

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

Monica de Gouveia Castex

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE  
TUBERCULOSTÁTICOS EM FORMULAÇÃO DE DOSE FIXA COMBINADA POR  
ELETROFORESE CAPILAR**

Rio de Janeiro

2015

Monica de Gouveia Castex

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE  
TUBERCULOSTÁTICOS EM FORMULAÇÃO DE DOSE FIXA COMBINADA POR  
ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Área de Concentração em Qualidade de Produtos em Saúde, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Castex, Monica de Gouveia

Validação de método analítico para a determinação de tuberculostáticos em formulação de dose fixa combinada por eletroforese capilar / Monica de Gouveia Castex. Rio de Janeiro:INCQS/FIOCRUZ, 2015.

86 f, Il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

1.Eletroforese Capilar. 2 Combinação Rifampicina - Isoniazida . 3. Metodologia I  
Título.

Validation of analytical method for the determination of fixed dose combination  
tuberculostatics by capillary electrophoresis

Monica de Gouveia Castex

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE TUBERCULOSTÁTICOS EM FORMULAÇÃO DE DOSE FIXA COMBINADA POR ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Área de Concentração em Qualidade de Produtos em Saúde, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovada em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Helena Pereira da Silva Zamith

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Marco Antonio Mota da Silva

Universidade Estadual da Zona Oeste

---

Maria Helena Wohlers Morelli Cardoso

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor) - Orientador

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela oportunidade para elaborar este trabalho e força para vencer desafios;

A minha família, pelo apoio em todos os momentos;

À minha orientadora Profa. Shirley Abrantes, pelos ensinamentos, pelo carinho e por sempre ter uma palavra amiga,

Ao meu Diretor Joi Luiz de Jesus, pelo apoio concedido, possibilitando minha participação na realização desta obra;

Aos colegas farmacêuticos Paulo Victor Pereira Baio e João Carlos Cypriano, pela compreensão e parceria durante o período em que estive dedicada a este trabalho.

Ao estagiário George Leon Machado, pela dedicação e cooperação;

A Abigar Chagas Holanda Junior, pelas palavras de incentivo e carinho que me inspiraram a prosseguir adiante com fé;

Aos colegas do Laboratório de Alimentos e Contaminantes do INCQS, Fabio, Marcus, Ângela e Cláudia, pelo companheirismo e suporte.

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.

Francisco de Assis

## RESUMO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs o protocolo de tratamento quimioterápico padrão para a tuberculose utilizando associações de fármacos formulados em doses fixas e adequadas conforme a fase da doença e faixa de peso do paciente. Essa medida visou reduzir a ocorrência de novos casos da doença e minimizar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos envolvidos na terapia. Nessas associações, a isoniazida e a rifampicina estão sempre presentes. Frente a essa demanda, a indústria farmacêutica busca continuamente manter a qualidade dos produtos antituberculose assegurando cumprir as exigências relativas ao registro sanitário e a sua responsabilidade legal com a segurança, qualidade e eficácia dos medicamentos. Dessa forma, é necessária a prática de um sistema que incorpore as Normas de Boas Práticas de Fabricação e de Laboratório, nas quais os estudos da validação constituem parte essencial desse processo. Ao mesmo tempo, para o combate de uma doença como a tuberculose, cujo custeio se faz gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, a disponibilização de metodologias analíticas confiáveis, rápidas, de baixo custo e menos poluentes, mostra-se extremamente interessante ao orçamento público, particularmente no Brasil, que galgou a sexta colocação no ranking dos maiores consumidores de medicamentos no mundo. A eletroforese capilar (EC) é uma ferramenta analítica que vem se desenvolvendo rapidamente nas últimas duas décadas, por ser uma técnica de alto desempenho e baixo custo, requerer menor volume de amostra e exigir pouca ou nenhuma utilização de solventes orgânicos, além de baixo impacto ambiental. Neste trabalho realizou-se a validação de uma metodologia para análise de isoniazida e rifampicina em comprimidos de Doses Fixas Combinadas (DFC) por EC. As condições da EC foram: capilar de sílica fundida recoberto com poliimida de 64,5 cm de comprimento total (56 cm de comprimento efetivo) e 50 µm de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura do cassete: 25 °C; varredura Detector por Arranjo de Diodos - (DAD): monitorando o comprimento de onda de 200 nm; introdução das amostras: hidrodinâmica por pressão a 25 mbar/3s de amostra, seguida de 25 mbar/2s de eletrólito. Eletrólitos: soluções contendo 60 mM de borato de sódio pH 9,85. A metodologia analítica empregada provou ser aplicável para a determinação quantitativa de isoniazida e rifampicina nos comprimidos de DFC. Comprovou-se que a faixa de trabalho é linear para o intervalo de concentração de 200 a 700 µg/mL

e 500 a 1000 µg/mL para isoniazida e rifampicina, respectivamente. A matriz do comprimido 2 em 1 não influencia nas respostas obtidas para análise de isoniazida e rifampicina. A repetibilidade da rifampicina e isoniazida de 3,17 % e 2,64 %, respectivamente, foram aceitáveis quando comparadas com o critério de aceitação de 3,30 % obtido para o coeficiente de variação de repetibilidade calculado pela equação de Horwitz. A precisão intermediária da isoniazida e rifampicina de 1,41 % e 1,67 %, respectivamente, foram aceitáveis quando comparadas ao coeficiente de variação de reprodutibilidade de 1,97 % e 1,67 % para isoniazida e rifampicina, respectivamente, calculados pela equação de Horwitz. As faixas de recuperação de 92,16-95,00 % para isoniazida e 97,59-98,41 % para rifampicina foram aceitáveis para o critério de aceitação do *International Conference Harmonization*.

Palavras-chave: Isoniazida. Rifampicina. Eletroforese Capilar. Validação.



## ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) has proposed a standard therapeutic protocol for tuberculosis using associations of drugs formulated in fixed and appropriated doses according to the disease's phase and weight range of patients. This guidance aimed to reduce the occurrence of new cases and to minimize the development of resistance to the drugs involved in this therapy. In this associations, isoniazide and rifampicin are always present. Due to this demand, pharmaceutical industry searches continually keeping the quality of antituberculosis products in order to fulfill the requirements of sanitary registration and the legal responsibility with safety, quality and efficacy of medications. Therefore, it is necessary the practice of a system that joins the good manufacturing and laboratory practices in which the validation studies compose a primary role of this process. At the same time, to fight such a disease like tuberculosis, which is funded by the public health system, the availability of analytic methodologies that are reliable, short time, low cost and less pollutant show to be extremely important to the public budget, particularly in Brazil, that has achieved the sixth position of world drugs market. As Capillary Electrophoresis (CE) is an analytic tool that has been rapidly growing in the last decades for being a technique of high performance, low cost, low volume samples, low organic solvents consumption and low environmental impact, this study validated a methodology for the analysis of isoniazide and rifampicin in tablets of Fixed Dose Combination (FDC) by CE. The conditions of CE were: capillary of fused silica covered with polyimide of 64.5 cm of total length (56 cm of effective length) and 50  $\mu\text{m}$  of internal diameter; 20 kV voltage; 25°C cassette temperature; Diode Array Detector (DAD) scan monitoring the wavelength of 200 nm; inserting samples by hydrodynamic of pressure of 25 mbar/3s of sample, followed of 25 mbar/2s of electrolyte. Electrolyc solutions containing 60 mM of sodium borate pH 9.85. The analytic methodology proved to be useful for quantitative determination of isoniazide and rifampicin in FDC tablets. It was proved that the working range is linear for the concentration interval of 200 to 700  $\mu\text{g/mL}$  and 500 to 1000  $\mu\text{g/mL}$  for isoniazide and rifampicine, respectively. The matrix of 2 in 1 tablet does not interfere the results for the analysis of isoniazide and rifampicine. Repeatability of rifampicine and isoniazide of 3.17 % and 2.64 %, respectively were acceptable when compared by the acceptance criterion of 3.30 % for variation coefficient of repeatability calculated by Horwitz equation. Intermediate precision of

isoniazide and rifampicine of 1.41 % and 1.67 %, respectively were acceptable when compared to the variation coefficient of reproductibility of 1.97 % and 1.67 % for isoniazide and rifampicine, respectively, calculated by Horwitz equation. Recuperation range of 92.16 – 95.00 % for isoniazide and 97.59 – 98.41 % for rifampicine were acceptable for the criterion of acceptance of the International Conference Harmonization.

