quando isoniazida e rifampicina estão presentes em uma mesma formulação, a substância relacionada isonicotinil hidrazona é gerada (figura 8-d). Sishoo e colaboradores (1999) relataram também que a rifampicina, em pH ácido, hidrolisa à 3-formil-rifamicina; esta hidrólise é duas vezes mais rápida em presença de isoniazida (SHISHOO *et al.*, 1999).

Quase não há informações disponíveis a respeito dos efeitos tóxicos que os produtos oriundos da degradação de isoniazida e rifampicina podem causar.

Além disso, não existem, em literaturas oficiais no Brasil, critérios de aceitação definidos e harmônicos para estas substâncias. A Farmacopeia Americana 34^a edição (2011) define critérios de aceitação apenas para a rifampicina-quinona (RQ) de limites inferiores a 1,5%. A Farmacopeia Internacional define critérios para a rifampicina-quinona (limites inferiores a 4,0%), para a Isonicotinil Hidrazona (limites inferiores a 5,0%), para qualquer outra substância relacionada desconhecida (limites inferiores a 1,5%) e também determina que o somatório de cada impureza individual seja inferior a 10%. (THE INTERNATIONAL PHARMACOPEA, 2010; USP 2011).

2.5. Metodologias analíticas

2.5.1. Metodologias analíticas de compêndios oficiais

Os compêndios oficiais examinados neste trabalho referem-se a apenas métodos utilizando a técnica de cromatografia de alta eficiência (CLAE) para análise de teor e substâncias relacionadas. As farmacopeias que apresentam metodologias de análise para a associação de isoniazida e rifampicina são apenas a Farmacopeia Internacional 4^a edição (2011) e a Farmacopeia Americana (USP) 34^a edição (2011). A Farmacopeia Brasileira 5^a edição (2010) não possui metodologia analítica para avaliação de FDCs de isoniazida e rifampicina, apenas para os fármacos em separado. Entretanto, os métodos propostos apresentam alguns inconvenientes.

A Farmacopeia Internacional utiliza um método isocrático com fase móvel constituída por proporção de metanol:tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 (60:40 v/v) em coluna C18 para o doseamento de rifampicina e suas substâncias relacionadas (THE INTERNATIONAL PHARMACOPEA, 2010).

Entretanto, devido ao fato da isoniazida ser estruturalmente diferente da rifampicina, uma metodologia analítica foi proposta pela Farmacopeia

Internacional para o doseamento desses dois ativos sem que, no entanto, contemplasse a avaliação das substâncias relacionadas. Portanto, para a análise de uma formulação FDC contendo isoniazida e rifampicina, é preciso avaliar o desempenho de duas metodologias: uma para teor e outra para quantificação de substâncias relacionadas presentes na formulação.

A metodologia analítica apresentada pela USP 34^a edição para a análise de teor da associação de isoniazida com rifampicina em cápsulas consiste na separação em coluna cromatográfica C18, medindo 250 mm de comprimento e com tamanho de partícula de 5,0 µm. A fase móvel utilizada é um gradiente de eluição composto de tampão fosfato pH 6,8 e acetonitrila. Tal metodologia se aplica não só para o teor de isoniazida e rifampicina como também para avaliação das substâncias relacionadas presentes na formulação (USP, 2011).

É descrito na literatura que o método descrito pela USP, embora possua a vantagem de apresentar uma única metodologia para avaliação de substâncias relacionadas e doseamento dos ativos, não possui robustez adequada, indicando que a resolução entre os picos relativos a substâncias relacionadas é dependente da marca da coluna cromatográfica e varia de formulação para formulação (MOHAN, SHARDA e SINGH, 2003).

2.5.2. Metodologias analíticas descritas na literatura

Na literatura há diversas metodologias para análise de isoniazida e rifampicina em formulações farmacêuticas podendo ou não conter outros fármacos. Os métodos estão apresentados abaixo.

Panchangula e colaboradores (1999) desenvolveram um método por CLAE para análise de rifampicina e seu principal metabólito, rifampicina-quinona, no plasma e na urina, em presença de isoniazida, pirazinamida e etambutol. A separação é realizada em 15 minutos em coluna C18 e modo de eluição isocrático com metanol : tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 5,2 (65 : 35 v/v).

Uma metodologia que utiliza pH mais ácido como fase móvel foi desenvolvida por Mariappan e colaboradores (2003). Uma coluna C18 é utilizada com gradiente de eluição composto de metanol e tampão fosfato dibásico de sódio 0,01 mol/L contendo 0,05 % (m/v) de cloreto de tetrametilamônio, sendo o pH ajustado para 3,5. O método desenvolvido foi adequado para a análise de amostras de isoniazida e rifampicina para testes de dissolução em HCl 0,1 mol/L e suco gástrico simulado.

Bhutani e colaboradores (2007) desenvolveram e validaram uma metodologia para análise de isoniazida seletiva aos seus principais produtos de degradação (ácido isonicotínico e isonicotinamida). A separação é realizada em coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) com água : acetonitrila 96:4 v/v em fluxo de 0,5 mL/min.

Gunasekaran e Sailatha (2009) desenvolveram um método utilizando CLAE capaz de separar isoniazida, pirazinamida e rifampicina. A análise é feita em duas etapas: a primeira para separar e quantificar isoniazida e pirazinamida usando uma coluna cromatográfica C18 e fase móvel contendo água, fosfato de potássio monobásico e acetonitrila com uma detecção em 254 nm e a segunda etapa para quantificar a rifampicina usando uma coluna cromatográfica C8, fase móvel composta de água, metanol, acetonitrila, ácido cítrico, com uma detecção também em 254 nm. Os tempos de retenção da pirazinamida, isoniazida e rifampicina, neste método, foram de 6,307, 4,763 e 5,124 minutos, respectivamente.

Zhou e colaboradores (2010) desenvolveram um método para determinação de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e acetil-isoniazida em plasma humano utilizando CLAE. No método em questão, foi empregada uma coluna C12 (Max-RP) e uma fase móvel com metanol : acetonitrila : tampão (20 mM heptanossulfonato de sódio, pH 2,5) em uma proporção de 10 : 8 : 82.

Cromatografia em camada delgada também foi usada por Shewiyo e colaboradores (2012) para separar isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol em FDCs. A fase móvel utilizada foi etanol : água : ácido acético glacial : solução amônio 37% (69 : 25 : 5 : 1). Esta condição, entretanto, não é utilizada para determinação quantitativa.

Wollinger (2008) baseou-se na metodologia apresentada na USP para a qual propôs uma alteração no gradiente de eluição da fase móvel. Sua otimização resultou em uma suavização da linha de base na região onde havia uma aglomeração de sinais não resolvidos resultantes do gradiente de eluição descrito na USP. Assim, conseguiu uma separação completa de substâncias relacionadas para aquela amostra alvo do seu estudo.

Nguyen e colaboradores (2008) desenvolveram e validaram um método utilizando CLUE para separação de isoniazida, pirazinamida, rifampicina e etambutol em comprimidos com dose fixa combinada objetivando a análise de teor desses fármacos. Eles usaram uma coluna com dimensões pequenas (2,1 x 50 mm) recheadas com partículas de diâmetros de 1,7 μm e usaram eluição por gradiente. O tempo de corrida cromatográfica foi extremamente curto (1 minuto).

Azevedo (2006) otimizou e validou uma metodologia analítica para a determinação de tuberculostáticos também em FDCs, porém não era adequada para a quantificação das substâncias relacionadas de seus IFAs e empregava a técnica de eletroforese capilar.

Essas metodologias, bem como as constantes nas farmacopeias, foram avaliadas no desenvolvimento do presente trabalho. Entretanto, alguns gargalos foram levantados inicialmente. Os trabalhos de Panchangula e colaboradores (1999) e de Zhou e colaboradores (2010) foram desenvolvidos para amostras biológicas e consideraram todas as substâncias relacionadas de isoniazida e rifampicina que geralmente estão presentes nas formulações farmacêuticas. Mariappan e colaboradores (2003) focaram no ensaio de dissolução, que também não abrange o estudo das impurezas. Bhutani e colaboradores (2007) apenas focaram na isoniazida e suas impurezas; Shewiyo e colaboradores (2012), por sua vez, utilizaram cromatografia em camada delgada, o que está fora do escopo do trabalho. Gunasekaran e Sailatha (2009) desenvolveram duas metodologias, uma para dosar isoniazida junto com pirazinamida e outra para rifampicina.

A proposta do presente trabalho é um método apenas que englobe a análise de teor bem como de substâncias relacionadas. Wollinger (2008) é o

trabalho que mais se aproxima da proposta dessa dissertação e será cuidadosamente avaliado. Por fim, Nguyen e colaboradores (2008) empregaram a CLUE, mas também somente avaliaram o doseamento dos fármacos em questão.

2.6. Cromatografia líquida

O processo cromatográfico é uma técnica físico-química e que consiste na partição dos componentes de uma mistura entre uma fase móvel e uma fase estacionária que permite separações por partição, adsorção, ou processos de troca iônica, dependendo dos tipos de fases móvel e estacionária utilizadas. Na cromatografia líquida a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel (SKOOG e LEARY, 1992).

São as forças físicas e químicas que atuam entre as duas fases as responsáveis pela retenção dos analitos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças determina o tempo de retenção desses analitos, isto é, a resolução entre eles e, portanto, a separação dos mesmos (GIL, 2010).

Os métodos por cromatografia líquida podem ainda ser divididos em dois tipos distintos, classificados de acordo com a polaridade de suas fases móveis e fases estacionárias: fase normal ou fase reversa.

2.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é realizada por meio de um equipamento chamado cromatógrafo líquido e é essencialmente uma cromatografia em coluna conduzida sob pressão de eluição, alta velocidade de

fluxo e tendo a coluna cromatográfica (fase estacionária) um material de empacotamento com pequeno tamanho de partícula (AULTON, 2005).

O sistema de bombeamento promove a corrida cromatográfica de volumes programados de fase móvel e da amostra através da coluna cromatográfica. As bombas são capazes de impulsionar a fase móvel de forma suave e reprodutível sob pressão para compensar a compressibilidade do solvente. Qualquer diferença de sinal pela passagem de alguma substância que não as componentes da fase móvel será registrada por um pico cromatográfico pelo detector, que também controla as condições cromatográficas do equipamento (SKOOG e LEARY, 1992).

Essa técnica é amplamente usada no controle de qualidade no contexto da indústria farmacêutica, sendo empregada na determinação de pureza de diferentes substâncias aplicadas a um medicamento, além de identificar e quantificar possíveis impurezas.

Quanto mais rápida e eficiente é uma análise qualitativa ou quantitativa melhor; por isso, a CLAE é vantajosa, pois resulta em tempos de retenção menores, alta sensibilidade, a necessidade de um pequeno volume de amostra e, ainda, alta seletividade para a resolução de misturas complexas (SKOOG e LEARY, 1992).

A grande flexibilidade na escolha da fase móvel, o crescente número de fases estacionárias disponíveis e sua sensibilidade inerente fazem da CLAE uma técnica analítica poderosa (AULTON, 2005).

2.6.2. Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) é uma tecnologia ainda recente das técnicas de separação. Baseia-se nos mesmos princípios da CLAE e utiliza fases estacionárias (FE) com partículas menores que 2µm e instrumentação capaz de operar com altas pressões de fase móvel (6000-15000 psi).

Por conta das partículas da fase estacionária serem bem menores é possível gerar colunas mais seletivas, eficientes (pois aumenta-se o número de pratos teóricos da coluna) e estáveis química e mecanicamente, de forma a aumentar a resolução e a capacidade de detecção de picos, com diminuição concomitante do comprimento da coluna. Além disso, partículas menores tendem a permitir trocas do soluto na fase móvel (FM) e nos poros das partículas mais rapidamente devido à menor profundidade dos poros. Assim, o soluto percorre em menor tempo o comprimento da coluna entre a FM e a FE, eluindo em picos estreitos. (MALDANER e JARDIM, 2009).

Ainda, o uso destas partículas, juntamente com as altas velocidades lineares da fase móvel, aumenta a pressão no sistema de CLUE, mas permitem análises 20 vezes mais rápidas (se comparadas a CLAE), consumo de solventes bem menor, alcançam eficiências mais elevadas e sensibilidade de 2-3 vezes maior, se comparadas às análises realizadas utilizando-se CLAE.

Na evolução da técnica cromatográfica de CLAE para CLUE, também foram otimizados fatores como volume extra coluna e tempo de residência dos gradientes de eluição – tempo que a FM leva para percorrer o sistema cromatográfico desde a saída do misturador até o topo da coluna, como forma de minimizar o alargamento do pico cromatográfico e obter a máxima eficiência de separação (MALDANER e JARDIM, 2009).

Uma análise por CLUE geralmente apresenta um tempo de análise drasticamente reduzido se comparada à técnica por CLAE. Além disso, a transferência de um método já desenvolvido por CLAE para CLUE pode ser facilmente realizada, deixando de ser um fator limitante para o emprego da CLUE (ORTIZ, ANTUNES e LINDEN, 2010).

Sendo assim, a migração da metodologia analítica para detecção de teor em medicamentos de doses fixas combinadas contendo isoniazida e rifampicina de CLAE para CLUE é oportuna já que, ao se reduzir o tempo de análise, permitir-se-á a automatização da análise, além de melhorar a sensibilidade do método e de reduzir custos.

Desta forma, a técnica de CLUE permite, dentre outras vantagens, solucionar, ou mesmo atenuar essa problemática da rápida degradação da

Rifampicina, uma vez que consegue reduzir o tempo de corrida de uma amostra em até nove vezes (JONES *et al.*, 2010).

2.7. Validação de métodos analíticos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma etapa denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI *et al.*, 2004).

Pode-se definir que validação de método analítico é uma etapa no desenvolvimento de um método analítico em que se assegura experimentalmente que o método desenvolvido é adequado para o fim a que ele se propõe.

A legislação vigente no Brasil para produtos farmacêuticos e suas matérias-primas é a resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003, na qual afirma-se que a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003).

A RE n° 899 classifica diferentes métodos por categorias. A tabela 2 mostra cada método com a sua respectiva categoria.

Tabela 2. Classificação dos testes analíticos, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003)

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Ainda, a Anvisa, por meio desta Resolução, determina que para cada categoria de método será exigido um conjunto de testes de modo a se testar diferentes parâmetros analíticos. A tabela 3 apresenta os diferentes parâmetros analíticos a serem testados de acordo com a classificação do método analítico.

Tabela 3. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003).

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	
		Quantitativo	Ensaio limite			
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não	
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não	
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não	
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não	
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

De acordo com essa classificação, o método desenvolvido no presente trabalho pertence à categoria I, podendo ser usado para quantificar impurezas e substâncias relacionadas e, portanto, também podendo ser classificado como categoria II. Assim, os parâmetros recomendados são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. A seguir, será discutido cada parâmetro a ser testado neste trabalho.

2.7.1. Seletividade

É a habilidade de determinar exatamente a substância de interesse em uma matriz analítica em que há outros componentes. A especificidade de um método analítico para determinação quantitativa do princípio-ativo é avaliada demonstrando que os resultados da análise não são afetados pela presença de excipientes da formulação ou até mesmo por impurezas e/ou produtos de degradação.

Para tanto, a especificidade de um método analítico para determinação de impurezas (ensaio limite) é avaliada contaminando a matéria-prima ou produto com quantidades apropriadas de impureza, comparando com amostras não contaminadas e demonstrando que estas impurezas podem ser isoladas dos demais componentes (USP, 2011).

2.7.2. Linearidade

O parâmetro analítico linearidade é definido como sendo a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Após a curva de linearidade ser feita com no mínimo cinco concentrações de analito, é observado se há relação linear, não sendo aceitos valores de coeficiente de regressão (R^2) inferiores a 0,999. É sabido, porém, que a legislação brasileira vigente especifica apenas que o coeficiente de correlação deva ser maior que 0,99, não mencionando critérios para R^2 (BRASIL, 2003).

2.7.3. Intervalo

É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. O intervalo é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (BRASIL, 2003).

2.7.4. Precisão

A precisão de um método analítico é o grau de concordância de uma série de resultados obtidos de múltiplas análises, de uma mesma amostra. Para a análise deste parâmetro, devemos levar em consideração a repetibilidade (precisão intra-corrída), a precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) (BRASIL, 2003).

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio-padrão ou desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O valor máximo aceitável de desvio-padrão relativo (DPR) não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2003).

2.7.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor teórico.

É determinada a partir da porcentagem de substância recuperada na análise de uma matriz com diferentes quantidades conhecidas do analito, em níveis acima e abaixo do valor normal esperado na amostra (LOWEN, 2003).

A RE 899 exige que devem ser feitas no mínimo nove determinações, de modo que sejam feitas três replicatas de determinações das concentrações baixa, média e alta. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (BRASIL, 2003).

2.7.6. Robustez

É a capacidade do método analítico de permanecer inalterado por variações, pequenas e deliberadas, nos diversos parâmetros analíticos. Indica a confiança do método durante o uso normal. Ao se verificar a suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

2.7.7. Limite de Detecção (LD)

É a menor quantidade do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais (BRASIL, 2003).

2.7.8. Limite de Quantificação (LQ)

É a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob determinadas condições experimentais (BRASIL, 2003).

2.8. Justificativa do trabalho

Em uma rotina de controle de qualidade, a otimização de metodologias rápidas e eficazes é de extrema importância. Um medicamento para ter o seu lote liberado ao comércio precisa ser submetido aos seguintes ensaios quantitativos: teor, uniformidade de conteúdo e dissolução. Se todos esses ensaios forem realizados por CLAE tem-se aproximadamente 70 injeções no cromatógrafo a líquido, sem contar possíveis re-análises. Se o tempo de corrida de cada injeção for de 10 minutos tem-se 12 horas de análise, sem mencionar o tempo anterior de preparo de amostra. Dessa forma, o uso da CLUE permite reduzir pelo menos à metade esse tempo o que, para a indústria, é a garantia de uma liberação mais rápida dos lotes ao mercado.

A literatura científica, apesar de apresentar diversas metodologias para análise de isoniazida e rifampicina, no entanto, não reporta uma única metodologia a qual permite uma análise concomitante de teor para esses dois IFAs e que também quantifique as substâncias relacionadas presentes na formulação.

Nesse sentido, se faz necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica para doseamento tanto da isoniazida quanto da rifampicina e que seja também seletiva para suas substâncias relacionadas. O uso da técnica de CLUE também é adequado, já que, dessa forma, reduz-se consideravelmente o tempo de corrida cromatográfica e, conseqüentemente o tempo total de análise do produto. Contudo, é necessário o desenvolvimento analítico também utilizando a técnica de CLAE, pois, como a técnica de CLUE é relativamente nova, muitos laboratórios analíticos ainda não possuem esse equipamento. Por fim, é também interessante uma comparação de tempo, custo e eficiência entre as metodologias analíticas utilizando as duas técnicas.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver e validar uma metodologia analítica eficaz para determinação multi-componente de rifampicina e isoniazida, capaz também de ser seletiva para substâncias relacionadas na formulação deste tuberculostático que será produzida por um Laboratório Oficial Farmacêutico para atendimento ao Sistema Único de Saúde (SUS), visando facilidade operacional e redução no custo e no tempo de análise.

3.2. Objetivos específicos

- Otimizar a metodologia de análise de teor para tuberculostáticos de dose fixa combinada 2 em 1 por CLAE, realizando alterações no fluxo, gradiente cromatográfico e composição de fase móvel, a fim de se tornar seletiva também para substâncias relacionadas dos IFAs e ser aplicada na formulação desenvolvida pelo Laboratório Oficial Farmacêutico;

- Validar a metodologia a ser otimizada utilizando a técnica de CLAE, através da avaliação dos seguintes parâmetros: Especificidade, Linearidade, Precisão (Repetibilidade e Precisão intermediária), Seletividade/Especificidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação;

- Realizar um Estudo de Estabilidade de longa e acelerada duração, de acordo com a legislação vigente, a fim de confirmar que a metodologia otimizada e validada é capaz de detectar as substâncias relacionadas conhecidas ou não já presentes na formulação no tempo inicial do estudo e também as que surgiram no decorrer do Estudo de Estabilidade.

- Transferir e otimizar a metodologia analítica de CLAE para CLUE, visando a aplicação da mesma na rotina de um laboratório de controle de qualidade.

- Comparar o impacto das diferentes técnicas analíticas como CLAE e CLUE.

- Validar a metodologia analítica desenvolvida por CLUE, através da avaliação dos seguintes parâmetros: Linearidade, Exatidão, Precisão (Repetibilidade e Precisão intermediária), Especificidade, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Os materiais aqui descritos foram utilizados no presente trabalho.