Key-words: Isoniazide. Rifampicin. Capillary Electrophoresis. Validation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da rifampicina .....	26
Figura 2: Estrutura química da Isoniazida .....	27
Figura 3: Esquema de instrumentação utilizada na EC.....	33
Figura 4: Esquema de apresentação da metodologia.....	44
Figura 5: Eletroferograma da associação DFC 2 em 1 com 200 µg/mL de isoniazida e rifampicina 800 µg/mL.....	57
Gráfico 1: Curva Analítica de isoniazida.....	58
Gráfico 2: Curva de Resíduos.....	58
Figura 6: Curva Analítica de isoniazida com solvente .....	67
Figura 7: Curva analítica de isoniazida com matriz.....	67
Figura 8: Curva Analítica de rifampicina com matriz....	70
Figura 9: Curva analítica de rifampicina com solvente.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).	36
Tabela 2: Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).....	37
Tabela 3: Preparo das soluções de trabalho de isoniazida em balões volumétricos de 10 mL para estudo de linearidade.....	48
Tabela 4: Preparo das soluções de trabalho de rifampicina para o estudo da linearidade.....	49
Tabela 5: Preparo das soluções de isoniazida em matriz e em solvente para a avaliação do efeito matriz.....	51
Tabela 6: Preparo das soluções de rifampicina em matriz e em solvente para a avaliação do efeito matriz.....	53
Tabela 7: Concentrações de trabalho e resposta analítica.....	58
Tabela 8: Resumo da avaliação de linearidade dos dados de concentração e resposta analítica .....	59
Tabela 9: ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste).....	59
Tabela 10: Estatística da regressão.....	59
Tabela 11: Normalidade dos resíduos.....	60
Tabela 12: Autocorrelação dos resíduos.....	60
Tabela 13: Homogeneidade da variância dos resíduos.....	60
Tabela 14: Concentração das soluções de trabalho de rifampicina e respostas analíticas em área normalizada.....	62
Tabela 15: Resumo da avaliação da linearidade para rifampicina.....	63
Tabela 16: Normalidade dos resíduos.....	63
Tabela 17: Autocorrelação dos resíduos.....	63
Tabela 18: Homogeneidade das variâncias dos resíduos.....	63
Tabela 19: Análise de regressão linear.....	64
Tabela 20: ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste).....	64
Tabela 21: Teste da variância dos resíduos, referentes às curvas analíticas de isoniazida.....	65

Tabela 22 : Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de isoniazida no solvente.....	65
Tabela 23: Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de isoniazida na matriz.....	66
Tabela 24: Estatísticas do teste t para avaliação do efeito matriz para análise de isoniazida.....	66
Tabela 25: Teste da variância dos resíduos para rifampicina .....	68
Tabela 26: Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de rifampicina no solvente.....	68
Tabela 27: Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de rifampicina na matriz.....	69
Tabela 28: Avaliação do efeito matriz pelo teste t de variâncias distintas, onde t crítico $t_{(1-\alpha/2;v)}$ .....	69
Tabela 29: Resultados dos ensaios analíticos para o teste de homogeneidade em percentual m/m de rifampicina no comprimido.....	71
Tabela 30: ANOVA.....	72
Tabela 31: Teor de isoniazida em percentual m/m apresentado nas análises do comprimido.....	72
Tabela 32: ANOVA.....	73
Tabela 33: Teor em percentual m/m de rifampicina na amostra.....	73
Tabela 34: Teor em percentual m/m de isoniazida na amostra encontrados nas análises realizadas para avaliar a repetitividade analítica.....	74
Tabela 35 Concentrações de isoniazida na amostra simulada.....	75
Tabela 36: ANOVA.....	76
Tabela 37: Concentrações de rifampicina na amostra simulada.....	76
Tabela 38: ANOVA.....	77
Tabela 39: Dados necessários para avaliar a precisão intermediária da análise de isoniazida.....	78
Tabela 40: Cálculos de precisão intermediária para isoniazida.....	78
Tabela 41: Dados necessários para avaliar a precisão intermediária da análise de rifampicina .....	79
Tabela 42: Avaliação da precisão intermediária.....	79
Tabela 43: Resumo dos resultados de recuperação analítica de isoniazida.....	80

Tabela 44: Resumo dos resultados na avaliação da recuperação analítica do método em questão, referente à quantificação de rifampicina.....	80
--	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Taxas de incidência e mortalidade de TB por região e estados do Brasil.....	21
Quadro 2 - Incidência de tuberculose em cinco municípios do Rio de Janeiro.....	21
Quadro 3 - Esquema básico para o tratamento da TB para adultos e adolescentes.....	24
Quadro 4 - Avaliação da repetibilidade analítica para rifampicina.....	74
Quadro 5 - Apresentam-se os cálculos necessários para avaliação da repetibilidade analítica.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BK	Bacilo de Kock
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DFC	Dose Fixa Combinada
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i>
DOTS	<i>Direct Observed Treatment Strategy</i>
DP	Diferença de Potencial
EC	Eletroforese Capilar
EMEA	<i>European Medicine Agency</i>
EP	<i>European Pharmacopeia</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEO	Fluxo Eletroosmótico
INH	Isoniazida
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LACEN	Laboratórios Centrais
LQFEx	Laboratório Químico Farmacêutico do Exército
MMQ	Método dos Mínimos Quadrados
MS	Ministério da Saúde
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
RMP	Rifampicina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SQR	Substância Química de Referência

SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TB	Tuberculose
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 TUBERCULOSE.....	17
1.2 O CONTROLE DA TUBERCULOSE.....	18
1.3 O TRATAMENTO.....	22
1.4 FÁRMACOS DO MEDICAMENTO DFC.....	25
1.4.1 Rifampicina.....	25
1.4.1.1 Mecanismo de ação da rifampicina.....	26
1.4.2 Isoniazida.....	26
1.4.2.1 Mecanismo de ação da isoniazida.....	28
1.5. METODOLOGIAS ANALÍTICAS DE COMPÊNDIOS OFICIAIS.....	28
1.6. VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO CONTEXTO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA DFC 2 EM 1 DE ISONIAZIDA + RIFAMPICINA.....	29
1.7 ELETROFORESE CAPILAR.....	31
1.7.1 Definição.....	31
1.7.2 Fluxo eletrosmótico (FEO).....	31
1.7.3 Histórico.....	32
1.7.4 Instrumentação.....	32
1.7.5 Modos de separação.....	34
1.7.6 Aplicabilidade.....	34
1.8 VALIDAÇÃO.....	35
1.8.1 Linearidade.....	37
1.8.2 Seletividade.....	38
1.8.3 Precisão.....	39
1.8.4 Exatidão.....	39
1.8.5 Robustez.....	40
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Geral.....	41
2.2 Específicos.....	41
3 METODOLOGIA.....	42
3.1 MATERIAIS.....	42
3.2 EQUIPAMENTOS.....	42

3.3 AMOSTRAS E REAGENTES.....	43
3.4 ELETROFORESE CAPILAR.....	43
3.4.1 Procedimentos gerais.....	43
3.4.1.1 Preparo da solução extratora de tampão de borato de sódio 10 mM pH 9,85.....	43
3.4.1.2 Preparo da solução de borato de sódio 60 mM pH 9,85 (eletrólito de corrida).....	44
3.4.1.3 Cálculo dos pontos da curva analítica (desenho experimental).....	44
3.4.2 Preparo da Amostra de DFC 2 em 1.....	45
3.5 CONDIÇÕES ANALÍTICAS DE ELETRO-MIGRAÇÃO ESTUDADAS NO MODO CZE.....	46
3.5.1 Tratamento inicial dos capilares.....	47
3.5.2 Condicionamento dos capilares.....	47
3.6. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL.....	47
3.6.1 Linearidade.....	46
3.6.1.1. Teste de linearidade para isoniazida.....	47
3.6.1.2. Teste de linearidade para rifampicina.....	48
3.6.2 Efeito Matriz.....	49
3.6.2.1 Teste de efeito matriz para isoniazida.....	49
3.6.2.2. Avaliação do efeito matriz para rifampicina.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
5 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta principalmente os pulmões, podendo também atingir outros órgãos do corpo, como os rins, meninges (membranas que envolvem o cérebro), gânglios, intestinos, ossos, ou outros locais do organismo. É causada por uma bactéria em forma de pequenos bastões cujo nome científico é *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK), em homenagem ao seu descobridor, o cientista alemão Robert Koch. Outras espécies de micobactérias também podem causar a tuberculose, são elas: *Mycobacterium bovis*, *M. africanum* e *M. microti* (BASTOS, 2006; BRASIL, 2002; REDE TB, 2012). A transmissão direta ocorre através do ar quando uma pessoa inala pequenas gotas de saliva, contendo o BK, expelidas por um indivíduo acometido pela TB pulmonar ao falar, tossir ou espirrar. A transmissão da doença só ocorre pelo ar, não se transmite TB pelo uso comum de pratos, talheres, roupas de cama, toalhas e vaso sanitário, nem pelo contato com o sangue ou secreções sexuais. Contudo, a má alimentação, falta de higiene, tabagismo, alcoolismo, pessoas imunodeprimidas, como portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), diabetes, insuficiência renal crônica, favorece o estabelecimento da doença (BRASIL, 2002; FURTADO, 2010; SECRETARIA DA SAÚDE, 2010; REDE TB, 2012).

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

Para a prevenção da doença devem-se evitar aglomerações, especialmente em ambientes fechados, mal ventilados e sem iluminação solar, além da imunização das crianças de 0 a 4 anos, obrigatoriamente as menores de 1 ano, com a vacina

BCG (Bacilo Calmette-Guérin). Para as crianças que chegam aos postos de atendimento ainda não vacinadas, a vacina está contraindicada na existência de sintomas ou sinais de imunodeficiência (BRASIL, 2011a; BRASIL, 2012). Com a evolução do estudo da doença, as nações desenvolvidas acreditavam que no final do século XX a TB estaria erradicada ou confinada aos países pobres. Entretanto, com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em 1981, ocorreu um aumento no número de casos notificados de TB em pessoas infectadas pelo VIH. Além disso, os intensos movimentos migratórios populacionais, a desestruturação dos sistemas de saúde pública, a crise social/financeira mundial, o empobrecimento da população, a urbanização caótica e a ausência de controle social vêm dificultando o controle da doença (CONDE, SOUZA, KRITSKI, 2002; SECRETARIA DA SAÚDE, 2010).

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

## 1.2 O CONTROLE DA TUBERCULOSE

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

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

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

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

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

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

O DOTS constitui uma mudança na forma de administrar os medicamentos, porém sem mudanças no esquema terapêutico: o profissional treinado passa a exercer supervisão do tratamento, diária ou três vezes na semana, desde o início até

a sua cura. O paciente poderá tomar o medicamento na unidade de saúde, na residência ou no trabalho. Estas escolhas deverão ser decididas pelo próprio e pela equipe de saúde. O uso de incentivos (lanche, auxílio-alimentação e outros) e facilitadores de acesso (vale-transporte) está recomendado como motivação para o tratamento. Para definir se o tratamento foi observado, o paciente deverá ter tido no mínimo 24 ingestões observadas na fase de ataque e 48 ingestões observadas na fase de manutenção ao final do tratamento (BRASIL, 2011).

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

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

No Brasil, a região norte apresentou a maior taxa de incidência de TB em 2012, tendo o estado do Amazonas a maior taxa dentro da região. A região nordeste apresentou a maior taxa de mortalidade da doença em 2011. Porém, isoladamente por estado, o Rio de Janeiro é o que possui a maior taxa de mortalidade, seguido do estado de Pernambuco, que ficou em segundo lugar. As taxas de incidência e mortalidade, por região e estados, estão descritas no quadro 1 (BRASIL, 2013a). Curiosamente, o Distrito Federal apresentou a mesma incidência observada para o estado de Tocantins.

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



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

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

Fonte: BRASIL, 2013a.

Quadro 2: incidência de tuberculose em cinco municípios do Rio de Janeiro

Município	Número de casos	Taxa de incidência por 100 mil habitantes
Rio de Janeiro	7.433	91,2
Duque de Caxias	977	81,9
Nova Iguaçu	729	75
São Gonçalo	680	49,1
São João de Meriti	531	93

Fonte: BRASIL, 2013b.

Das notificações realizadas no estado do Rio de Janeiro (14.039) em 2012, 11.149 ou 79, 41% se referem a casos novos da doença. O Rio também concentra a maior parte dos casos em pacientes que apresentam resistência à medicação usada

no tratamento. Entre os 14.039 casos de tuberculose no estado, 954 se referem a pacientes que retomaram o tratamento depois de abandoná-lo. De 2009 a dezembro de 2012, 33 municípios fluminenses diagnosticaram 551 pacientes resistentes.

Não é por acaso que o estado apresenta as maiores taxas de incidência da doença. Segundo o censo de 2010 realizado pelo IBGE, o RJ concentra 96% de sua população em áreas urbanas e tem densidade demográfica de 368 habitantes por km<sup>2</sup>, quando no Brasil a média é de 22,4 habitantes por km<sup>2</sup>. (BRASIL, 2013).

### 1.3 O TRATAMENTO

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

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

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

Em 2009, o PNCT junto com o seu comitê técnico assessor, reviu o sistema de tratamento da TB no Brasil. Os resultados preliminares do II Inquérito Nacional de Resistência aos Medicamentos antiTB conduzido em 2007-2008, mostraram um aumento da resistência primária à isoniazida (de 4,4 % para 6,0 %) e da resistência primária à isoniazida associada a rifampicina (de 1,1 para 1,4 %), quando comparadas com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado em 1995-1997. Com base nestes resultados, alterou o Esquema básico, a fim de aumentar o sucesso terapêutico e evitar o aumento da multirresistência. Acrescentou ainda a

apresentação de comprimidos em doses fixas combinadas (DFC) associando os quatro fármacos (4 em 1), nas seguintes dosagens: rifampicina 150 mg, isoniazida 75 mg, pirazinamida 400 mg e etambutol 275 mg, conforme descrito no quadro 3 (BRASIL, 2008, BRASIL, 2011), seguidos de manutenção de tratamento com DFC contendo os dois fármacos já consagrados: rifampicina 300 mg com isoniazida 200 mg ou rifampicina 150 mg com isoniazida 100 mg, conforme peso do paciente.

O esquema básico com quatro fármacos é indicado pela OMS, e mundialmente utilizado, para os dois primeiros meses (fase intensiva), e o esquema com dois fármacos, para os quatro meses seguintes (fase de manutenção) conforme mostrado no quadro 3, apresentando excelentes resultados quanto à efetividade, em particular pela maior adesão ao tratamento.

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

As DFC também têm desvantagens. Primeiro, em relação às dosagens que podem não estar adequadas para o caso. Segundo, os profissionais de saúde devem estar comprometidos com a avaliação do paciente adaptando as dosagens medicamentosas. Terceiro, foi constatado que em algumas DFC a rifampicina tem fraca biodisponibilidade, particularmente nas combinações de 3 e 4 drogas. Assim, é essencial assegurar a qualidade das DFC. Finalmente, o uso de DFC não exclui a necessidade de dispor de formulações em drogas separadas para os doentes que desenvolvem efeitos secundários (BWIRE, 2003).

Quadro 3 - Esquema básico para o tratamento da TB para adultos e adolescentes.

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

Fonte: BRASIL, 2011.