Balões volumétricos calibrados de 25, 100, 200 e 250 mL calibrados e certificados, marca Brand[®] e Roni Alzi[®];

Membrana filtrante de 0,22 µm; Millipore[®]

Membrana filtrante de 0,45 µm; Millipore[®]

Membrana filtrante HA éster de celulose 0,45 µm; 47 mm; Sartorius[®]

Membrana filtrante HA éster de celulose 0,22 µm; 47 mm; Millipore[®]

Coluna cromatográfica C18 5 µm – 250 x 4,6 mm ACE 5[®]

Coluna cromatográfica C18 10 µm – 250 x 4,6 mm µbondapack[®]

Coluna cromatográfica C18 Excel 2 µm - 100 x 2,1 mm ACE 5[®]

Coluna cromatográfica C18 2 µm – 50 x 2,1 mm Acquity Waters[®]

Pré-coluna µbondapack C18 10 µm Waters[®]

Vials de 2,0 mL.

4.1.1. Padrões e amostras

Padrão primário de isoniazida USP;

Padrão primário de rifampicina USP;

Padrão primário de rifampicina-quinona USP;

Padrão Primário de rifampicina-N-óxido BP;

Padrão Primário de 3-formil-rifampicina BP;

Padrão secundário de isoniazida - Farmanguinhos;

Padrão secundário de rifampicina - Farmanguinhos;

Comprimidos revestidos de isoniazida + rifampicina (150 + 300)mg
fabricados por Laboratório Farmacêutico Oficial;

Placebo da formulação fabricada por Laboratório Farmacêutico Oficial.

4.1.2. Reagentes

Acetonitrila grau CLAE marca Tedia[®];

Acetato de amônio marca Vetec[®]

Ácido fosfórico marca Vetec[®];

Ácido acético glacial marca Vetec[®];

Água purificada[®];

Fosfato de sódio dibásico marca Vetec[®].

4.1.3. Equipamentos

Balança analítica certificada para uso Mettler Toledo[®] XS205;

Banho ultrassônico *Ultrasonic Cleaner* - Unique[®];

Câmara climática Sanyo-Alien[®]

Sistema de CLAE certificado para uso LC-20 Shimadzu[®];

Sistema de CLAE certificado para uso LC-10 Shimadzu[®]

Sistema de CLUE certificado para uso Waters Acquity[®];

Pipeta automática 5000 µL certificada para uso *Eppendorf Research*[®];

Potenciômetro medidor de pH certificado para uso Metrohm[®] 780.

Sistema de purificação de água Integral 10 Milli-Q[®].

4.2. Metodologia analítica e parâmetros cromatográficos

O método descrito na USP é baseado na cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna de fase reversa (desativada), com pré-coluna μ Bondapack[®] C18 10 μ m 125 Å e modo de eluição por gradiente, detecção por arranjo de diodo com comprimento de onda específico em 238 nm.

Os parâmetros cromatográficos são descritos a seguir:

- Coluna: C18, 250 x 4,6 mm; 5 μ m, 100 Å
- Pré-coluna: μ Bondapack[®] C18 10 μ m, 125 Å
- Comprimento de onda: 238 nm
- Fluxo: 1,50 mL/min (eluição por gradiente)
- Temperatura: ambiente
- Tempo de análise: 18 minutos

Baseada na metodologia proposta por Wollinger (2008), algumas otimizações foram realizadas e avaliadas através dos seguintes parâmetros: coluna cromatográfica, fluxo, proporção de acetonitrila na fase móvel e/ou no preparo de amostras e alteração na rampa do gradiente de eluição cromatográfico. As alterações estão na tabela 4 abaixo.

Tabela 4: Condições cromatográficas experimentadas para metodologias utilizando CLAE

Condições	Coluna	Fluxo (mL/min)	Fase Móvel	Gradiente de eluição
C1	μ Bondapack [®]	1,5	A: Tampão Fosfato : Acetonitrila (96:4) B Tampão Fosfato : Acetonitrila (45:55)	0 min: 100% A 5 min: 100% A 6 min: 0% A 15 min: 0% A 18 min: 100% A 25 min: 100% A
C2	μ Bondapack [®]	1,5	A: Tampão Fosfato : Acetonitrila (96:4) B Tampão Fosfato : Acetonitrila (45:55)	0 min: 100% A 15 min: 0% A 18 min: 100% A 25 min: 100% A
C3	μ Bondapack [®]	1,5	A: Tampão Fosfato : Acetonitrila (96:4) B Tampão Fosfato : Acetonitrila (55:45)	0 min: 100% A 15 min: 0% A 22 min: 100% A 27 min: 100% A
C4	ACE [®]	1,5	A: Tampão Fosfato : Acetonitrila (96:4) B Tampão Fosfato : Acetonitrila (55:45)	0 min: 100% A 15 min: 0% A 22 min: 100% A 27 min: 100% A
C5	ACE [®]	2,0	A: Tampão Fosfato : Acetonitrila (96:4) B Tampão Fosfato : Acetonitrila (55:45)	0 min: 100% A 10 min: 31% A 32 min: 17% A 35 min: 100% A 40 min: 100% A
C6	ACE [®]	2,0	A: Tampão Fosfato : Acetonitrila (96:4) B Tampão Fosfato : Acetonitrila (55:45)	0 min: 100% A 10 min: 31% A 35 min: 15% A 40 min: 100% A 45 min: 100% A

4.2.1. Preparo de soluções e fase móvel para CLAE

4.2.1.1. Preparo da solução tampão fosfato de sódio dibásico 0,01 M pH 6,8

Pesar com exatidão 1,4 g de fosfato de sódio dibásico e transferir para balão volumétrico de 1000 mL. Solubilizar e ajustar o pH da solução para 6,8 com ácido fosfórico concentrado. Completar o volume com água purificada.

4.2.1.2. Preparo das fases móveis para metodologia em CLAE

Fase móvel A USP: em proveta com tampa de 1 L, misturar 960 mL de tampão fosfato de sódio dibásico 0,01 M pH 6,8 com 40 mL de acetonitrila, medidos separadamente. Homogeneizar e levar ao banho ultrassônico por 15 minutos.

Fase móvel B USP: em proveta com tampa de 1 L, misturar 450 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8 com 550 mL de acetonitrila, medidos separadamente. Homogeneizar e levar ao banho ultrassônico por 15 minutos.

Fase móvel A (para as condições C3, C4, C5 e C6, conforme tabela 4): em proveta com tampa de 1 L, misturar 550 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8 com 450 mL de acetonitrila, medidos separadamente. Homogeneizar e levar ao banho ultrassônico por 15 minutos.

Todas as soluções e solventes foram previamente filtrados em membrana 0,45 μ m.

4.2.1.3. Preparo de solução padrão de isoniazida e rifampicina para metodologia em CLAE

Pesar com exatidão 16,0 mg de padrão de isoniazida e 24,0 mg do padrão de rifampicina e transferir para balão volumétrico de 200 mL. Adicionar 10 mL de acetonitrila e agitar por 5 minutos. Adicionar 150 mL de tampão de fosfato de sódio dibásico 0,01 M e agitar por 10 minutos. Após o tempo determinado, completar o volume com tampão de fosfato de sódio dibásico 0,01 M. Homogeneizar. Filtrar em unidade filtrante com 0,45 μ m de porosidade e compatível com a solução utilizada. Para cada análise, eram preparadas duas soluções padrão oriundas de pesagens distintas, com o objetivo de ter sempre um padrão de checagem.

4.2.1.4. Preparo da solução amostra para metodologia em CLAE

Pulverizar 20 comprimidos em gral de porcelana. Pesar em triplicata o equivalente a meio peso médio e transferir para balão volumétrico de 250 mL. Adicionar 50 mL de acetonitrila e agitar por 10 minutos. Adicionar 150 mL de tampão fosfato de sódio dibásico 0,01 M agitar por 10 minutos. Completar o volume com tampão de fosfato de sódio dibásico 0,01 M. Homogeneizar. Transferir uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com tampão de fosfato de sódio dibásico 0,01M. Homogeneizar. Filtrar em unidade filtrante com 0,45 µm de porosidade e compatível com a solução utilizada. A concentração final de rifampicina é de aproximadamente 240 µg/mL e de 120 µg/mL para isoniazida.

4.2.1.5. Preparo da solução placebo para metodologia em CLAE

A solução placebo foi utilizada durante a validação da metodologia em CLAE.

Pesar em triplicata o equivalente a meio peso médio de placebo e transferir para balão volumétrico de 250 mL. Adicionar 50 mL de acetonitrila e agitar por 10 minutos. Adicionar 150 mL de tampão fosfato de sódio dibásico 0,01 M agitar por 10 minutos. Completar o volume com tampão de fosfato de sódio dibásico 0,01 M. Homogeneizar. Transferir uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com tampão de fosfato de sódio dibásico 0,01M. Homogeneizar. Filtrar em unidade filtrante com 0,45 µm de porosidade e compatível com a solução utilizada.

4.3. Validação da metodologia utilizando a técnica de CLAE

Foram avaliados os seguintes parâmetros na validação de metodologia desenvolvida para CLAE: seletividade, linearidade, exatidão e precisão (repetibilidade e Precisão intermediária).

4.3.1. Seletividade

Foi preparada uma solução da matriz (placebo) com a mesma concentração da solução amostra isenta de analito e procedeu-se conforme o preparo da amostra descrito no item 4.2.1.4.

4.3.2. Linearidade

Foram analisados 6 níveis de concentração avaliados no parâmetro de Linearidade: 50%; 90%; 100%; 110%; 130% e 150%.

As amostras de cada nível de concentração foram preparadas em triplicata e com quantidades de placebo e IFAs (isoniazida e rifampicina) conforme descrito na tabela 5. A execução de preparo das amostras seguiu como descrita no item 4.2.1.4.

Tabela 5: Quantidades de placebo e IFAs pesados no ensaio linearidade

Nível de concentração	Massa de Isoniazida (mg)	Massa de Rifampicina (mg)	Massa de Placebo (mg)	Total Pesado (mg)
50%	37,5	75	247,5	360
90%	67,5	135	157,5	360
100%	75	150	135	360
110%	82,5	165	112,5	360
130%	97,5	195	67,5	360
150%	112,5	225	22,5	360

Para cada nível de concentração, a amostra foi injetada em duplicata. A cada nível avaliado, foram injetadas as duas soluções padrão de isoniazida e de rifampicina, chamadas de P1 e P2 para fazer a checagem do sistema e do processo como um todo.

4.3.3. Precisão e exatidão

A repetibilidade e exatidão foram avaliadas por meio de 9 determinações em três concentrações diferentes (90%, 100% e 110% para isoniazida e 90%, 100% e 130% para rifampicina), utilizando os dados obtidos na linearidade.

Para avaliação da precisão intermediária, o analista B também preparou triplicata dos mesmos três níveis de concentração para isoniazida e para rifampicina.

4.3.4. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O cálculo desses limites pode ser feito pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de detecção foi expresso como:

$$LD = DP_a \times \frac{3}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

onde: DP_a é a estimativa do desvio padrão do intercepto com o eixo Y
 IC é a inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica.

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o limite de quantificação, utilizando uma relação 10:1, a partir da equação 2:

$$LQ = DP_a \times \frac{10}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

4.4. Estudo de estabilidade de comprimidos revestidos de isoniazida + rifampicina (150 + 300) mg

Um estudo de estabilidade de longa e acelerada duração foi realizado com a metodologia desenvolvida e validada utilizando a metodologia de CLAE para teor e substâncias relacionadas proposta nesse trabalho. As amostras usadas no estudo foram comprimidos revestidos contendo FDCs de isoniazida e rifampicina (150 + 300) mg fabricados por laboratório farmacêutico oficial com objetivo de serem distribuídos para atendimento na rede nacional de saúde pública.

Foram utilizadas duas estufas em duas condições diferentes: uma a 30°C e 75% umidade (duração longa) e a outra a 40°C e 75% de umidade (duração acelerada), como preconizado pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 2005).

As amostras foram analisadas antes de irem para a estufa (T0) e foram retiradas da mesma após tempos pré-determinados. Para o estudo de duração acelerada, os tempos determinados para retirada das amostras foram 3 e 6 meses. Já para o estudo de longa duração, os tempos determinados foram 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses (BRASIL, 2005).

A análise realizada contemplava os seguintes ensaios: aspecto, cor, peso médio, dureza, desintegração, umidade (pelo método de Karl Fischer), perda por secagem, teor, dissolução em 45 minutos e substâncias relacionadas.

As análises de teor e substâncias relacionadas foram conduzidas usando a metodologia otimizada e validada de CLAE. Os demais ensaios foram conduzidos como preconizados na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição.

4.5. Transferência da metodologia analítica de CLAE para CLUE

Após o fechamento e validação da metodologia por CLAE, foi realizada a transferência do método para a técnica CLUE.

Na transferência alguns parâmetros foram avaliados, e estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Condições cromatográficas experimentadas para metodologia utilizando CLUE

Condição	Coluna	Fases Móveis	Fluxo	Gradiente de eluição
C1	C18 Acquity Waters® 50 x 2,1mm 3 µm	Tampão fosfato: ACN (96:4)/ Tampão fosfato: ACN (55:45)	0,4 mL/min	0 min: 100% A 2,0 min: 31% A 7,0 min: 15% A 8,0 min: 100% A 9,0 min: 100% A
C2	C18 Acquity Waters® 50 x 2,1mm 3 µm	Tampão fosfato: ACN (96:4)/ Tampão fosfato: ACN (55:45) Tampão fosfato	0,6 mL/min	0 min: 100% A 0,8 min: 31% A 3,2 min: 15% A 3,3 min: 0% A 6,5 min: 100% A
C3	C18 ACE Excel® 100 x 2,1 mm 2 µm	Tampão fosfato: ACN (96:4)/ Tampão fosfato: ACN (55:45) Tampão fosfato	0,6 mL/min	0 min: 100% A 0,8 min: 31% A 3,2 min: 15% A 3,3 min: 0% A 6,5 min: 100% A
C4	C18 ACE Excel® 100 x 2,1 mm 2 µm	Tampão acetato 0,01 M pH 6,0/ Tampão acetato : ACN (60:40)	0,5 mL/min	0 min: 95% A 1,0 min: 95% A 2,0 min: 45% A 3,0 min: 40% A 3,5 min: 40% A 5,0 min: 10% A 6,0 min: 10% A 7,0 min: 95% A
C5	C18 ACE Excel® 100 x 2,1 mm 2 µm	Tampão acetato 0,01 M pH 5,5/ Tampão acetato : ACN (60:40)	0,5 mL/min	0 min: 95% A 1,0 min: 95% A 2,0 min: 38% A 3,5 min: 38% A 5,0 min: 10% A 6,0 min: 10% A 7,0 min: 95% A

A filtração da fase móvel bem como das soluções foi realizada em membrana com porosidade de 0,22 ao invés de 0,45 µm, seguindo recomendações do fabricante do equipamento.

Em todas as condições cromatográficas testadas, o volume de injeção foi sempre de 5 µL. A temperatura do forno de equipamento contendo a coluna também não sofreu alterações, estando sempre em 25 °C e a temperatura do sistema de *cooler* também esteve sempre em 5 °C, a fim de manter a amostra resfriada e retardar sua decomposição.

Na CLUE foi necessária ainda a troca do diluente das amostras de tampão fosfato de sódio dibásico 0,01 M pH 6,8 para tampão acetato de

amônio 0,01 M pH 5,5 pois pretendia-se ainda transferir a metodologia para CLUE/EM com o objetivo de caracterizar todas as substâncias relacionadas não conhecidas. Assim, o tampão adequado para análises em CLUE/EM é o tampão acetato de amônio.

4.5.1. Preparo de soluções e fases móveis para análises utilizando a técnica de CLUE

O preparo da solução tampão fosfato de sódio dibásico 0,01 M pH 6,8 utilizada nas condições C1, C2 e C3 da tabela 6 já foi descrito na sessão 4.2.1.1.

4.5.1.1. Preparo da solução de acetato de amônio 0,01 M

Pesar 0,77 g de acetato de amônio e transferir para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver e ajustar pH para $5,5 \pm 0,02$ com ácido acético glacial. Completar o volume com água purificada.

4.5.1.2. Preparo das fases móveis para análises utilizando a técnica de CLUE

O preparo das fases móveis A e B para as condições C1, C2 e C3 apresentadas na tabela 6 está descrito na sessão 4.2.1.2. (CLAE), excetuando a etapa de filtração que foi feita em membrana de 0,22 μm .

As fases móveis A e B utilizadas nas condições C4 e C5 apresentadas na tabela 6 foram preparados conforme descrito a seguir:

Fase móvel A: 100% solução tampão acetato de amônio 0,01 M pH 5,5, como descrito na sessão 4.2.1.1.

Fase móvel B: em proveta com tampa de 1 L, misturar 600 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 5,5 com 400 mL de acetonitrila, medidos separadamente. Homogeneizar e levar ao banho ultrassônico por 15 minutos. A solução final foi filtrada em membrana 0,22 µm.

4.5.1.3. Preparo da solução padrão para metodologia utilizando CLUE

Para as condições C1, C2 e C3 apresentadas na Tabela 6, o preparo da solução padrão não sofreu alterações em relação ao descrito na metodologia para CLAE. Para as condições C4 e C5, o preparo da solução padrão foi feito como descrito abaixo.

Pesar com exatidão 6,0 mg de padrão de isoniazida e 12,0 mg do padrão de rifampicina e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 5 mL de acetonitrila e agitar por 5 minutos. Adicionar 60 mL de tampão de acetato de amônio 0,01 M e agitar por 10 minutos. Após o tempo determinado, completar o volume com tampão de acetato de amônio 0,01 M. Homogeneizar. Filtrar em unidade filtrante com 0,22 µm de porosidade e compatível com a solução utilizada. Para cada análises eram preparados duas soluções padrão oriundas de pesagens distintas, o objetivo era ter sempre um padrão de checagem.

4.5.1.4. Preparo da solução amostra para metodologia utilizando a técnica de CLUE

Para as condições C1, C2 e C3 da tabela 6, o preparo das soluções amostra não sofreu alterações em relação ao descrito na metodologia

utilizando CLAE. Para as condições C4 e C5, o preparo foi feito da seguinte forma:

Pulverizar 20 comprimidos em gral de porcelana. Pesar em triplicata o equivalente a 20% do peso médio e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Adicionar 20 mL de acetonitrila e agitar em banho ultrassônico por 10 minutos. Adicionar cerca de 60 mL de tampão acetato de amônio 0,01 M agitar por 10 minutos em banho ultrassônico. Completar o volume com tampão de acetato de amônio 0,01 M. Homogeneizar. Transferir uma alíquota de 5,0 mL do filtrado para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com tampão de acetato de amônio 0,01M. Homogeneizar. Filtrar em unidade filtrante com 0,22 μm de porosidade e compatível com a solução utilizada. A concentração final de rifampicina é de aproximadamente 240 $\mu\text{g/mL}$ e de 120 $\mu\text{g/mL}$ para isoniazida.

4.5.1.5. Preparo da solução placebo para metodologia utilizando a técnica de CLUE

A solução placebo foi utilizada durante a validação da metodologia utilizando a técnica de CLUE.

Para o seu preparo, foram pesados, com exatidão, 144,0 g de placebo e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 20 mL de acetonitrila e levados em banho ultrassônico por 10 minutos. Cerca de 60 mL de solução tampão de acetato de amônio 0,01 M foram adicionados e levados por mais dez minutos em banho ultrassônico. Completou-se o volume com solução tampão acetato de amônio 0,01 M e homogeneizou-se. Uma alíquota de 5,0 mL do filtrado foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL e avolumado com solução de tampão acetato de amônio 0,01 M pH 5,5. A solução final foi filtrada em membrana 0,22 μm

4.6. Validação da metodologia utilizando a técnica de CLUE

A validação da metodologia analítica desenvolvida para análises em CLUE foi obtida estudando-se os parâmetros a seguir.

4.6.1. Linearidade

Uma curva de 5 níveis de concentrações espaçadas no intervalo estudado (50 a 150%) foi preparada, conforme descrito a seguir:

Foram pesados, analiticamente, 6,0 mg de padrão de Isoniazida e 12,0 mg de padrão de rifampicina para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 2,5 mL de acetonitrila e levados a banho ultrassônico por 5 minutos. Foram adicionados 30 mL da solução de tampão acetato de amônio 0,01 M pH 5,5 e levados novamente em banho ultrassônico por mais dez minutos. O volume final do balão volumétrico foi alcançado com a solução tampão acetato de amônio 0,01 M pH 5,5. A solução final foi homogeneizada e filtrada através de membrana 0,22 μm .

Diluições foram feitas conforme a tabela 7, a seguir:

Tabela 7: Esquema com diluições em cada nível de concentração estudado

Nível de Concentração (%)	Concentração de Rifampicina ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de Isoniazida ($\mu\text{g/mL}$)	Alíquota (mL)	Balão Volumétrico (mL)
50	60	30	5,0	20
70	84	42	3,5	10
100	120	60	5,0	10
130	156	78	6,5	10
150	180	90	7,5	10

Triplicatas foram feitas e injetadas no cromatógrafo líquido de ultra eficiência com cada uma das soluções preparadas.

A equação da regressão linear ($y = ax + b$) e o coeficiente de regressão (R^2) foram calculados utilizando o aplicativo Excel.

4.6.2. Exatidão

A exatidão foi avaliada em 4 níveis de concentração.