Os medicamentos disponibilizados pelo MS para o tratamento da TB e distribuído pelo SUS são o comprimido de DFC de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, chamado COXCIP-4, e o comprimido ou cápsula de isoniazida com rifampicina (dois em um). Atualmente a produção, distribuição e comercialização de medicamentos no país são reguladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que tem por finalidade institucional promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos e dos insumos e das tecnologias a eles relacionadas, bem como o controle de portos, aeroportos e de fronteiras, pela Lei nº 9782 de 1999 definindo o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) que ainda apresenta-se em vigor (BRASIL, 1999; BUENO, 2005).

O controle sanitário dos medicamentos após a comercialização, desempenhado pela agência, conta com as vigilâncias estaduais e municipais e com o auxílio dos Laboratórios Centrais (LACEN) e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que têm como uma de suas funções a avaliação

analítica de alimentos, produtos biológicos, medicamentos e produtos para saúde, para fornecer subsídios e elucidar dúvidas quanto à qualidade mínima dos produtos sujeitos à vigilância sanitária, e vem ao longo dos anos comprovando a possível ineficácia terapêutica de muitos medicamentos, levando ao recolhimento destes do mercado (SOUZA, 2011).

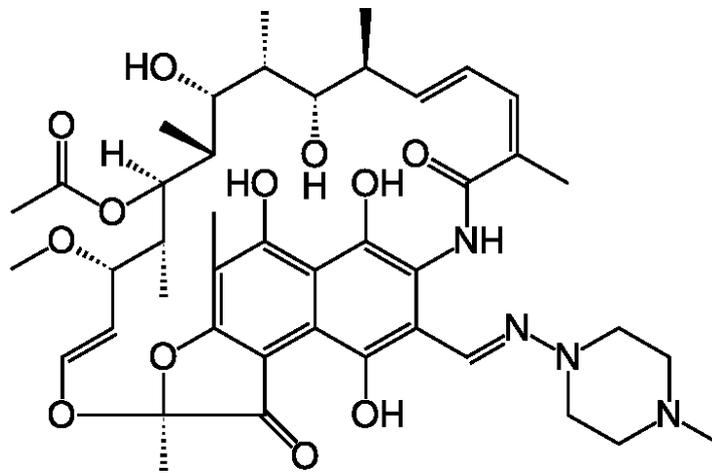
## 1.4 FÁRMACOS DO MEDICAMENTO DFC

### 1.4.1 Rifampicina

A Rifampicina (RMP) é um antibiótico bactericida e um dos tuberculostáticos ativos mais conhecidos. É uma substância semissintética produzida a partir da RMP B, obtida pela fermentação da *Streptomyces mediterranei*. A partir da sua utilização em 1966, a RMP vem sendo utilizada como o fármaco fundamental no tratamento da TB, apresentando um sucesso terapêutico da ordem de 95 %. A concentração inibitória mínima (CIM) para o *M. tuberculosis* é de 0,05-0,50 µg/mL. (ZHANG, 2005). O impacto e a eficácia desse fármaco no combate à TB podem ser observados pela redução do tratamento de doze para seis meses, quando combinada com a isoniazida e pirazinamida (SOUZA, 2005). Ela é um fármaco bactericida que atua tanto no bacilo em crescimento e metabolicamente ativo quanto na fase estacionária, com metabolismo reduzido (BLUMBERG, 2003).

A RMP apresenta fórmula molecular  $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$  e massa molar de 822,94 g/mol e sua estrutura química está representada na Figura 1. É um pó cristalino de cor marrom avermelhado, possui ponto de fusão (PF) de 183 a 188 °C, com decomposição. É levemente solúvel em água, etanol, acetona e solúvel em metanol e tetrahidrofurano e facilmente solúvel em clorofórmio e sulfóxido de dimetila (DMSO). Apresenta características anfóteras com pka de 1,7 referente à hidroxila na posição 4 e pka 7,9 em função do nitrogênio no grupo piperazina. Sua solubilidade e estabilidade variam de acordo com o pH, devido à sua natureza anfótera. A máxima estabilidade da RMP é verificada em soluções com pH próximo da neutralidade. A adição de ácido ascórbico à solução aumenta a solubilidade da RMP e diminui a sua oxidação (GALLO, RADAELLI, 1976; CONNORS, AMIDON, STELLA, 1986).

Figura 1: Estrutura química da Rifampicina



#### 1.4.1.1 Mecanismo de ação da Rifampicina

A rifampicina inibe a transcrição gênica da micobactéria por bloqueio da RNA polimerase DNA dependente, o que impede a síntese de RNA mensageiro (RNAm) e de proteína pelo bacilo, produzindo morte celular (RAMASWAMY, 1998).

#### 1.4.2 Isoniazida

A isoniazida (INH) é um dos mais importantes fármacos no tratamento da tuberculose. É utilizada desde 1952. Tem estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida, e sua CIM para o *Mycobacterium tuberculosis* varia de 0,02-0,20 µg/mL (ZHANG, 2005).

Derivado sintético do ácido isonicotínico, possui ação bacteriostática, nos bacilos em crescimento lento, e bactericida, para microrganismos em rápida divisão, como nos bacilos intracelulares (BASTOS, 2006). É considerado um fármaco de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de tuberculose. Devido a possibilidade de gerar resistência microbiana, deve estar associada simultaneamente com outros tuberculostáticos. Se não houver contraindicação ou

resistência ao medicamento, ela é incluída em todos os esquemas terapêuticos (KATZUNG, 2005).

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

Figura 2: Estrutura química da isoniazida:



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

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

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

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

#### 1.4.2.1 Mecanismo de ação da isoniazida

É um agente bactericida sintético notavelmente seletivo para micobacterias. Possui ação bacteriostática para o bacilo semidormente e bactericida para os microorganismos em rápida divisão (MANDEL; PETRI, 1996).

A isoniazida é uma pré-droga que necessita ser ativada pela enzima catalase/peroxidase (KatG) do *M. tuberculosis*, conseqüentemente produzindo radicais reativos de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e peroxinitrato) e radicais orgânicos que inibem a formação de ácido micólico da parede celular, causando dano ao DNA e subsequente morte do bacilo (SLAYDEN, 2000). Timmins et al., sustentam que metabólitos da isoniazida inibem enzimas chaves na respiração da micobacterias aumentando seu poder bactericida (TIMMINS et al., 2004).

### 1.5. METODOLOGIAS ANALÍTICAS DE COMPÊNDIOS OFICIAIS

As farmacopeias que apresentam monografia específica para dosagem dos dois fármacos presentes na mesma formulação de DFC são a Farmacopeia Americana (USP) 37<sup>a</sup> edição (2014) e a Farmacopeia Internacional (Ph. Int.) 4<sup>a</sup> edição (2014). A Farmacopeia Brasileira (FB) 5<sup>a</sup> edição (2010) só possui monografia para análise de formulação de cada um dos ativos individualmente.

A USP recomenda o uso de uma metodologia para a dosagem dos fármacos 2 em 1 por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por Ultravioleta (UV). Na Ph. Int. a metodologia para a determinação do teor de INH é realizada separadamente da determinação da RMP. Os diluentes para a análise de

RMP só diferem nas proporções: o diluente da USP usa 96:4 e o da Ph. Int. usa 60:40 da mistura tampão fosfato pH ~ 7 e metanol, respectivamente.

A técnica de análise da RMP e INH na USP baseia-se em uma eluição por gradiente utilizando duas misturas nas proporções de tampão fosfato, pH 6,8 e metanol em fase octadecilsilano. A leitura é efetuada em um comprimento de onda de 238 nm (USP 37-NF32, 2014). Os dois fármacos numa única corrida, na mesma coluna e mesmo comprimento de onda.

Na Ph. Int., o método de análise da INH, utiliza-se da fase móvel contendo uma solução de acetato de amônio e acetato de cobre pH 5,0 e metanol (94:6) em um método isocrático em fase de octadecilsilano com leitura efetuada em um comprimento de onda de 240 nm. Já a análise da RMP é realizada em um comprimento de onda de 254 nm, em fase de sílica, com 5 µm de diâmetro de partícula, derivatizada com octadecilsilil, com o método isocrático (FARMACOPEIA INTERNACIONAL, 2014). Nesse caso, são duas corridas diferentes, duas colunas, com dois comprimentos de onda.