Em balão volumétrico de 100 mL, foram pesadas em triplicata as quantidades de placebo e matérias-primas dos IFAs conforme apresentado na tabela 8, 20 mL de acetonitrila foram adicionados e, após 10 minutos em banho ultrassônico, foram adicionados cerca de 60 mL de tampão acetato de amônio 0,01 M pH 5,5. O balão volumétrico foi levado novamente a banho ultrassônico por mais 10 minutos e o volume final foi completado com tampão acetato. A solução final foi filtrada, descartando-se os primeiros mililitros do filtrado e 5,0 mL do filtrado foram transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL e o volume final do balão foi completado com a solução de tampão acetato de amônio 0,01 M pH 5,5. A solução foi filtrada em membrana 0,22 μ m.

Tabela 8: Quantidades de IFAs e placebo pesadas em cada nível estudado na exatidão

Nível de Concentração (%)	Massa de Isoniazida (mg)	Massa de Rifampicina (mg)	Massa de Placebo (mg)	Balão Volumétrico (mL)
90	27,0	54,0	63,0	100
100	30,0	60,0	54,0	100
110	33,0	66,0	45,0	100
130	39,0	78,0	27,0	100

Foram injetadas duplicatas de cada solução.

Foram preparadas soluções padrão 1 e 2 conforme já descrito e a solução padrão 1 foi injetada 5 vezes e a solução padrão 2 foi injetada 2 vezes,

de modo que a relação entra a solução padrão 1 e padrão 2 seja entre 98,0 e 102,0%.

4.6.3. Precisão

Para avaliação da precisão, foram estudados a repetibilidade e a precisão intermediária da metodologia.

4.6.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por meio de nove determinações em três concentrações diferentes, utilizando os dados obtidos na avaliação da exatidão.

4.6.3.2. Precisão intermediária

O analista B repetiu os ensaios de repetibilidade realizados pelo analista A em dia diferente.

4.6.4. Seletividade

Para avaliar a seletividade da metodologia, foram estudados a interferência cromatográfica; o impacto da filtração no sinal cromatográfico e a existência ou não de efeito memória.

4.6.4.1. Avaliação da interferência cromatográfica

Uma solução placebo foi preparada como descrito anteriormente no item 4.5.1.5. A solução amostra foi preparada conforme já descrito no item 4.5.1.4.

Soluções individuais de IFAs e suas substâncias relacionadas e também uma solução de placebo fortificado (Placebo + IFAs nas concentrações de trabalho+ soluções de todas as SRs) foram preparadas.

Foram injetadas em duplicata no equipamento de CLUE cada uma das soluções acima e o diluente.

4.6.4.2. Avaliação da filtração

A solução padrão foi preparada conforme já descrito e duplicatas de injeções da mesma e da solução do branco foram feitas antes e depois da filtração em membrana de 0,22 μm e as áreas obtidas foram registradas.

4.6.4.3. Avaliação do efeito memória

Foram feitas uma injeção de diluente, uma injeção de solução padrão e uma injeção de diluente consecutivas e os sinais cromatográficos obtidos foram avaliados.

4.6.5. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de quantificação e detecção foram calculados conforme descrito no item 4.3.4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da metodologia analítica utilizando CLAE

Diante de todas as metodologias apresentadas no item 2.5 da revisão da literatura, optou-se partir das monografias já descritas em compêndios oficiais, pois teoricamente estas são abrangentes a um número maior de produtos. Dentre as farmacopeias usualmente empregadas no Brasil com o reconhecimento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) as que apresentam monografias para medicamentos com associação isoniazida com rifampicina são a Farmacopeia Americana (USP) e a Internacional.

A metodologia proposta pela USP 34^a edição e pela Farmacopeia Internacional 4^a edição não são, entretanto, seletivas para detecção e quantificação de substâncias relacionadas à rifampicina na formulação utilizada nesse estudo, desenvolvida por um laboratório oficial. Nesse contexto, uma otimização na metodologia descrita na literatura se faz necessária a fim de se obter uma metodologia analítica a ser utilizada não só para análise de teor, mas também para análise de substâncias relacionadas. Para uma rotina de controle de qualidade é de grande relevância uma metodologia através da qual se possa avaliar dois parâmetros em uma mesma corrida cromatográfica, pois permite agilidade na liberação dos resultados e, conseqüentemente, dos lotes.

O início do desenvolvimento da metodologia baseou-se na descrita na USP 34^a edição, por ser um compêndio oficial e pela facilidade em relação ao material a ser empregado. As considerações propostas por Wollinger (2008) também foram avaliadas, uma vez que estas permitem o doseamento dos ativos bem como das substâncias relacionadas em uma mesma corrida cromatográfica. Conforme mencionado anteriormente, a metodologia da Farmacopeia Internacional como as outras não oficiais existentes em literatura foram descartadas por serem duas metodologias distintas (uma para teor e

outra para substâncias relacionadas), e/ou pela complexidade do método e falta de material, como coluna, por exemplo.

É importante sinalizar que muitas vezes diferentes formulações exigem diferentes metodologias, pois os excipientes variam de medicamento a medicamento e estes acabam influenciando a análise, podendo apresentar um mesmo tempo de retenção, por exemplo, que o de uma impureza ou do próprio ativo.

A tabela 9 apresentada a seguir mostra a diferença entre as metodologias da USP 34^a edição e a sugerida por Wollinger (2008).

Tabela 9. Comparação entre as metodologias USP 34^a edição e Wollinger, 2008. (Adaptado de Wollinger 2008)

parâmetro	USP 34			Wollinger 2008		
Fase móvel ^a	Solução tampão A = tampão:ACN (96:4)			Solução tampão A = tampão:ACN (96:4)		
	Solução tampão B = tampão:ACN (45:55)			Solução tampão B = tampão:ACN (45:55)		
Fluxo	1,5 mL/min			1,5 mL/min		
	tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)	tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
Gradiente de eluição de fase móvel ^b	0	100	0	0	100	0
	5	100	0	15	0	100
	6	0	100	18	100	0
	15	0	100	25	100	0
	18	100	0			
	25	100	0			

^a Tampão fosfato 0,01 mol/L pH 6,8 e acetonitrila (ACN), as proporções das fases estão expressas em v/v

^b Na USP, os últimos 10 min do gradiente de eluição foram acrescentados para estabilização da coluna para injeção seguinte; esta etapa já está contemplada no método de Wollinger

No método descrito na USP 34^a edição, a transição da fase móvel A (tampão:acetonitrila 96:4 v/v) para a fase móvel B (tampão:acetonitrila 45:55) é feita em apenas 1 minuto. Esta metodologia também não é capaz de detectar algumas substâncias relacionadas (conhecidas ou não da rifampicina). Desta forma, Wollinger (2008) propôs uma transição mais lenta entre as fases. Isso permitiu a detecção de tais substâncias relacionadas. O tempo total de análise, na metodologia proposta por Wollinger (2008), foi também de 25 minutos.

As figuras 9 e 10 apresentam cromatogramas empregando a metodologia descrita na USP 34ª edição e por Wollinger (2008), respectivamente.

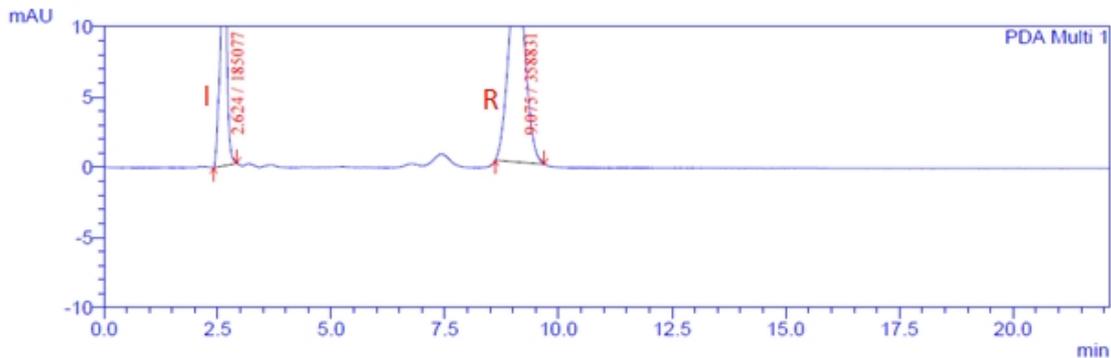


Figura 9: Cromatograma de amostra de isoniazida (I) + rifampicina (R) utilizando metodologia analítica proposta na USP 34.

O pico com tempo de retenção (t_r) de aproximadamente 2,5 minutos refere-se à isoniazida enquanto que o pico que elui em aproximadamente 9,5 minutos refere-se à rifampicina. Todos os picos cromatográficos sem integração referem-se a componentes presentes no placebo da formulação.

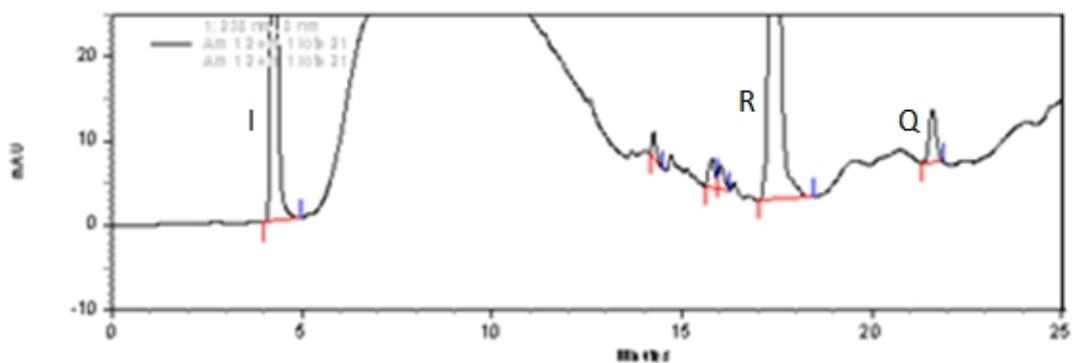


Figura 10: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina utilizando metodologia analítica proposta por Wollinger (2008)

De acordo com a figura 10, o pico com t_r de aproximadamente 4 minutos refere-se à isoniazida, enquanto que o pico com t_r de 18 minutos refere-se à rifampicina. Todos os outros picos integrados são referentes às substâncias

relacionadas. A substância relacionada rifampicina-quinona apresenta tr de aproximadamente 22 minutos, enquanto a rifampicina-N-óxido possui tr de aproximadamente 14 minutos; as substâncias relacionadas 3-formil-rifampicina e isonicotinil hidrazona não foram detectadas nesta metodologia. No método da USP observa-se que não há definição dos picos de substâncias relacionadas.

Ao aplicar uma aproximação na Figura 10, após uma análise criteriosa, sobre o cromatograma, observa-se uma co-eluição dos picos eluídos em 16 minutos, isto é, a resolução entre os picos não é satisfatória, sendo de 0,3, quando o ideal seria de pelo menos 1,5. A figura 11 mostra um destaque do cromatograma entre 15 e 20 minutos de corrida e a co-eluição das substâncias relacionadas.

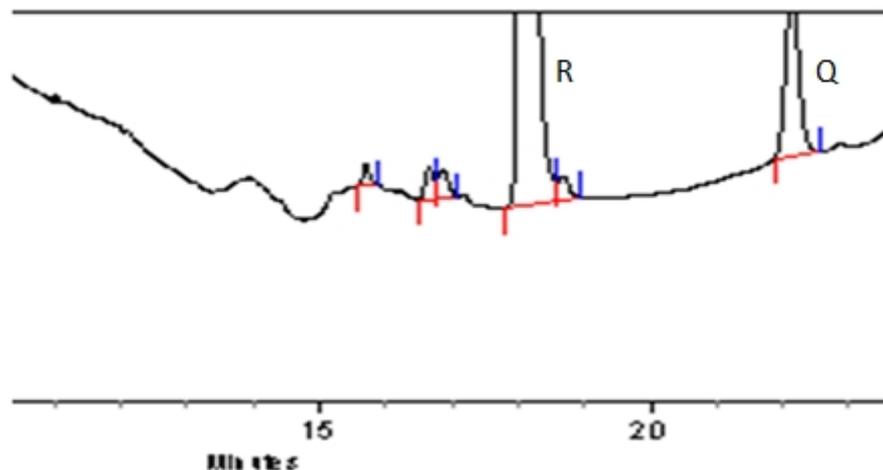


Figura 11: Destaque do cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina entre 15 e 20 minutos de corrida cromatográfica utilizando metodologia analítica proposta por Wollinger (2008)

Dessa maneira, com o uso contínuo de uma mesma coluna cromatográfica, essa co-eluição pode ficar bastante acentuada, de forma a parecer somente um pico demonstrando, a princípio, que se tem apenas uma substância. A Figura 12 mostra em destaque a corrida cromatográfica da mesma amostra mostrada na Figura 11 entre 15 e 20 minutos de corrida utilizando uma coluna cromatográfica com mesmo empacotamento que a anterior, empregada em mais de 150 corridas cromatográficas (sendo a coluna

mais utilizada no laboratório para análise de medicamentos tuberculostáticos) e o pronunciamento desta co-eluição, que não é desejável.

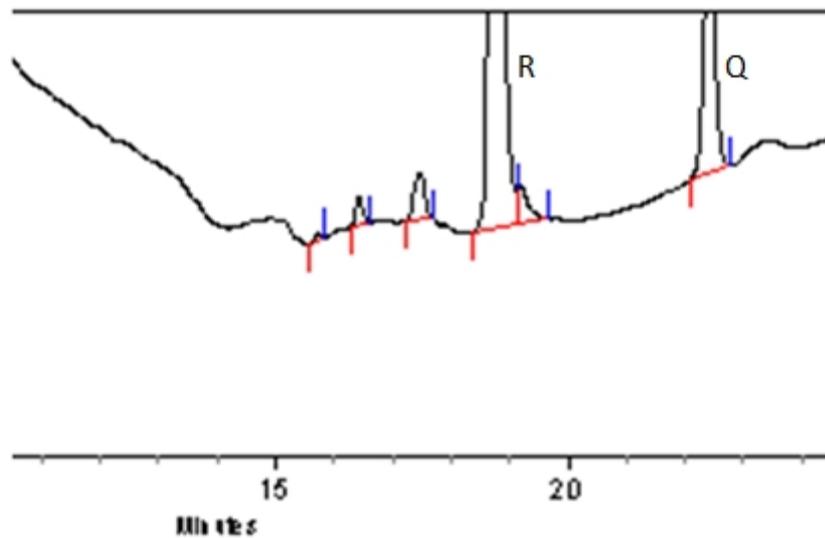


Figura 12: Destaque do cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina entre 15 e 20 minutos utilizando coluna C18 μ bondapack[®] 250 x 4,6 mm usada em mais de 150 corridas.

Os percentuais de substâncias relacionadas obtidos foram calculados por normalização de área em relação ao pico cromatográfico da rifampicina. Os critérios de aceitação para impurezas foram baseados no critério estabelecido pela Farmacopeia Internacional, uma vez que é a única que possui essa informação abrangendo todas as substâncias. De acordo com esta, o limite máximo aceitável de substâncias relacionadas para este produto é de 5,0% para isonicotil hidrazona, 4,0% para a rifampicina quinona, máximo de 1,5% para qualquer outra quantificada individualmente e até 10,0% para o total de substâncias relacionadas quantificadas em uma amostra (THE INTERNATIONAL PHARMACOPEA, 2010).

Dessa forma, a co-eluição dos picos de substâncias relacionadas pode ser interpretada equivocadamente como sendo referente a apenas uma substância relacionada onde, na verdade, são pelo menos duas que estão eluindo muito próximas. Sendo assim, pode-se ultrapassar o percentual

máximo aceitável para uma substância relacionada individual especificado em 1,5% e reprovar equivocadamente o produto.

Por se tratar de moléculas com estruturas químicas bastante semelhantes, já que eluem praticamente juntas, buscou-se otimizar a metodologia analítica alterando a proporção de solvente orgânico na fase móvel e estendendo a rampa do gradiente de eluição cromatográfica a fim de retardar a eluição das substâncias relacionadas e de quantificar esses picos separadamente. Nesse contexto, foram testadas as condições de gradiente de eluição descritas na tabela 4 presente no item 4.2 de Materiais e Métodos.

A figura 13 mostra o cromatograma de uma análise obtida sob a condição 3 descrita na sessão 4.2.

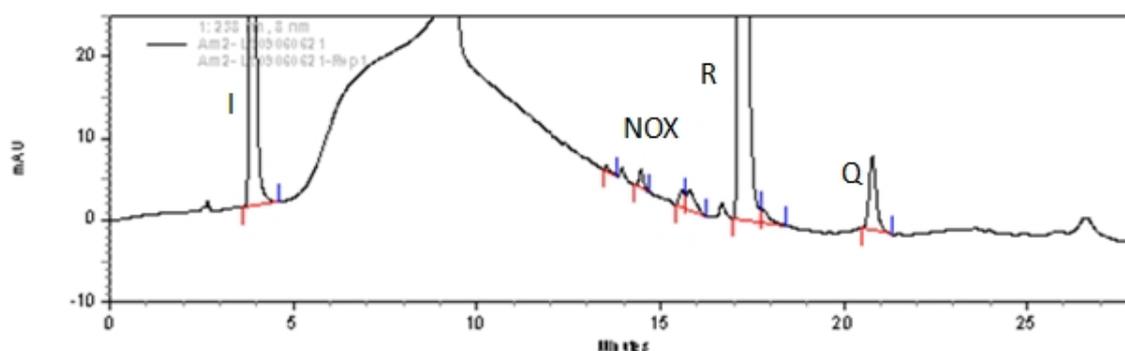


Figura 13: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C3

Nesta condição, procurou-se diminuir a concentração de solvente orgânico no interior da coluna ao se alterar a composição da fase móvel B de 55% para 45% de acetonitrila. Alterou-se também a rampa do gradiente de eluição cromatográfico (conforme tabela 4 da sessão 4.2), de modo a ampliar de 3 minutos, conforme metodologia sugerida por Wollinger (2008), para 7 minutos, o tempo de saída de solvente orgânico (fase móvel B) na coluna. O tempo total da corrida cromatográfica se estendeu em mais 2 minutos nesta condição. Contudo, os picos continuaram co-eluído.

Foi avaliado então o desempenho da coluna ACE[®] nas mesmas condições descritas acima. O cromatograma dessa avaliação (Condição 4) pode ser visto na figura 14:

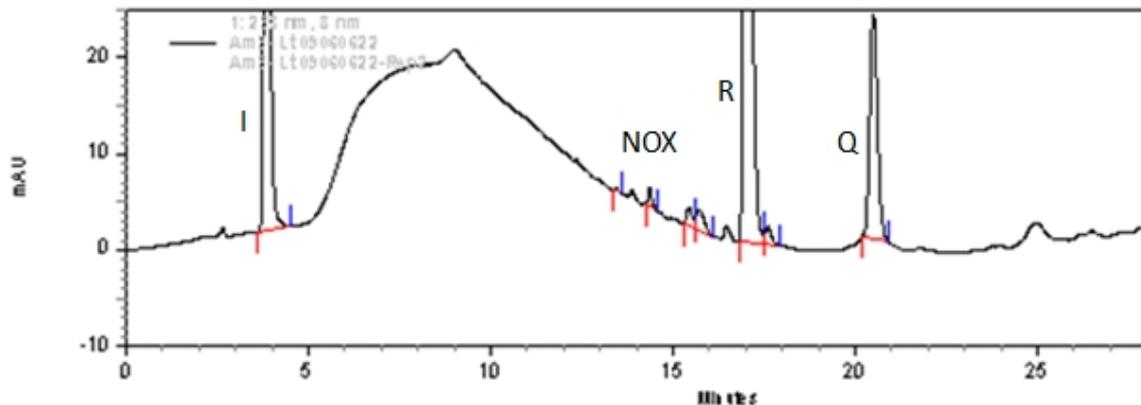


Figura 14: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C4

Nota-se a superioridade na eficiência da Coluna ACE 5[®] frente à coluna μ bondapack. A vantagem da ACE 5[®] é o tamanho de partícula (5 μ m contra 10 μ m da μ bondapak), além de possuir partículas esféricas e uma distribuição do tamanho de partículas mais estreita contra as partículas irregulares da μ Bondapack[®] o que permite uma melhor separação e obviamente uma melhor resolução entre os picos (ACE, 2013).

Contudo, uma nova avaliação foi feita a fim de se buscar uma melhor resolução entre os picos cromatográficos. A figura 15 ilustra essa nova avaliação, em que a rampa de gradiente de eluição foi alterada para se retardar ainda mais a entrada de solvente orgânico no sistema de CLAE e o fluxo foi aumentado de 1,5 mL/min para 2,0 mL/min, visando um tempo de análise mais curto.

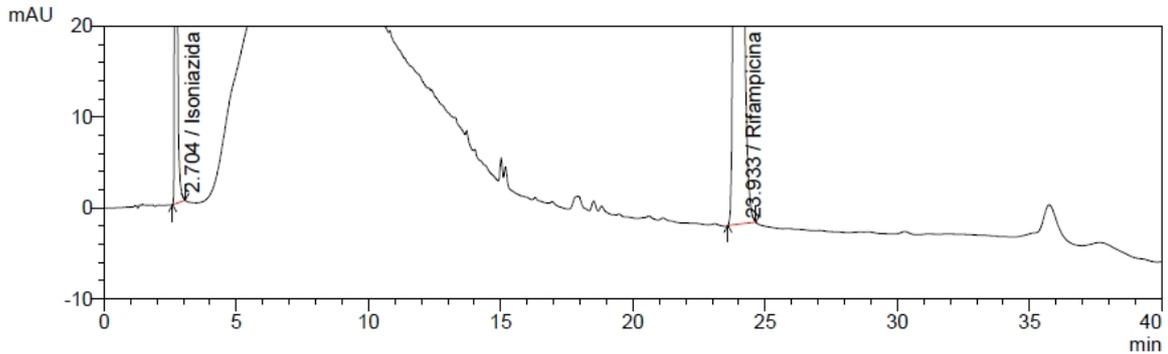


Figura 15: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C5

Fazendo uma avaliação da figura 15, vê-se que os picos em questão estão separados, porém não houve detecção dos demais picos de substâncias relacionadas. Alterações em rampas de gradientes de eluição são geralmente complicadas, pois ao se alterar a entrada de solvente orgânico, pode-se melhorar a resolução de uns picos em determinada região do cromatograma, mas prejudicar a de outros em outras regiões.

Assim, fez-se novamente uma alteração no gradiente de eluição de forma a estender para 25 minutos a rampa de gradiente de eluição em que a fase móvel A reduz de cerca de 30% para 15%, de forma a garantir que a concentração de solvente orgânico dentro da coluna cromatográfica aumente paulatinamente e seja tal que permita a eluição separadamente dos picos referentes às substâncias relacionadas e, conseqüentemente, houvesse uma maior resolução entre esses picos cromatográficos. A figura 16 ilustra essa alteração que foi chamada de C6, de acordo com a tabela 4.

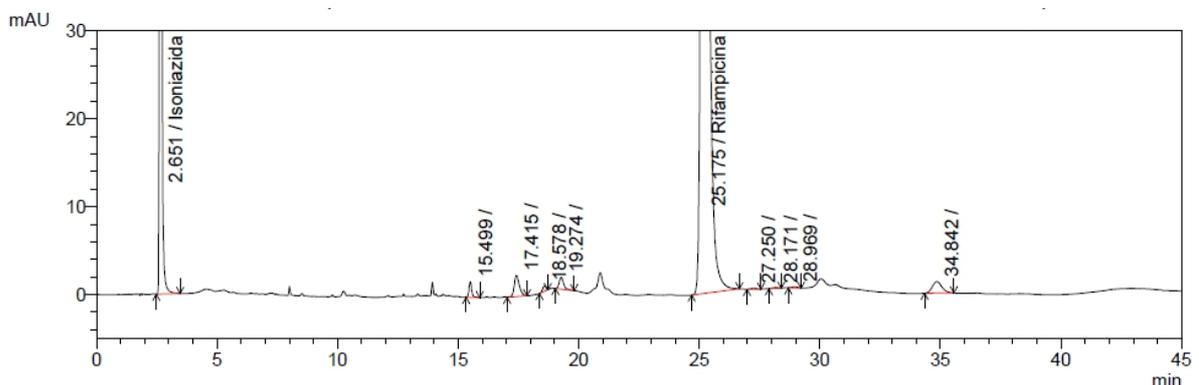


Figura 16: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina obtido utilizando gradiente de eluição de acordo com a condição C6

Ao analisar a figura 16, nota-se um visível aumento da resolução entre os picos de substâncias relacionadas nos tempos de retenção de 18,57 minutos e 19,27 minutos.

O tempo de análise, que era de 25 minutos, teve de ser estendido para 45 minutos, garantindo que todas as substâncias relacionadas já eluíram da coluna cromatográfica. Foram acrescentados 5 minutos para estabilização do sistema, de forma a permitir o equilíbrio do gradiente de eluição na coluna, preparando a mesma para a próxima corrida cromatográfica.

O aumento do tempo de análise não é desejado; entretanto, é melhor um tempo um pouco mais longo e a garantia de uma separação adequada que possibilite a qualidade do medicamento em questão.

Diante de todos os ensaios realizados obteve-se uma condição satisfatória com os seguintes parâmetros:

- Programação de gradiente de eluição (Tabela 10):

Tabela 10: Programação do gradiente de eluição final para CLAE

Tempo (min)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0	100	0
10	31	69
35	15	85
40	100	0
45	100	0

- Fase Móvel A: tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8 : acetonitrila (96:4)
- Fase Móvel B: tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8 : acetonitrila (55:45)
- Coluna: C18 ACE[®] (5) 250 x 4,6 mm; 5 µm
- Fluxo: 2,0 mL/min
- Tempo de análise: 45 minutos
- Volume de injeção: 20 µL

Os tempos de retenção da isoniazida e da rifampicina são de 3 e 25 minutos, respectivamente.

Os tempos de retenção das substâncias relacionadas, de acordo com a injeção padrão de cada uma delas, são de 15,5 minutos para rifampicina-N-óxido; 19,2 minutos para isonicotinil hidrazona; 30,7 minutos para a 3-formil-rifampicina e 35,7 minutos para rifampicina-quinona.

Assim, o próximo passo foi a validação da metodologia analítica que foi necessária para garantir a confiabilidade do método, discutida na sessão seguinte.

5.2. Validação da Metodologia Analítica utilizando CLAE

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados (RIBANI, *et. al.*, 2004).

Nesse sentido, uma adequação do delineamento analítico para conduzir os ensaios de validação deve ser feito, levando-se em consideração as limitações existentes na metodologia, no que diz respeito ao longo tempo de corrida cromatográfica e à pouca estabilidade do IFA rifampicina quando em solução.

O estudo de validação para metodologia otimizada para CLAE foi conduzido avaliando-se os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e Precisão intermediária) e exatidão, além dos parâmetros para avaliação de desempenho de sistema.

A escolha dos níveis de concentração avaliados no parâmetro linearidade foi baseada nos limites de especificação estabelecidos na análise de teor e de uniformidade de conteúdo apresentado na USP 34^a edição. A faixa de especificação para doseamento é de 90,0% a 110,0% (isto é, de 135,0 a 165,0 mg/comprimido de 150 mg) para isoniazida e 90,0 a 130,0% para rifampicina (isto é, de 270,0 a 390,0 mg/comprimido de 300 mg) (USP, 2011).

De acordo com os critérios de aceitação estabelecidos na USP 34^a edição para uniformidade de conteúdo, o percentual mínimo de isoniazida (caso 1) para que o produto seja aprovado é de aproximadamente 74% (111,0 mg/comprimido) e o percentual máximo é de aproximadamente 127% (190,5 mg/comprimido). Já para a rifampicina (caso 2), o percentual mínimo para que o produto seja aprovado é de também aproximadamente 74% (222,0 mg/comprimido), mas o percentual máximo é de aproximadamente 138% (414,0 mg/comprimido) (USP, 2011).

Portanto foi necessária a avaliação da linearidade em um intervalo que contemple todos esses pontos. Assim, foi estudada a linearidade do intervalo entre 50% e 150%, contemplando os pontos de 50% (30 µg/mL de isoniazida e 60 µg/mL de rifampicina), 70% (42 µg/mL de isoniazida e 84 µg/mL de rifampicina), 100% (60 µg/mL de isoniazida e 120 µg/mL de rifampicina) 130% (78 µg/mL de isoniazida e 156 µg/mL de rifampicina) e 150% (90 µg/mL de isoniazida e 180 µg/mL de rifampicina). A avaliação do parâmetro exatidão também é necessária nesses pontos do intervalo, mas principalmente nos níveis 90% (limite mínimo aceitável para análise de teor e de uniformidade de conteúdo para isoniazida e rifampicina), 100%, 110% e 130% (limites máximos aceitáveis para análise de teor e uniformidade de conteúdo para isoniazida e rifampicina, respectivamente).

O parâmetro linearidade foi avaliado fazendo-se triplicata de pesada para cada nível com duplicata de injeção para cada pesada. Devido ao longo tempo de corrida cromatográfica e também à baixa estabilidade da rifampicina em solução (fazendo com que a amostra fosse preparada minutos antes de cada injeção), um único nível de concentração foi executado em um dia de análise e seus resultados foram enquadrados nos parâmetros linearidade, exatidão e precisão intermediária. A cada dia de análise também foram preparadas e injetadas soluções de padrão 1 e 2 de isoniazida e de rifampicina para verificação do sistema e de todo o processo de preparo de amostras.

Nas sessões a seguir, encontram-se os resultados de cada parâmetro avaliado.

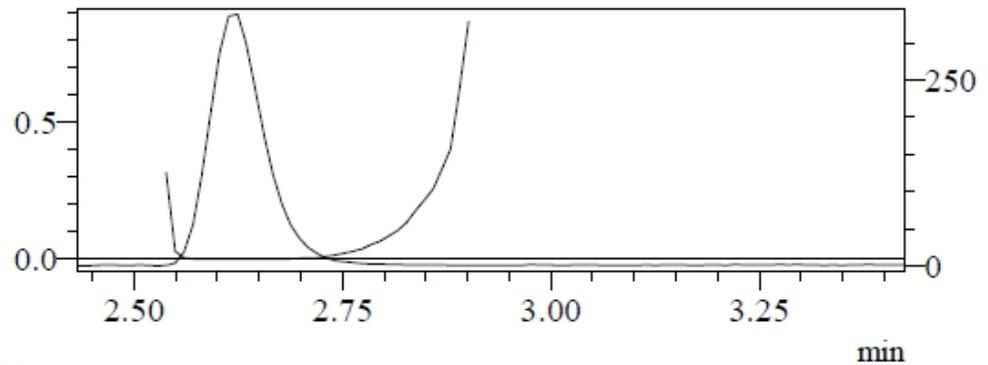
5.2.1. Seletividade

Por se tratar de um método cromatográfico, a especificidade foi demonstrada através dos placebos frente às amostras e também pelo uso do *software* LC Solution[®]. Os cromatogramas obtidos com o padrão e com o placebo contaminado demonstram a ausência de interferentes, sejam eles impurezas ou excipientes, na detecção das substâncias ativas. Nenhum pico desconhecido foi identificado no mesmo tempo de retenção da isoniazida, da rifampicina e de suas substâncias relacionadas conhecidas. Portanto, os picos referentes a isoniazida e rifampicina obtidos não são afetados pela presença destas substâncias.

A pureza média dos picos foi avaliada também pela construção de "*ratio*grams" através do *software* do equipamento, onde é plotada a razão entre as absorvâncias (que deve ser menor que 1) em 2 comprimentos de onda, em função do tempo de corrida. Este tipo de gráfico deve ter a forma retangular, mostrando que a razão é uma constante e evidenciando, assim, a pureza do pico (SNYDER *et al.*, 1997) como apresentado na Figura 17 e Figura 18 para isoniazida e rifampicina, respectivamente.

Purity

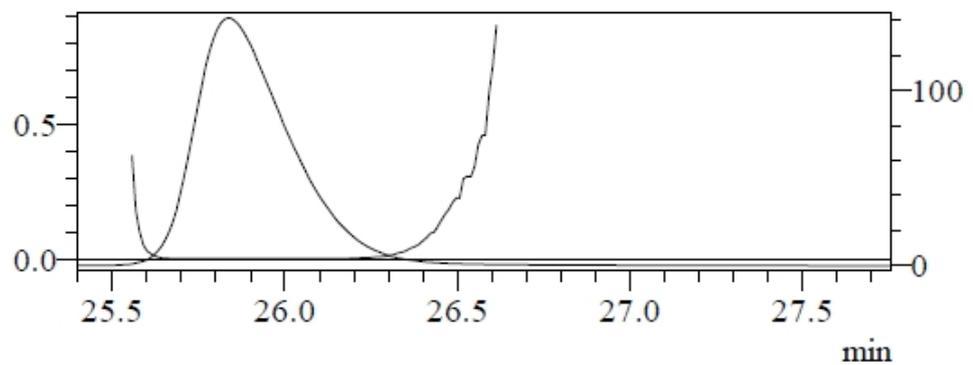
ID# : 1
Retention Time : 2.614
Compound Name : Isoniazida



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 0.999999
Single point threshold : 0.999946
Minimum peak purity index : 53

Figura 17: Pureza cromatográfica da isoniazida obtida pela razão cromatográfica

ID# : 2
Retention Time : 25.832
Compound Name : Rifampicina



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 0.999994
Single point threshold : 0.999914
Minimum peak purity index : 80

Figura 18: Pureza cromatográfica da rifampicina obtida pela razão cromatográfica

Pela análise espectral, acredita-se que a pureza foi comprovada, pois nota-se um "*ratioqram*" retangular com razão constante e menor que 1 (*peak purity index*) para ambos os ativos, no caso 0,999999 para isoniazida e 0,999946 para rifampicina, mas maior que o ruído (*Treshold*) 0,999946 para isoniazida e 0,999914 para rifampicina. Dessa forma, de acordo com os critérios descritos na legislação brasileira vigente, a metodologia é considerada específica para isoniazida e rifampicina (BRASIL, 2003).

Os resultados obtidos para os fármacos também foram observados para as substâncias relacionadas analisadas (em uma validação posterior da metodologia própria para substâncias relacionadas). Assim, o método foi considerado seletivo.

5.2.2. Linearidade

A curva de linearidade foi construída usando-se triplicata de pesada para cada nível e duplicata de injeção para cada pesada. As áreas para o IFA isoniazida e rifampicina obtidas em cada cromatograma para cada triplicata de cada nível estudado estão apresentadas na tabela 11 e 12, respectivamente.

Tabela 11: Áreas obtidas para isoniazida na avaliação da linearidade

Concentração (µg/mL)	Área (a.u.)
0	0
10	1000
20	2000
30	3000
40	4000
50	5000
60	6000
70	7000
80	8000
90	9000
100	10000
120	12000
140	14000
160	16000
180	18000
200	20000
220	22000
240	24000
260	26000
280	28000
300	30000
320	32000
340	34000
360	36000
380	38000
400	40000
420	42000
440	44000
460	46000
480	48000
500	50000
520	52000
540	54000
560	56000
580	58000
600	60000
620	62000
640	64000
660	66000
680	68000
700	70000
720	72000
740	74000
760	76000
780	78000
800	80000
820	82000
840	84000
860	86000
880	88000
900	90000
920	92000
940	94000
960	96000
980	98000
1000	100000

Tabela 12: Áreas obtidas para rifampicina na avaliação da linearidade

Concentração (µg/mL)	Área (a.u.)
0	0
10	1000
20	2000
30	3000
40	4000
50	5000
60	6000
70	7000
80	8000
90	9000
100	10000
120	12000
140	14000
160	16000
180	18000
200	20000
220	22000
240	24000
260	26000
280	28000
300	30000
320	32000
340	34000
360	36000
380	38000
400	40000
420	42000
440	44000
460	46000
480	48000
500	50000
520	52000
540	54000
560	56000
580	58000
600	60000
620	62000
640	64000
660	66000
680	68000
700	70000
720	72000
740	74000
760	76000
780	78000
800	80000
820	82000
840	84000
860	86000
880	88000
900	90000
920	92000
940	94000
960	96000
980	98000
1000	100000

Os gráficos de isoniazida e rifampicina, assim como seus respectivos valores de R^2 e equações da reta, são apresentados a seguir nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

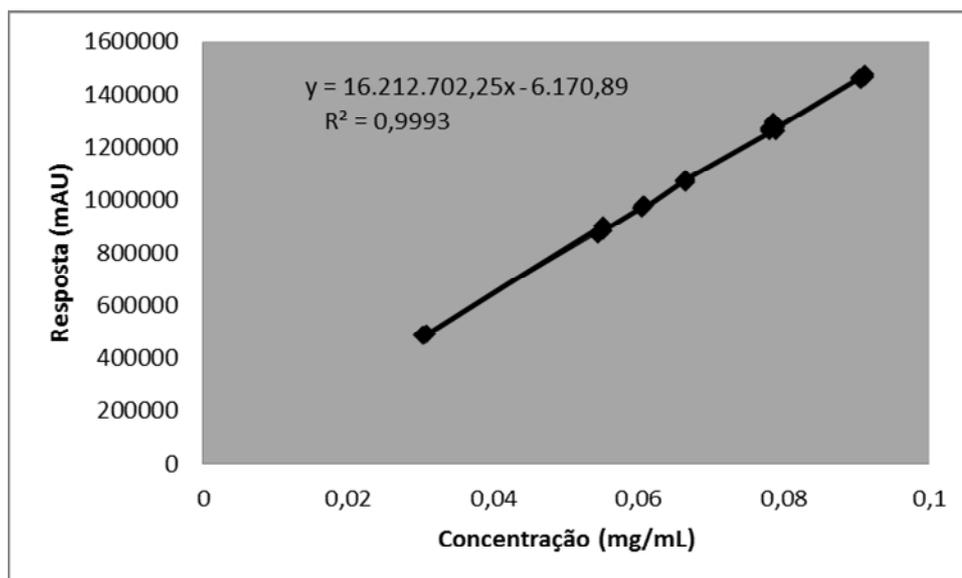


Gráfico 1: Curva de linearidade para isoniazida elaborada a partir dos dados relacionados na Tabela 11

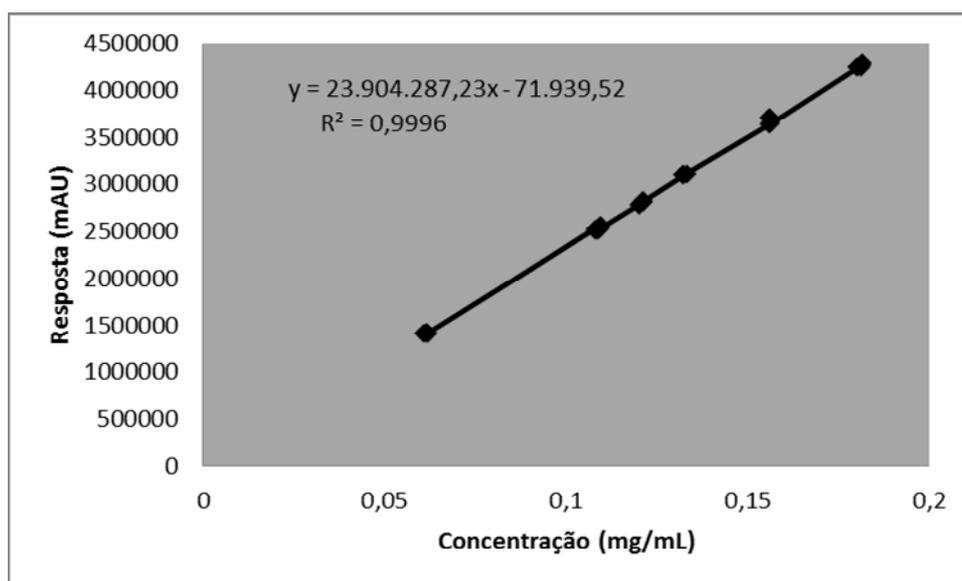


Gráfico 2: Curva de linearidade para rifampicina elaborada a partir dos dados relacionados na Tabela 12

A equação da reta para a isoniazida é $y = 16212702,25x - 6170,89$ e o coeficiente de determinação (R^2) é 0,9993. A equação da reta para a rifampicina é $y = 23904287,23x - 71939,52$ e o seu coeficiente de determinação é 0,9996. As curvas apresentam uma boa adequação aos dados.

O coeficiente de correlação (r) é obtido extraíndo-se a raiz do valor de R^2 expressa no gráfico, sendo este valor de 0,9996 para isoniazida e 0,9998 para rifampicina. O coeficiente de correlação (r) expressa a relação entre as duas matrizes na curva (x e y) e estes valores estão compreendidos entre -1 e +1, sendo os valores ideais os mais próximos de +1 (BRASIL, 2003).

Os valores de correlação obtidos para isoniazida e rifampicina atendem ao critério mínimo aceitável preconizado em legislação brasileira vigente ($r > 0,99$) e a metodologia demonstra linearidade definida para o intervalo de concentração avaliado para isoniazida e rifampicina (BRASIL, 2003).

Com o objetivo de determinar a significância do coeficiente angular do modelo de equação da reta ($y = ax + b \rightarrow a \neq 0$), foi feita a análise de variância da regressão (ANOVA) e seus dados estão apresentados na tabela 13 para isoniazida e 14 para rifampicina:

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) para isoniazida

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	3,38689E+12	3,39E+12	49050,44	2,6439E-55
Resíduo	34	2347668559	69049075		
Total	35	3,38924E+12			

gl: graus de liberdade; *SQ* = Soma quadrática; *MQ* = média quadrática; *F* = *F* calculado;

Tabela 14: Análise de variância (ANOVA) para rifampicina

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	2,90077E+13	2,90077E+13	93011,28	5,01672E-60
Resíduo	34	10603690141	311873239,4		
Total	35	2,90183E+13			

gl: graus de liberdade; *SQ* = Soma quadrática; *MQ* = média quadrática; *F* = *F* calculado;

De acordo com os dados expressos nas tabelas acima, ficou demonstrado que o coeficiente angular das regressões é significativamente diferente de zero.