## 1.6. VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO CONTEXTO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA DFC 2 EM 1 DE ISONIAZIDA + RIFAMPICINA

A indústria farmacêutica deve se responsabilizar pela qualidade dos produtos farmacêuticos, assegurando a adequação dos mesmos com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos e, cumprir com as exigências relativas ao registro, não colocando os pacientes em risco, em função de erros que possam comprometer a segurança, qualidade ou eficácia dos próprios. Assim, para se alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessária a implantação de um sistema de garantia de qualidade, que incorpore as Normas de Boas Práticas de Fabricação e de Laboratório, no qual os estudos da validação constituem parte essencial destas normas (VALENTINI, 2002).

Durante o ano de 1990, as agências regulatórias dos Estados Unidos (“FDA, Food and Drug Administration”), Japão (MHLW, “Ministry of Health, Labour and Welfare”) e União Europeia (EMA, “European Medicine Agency”) passaram a

organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, “International Conference on Harmonisation”), a fim de estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos. Neste contexto, o ICH elaborou um guia sobre validação de métodos que tem sido a principal fonte de referência até hoje para indústrias farmacêuticas e afins (RIBEIRO et al, 2008). E nesse contexto, a Vigilância Sanitária municia-se de recursos normativos e técnicos para atuar na fiscalização da fabricação e distribuição desses produtos de tamanho interesse nacional.

As técnicas para a análise desta DFC apresentam algumas desvantagens, como o alto custo por utilizarem grande quantidade de solventes orgânicos, causando impacto negativo na saúde do trabalhador e no meio ambiente (FARMACOPEIA, 2010; USP, 2014). Tendo em vista que o preço de um medicamento é composto não só pelo custo da sua produção, como também das análises as quais esse medicamento é submetido para o controle de qualidade, métodos analíticos de baixo custo adquirem grande importância. A Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, que dispõe sobre a organização e o funcionamento dos serviços intrínsecos à saúde, define como uma das competências da Vigilância Sanitária: “a colaboração na proteção do meio ambiente, nele compreendido, o do trabalho” (BRASIL, 1990). Levando em consideração que a metodologia analítica por eletroforese capilar (EC) utiliza pouco ou não utiliza solventes orgânicos, a substituição dos métodos cromatográficos na indústria farmacêutica por métodos de eletroforese capilar pode possuir grande relevância no contexto da Vigilância Sanitária por contribuir para a redução dos resíduos químicos gerados. Além disso, também é relevante por ocasionar menor exposição do trabalhador a solventes orgânicos que, em sua maioria, apresentam grande toxicidade. Sendo assim, é positivo para o campo de alcance da Vigilância Sanitária o desenvolvimento de uma metodologia analítica para a análise da formulação de dose fixa combinada de isoniazida e rifampicina por EC, que possa vir a substituir no futuro os métodos cromatográficos utilizados atualmente, representa uma estratégia para diminuir o custo do medicamento, reduzir a utilização de solventes orgânicos e, também, a geração de resíduos.

## 1.7 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

### 1.7.1 Definição

A EC é uma técnica de instrumentação analítica utilizada para detecção, separação e/ou quantificação de moléculas e íons de origem química ou biológica. É definida como o transporte, em solução eletrolítica, de substâncias carregadas eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com as diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas. A velocidade do analito pode ser calculada de acordo com a seguinte equação (LANDERS, 1996):

$$V_i = \mu_e \cdot E$$

Sendo que,

$V_i$  = velocidade do analito

$E$  = campo elétrico

$\mu_e$  = mobilidade eletroforética

### 1.7.2 Fluxo eletrosmótico (FEO)

Um componente fundamental da operação de EC é o fluxo eletrosmótico (FEO). O FEO é o fluxo de massa de líquido no tubo capilar e é uma consequência da carga da superfície na parede interna dos capilares. O FEO resulta do efeito do campo elétrico aplicado partindo do anodo, que repele as cargas positivas da solução que formam a dupla camada na parede da coluna. Em capilares de sílica fundida, o fluxo eletrosmótico é formado a partir da ionização dos grupos silanóis presentes na parede do capilar. Quando uma solução alcalina passa através do capilar, este adquire uma carga negativa. A seguir uma camada de contra íons é formada a fim de manter a eletroneutralidade, o que origina uma dupla camada elétrica composta por uma camada fixa e outra móvel. Quando se aplica um campo elétrico, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa. Com isto, os íons arrastam moléculas de água pelo efeito da solvatação, formando um fluxo que é direcionado para o catodo, enquanto a parede do capilar permanece negativa. Neste caso, os cátions e o FEO migram em direção ao catodo, sendo que os cátions migram mais rapidamente, pois sofrem atração em direção a este polo. Espécies

neutras são carregadas na mesma velocidade do fluxo eletroosmótico e não sofrem separação. Ânions migram mais lentamente, pois são atraídos pelo anodo, porém ainda assim, são carregados pelo FEO em direção ao catodo (HEIGER, 1997).

### 1.7.3 Histórico

A eletroforese como uma técnica de separação foi introduzida por Tiselius em 1937. Colocando em um tubo misturas de proteínas entre soluções eletrolíticas e aplicando um campo elétrico, o pesquisador percebeu que os componentes da amostra migravam em uma direção e com uma taxa determinada pela sua carga e mobilidade. Por esse trabalho de separação, Tiselius recebeu o Prêmio Nobel (HEIGER, 1997).

O final da década de 1980 e início dos anos 1990 viram o advento comercial da instrumentação da EC e a transformação de uma técnica de pesquisa em uma tecnologia de rotina em muitos ambientes industriais (HEIGER, 1997).

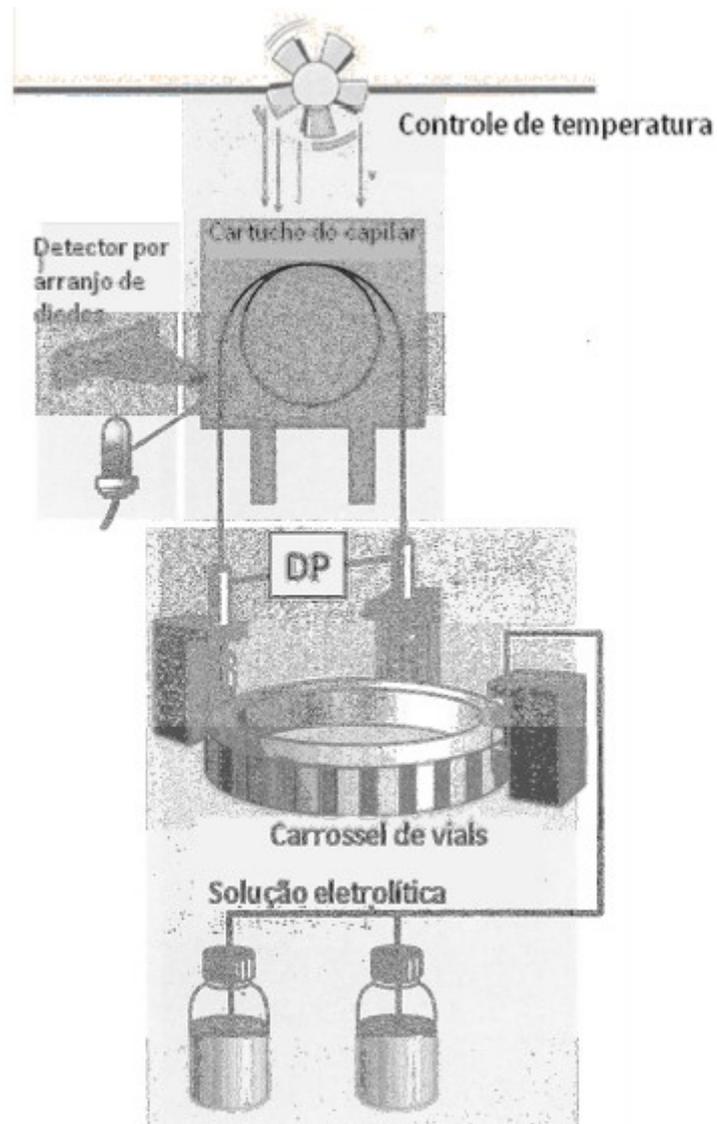
A análise de pequenas moléculas, como fármacos e agroquímicos, não foi historicamente estabelecida por EC, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a técnica mais utilizada nestas áreas. A EC foi, gradualmente, se estabelecendo como uma técnica alternativa e uma técnica de apoio para a CLAE.