Foi verificada a homocedasticidade do método, isto é, que as respostas (áreas) são independentes da variância da concentração do analito, através do método de Cochran.

Dessa forma, por meio da equação apresentada abaixo, podemos dizer que o método é homocedástico, uma vez que o C calculado (0,463 para isoniazida e 0,487 para rifampicina) é menor que o C tabelado ou crítico (0,616), para um valor de significância de 5%. A maior variância encontrada foi de $1,025 \times 10^{-6}$ para isoniazida e $2,101 \times 10^{-6}$ para rifampicina, respectivamente.

$$C_{calc.} = \frac{S^2_{maior}}{\sum S^2 j} \quad (\text{Equação 3})$$

onde: S^2_{maior} : maior variância
 $\sum S^2 j$: somatório das variâncias

5.2.3. Precisão

A precisão foi estudada avaliando-se a repetibilidade e a precisão intermediária, sendo esta avaliada variando-se o dia de análise e o analista.

5.2.3.1. Repetibilidade

Os resultados da repetibilidade são demonstrados nas tabelas 15 e 16.

O Desvio Padrão Relativo das nove determinações nos três níveis é de 0,73 e 0,74 % para determinações de isoniazida e rifampicina, respectivamente.

Portanto, esses valores encontram-se inferiores ao determinado pela legislação vigente brasileira que é de até 5,0%. Assim, o método é considerado preciso para os dois fármacos presentes na formulação avaliada (BRASIL, 2003).

5.2.3.2. Precisão intermediária

Os resultados da Precisão intermediária para os IFAs isoniazida e rifampicina são demonstrados nas tabelas 17 e 18, respectivamente.

O Desvio Padrão Relativo de todos os resultados obtidos pelo analista B é de 0,86 e 0,80 % para determinações de isoniazida e rifampicina, respectivamente. E o desvio padrão relativo entre as determinações obtidas pelos analistas A e B é de 0,78 % para a isoniazida e de 0,97 % para a rifampicina.

Portanto, os valores de precisão intermediária do analista B encontram-se inferiores ao preconizado na legislação brasileira que é de até 5,0%. Dessa forma os valores entre os analistas também encontram-se bem abaixo de 5,0% verificando-se a precisão intermediária do método (BRASIL, 2003).

5.2.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada realizando 9 determinações em três concentrações diferentes (90%, 100% e 110% para isoniazida e 90%, 100% e 130% para rifampicina), utilizando os dados obtidos na linearidade.

Ao analisar os valores obtidos nas tabelas 17 e 18 verifica-se que os valores de recuperação obtidos encontram-se dentro da faixa estabelecida por legislação vigente (98,0 a 102,0%), obtendo-se médias de 100,47 e 101,01 % para isoniazida e rifampicina, respectivamente, e com DPRs 0,73 e 0,74, inferiores a 5,0% para ambos os ativos, sendo assim considerados satisfatórios (BRASIL, 2003).

5.2.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os resultados para os limites inferiores de quantificação e de detecção estão apresentados na Tabela 19 e foram calculados com base em todas as curvas padrão preparadas para o teste de linearidade.

Tabela 19: Resultado dos limites de quantificação e detecção obtidos a partir das curvas analíticas.

Fármacos	LQ (mg/mL)	Área teórica LQ	LD (mg/mL)	Área teórica LD
Isoniazida	0,0039	57199,4	0,0013	6407,4
Rifampicina	0,0055	59281,9	0,0018	13390,1

5.2.6. Verificações de desempenho de sistema

A verificação de adequação do sistema é chamado no inglês de *System Suitability* e tem a função de verificar a sensibilidade da detecção, resolução e reprodutibilidade do sistema cromatográfico adequado à análise em questão (USP, 2011). Os parâmetros verificados durante o período de validação foram número de pratos teóricos, fator de cauda e resolução. Todos os parâmetros de avaliação foram calculados usando método proposto na USP 34^a edição (USP, 2011).

Os valores médios de pratos teóricos para isoniazida e rifampicina são: 17687 e 116670 respectivamente. Os valores médios de fator de cauda para isoniazida e rifampicina são de 1,4 e 1,6 respectivamente. E o valor médio de resolução para isoniazida e rifampicina é 58,8. De acordo com os resultados a adequação do sistema foi considerada satisfatória.

5.2.7. Robustez

A avaliação para o teste de desempenho de robustez não foi explorada, devido às condições analíticas serem extremamente sensíveis a qualquer variação mínima pretendida.

A variação da concentração de íons e pH pode gerar a ionização parcial da isoniazida, com conseqüente deformação de seu pico.

A variação da concentração de solvente orgânico, acetonitrila, pode proporcionar variações nos tempos de retenção e, conseqüentemente, variações de área.

A substituição de colunas do tipo “*endcapped*” por outra coluna de fase reversa, pode causar deformidade dos picos referentes aos IFAs, gerando variações de tempo de retenção e áreas. (RIBANI *et. al.* 2004).

A alteração de fluxo não pode ser efetuada devido à programação do gradiente de eluição, onde qualquer desproporcionalidade na composição da fase móvel, no tempo determinado, pode acarretar nos mesmos efeitos citados acima.

Portanto, com as variáveis previamente estudadas e justificadas, concluiu-se não ser adequado executar os testes e, assim, considerar o método como não sendo robusto. Com isto, os parâmetros analíticos estabelecidos nesta metodologia devem ser seguidos rigorosamente.

5.3. Estudo de estabilidade

O estudo de estabilidade de longa e acelerada durações foi realizado com a metodologia desenvolvida e validada para teor e substâncias relacionadas utilizando a técnica de CLAE. As amostras foram comprimidos revestidos de FDCs contendo isoniazida + rifampicina (150 + 300) mg fabricados por laboratório farmacêutico oficial e destinado ao atendimento na rede nacional de saúde pública. Um resumo com os principais ensaios pode ser visto na tabela 20:

Tabela 20: Resultados obtidos em análises de estudo de estabilidade de comprimidos revestidos de FDC de isoniazida + rifampicina (150 + 300) mg

Lote	Tempo (meses)	Isoniazida (mg)		Rifampicina (mg)		pH	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Observações
		Q1	Q2	Q1	Q2				
01	0	150	150	300	300	7,0	25	60	
	3	148	148	298	298	7,0	25	60	
	6	146	146	296	296	7,0	25	60	
	9	144	144	294	294	7,0	25	60	
	12	142	142	292	292	7,0	25	60	
	15	140	140	290	290	7,0	25	60	
	18	138	138	288	288	7,0	25	60	
	21	136	136	286	286	7,0	25	60	
	24	134	134	284	284	7,0	25	60	
	27	132	132	282	282	7,0	25	60	
	30	130	130	280	280	7,0	25	60	
	33	128	128	278	278	7,0	25	60	

Ao analisar a tabela 20, observa-se que a metodologia desenvolvida e validada utilizando a técnica de CLAE foi capaz de detectar todos os picos referentes às substâncias relacionadas conhecidas e também de detectar o surgimento de demais picos de substâncias relacionadas desconhecidas originados graças ao tempo de estufa durante o tempo de estabilidade.

Os gráficos 3 e 4 ilustram o comportamento do teor de comprimidos revestidos de isoniazida e rifampicina (150 + 300) mg ao longo do estudo de estabilidade longa e acelerada duração, respectivamente.

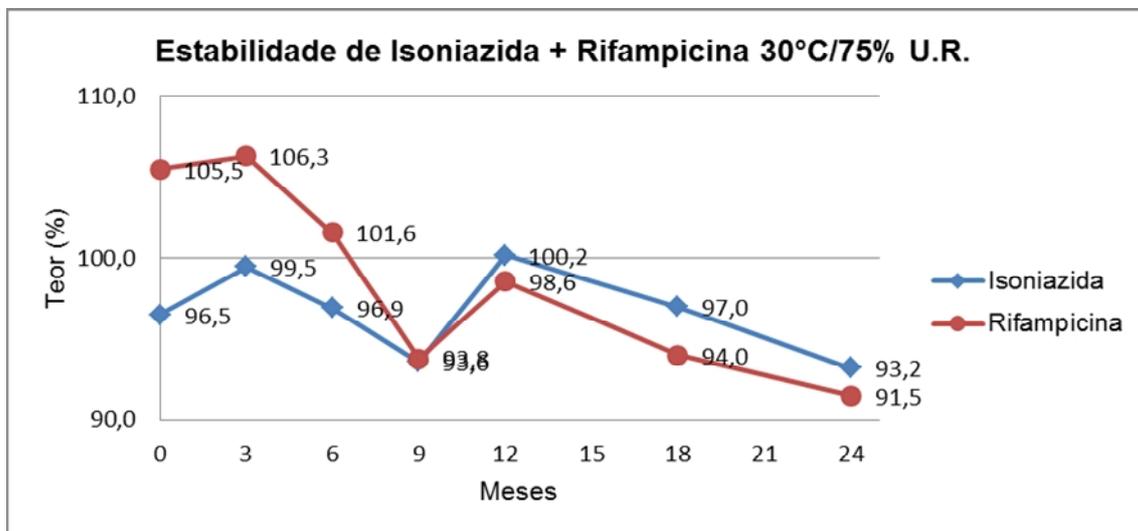


Gráfico 3: Comportamento de teor de isoniazida e rifampicina durante o estudo de estabilidade de longa duração

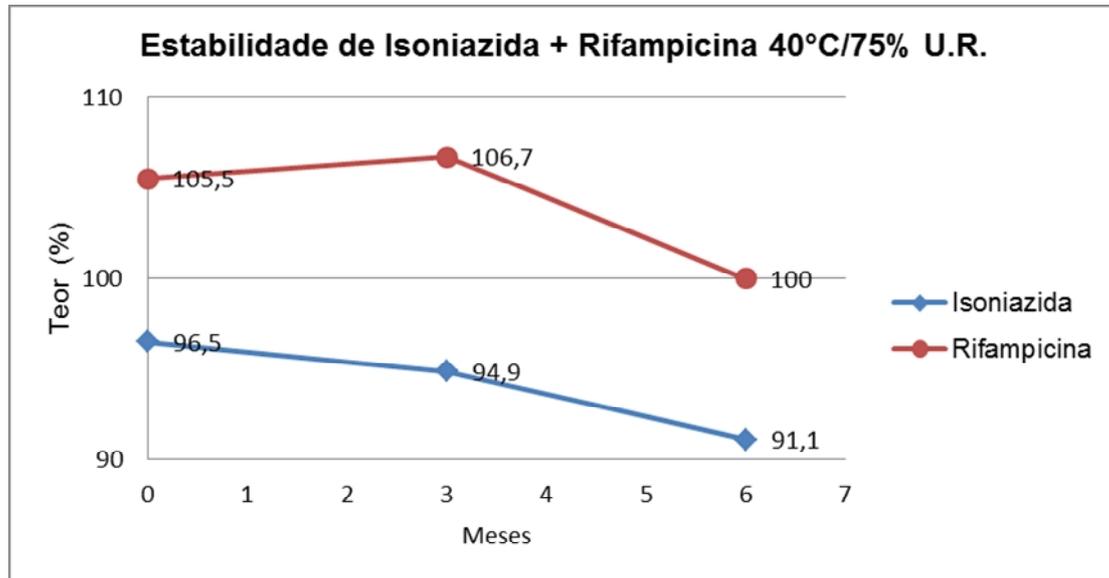


Gráfico 4: Comportamento de teor de isoniazida e rifampicina durante o estudo de estabilidade duração acelerada

Como pode ser visto, a formulação em questão foi aprovada no estudo de estabilidade de longa e acelerada duração. De acordo com o estudo, o prazo de validade para a formulação é de 24 meses.

Esses resultados confirmam que a metodologia aqui proposta, por CLAE, é adequada à análise de teor e substâncias relacionadas de isoniazida e rifampicina até mesmo na presença dos excipientes contidos na formulação desenvolvida. Tal fato é relevante, pois como mencionado anteriormente, nem sempre uma metodologia se aplica a todas as formulações farmacêuticas existentes, uma vez que diferentes excipientes podem ser impactantes durante uma análise, podendo provocar interferências e gerar resultados falso-positivos.

5.4. Migração da metodologia analítica de CLAE para CLUE

A transferência da metodologia analítica desenvolvida e validada em CLAE para CLUE foi necessária para, sobretudo, reduzir o elevado tempo de corrida cromatográfica sem prejudicar a resolução entre picos.

A alternativa mais simples para diminuir o tempo de análise, sem a necessidade de transferir a metodologia para CLUE, seria o uso de colunas mais curtas associadas a fluxos mais elevados de fase móvel em CLAE (MALDANER e JARDIM, 2009). Contudo, isso reduziria a resolução, uma vez que o número de pratos teóricos diminuiria com a redução do tamanho da coluna, sobrecarregaria o sistema de bombeamento de CLAE e poderia danificar o empacotamento da coluna ao se aumentar o fluxo. Portanto, a transferência para análises em CLUE foi extremamente necessária para solucionar essa questão.

Segundo Guillaume e colaboradores (2008), a transferência de um método de CLAE já desenvolvido para CLUE é totalmente possível, desde que determinados fatores sejam considerados. Ainda segundo eles, para a transferência de um método de separação no qual foi empregada eluição por gradiente ser eficiente, a fase estacionária empregada deve ser similar à usada no método já existente e as composições inicial e final do gradiente de eluição devem permanecer constantes.

Assim, com o objetivo de interferir o mínimo possível na metodologia já otimizada para CLAE, foram preservadas, inicialmente, a composição das fases móveis e o preparo de soluções amostras e de solução padrão.

A coluna testada foi a Waters Acquity[®] C18 5 cm x 2,1 mm - 3 µm desenvolvida especialmente para análises que utilizam a técnica de CLUE. Colunas cujo material de recheio possui partículas com tamanhos menores que 2 µm minimizam o efeito do aquecimento dos solventes da fase móvel, que ocorre quando grandes pressões são utilizadas. Este aquecimento pode provocar um gradiente de temperatura ao longo da corrida cromatográfica, gerando um fluxo de fase móvel não uniforme, o que pode prejudicar as separações tornando-as irreprodutíveis (MALDANER e JARDIM, 2009).

O fluxo das fases móveis bombeadas no sistema foi ajustado de acordo com a pressão máxima especificada para CLUE e também de acordo com o tamanho da coluna cromatográfica empregada. Assim, ele ficou ajustado inicialmente para 0,4 mL/min.

O volume de injeção foi sugerido pelo *software* Acquity® para 5 µL. De acordo com Nováková e colaboradores (2006), o volume de injeção de amostra deve ser reduzido para evitar o espalhamento da amostra e, conseqüentemente, o alargamento do pico cromatográfico. Ainda segundo eles, seria necessário também um ciclo rápido para a injeção da amostra para se obter o máximo de aproveitamento da velocidade oferecida pelo CLUE, uma vez que é requerida a separação de uma grande quantidade de compostos por unidade de tempo.

O primeiro gradiente de eluição das fases móveis bombeadas pelo sistema foi feito de acordo com o sugerido pelo *software* Acquity® do sistema de CLUE. Visando uma maior resolução entre os picos cromatográficos, procurou-se respeitar também a concentração de solvente orgânico dentro da coluna cromatográfica durante a eluição dos picos cromatográficos (referentes aos IFAs isoniazida e rifampicina e também a suas substâncias relacionadas) que foi proposta na metodologia otimizada para CLAE. Dessa forma o primeiro gradiente de eluição testado ficou de acordo com a tabela 21 abaixo.

Tabela 21: Gradiente de eluição proposto para a condição C1 em CLUE

Minutos	Concentração	
	A (%)	B (%)
0	100	0
2,0	31	69
7,0	15	85
8,0	100	0
11,0	100	0

O cromatograma referente às condições descritas acima está apresentado na Figura 19:

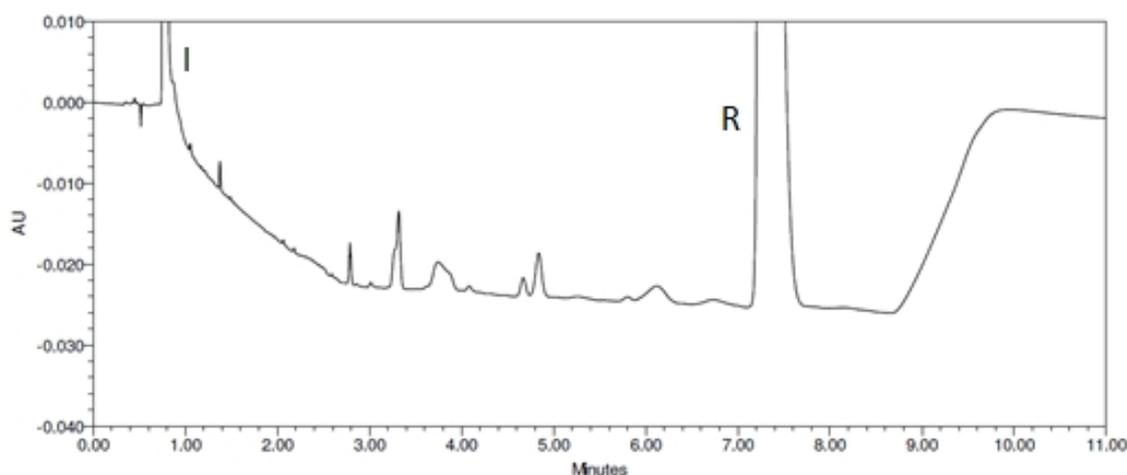


Figura 19: Cromatograma referente a uma amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE (condição C1)

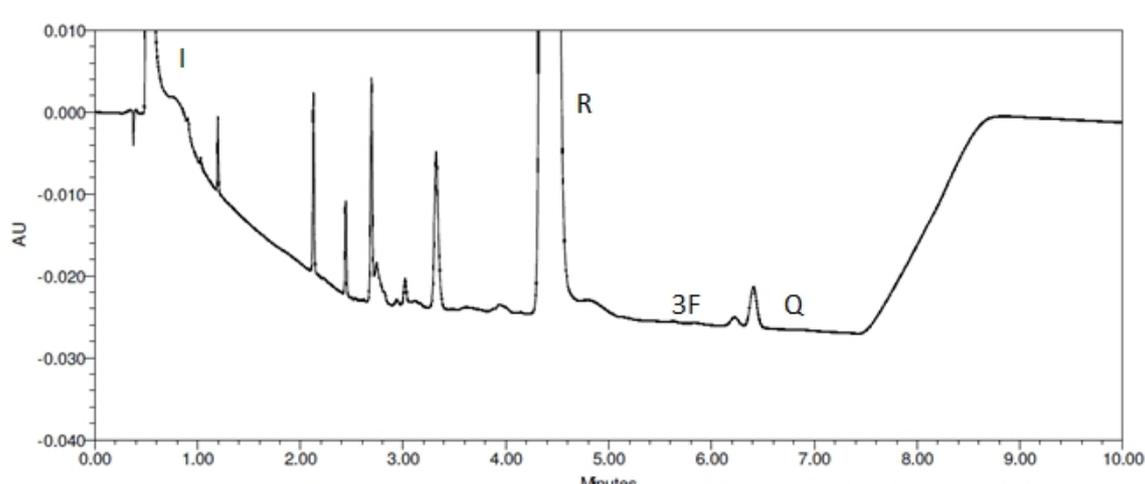
Nas condições descritas acima, o tempo de corrida cromatográfica ficaria em 11 minutos e não houve o aparecimento dos picos cromatográficos das substâncias relacionadas 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona (que ocorreria após a eluição do pico da rifampicina). A assimetria dos picos cromatográficos referentes as outras substâncias relacionadas desconhecidas também não foi considerada satisfatória.

Na condição 2 procurou-se aumentar o fluxo visando um menor tempo de corrida cromatográfica, mas com a preocupação de não aumentar a pressão no interior da coluna e de não alterar a composição de componente orgânico no momento da eluição dos picos cromatográficos de interesse. Portanto, o fluxo passou de 0,4 mL/min para 0,6 mL/min. Além disso, de forma a ocorrer a eluição dos picos cromatográficos da 3-formil-rifampicina e da rifampicina-quinona, o gradiente de eluição foi alterado. Assim, o gradiente de eluição proposto para condição 2 foi o seguinte (Tabela 22):

Tabela 22: Gradiente de eluição proposto para a condição C2 em CLUE

Tempo (Min)	Fluxo (mL/min)	Composição das Fases Móveis	
		A (%)	B (%)
0	0,6	100	0
0,8	0,6	31	69
3,2	0,6	15	85
3,3	0,6	0	100
6,5	0,6	100	0

O cromatograma que demonstra essa condição é apresentado na Figura 20:

**Figura 20:** Cromatograma referente a uma amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE (condição C2)

Nota-se que nesta condição há a eluição dos picos 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona porém, a resolução entre esses picos não foi considerada satisfatória.

Portanto, visando uma melhor resolução entre os picos referentes à 3-formil-rifampicina e à rifampicina-quinona, a coluna C18 ACE Excel[®] 2 µm 100 x 2,1 mm foi testada. A figura 21 mostra uma corrida cromatográfica utilizando a coluna ACE[®] e o gradiente de eluição foi o mesmo descrito na condição 2.

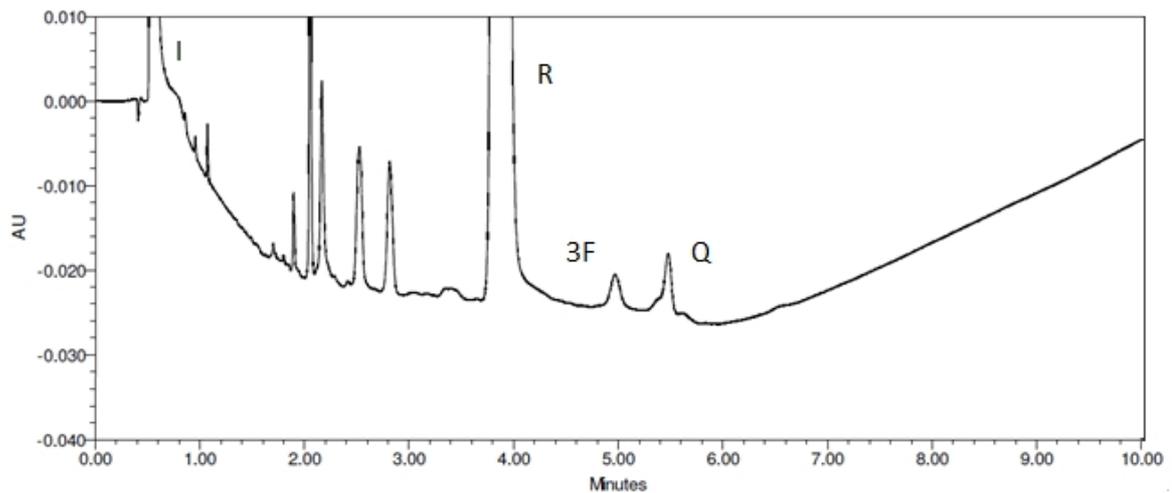


Figura 21: Cromatograma referente a uma amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE utilizando uma coluna ACE[®] (condição C3)

Nota-se que a coluna ACE[®] foi capaz de melhorar a assimetria entre os picos das substâncias relacionadas e melhorar a resolução dos picos de 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona. Sugere-se que isso é devido ao seu empacotamento ter uma distribuição de tamanho de partículas mais estreita, isto é, seu empacotamento é mais reprodutível, de modo a gerar um leito cromatográfico mais homogêneo e eficiente (ACE, 2013).

As figuras 22 e 23 mostram uma corrida cromatográfica de uma solução de padrão de 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona, utilizando a coluna Acquity[®] e ACE[®] respectivamente, nas mesmas condições cromatográficas, de formar a melhor ilustrar a superioridade da eficiência da coluna ACE[®].

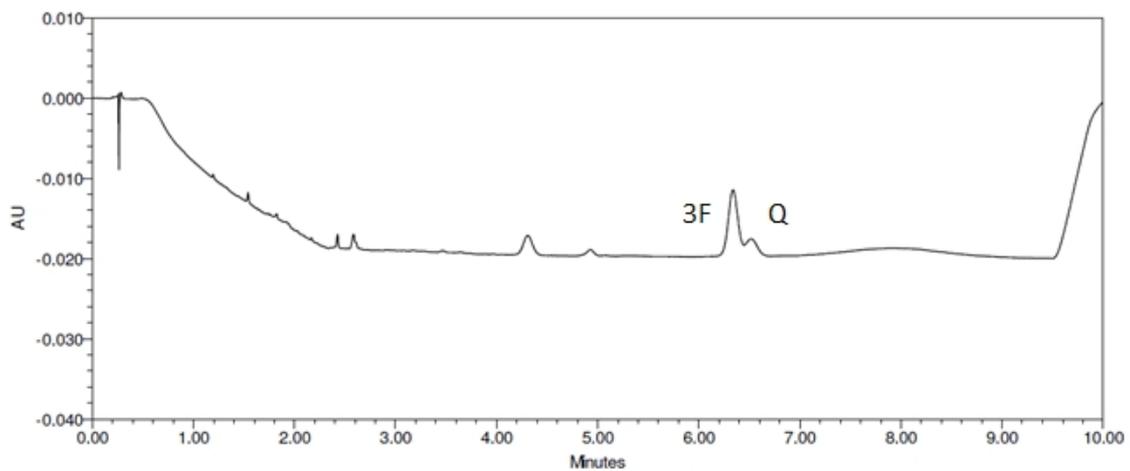


Figura 22: Cromatograma referente à solução de 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona em CLUE, utilizando uma coluna Acquity® (condição C3)

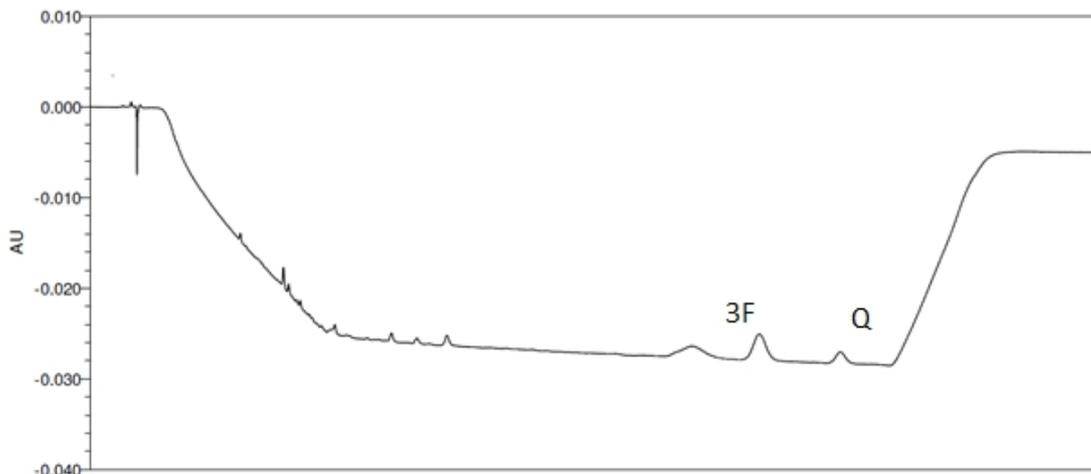


Figura 23: Cromatograma referente à solução de 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona em CLUE, utilizando uma coluna ACE® (condição C3).

Nesse ponto do trabalho temos as mesmas condições de análise entre a CLUE e a CLAE. Assim, algumas comparações são importantes. O tempo de corrida cromatográfica reduziu em 6 vezes, de 45 minutos para 7,5 minutos. O consumo total das fases móveis A e B para apenas uma corrida cromatográfica reduziu de 90 mL/corrída para apenas 4,5 mL/corrída, isto é, uma redução de 20 vezes. Portanto, a técnica de CLUE pode não só solucionar problemas frequentes de escassez de solventes orgânicos no mercado como também proporcionar uma economia de tempo e custo.

Em análises de FDCs de isoniazida + rifampicina utilizando a técnica de CLAE, em função da rápida degradação da rifampicina, as amostras são preparadas apenas no momento da injeção no cromatógrafo líquido. Tal fato impede que a análise seja automatizada e também que se analise mais de um lote de amostra por dia, uma vez que são necessárias mais de 8 horas para se realizar todas as corridas cromatográficas de um único lote, com triplicata de pesada e duplicata de injeções, além de injeções de diluente (para estabilizar o sistema) e injeções de solução de padrão 1 e padrão 2. Com a transferência de metodologia para CLUE, a análise de um lote demandaria pouco mais de 80 minutos, permitindo, dessa forma, a análise de mais de um lote em um mesmo dia.

Entretanto, uma tendência em análises usando essa técnica de cromatografia de ultra-eficiência é o uso de CLUE acoplado a um sistema de espectrometria de massas (EM) (CLUE-EM). No caso de análises de FDCs contendo rifampicina, essa técnica seria extremamente relevante, uma vez que possibilitaria a identificação de substâncias relacionadas até então desconhecidas. Porém, um entrave a essa técnica é o uso limitado de tipos de soluções tampão no equipamento de espectrômetro de massas.

Nesse sentido, considerando a faixa de pH ideal para a não ionização dos IFAs, foi testado o uso de tampão acetato de amônio 0,01 M (mesma concentração de sal da fase móvel constituída de tampão fosfato de sódio) na fase móvel e como diluente no preparo de amostra. O valor de pH do tampão acetato de amônio também foi avaliado. As figuras 24, 25 e 26 mostram cromatogramas dessa avaliação para os valores de 4,0; 5,5 e 6,0; respectivamente. A amostra utilizada foi preparada no dia anterior da corrida cromatográfica e, portanto, apresentava nítida degradação, com picos de substâncias relacionadas bem pronunciados.

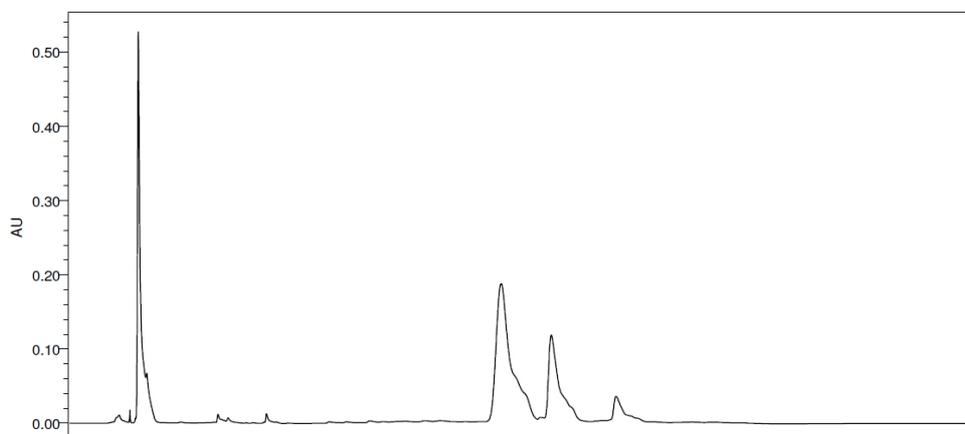


Figura 24: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina com fase móvel modificada com tampão acetato de amônio pH 4,0

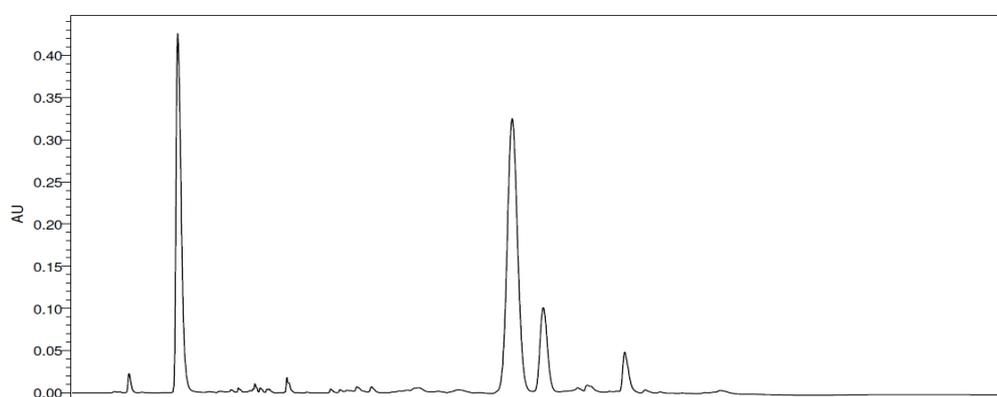


Figura 25: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina com fase móvel modificada com tampão acetato de amônio pH 5,5

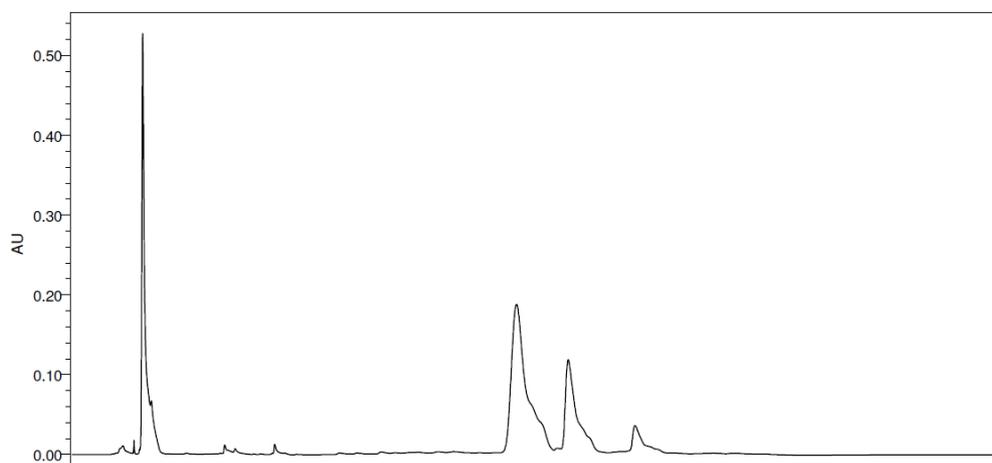


Figura 26: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina com fase móvel modificada com tampão acetato de amônio pH 6,0

As figuras acima ilustram que a faixa ideal de trabalho para a solução de acetato de amônio 0,01 M utilizada tanto na preparação das fases móveis quanto como diluente no preparo de amostras é de 5,5, já que as demais apresentaram deformações nos picos cromatográficos de interesse.

Ajustado o pH da fase móvel, foi feita uma nova solução de amostra conforme descrito no item 4.5.1.4. e realizada uma nova corrida cromatográfica.

A fase móvel A foi definida como sendo composta por 100% tampão acetato de amônio 0,01 M e não mais 96% tampão : 4% acetonitrila como definida na metodologia por CLAE, pois a proporção de acetonitrila foi ajustada pelo gradiente de eluição. A composição de fase móvel B foi definida como sendo tampão acetato : acetonitrila (60 : 40).

O primeiro gradiente de eluição avaliado utilizando tampão acetato de amônio 0,01 M pH 5,5 como constituinte da fase móvel e diluente está descrito na tabela 23. O fluxo de trabalho para essa nova fase móvel foi definido como sendo de 0,5 mL/min, de acordo com os valores de pressão do equipamento.

Tabela 23: Gradiente de eluição proposto para a Condição C4 em CLUE

Tempo (Min)	Composição das Fases Móveis	
	A (%)	B (%)
0,0	95	5
1,0	95	5
2,0	45	55
3,0	40	60
3,5	40	60
5,0	10	90
6,0	10	90
7,0	95	5

Os valores de percentual de fases móveis A e B apresentados na tabela 23 foram determinados calculando-se a equação da reta da rampa cromatográfica durante a eluição dos picos principais e das substâncias relacionadas e adaptados para as condições de CLUE.

Nesse gradiente de eluição, a corrida cromatográfica inicia-se com a composição de fase móvel A sendo de 95% de modo a garantir a entrada de solvente orgânico no início da corrida, visto que a composição de fase móvel A é integralmente de tampão acetato de amônio. Esse recurso também permitiu o atraso na eluição do pico referente a isoniazida, que acontecia no *front* do cromatograma nas condições anteriormente comentadas (Figura 18). Diversos eventos foram inseridos na programação do gradiente de eluição de forma a atrasar a entrada de fase móvel B (solvente orgânico) e ter uma melhor resolução entre os picos das substâncias relacionadas. A figura 27 mostra um cromatograma de amostra nas condições descritas acima.

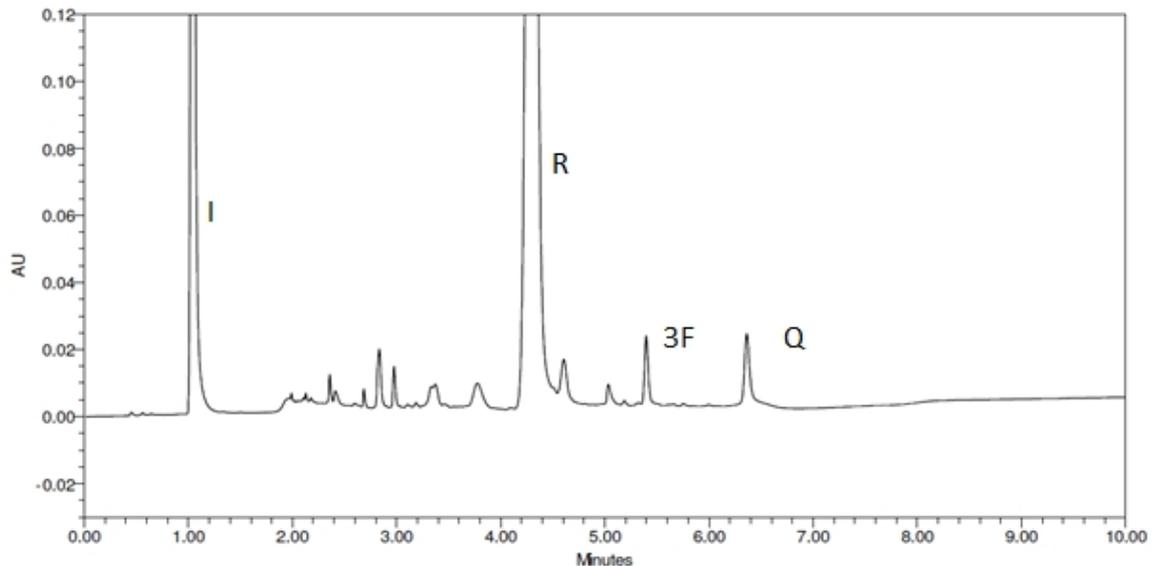


Figura 27: Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE (Condição C4)

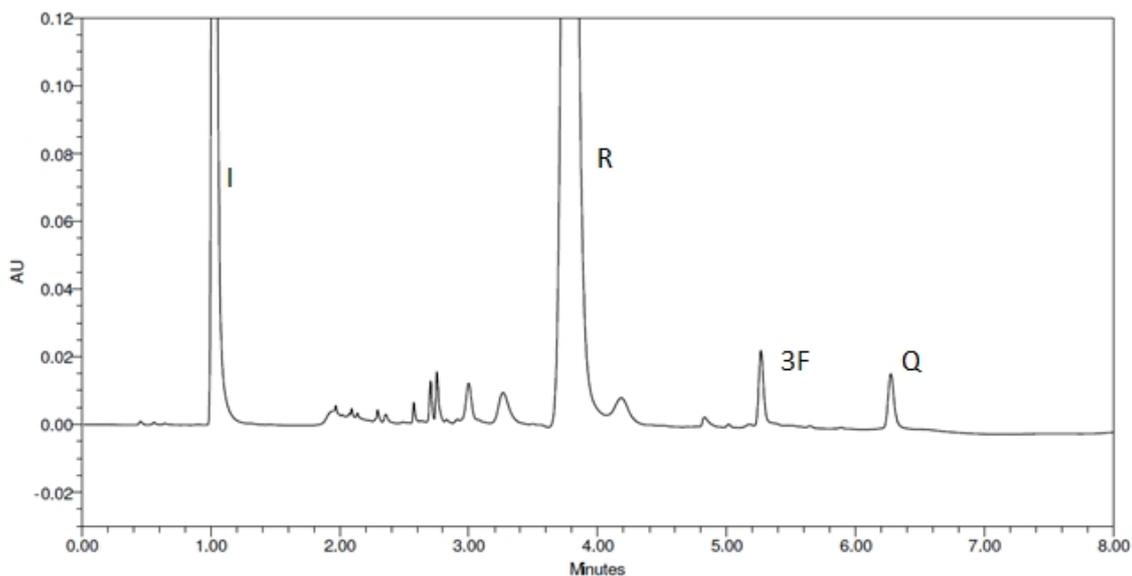
Observa-se que a resolução entre os picos rifampicina e o imediatamente posterior à sua eluição apresentam pouca resolução. Além disso, outros picos de substâncias relacionadas mostraram-se deformados.

Assim, uma nova condição foi avaliada alterando-se discretamente o gradiente de eluição. A nova condição é apresentada na tabela 24:

Tabela 24: Gradiente de eluição proposto para a Condição C5 em CLUE.

Tempo (Min)	Composição das Fases Móveis	
	A (%)	B (%)
0,0	95	5
1,0	95	5
2,0	38	62
3,5	38	62
5,0	10	90
6,0	10	90
7,0	95	5

Alterou-se discretamente a entrada de solvente orgânico (fase móvel B) no sistema durante os tempos de 2 a 3,5 minutos, pois é nessa faixa de tempo em que ocorre a eluição dos picos das substâncias relacionadas desconhecidas e da rifampicina. A figura 28 mostra o cromatograma nessa nova condição.

**Figura 28:** Cromatograma de amostra de isoniazida + rifampicina em CLUE (Condição C5)

Houve uma melhoria significativa na assimetria dos picos referentes às substâncias relacionadas desconhecidas e também na resolução entre os picos de rifampicina e o pico que elui imediatamente após a sua eluição. A figura 29 traz uma sobreposição dos cromatogramas, em que pode-se notar melhor a separação entre os picos. O cromatograma em preto é referente ao gradiente

de eluição final (condição C5) e o cromatograma em vermelho é referente à condição comentada anteriormente (condição C4).