### 1.7.4 Instrumentação

A instrumentação utilizada consiste no emprego de uma solução eletrolítica na qual são imersos eletrodos de platina. Através de uma fonte de alta tensão aplica-se uma diferença de potencial na solução eletrolítica onde também estão imersos as extremidades do capilar. O campo elétrico gerado é o responsável pela separação dos analitos que serão direcionados para um sistema de detecção. A amostra é introduzida no capilar através da aplicação de uma pressão. Esse é um dos modos mais utilizados para a introdução da amostra, porém, há outros como, por exemplo, a aplicação de uma diferença de potencial ou de vácuo. A Figura 3 apresenta o esquema da instrumentação utilizada (LANDERS, 1996).



Figura 3 – Esquema de instrumentação utilizada na EC.



Fonte: HEIGER, 1997.

Para otimizar a separação eletroforética, alguns fatores podem ser manipulados como o capilar, composição e concentração do tampão, temperatura, pH e diferença de potencial (HEIGER, 1997).

Segundo Heiger (1997) as soluções eletrolíticas devem apresentar as seguintes características:

- Constância no valor de pH (alta capacidade);
- Baixo valor de absorvância no comprimento de onda selecionado para a análise;

- Baixa mobilidade.

Existem diversos tipos de capilares, entre os quais se pode citar o de sílica fundida, que é o mais utilizado por possuir dimensões precisas, baixa condutividade elétrica, alta condutividade térmica e alta transmissão óptica para um intervalo do espectro de 190 a 900 nm. Há outros tipos de capilar com diversos revestimentos, como os revestidos com polímeros (HEIGER, 1997).

#### 1.7.5 Modos de separação

Os modos mais utilizados de separação em eletroforese capilar são os seguintes:

- Eletroforese capilar em zona livre, conhecida pela sigla CZE, do inglês “capillary zone electrophoresis”: separa substâncias carregadas eletricamente. Consiste na aplicação de um campo elétrico a um tubo capilar que é preenchido com o eletrólito (solução tampão). É o modo mais simples e o mais utilizado (LANDERS, 1996).
- Cromatografia eletrocinética micelar, do inglês “micellar electrokinetic chromatography” (MECK): separa tanto as substâncias carregadas eletricamente quanto as de carga neutra. Consiste na adição à solução eletrolítica de um surfactante, com concentração igual ou superior à concentração micelar crítica. Assim, propicia a partição diferenciada das espécies entre duas fases, através da formação de micelas que interagem com as moléculas não ionizáveis. As micelas são essencialmente esféricas, com as porções hidrofóbicas das moléculas do surfactante orientadas em direção ao centro, para evitar a interação com o tampão hidrofílico, e a porção carregada orientada para o tampão (HEIGER, 1997). O surfactante aniônico mais utilizado é o dodecil sulfato de sódio (SDS), pois apresenta baixa absorvância no UV e alta solubilidade (ALTRIA, 1999).

#### 1.7.6 Aplicabilidade

A EC vem sendo utilizada com sucesso em muitas áreas de aplicação. As mais frequentes são as análises de produtos farmacêuticos, porém, há outras, como

o controle de qualidade de imunobiológicos, as análises ambientais, o sequenciamento de DNA, a análise de proteínas e peptídeos e a separação de compostos quirais (HEIGER, 1997).

A análise de produtos farmacêuticos é predominantemente realizada utilizando a CLAE em diversas áreas de aplicação, incluindo análise de teor, a determinação de substâncias relacionadas, impurezas, as separações quirais, determinações em nível de traço e de quantificação de íons metálicos e ânions inorgânicos. Estas áreas de aplicação são igualmente possíveis pela EC. Portanto, EC é geralmente considerada como uma técnica complementar ou alternativa para a CLAE para a análise farmacêutica. Métodos de EC foram validados com êxito e foram incluídos nas submissões às autoridades regulatórias. A EC também está incluída em farmacopeias. Atualmente, mais de 50 % dos instrumentos de EC mundiais estão localizados em empresas farmacêuticas (ALTRIA, 1999).

Em relação à CLAE, a EC tem uma série de vantagens a oferecer podendo-se citar: menor tempo de desenvolvimento do método, os custos operacionais reduzidos, o pequeno consumo de solventes orgânicos, além de uma maior eficiência na separação (maior número de pratos teóricos) e análise de solutos com poucos cromóforos no ultravioleta (ALTRIA, 1999).

Os fármacos, em sua grande maioria, são bases fracas e estão protonadas (carregadas positivamente) em baixos valores de pH. Portanto, uma solução eletrolítica com baixo valor de pH como o fosfato de sódio pode ser aplicado a uma grande quantidade de drogas básicas. Drogas ácidas podem ser resolvidas utilizando-se um pH próximo a 7 ou superior, utilizando um tampão borato ou fosfato. A separação de fármacos neutros requer a utilização do modo de separação por cromatografia eletrocínética micelar (HEIGER, 1997).

## 1.8 VALIDAÇÃO

O controle de qualidade de produtos farmacêuticos apresenta-se como um conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos, para que satisfaçam as normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade (ANVISA, 2003). Para garantir que os resultados do controle de qualidade sejam verdadeiros, é necessária a utilização de métodos oficiais ou validados. A validação é um dos meios universalmente reconhecidos como uma

parte necessária para a garantia do sistema de qualidade na química analítica. Thompson e colaboradores destacam que métodos analíticos validados e, portanto confiáveis, são requeridos para a submissão a agências reguladoras nacionais e internacionais em todas as áreas de análise (THOMPSON et al., 2006).

O objetivo de uma validação no controle de qualidade de formulações farmacêuticas é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (ANVISA, 2003). Segundo o INMETRO (2011), a validação é necessária para:

- Métodos não normatizados;
  - Métodos criados/desenvolvidos no próprio laboratório;
  - Métodos normatizados usados fora dos escopos para os quais foram desenvolvidos;
  - Ampliações e modificações de métodos normatizados.
- (INMETRO, 2011, p. 4)

Para o planejamento de uma validação é necessário definir os parâmetros e os critérios de aceitação dessa validação, de acordo com a finalidade pretendida. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 29 de maio de 2003, define a categoria à qual o teste pertence de acordo com a finalidade, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação dos testes, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
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.

Para cada categoria será exigido um conjunto de parâmetros, dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade (ANVISA, 2003).

Parâmetro	Categoria I	Categoria II	Categoria III			Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio Limite		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*		Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*		Não
Faixa Linear	Sim	Sim	*	*		Não
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim		Não
Precisão 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 à comprovação da Precisão Intermediária.

### 1.8.1 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003; INMETRO 2011).

A RDC 899, de 23 de maio de 2003, recomenda que a faixa linear deva englobar o intervalo de 80 % a 120 % da concentração teórica do teste e que seja determinada através da análise de no mínimo cinco pontos de concentração (ANVISA, 2003).