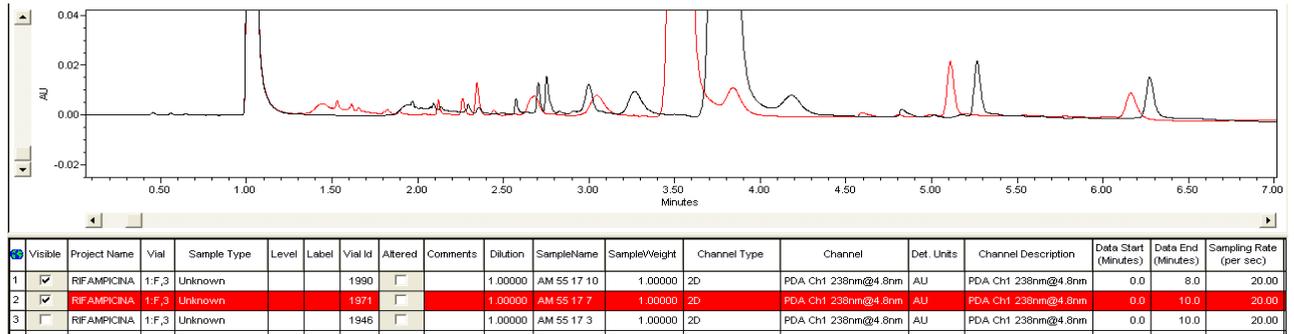


Figura 29: Sobreposição de cromatogramas nas condições C4 e C5.

Como houve alterações na marca da coluna e também no gradiente de eluição, foram injetadas também, nas mesmas condições acima descritas soluções de padrão de rifampicina-N-óxido, 3-formil-rifampicina e rifampicina-quinona. Essas injeções estão representadas nas figuras 30, 31 e 32, respectivamente.

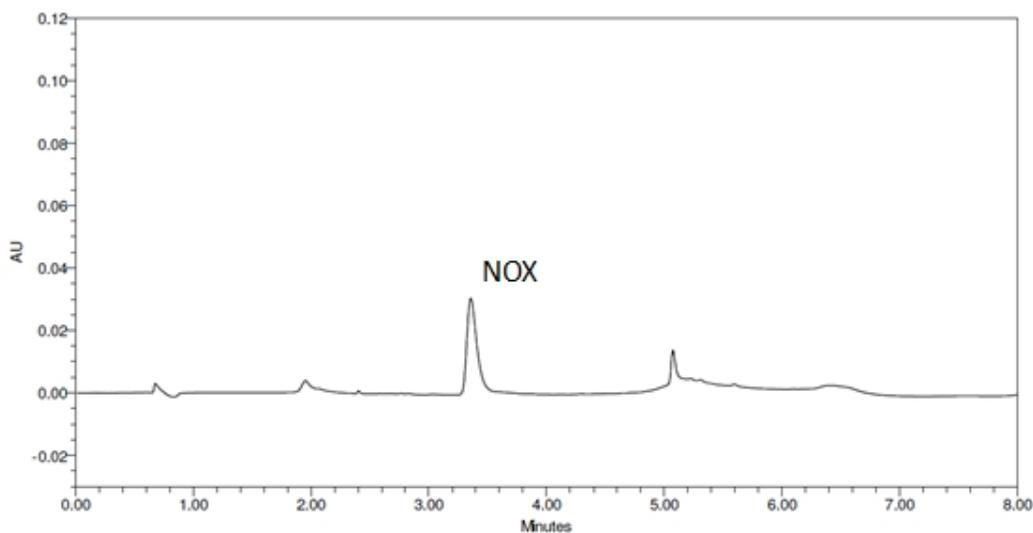


Figura 30: Cromatograma referente à solução padrão de rifampicina-N-óxido sob à condição C5

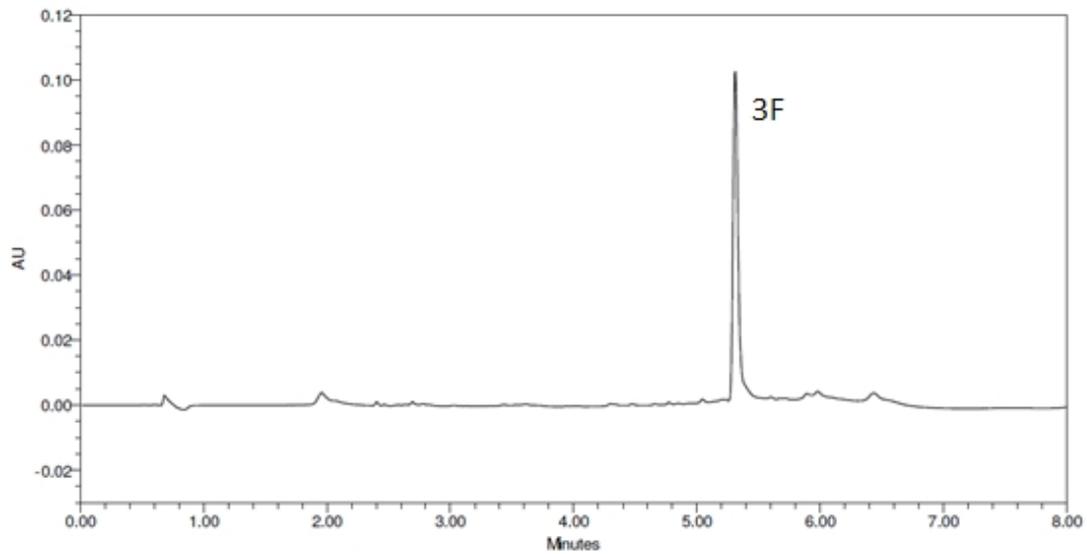


Figura 31: Cromatograma referente à solução padrão de 3-formil-rifampicina sob à condição C5

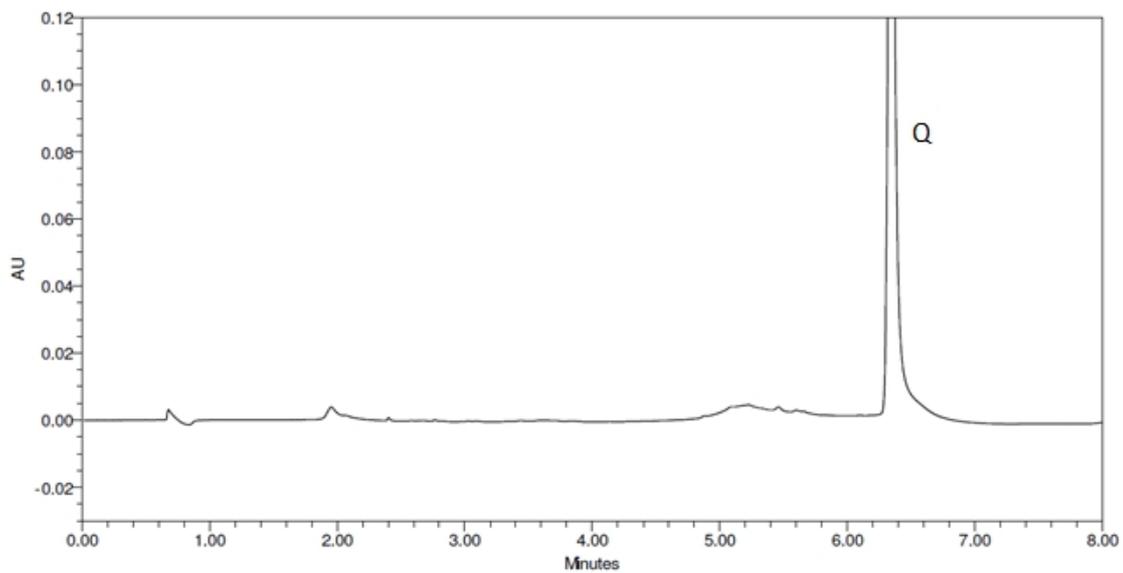


Figura 32: Cromatograma referente à solução padrão de rifampicina-quinona sob à condição C5

Desta forma, os parâmetros cromatográficos para metodologia desenvolvida para performance em CLUE foram os seguintes:

Coluna: ACE Excel[®] 2 C18

Comprimento de Onda: 238 nm

Fluxo: 0,5 mL/min

Volume de Injeção: 5,0 µL

Tempo de análise: 8,0 minutos

Tempo de retenção aproximado dos picos principais: 1,2 min (isoniazida) e 3,8 min (rifampicina).

Os tempos de retenção das substâncias relacionadas conhecidas são: 6,4 minutos para rifampicina-quinona, 5,3 minutos para 3-formil-rifampicina e 3,35 minutos para rifampicina-N-óxido.

Os resultados encontrados mostram que a análise por CLUE apresenta vantagens como tempo de análise, que passou a ser seis vezes mais rápida, implicando em uma diminuição significativa de solvente e eficiência.

Após a transferência, foi realizada a validação desta metodologia analítica proposta para CLUE que está discutida na sessão seguinte.

5.5. Validação da Metodologia Analítica por CLUE

5.5.1. Linearidade

A verificação da linearidade foi realizada através da construção da curva analítica, em que o eixo x corresponde à concentração de isoniazida ou de rifampicina na solução padrão e o eixo y corresponde à área obtida no cromatograma referente a uma determinada concentração.

A curva analítica foi construída fazendo-se triplicata de injeções de cada ponto de diluição. As áreas obtidas em cada replicata estão descritas nas tabelas 25 e 26.

Tabela 25: Áreas obtidas para isoniazida na avaliação da linearidade

Nível estudado (%)	Concentração estudada (mg/mL)	Concentração Teórica (mg/mL)	Área (mAU)	Média	DPR
50	0,030	0,030030	703002	702802	0,06
			703074		
			702331		
70	0,042	0,042042	987611	987713	0,03
			987447		
			988081		
100	0,060	0,060060	1425518	1423820	0,11
			1422481		
			1423462		
130	0,078	0,078078	1803524	1804398	0,06
			1804103		
			1805567		
150	0,090	0,090090	2105945	2107649	0,07
			2108075		
			2108927		

* A massa pesada de isoniazida para a solução mãe foi de 6,006 mg

Tabela 26: Áreas obtidas para rifampicina na avaliação da linearidade

Nível estudado (%)	Concentração estudada (mg/mL)	Concentração Teórica (mg/mL)	Área (mAU)	Média	DPR
50	0,060	0,063655	1754284	1755288	0,08
			1756789		
			1754790		
70	0,084	0,089117	2722486	2727259	0,17
			2727796		
			2731494		
100	0,120	0,127310	4143562	4128525	0,36
			4128349		
			4113664		
130	0,156	0,165503	5358340	5354748	0,20
			5342576		
			5363328		
150	0,180	0,190965	6332499	6334685	0,14
			6344168		
			6327387		

* A massa pesada de rifampicina para a solução mãe foi de 12,731 mg

As representações gráficas das curvas analíticas de isoniazida e rifampicina, assim como seus respectivos valores de R^2 e equação da reta, são apresentados nos gráficos 5 e 6, respectivamente.

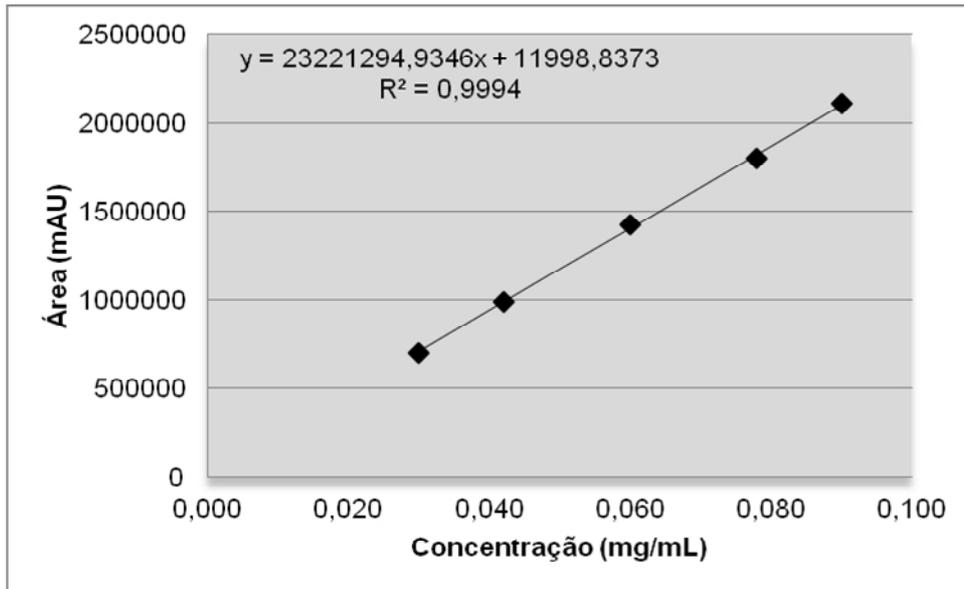


Gráfico 5: Curva de linearidade para isoniazida a partir dos dados obtidos na Tabela 25

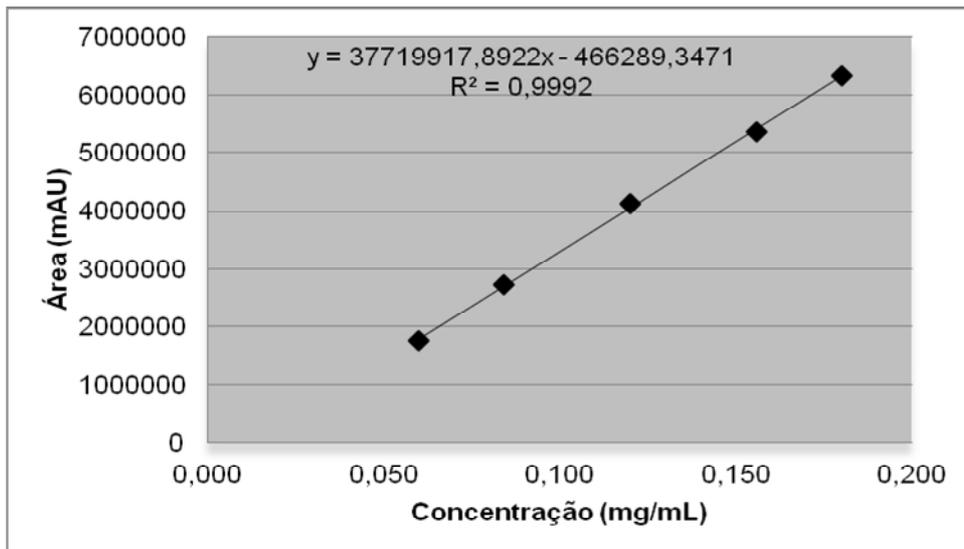


Gráfico 6: Curva de linearidade para rifampicina a partir dos dados obtidos na Tabela 26

A equação da reta para a isoniazida é $y = 23221294,9346x + 11998,8373$. O valor de R^2 , para a isoniazida foi de 0,9994.

A equação da reta para a rifampicina é $y = 37719917,8922x - 466289,3471$. O valor de R^2 para a rifampicina foi de 0,9992.

É importante também destacar que as curvas apresentam uma boa adequação aos dados.

O coeficiente de correlação (r) é obtido extraído-se a raiz do valor de R^2 expressa no gráfico, sendo este valor de 0,9997 para isoniazida e 0,9996 para rifampicina. O coeficiente de correlação (r) expressa a relação entre as duas matrizes na curva (x e y) e estes valores estão compreendidos entre -1 e +1, sendo os valores ideais os mais próximos de +1 (BRASIL, 2003).

Observa-se também que o DPR foi muito inferior ao estabelecido.

Desta forma, os valores de correlação obtidos para isoniazida e rifampicina atendem ao critério mínimo aceitável preconizado na RE 899/2005 (r maior que 0,99) e a metodologia demonstra linearidade definida para o intervalo de concentração avaliado para isoniazida e rifampicina (BRASIL, 2003).

Assim como feito na validação de CLAE, com o objetivo de determinar a significância do coeficiente angular do modelo ($y = ax + b \rightarrow a \neq 0$), foi feita a análise de variância da regressão (ANOVA) e seus dados estão apresentados na tabela 27 para isoniazida e 28 para rifampicina

Tabela 27: Análise de variância (ANOVA) para Isoniazida

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	3,96009E+12	3,96009E+12	22261,9	2,07281E-22
Resíduo	13	2312523139	177886395,3		
Total	14	3,96241E+12			

gl: graus de liberdade; SQ = Soma quadrática; MQ = média quadrática; F= F calculado;

Tabela 28: Análise de variância (ANOVA) para Rifampicina

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	4,17959E+13	4,17959E+13	15794,7	1,92646E-21
Resíduo	13	34400537892	2646195222		
Total	14	4,18303E+13			

gl: graus de liberdade; SQ = Soma quadrática; MQ = média quadrática; F= F calculado;

De acordo com os dados das tabelas 27 e 28 e como discutido anteriormente, ficou demonstrado que o coeficiente angular das regressões é significativamente diferente de zero.

Foi verificada a homocedasticidade do método por meio do teste de Cochran já comentado anteriormente. Assim, pode-se dizer que o método é homocedástico, uma vez que o C calculado (0,391 para isoniazida e 0,511 para rifampicina) é menor que o C tabelado ou crítico (0,684), considerando um valor de significância de 5%. A maior variância encontrada foi de $4,464 \times 10^{-9}$ e $1,768 \times 10^{-7}$ para isoniazida e rifampicina, respectivamente e o somatório foi de $1,142 \times 10^{-8}$ para isoniazida e $3,458 \times 10^{-7}$ para rifampicina.

5.5.2. Exatidão

A exatidão foi avaliada através de 9 determinações, sendo feitas triplicatas de amostras de 3 níveis diferentes.

Nas tabelas abaixo (Tabelas 29 e 30), estão demonstrados as taxas de recuperação, isto é, a relação percentual entre as concentrações de isoniazida e rifampicina, em cada nível de concentração e a concentração esperada. Os níveis de concentração estudados foram: 90, 100 e 110% para o ativo isoniazida 90, 100 e 130% para rifampicina. Cada nível de concentração foi analisado em triplicata.

Tabela 29: Taxa de recuperação de isoniazida no teste de exatidão

Concentração (µg/ml)	Recuperação (%)
100	100
200	100
300	100
400	100
500	100
600	100
700	100
800	100
900	100
1000	100

Os valores de recuperação obtidos encontram-se dentro da faixa estabelecida 98,0 a 102,0%, obtendo-se médias de 101,26 e 100,22 % para isoniazida e rifampicina, respectivamente, sendo assim considerados satisfatórios (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003). Portanto, o método apresenta exatidão nesses pontos avaliados, para ambos os ativos.

5.5.3. Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade e a precisão intermediária.

5.5.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada por meio de 9 determinações em três concentrações diferentes (90%, 100% e 110% para isoniazida e 90%, 100% e 130% para rifampicina).

Os valores de área obtidos assim como as massas pesadas de cada triplicata em cada nível estudado estão demonstrados na tabela 29 (valores para isoniazida) e na tabela 30 (valores para rifampicina).

O Desvio Padrão Relativo (DPR) das nove determinações nos três níveis é de 0,92 e 1,06% para determinações de isoniazida e rifampicina, respectivamente. Portanto, esses valores encontram-se inferiores ao determinado pela RE 899/03 que é de 5,0%; assim, o método é considerado preciso para os dois IFAs (BRASIL, 2003).

5.5.3.2. Precisão intermediária

A avaliação da precisão intermediária foi avaliada através da repetição dos testes avaliados na repetibilidade, diferenciando-se o analista e o dia da análise.

As tabelas 31 e 32 demonstram os resultados obtidos pelo analista B.

O Desvio Padrão Relativo de todos os resultados obtidos pelo analista B é de 0,56 e 0,81 % para determinações de isoniazida e rifampicina, respectivamente. E o Desvio Padrão Relativo entre as determinações obtidas pelos analistas A e B é de 0,81 % para a isoniazida e de 0,97 % para a rifampicina.

Dessa forma, os valores de precisão intermediária do analista B encontram-se inferiores ao determinado pela legislação vigente que é de 5,0%. Ainda, os valores entre os analistas também encontram-se abaixo de 5,0% verificando-se a precisão do método (BRASIL ,2003).

5.5.4. Especificidade

A seletividade/especificidade da metodologia desenvolvida para emprego em CLUE foi avaliada estudando-se 3 critérios: avaliação da interferência cromatográfica, avaliação da filtração, avaliação do efeito memória e LQ e LD. Esses critérios serão discutidos a seguir.

5.5.4.1. Avaliação da interferência cromatográfica

A avaliação da interferência cromatográfica foi realizada através de injeções cromatográficas do diluente, da solução placebo, da solução amostra, da solução de placebo fortificado e das soluções individuais de cada IFA e de cada substância relacionada conhecida. Os cromatogramas obtidos para cada injeção cromatográfica descritas acima estão apresentados nas figuras 33 e 34.

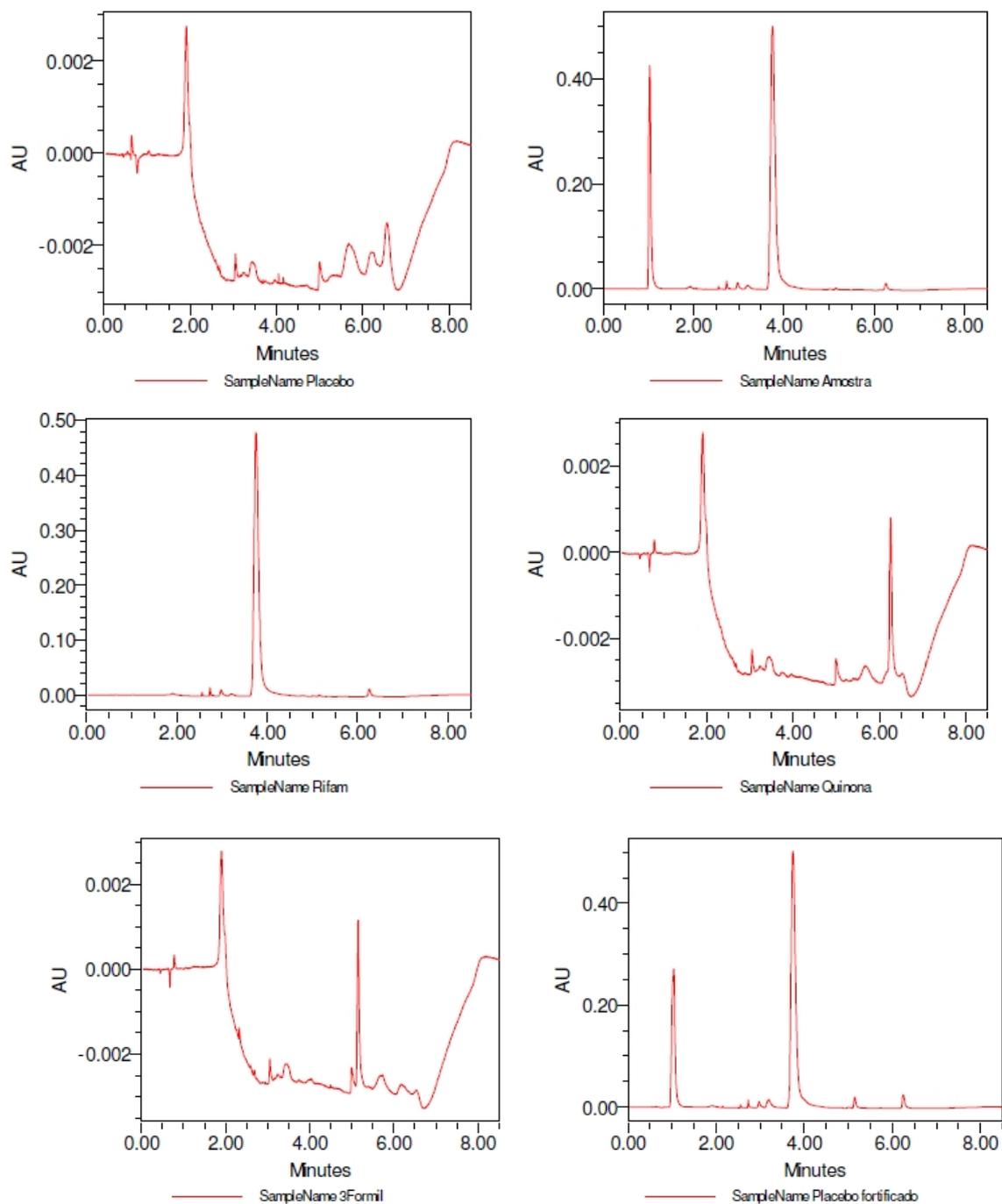


Figura 33: Cromatogramas de placebo, amostra de isoniazida + rifampicina, rifampicina, rifampicina-quinona, 3-formil-rifampicina e placebo fortificado em CLUE

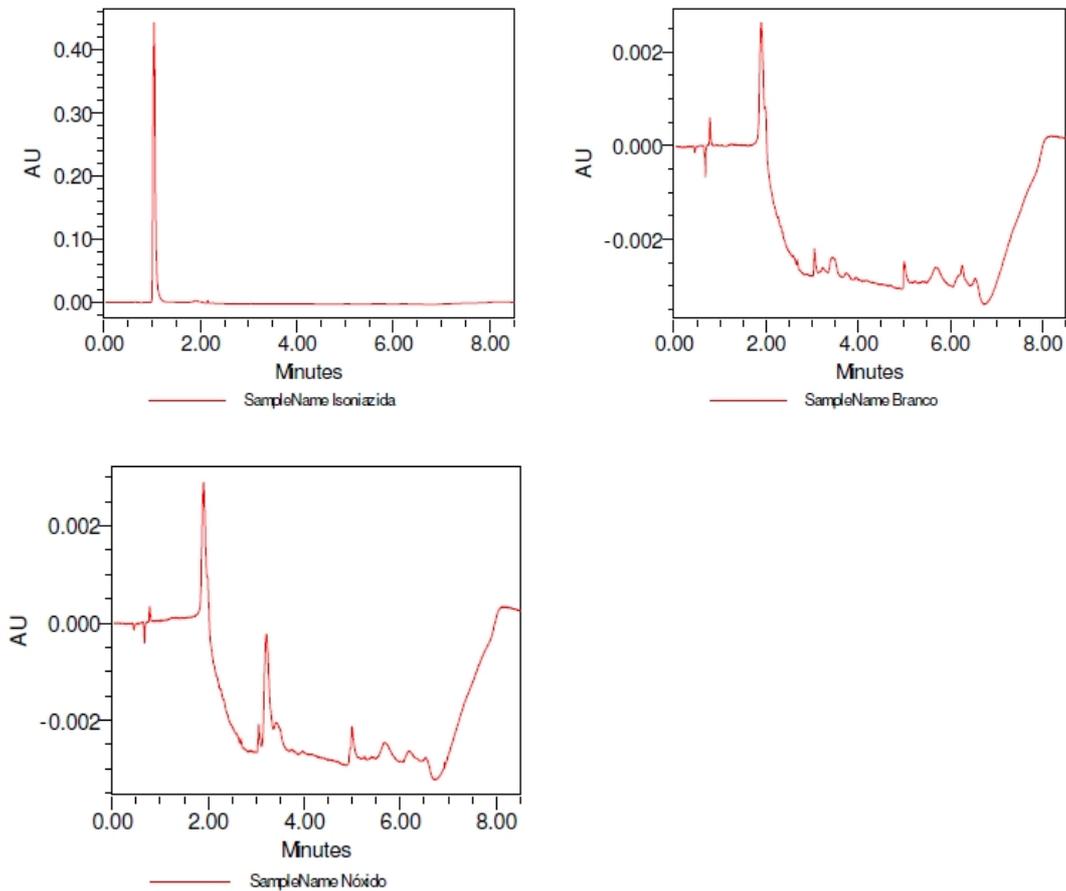


Figura 34: Cromatogramas de isoniazida, branco e rifampicina-N-óxido em CLUE

Conforme observado nas figuras apresentadas, observa-se que não há influência do placebo nem do diluente para os IFAs e as substâncias relacionadas. Os tempos de retenção aproximados, nessas condições cromatográficas, da isoniazida, da rifampicina, da rifampicina-quinona, da 3-formil-rifampicina e da rifampicina-N-óxido são de 6,4 minutos, 5,3 minutos e 3,4 minutos, respectivamente.

Desta maneira, o método desenvolvido é considerado seletivo, uma vez que, como foi mostrado, não foram observadas interferências cromatográficas do diluente, do placebo ou de qualquer outra impureza no tempo de retenção da isoniazida, da rifampicina e de suas substâncias relacionadas.

5.5.4.2. Avaliação da filtração

A avaliação da filtração foi feita realizando-se duplicata da injeção de solução padrão, seguida de uma injeção do diluente, antes e depois de se realizar a filtração em membrana 0,22 μm . Não foi avaliado o impacto da filtração na solução amostra, pois a mesma não é totalmente solúvel no diluente. Assim, a injeção de amostras com particulados poderia ocasionar um entupimento na tubulação e capilares do equipamento de CLUE (JONES *et al.*, 2010).

As áreas obtidas em cada cromatograma estão demonstradas na tabela 33:

Tabela 33: Registro de áreas de isoniazida e rifampicina em solução padrão antes e depois de filtração com membrana 0,22 μm .

	1ª Injeção		2ª Injeção	
	Isoniazida	Rifampicina	Isoniazida	Rifampicina
Area antes da Filtração	1413256	3669972	1414552	3671236
Area depois da Filtração	1413091	3660452	1412783	3673295
Variação (%)	0,01	0,26	0,13	0,06

De acordo com a tabela 33, mesmo a filtração sendo feita com a membrana com a menor porosidade existente para este fim, esta operação unitária não impacta na quantificação dos analitos, uma vez que a razão entre as áreas obtidas para o pico da solução padrão filtrada e não filtrada não foi superior a 1,0%. Na literatura a questão de adsorção ao filtro é mais aplicada quando se fala dos ensaios de dissolução; entretanto, acatou-se a referência usada para esse ensaio para o teste de teor, do qual esse trabalho trata. As especificações encontradas são de no máximo de 2%, segundo Fortunato (2005), e 5% segundo Lindenberg e colaboradores (2005), de perda do soluto por adsorção ao material filtrante. A membrana filtrante também não interferiu no sinal cromatográfico do diluente.

Assim, é demonstrado que os filtros empregados no estudo não implicam perda do fármaco em análise.

5.5.4.3. Avaliação do efeito memória

A avaliação do efeito memória foi feita através da injeção de diluente, seguida de uma injeção de solução padrão e de mais uma injeção de diluente.

Pelos cromatogramas obtidos, pode-se considerar que não ocorreu efeito memória na metodologia desenvolvida por CLUE, já que nenhum pico foi registrado nos tempos de retenção dos componentes da solução padrão na injeção de diluente imediatamente posterior à solução padrão.

5.5.4.4. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os resultados para os limites inferiores de quantificação e de detecção obtidos na metodologia por CLUE estão apresentados na Tabela 36 e foram calculados com base em todas as curvas padrão preparadas para o teste de linearidade.

Tabela 34: Resultado dos limites de quantificação e detecção obtidos a partir das curvas analíticas.

Fármacos	LQ (mg/mL)	Área teórica LQ	LD (mg/mL)	Área teórica LD
Isoniazida	0,0089	218631,6	0,0029	21612,1
Rifampicina	0,0209	322583,2	0,0069	83144,1

Quando compara-se CLUE com CLAE tem-se, em muitos casos, o que é chamado de aumento de detectabilidade, ou seja, a CLUE apresenta LQs menores do que os encontrados por CLAE (KOVALCZUK *et al.*, 2006; MALDANER e JARDIM, 2009). Entretanto, neste trabalho isso não ocorreu para os LQ e LD inferiores, mas ambos apresentaram valores bem baixos.

5.5.5. Robustez

Assim como a metodologia não foi considerada robusta para performance em CLAE, por motivos já explicitados, a metodologia analítica para CLUE também não deve ser considerada robusta. Portanto, cada parâmetro cromatográfico, assim como preparo de soluções e colunas devem ser seguidos rigorosamente como descrito na metodologia.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- A metodologia otimizada de análise de teor para tuberculostáticos FDC 2 em 1 por CLAE foi comprovada como sendo seletiva também para substâncias relacionadas conhecidas ou não dos IFAS.

- A validação do método por CLAE comprovou que o mesmo apresenta linearidade para o intervalo de 50% a 150%, isto é, de 30 a 90 $\mu\text{m/mL}$ para isoniazida e de 60 a 180 $\mu\text{g/mL}$ para rifampicina. Além disso, como comprovado, apresenta também especificidade, exatidão e precisão. Porém, não apresenta robustez e, portanto, todos os parâmetros cromatográficos devem ser seguidos rigorosamente.

- A fim de se obter corridas cromatográficas mais rápidas, foi realizada com êxito a transferência e otimização da metodologia analítica de CLAE para CLUE. Os parâmetros cromatográficos foram desenvolvidos com o intuito de, futuramente, utilizar essa metodologia com CLUE acoplado a um sistema de espectrometria de massas (EM) (CLUE-EM) permitindo, assim, a caracterização das substâncias relacionadas ditas desconhecidas. Portanto, o uso de fase móvel e diluente contendo tampão acetato de amônio pH 5,5 mostrou-se indispensável.

- A metodologia utilizando a técnica de CLUE foi validada e, assim como a metodologia desenvolvida para CLAE, apresentou especificidade, linearidade no mesmo intervalo estudado, exatidão e precisão. Esta, também não apresentou robustez. Uma

validação desta metodologia específica para substâncias relacionadas será conduzida futuramente.

- Ao fazer a comparação entre as metodologias de CLAE e CLUE, podemos observar que o tempo de corrida cromatográfica reduziu-se em 6 vezes e o consumo total das fases móveis A e B reduziu-se em 20 vezes; isto é, a técnica de CLUE foi capaz de gerar uma economia de tempo e dinheiro, além de proporcionar a análise de mais de um lote de amostra em um único dia; tornando-se viável a rotina de um laboratório de controle de qualidade de uma indústria farmacêutica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACE 2013. Comparison Guide to C18 Reversal Guide Columns. Disponível em www.ace-hplc.com. Acesso em 26 de fevereiro de 2013.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas. Segunda edição. Porto Alegre. p. 139. 2005.

AZEVEDO, M. L. G. Otimização de método analítico para determinação de tuberculostáticos em formulações de doses fixas combinadas, por eletroforese capilar. Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. UFRJ. 2006.

BATES, J.H., KUBICA, G.P.; WAYNE, L.G. Transmission, pathogenesis, pathology, and clinical manifestations of tuberculosis. The Mycobacteria: a sourcebook. Part B. New York: Marcel Dekker, Inc.. p.991-1005. 1984.

BRASIL 2003. Resolução (RE) nº 899, de 29 de maio de 2003. "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". ANVISA, 2003.

BRASIL 2005. Resolução (RE) nº 01 de 29 de julho de 2005 "Guia para realização de estudos de estabilidade". ANVISA, 2005

BRASIL 2009. Guia de Vigilância Epidemiológica – Normas e Manuais Técnicos. série A, 7ª ed., cad.7, p.39-60, Ministério da Saúde. Brasil, 2009.

BRASIL 2011a. Informe Técnico de Tuberculose. Ministério da Saúde. Brasil. Disponível em: : <http://portal.saude.gov.br/saude>. Acesso em: 03 de julho de 2011.

BRASIL, 2011b. Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). Ministério da Saúde. Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude>. Acesso em: 03 de julho de 2011.

BRASIL, 2013. Tuberculose no Brasil e no mundo. Ministério da Saúde. Brasil. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

BHUTANI, H; SINGH, S; JINDAL, K C; CHAKRABORTI, A K. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 39, p. 892-899, 2005.

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.

FORTUNATO, D. Dissolution method development for immediate release solid oral dosage forms. Dissolution Technologies, p. 12-14, 2005

GIL, E.S. Controle de Qualidade Físico-químico de Medicamentos. São Paulo: Pharmabooks. p. 413-424. 2010

GUILLARME, D; NGUYEN, D.T.T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. v. 68. p. 430-440. 2008.

GUNASEKARAN,S.;SAILATHA,E. Estimation of pyrazinamide, isoniazid and rifampicin in pharmaceutical formulations by high performance liquid chromatography method. Asian Journal of Chemistry, v.21. p. 3561-3566. 2009.

JONES, M.D.; ALDEN, P.; FOUNTAIN, K.J.; AUBIN, A. Implementation of methods translations between liquid chromatography instrumentation. Waters Corporation, 2010

JOKLIK, W.K.; WILLET, H.P.; AMOS, D.B.; WILFERT, C.M. Zinsser Microbiology. 20.ed. California: Appleton & Lange. p.498-510. 1992

KATZUNG, B.G. Farmacologia: Básica & Clínica. 9^a.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. p. 654-657. 2005

KOVALCZUK, T.; JECH, M.; POUSTKA, J; HAJSLOVÁ. Ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food. Analytica Chimica Acta. v. 577, p. 8-17. 2006.

LINDENBERG, M.; WIEGAND, C.; DRESSMAN, J. B. Comparison of the adsorption of several drugs to typical filter materials. Dissolution Technologies, p. 22-25, 2005.

LOWEN, T.C.R. Desenvolvimento e Validação da Metodologia de Análise do Teor de Lamivudina e do Ensaio Limite do Enantiômero(+)-BCH-189 em Comprimidos de Lamivudina. Rio de Janeiro:Dissertação de mestrado INCQS/FIOCRUZ, 2003.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra-eficiência. Química Nova. v. 32. p. 214-222, 2009.

MARIAPPAN, T.T.; SINGH, S. Regional gastrointestinal permeability of rifampicin and isoniazid (alone and their combination) in the rat. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, v.7, n.8, p.797-803, 2003.

MARTINDALE. *The complete drug reference*. 33 ed. London: Pharmaceutical Press, 2002.

MERCK. *The Index Merck*. 14th edition. 2000

MOHAN, B.; SHARDA, N.; SINGH, S. Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.31, p.607-612, 2003.

NGUYEN, D.T.-T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L. Validation of an ultra-fast UPLC-UV method for the separation of antituberculosis tablets. *J. Sep. Sci.* v. 31, 1050 – 1056, 2008.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L; SOLICH, P. Advantages of application in UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*. v. 68. 908-918. 2006

OMS 2011a , ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global Tuberculosis Control 2011 – WHO Report 2011. Disponível em : <http://www.who.int/tb>. Acesso em 02 de novembro de 2011

OMS 2011b, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. A world free of TB. Disponível em: <http://www.who.int/tb>. Acesso em 03 de julho de 2011.

ORTIZ, R.S., ANTUNES, M.V., LINDEN, R. Determinação de citrato de Sildenafil e de Tadalafila por cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção por arranjo de diodos (CLUE-DAD). *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 2, 389-393, 2010

PACHANGULA, R.; SOOD, A.; SHARDA, N.; KAUR, K; KAUL, C.L. Determination of rifampicin and its main metabolite in plasma and urine in presence of pyrazinamide and isoniazid by HPLC method. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. vol.18 p. 1013–1020. 1999

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSEN, G. Farmacologia. 7ª .ed. São Paulo. Editora Elsevier., 2012.

REDE TB – Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose. Disponível em: <http://redetb.org/sobre-a-tuberculose>. Acesso em 15 de janeiro de 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quim. Nova, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSSETI, M.L.R., VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. Revista de Saúde Pública, v.36, n. 4, p.525-532, 2002.

SHABIR, G.A. Validation of high performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. Journal of Chromatography, v. 987, n.1-2, p. 57-66. 2003

SHEWIYO, D.H.; KAALE, E.; RISHA, P.G.; DEJAEGHER, B.; VERBEKE, J.S.; HEYDEN, V. Optimatization of a reversed-phased-high-performance thin-layer chromatograph method for the separation of isoniazid, ethambutol, rifampicin and pyrazinamide in fixed-dose combination antituberculosis tablets. Journal of Chromatograph A. v.1260. p. 232-238. 2012.

SHISHOO, C. J.; SHAH, S. A.; RATHOD, S.; S; SAVALE, J. S.; KOTECHA, J. S.; SHAH, P.B. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 190, p. 109-123. 1999.

SILVA, A.M. Estudos para o desenvolvimento de comprimidos dose fixa combinada (DFC) 3 em 1 para o tratamento da tuberculose. Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. UFRJ. 2010.

SINGH,S.; MARIPPAN,T.T.; SANKAR, R.; SARDA, N.; SINGH, B. A critical review of probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 228, p. 5-17. 2001.

SKOOG, D. A. e LEARY, J. J., *High-Performance liquid Chromatography In: Principles of Instrumental Analysis*, 4 ed., Harcourt Brace College Publishers, Florida, p 628 - 669. 1992.

SNYDER; LLOYD, K.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*. 2 ed. John Wiley & Sons, p.77-79. 1997.

STOP TB PARTNERSHIP. *The Global Plan to Stop TB, 2010 – 2015. Actions for life: towards a world free of tuberculosis*, p. 26, 2010.

THE INTERNATIONAL PHARMACOPEA. 4th.ed. World Health Organization, 2010. [Document QAS/04.114Disponível em: www.who.org. Acesso em: 01de Julho de 2011.

TIBOLA, A.P.O.V. Estudo de Compatibilidade entre a Isoniazida e Excipientes farmacêuticos. Curitiba. Dissertação de mestrado. 2009.

USP. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 34th.ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, INC. p.4150-4152. 2011.

WOLLINGER, W. Influência dos excipientes na degradação dos fármacos da associação dos tuberculostáticos isoniazida e rifampicina em comprimidos. Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. UFRJ. 2008.

ZHOU. Z.; CHEN, L.; LIU,P.;SHEN,M.;ZOU,F. Simultaneous Determination of Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin and Acetylisoniazid in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. Analytical Sciences. v. 26. p. 1133-1139. 2010