O procedimento de linearidade descrito por Souza e Junqueira (2005) sugere que a avaliação da linearidade deve ser realizada através dos seguintes testes estatísticos:

- Normalidade dos resíduos – Teste de Ryan- Joiner
- Homogeneidade dos resíduos – Teste de Brown- Forsythe
- Autocorrelação dos resíduos – Teste de Durbin- Watson

Caso o método satisfaça as premissas da avaliação da linearidade procede-se à análise de variância da regressão, através do método dos mínimos quadrados e falta de ajuste, por meio da análise de variância (ANOVA) (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

#### 1.8.2 Seletividade

É a característica do método de garantir que não haja interferentes sendo identificados e/ou quantificados juntamente com o analito de interesse. Os experimentos para a avaliação da seletividade encontrados na literatura descrevem ensaios com o material de referência certificado, amostras com ou sem o analito e a avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

Para a análise quantitativa, a seletividade pode ser avaliada através do estudo do efeito matriz. Souza e Junqueira (2005) descreveram o procedimento de efeito matriz da seguinte forma:

- Elaborar uma curva denominada de solventes, com o analito de interesse;
- Elaborar uma segunda curva com a presença da matriz da amostra que se pretende analisar, adicionando-se o analito de interesse.

Após a verificação do cumprimento das premissas da linearidade já descritas, procede-se a avaliação do efeito matriz, comparando as inclinações e interseções das curvas de solvente e de matriz através do teste *t* com variâncias combinadas (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). Para a determinação de impurezas, quando esta ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, podem-se comparar

os resultados do teste das amostras armazenadas sob condições de estresse como luz, calor, umidade, hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (ANVISA, 2003).

### 1.8.3 Precisão

A precisão de um método analítico expressa a proximidade das medições de uma mesma amostra através do grau de dispersão dos resultados. A precisão deve ser investigada entre uma série de replicatas genuínas obtidas de uma amostra homogênea sob um procedimento bem documentado. Esta é considerada em três níveis (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011):

a) Repetibilidade (precisão intra-corrída): é a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo com as mesmas condições de operação, isto é, mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 replicatas cada ou, mínimo de 6 determinações a 100 % da concentração do teste (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

b) Precisão intermediária (precisão inter-corrídas ou reprodutibilidade parcial): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém obtidos com uma variação dentro desse laboratório como, por exemplo, resultados obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (ICH, 2005).

c) Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para a inclusão de metodologia em farmacopeias (ICH, 2005). A precisão é usualmente expressa como variância, desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de medições (ICH, 2005).

### 1.8.4 Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor que é aceito ou é padronizado como valor real ou valor de referência (ANVISA 2003; ICH 2005). Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis (INMETRO, 2011):

a) Procedimento de recuperação: realiza-se a análise de uma amostra, na qual uma quantidade conhecida do fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);

b) Veracidade: nos casos em que as amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, utilizando um material de referência certificado. A exatidão é calculada como percentual de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três replicatas cada (ANVISA, 2003; INMETRO, 2011).

#### 1.8.5 Robustez

É a medida da capacidade do método de apresentar precisão e exatidão após pequenas e deliberadas modificações nos seus parâmetros. A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante as análises de rotina (ICH, 2005).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O objetivo deste projeto é validar um método analítico para a determinação de fármacos tuberculostáticos em formulações DFCs por eletroforese capilar.

### 2.2 Específicos

a) Otimizar o método analítico por eletroforese capilar em zona livre para análise de comprimidos DFC contendo 200 mg de isoniazida e 300 mg de rifampicina fabricados em Farmanguinhos, adequadamente quantificáveis;

b) Validação do método analítico.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS

- Bureta volumétrica de 5 mL calibrada;
- Bureta volumétrica de 25 mL calibrada;
- Bureta volumétrica de 50 mL calibrada;
- Balões volumétricos de 10 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL calibrados;
- Gral e pistilo;
- Frasco em polipropileno de 1000  $\mu$ L, Agilent Technologies;
- Tampa em poliuretano para frasco de amostragem para uso em eletroforese capilar, Agilent Technologies;
- Capilar de sílica fundida recoberto com poliimida de 64,5 cm de comprimento total (56 cm de comprimento efetivo) e 50  $\mu$ m de diâmetro interno;
- Cartucho de membrana filtrante de nylon, de 0,22  $\mu$ m de diâmetro de malha.

#### 3.2 EQUIPAMENTOS

- Equipamento de eletroforese capilar HP 3CE, com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), equipado com controle de temperatura por ar forçado, eletrodos de platina e “ChemStation Software”, modelo G1601A, para controle do equipamento e tratamento de dados;
- Balança analítica, modelo R 200 D, com cinco casas decimais, marca Sartorius;
- Sistema de purificação de água marca Millipore, modelo Milli Academic, EUA;
- Voltímetro acoplado a eletrodo de vidro, com referência prata-cloreto de prata; marca Corning, modelo 440, calibrado diariamente com soluções pH= 4,0 e 10;
- Agitador de tubos marca Marconi, modelo MA 162;
- Banho ultra-sônico, marca Branson Ultrasonic, modelo 3200.

### 3.3 AMOSTRAS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico e os solventes são de grau para CLAE.

- Substância Química de Referência (SQR) Isoniazida (INCQS) – padrão primário;
- Substância Química de Referência (SQR) Rifampicina (USP) – padrão primário;
- Matéria-prima de Isoniazida (LQFEx) – padrão secundário;
- Matéria-prima de Rifampicina (LQFEx) – padrão secundário;
- Comprimidos de Isoniazida 200mg + Rifampicina 300mg (Farmanguinhos);
- Metanol, Merck;
- Ácido Bórico hexahidratado, Peso molecular: 61,83 g/mol, Merck;
- Hidróxido de sódio 1 mM, Agilent;
- Hidróxido de sódio 0,1 mM, Agilent;
- Água grau reagente, tipo I, ultrapura Millipore.
- Acetonitrila grau Lichrosolv, Merck);

### 3.4 ELETROFORESE CAPILAR

Os experimentos de EC foram realizados no setor de Contaminantes Orgânicos, Departamento de Química, INCQS – FIOCRUZ – RJ.

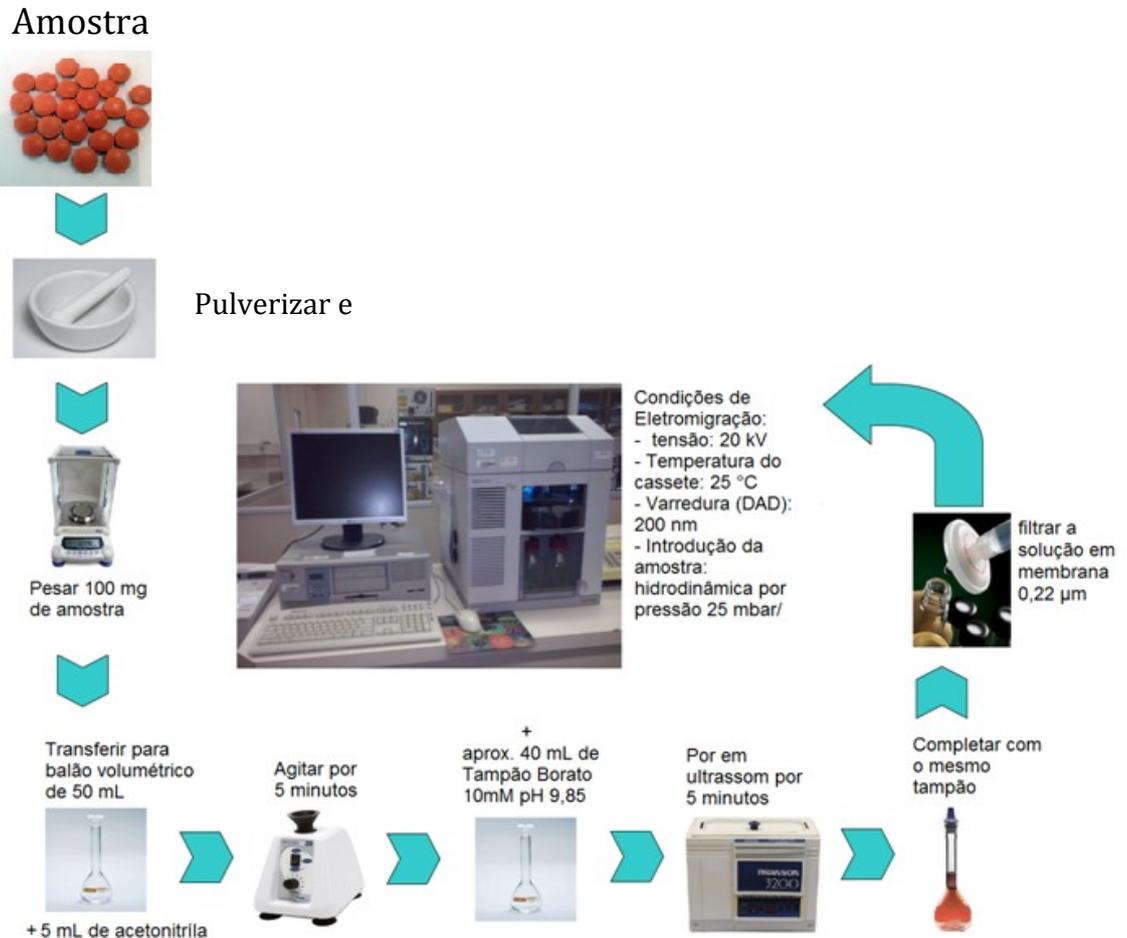
#### 3.4.1 Procedimentos gerais

##### 3.4.1.1 Preparo da solução extratora de tampão de borato de sódio 10 mM pH 9,85

Em um balão volumétrico de 1000 mL pesou-se 618 mg de ácido bórico diluindo-se com aproximadamente 980 mL de água. A solução foi submetida ao ultra-som por 10 minutos e o pH foi ajustado para 9,85 com solução de NaOH 0,1M.

O volume foi completado após ter alcançado a temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada com membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Figura 4: Esquema de apresentação da metodologia



#### 3.4.1.2 Preparo da solução de borato de sódio 60 mM pH 9,85 (eletrólito de corrida)

Em um balão volumétrico de 100 mL pesou-se 370,8 mg de ácido bórico diluindo com aproximadamente 98,5 mL de água, levada ao ultra-som por 10 minutos e o pH ajustado para 9,85 com NaOH 0,1 M. O volume foi completado para 100 mL com água. A solução foi filtrada com membrana filtrante de 0,22 $\mu\text{m}$ .

#### 3.4.1.3 Cálculo dos pontos da curva analítica (desenho experimental)

O cálculo para o estabelecimento da faixa de trabalho da concentração de isoniazida a ser utilizada, para verificar a faixa de concentração em que o detector

demonstra resposta linear, foi baseado na concentração da alíquota de análise da amostra a ser analisada na solução extratora. Para a análise de teor dos princípios ativos de um lote de medicamento são tomados vinte comprimidos que em seguida são triturados e homogeneizados. O peso médio de um comprimido do medicamento analisado foi de 734,81 mg.

a) Isoniazida (INH)

Partindo-se da premissa que quando a análise da formulação for realizada serão tomados 100 mg da mistura do comprimido pulverizado e diluídos para o volume final de 50 mL com a solução extratora, a concentração final de isoniazida será de 544,35  $\mu\text{g/mL}$ . Desta forma a concentração de 550  $\mu\text{g/mL}$  foi estabelecida como ponto central da curva. Trabalhando-se com a faixa contendo 50 a 150 % do ativo o ponto de menor concentração seria 275  $\mu\text{g/mL}$  e o maior conteria 825  $\mu\text{g/mL}$ . Por questões práticas foram preparados sete níveis de concentração em intervalos de 100  $\mu\text{g/mL}$  na faixa de concentrações entre 200 e 800  $\mu\text{g/mL}$ .

b) Rifampicina (RMP)

Seguindo o raciocínio anterior, para a determinação dos níveis de concentração da curva analítica para rifampicina, leva-se em consideração sua concentração final na solução de amostra. Assim sendo, em uma amostra de 100 mg da mistura do comprimido pulverizado e diluída em 50 mL da solução extratora tem a concentração de 816,54  $\mu\text{g/mL}$  de rifampicina. Esta concentração é equivalente ao ponto central da curva analítica. Para uma faixa de trabalho de 50 a 150 %, a menor concentração seria 408,27  $\mu\text{g/mL}$  de rifampicina. Visando a facilitação do preparo das concentrações e respeitando o intervalo equidistante entre os níveis de concentração da faixa de trabalho, foram preparados sete pontos entre 500 a 1100  $\mu\text{g/mL}$  com intervalo de 100  $\mu\text{g/mL}$  entre os mesmos.

### 3.4.2 Preparo da Amostra de DFC dois em um

a) Amostragem

O peso médio dos comprimidos foi obtido a partir da pesagem individual de 20 unidades. Posteriormente, os comprimidos foram triturados e homogeneizados com o auxílio de um gral e pistilo.

b) Procedimento analítico para amostra DFC dois em um:

A partir da mistura homogeneizada, são pesadas amostras de 100 mg. Essas amostras são transferidas para balões volumétricos com capacidade de 50 mL e adicionados 10 % de seu volume total, ou seja, 5 mL do solvente acetonitrila. A solução sofre o primeiro processo de extração com o auxílio do vortex por 5 minutos. Aproximadamente 40 mL da solução de borato de sódio 10 mM tamponado em pH 9,85 é adicionado no balão e em seguida levado ao ultra-som por 5 minutos. O volume do balão é completado com a mesma solução tampão.

A filtração da solução resultante é realizada em membrana filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$  para serem analisadas no equipamento de eletroforese capilar (AZEVEDO, SIMÕES & ABRANTES, 2008; RIBEIRO et al, 2008).

### 3.5 CONDIÇÕES ANALÍTICAS DE ELETRO-MIGRAÇÃO ESTUDADAS NO MODO CZE

- Capilar de sílica fundida: 64,5 cm (56 cm de comprimento efetivo) x 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno;
- Tensão: 20 kV;
- Temperatura do cassete: 25 °C;
- Varredura (DAD): monitorando o comprimento de onda de 200 nm;
- Introdução das amostras: hidrodinâmica por pressão a 25 mbar/3s de amostra, seguida de 25 mbar/2s de eletrólito. Foi realizada uma introdução de cada amostra para cada experimento;
- Eletrólitos: soluções contendo 60 mM de borato de sódio pH 9,85.

### 3.5.1 Tratamento inicial dos capilares

O capilar virgem foi condicionado com um fluxo de metanol por 5 min, NaOH 1 M por 5 min, água por 5 min e eletrólito de corrida por 20 min.

### 3.5.2 Condicionamento dos capilares

Pré-condicionamento: Entre análises, foram introduzidos nos capilares uma solução de NaOH 0,1 M durante um minuto, água por dois minutos e eletrólito de corrida por três minutos.

Pós-condicionamento: Foi realizado introduzindo água por três minutos no capilar.

## 3.6. VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL

### 3.6.1 Linearidade

#### 3.6.1.1. Teste de linearidade para isoniazida

Procedimento: Para a avaliação de linearidade da faixa de trabalho proposta para isoniazida foram feitas três soluções concentradas independentes do padrão secundário de isoniazida gerando o preparo de três curvas analíticas. Inicialmente, a faixa de trabalho proposta foi de 200 a 800  $\mu\text{g/mL}$ . Segue-se o preparo das soluções concentradas e de trabalho.

Soluções concentradas: Pesar 100,00 mg do padrão de isoniazida e transferi-lo, quantitativamente com o auxílio do solvente acetonitrila (5mL), para balão volumétrico de 50 mL calibrado. Agitar a solução no vortex por 5 min. Acrescentar aproximadamente 40 mL de solução tampão de borato de sódio 10 mM e levar ao ultra-som por 5 min. Completar o volume do balão volumétrico com o mesmo tampão e homogeneizar a solução. Após as correções de pesagem e considerar os volumes reais do balão utilizado, a concentração final da solução será aproximadamente 2000,0  $\mu\text{g/mL}$ .

O preparo das soluções de trabalho: está resumido na tabela 3:

Tabela 3: Preparo das soluções de trabalho de isoniazida em balões volumétricos de 10 mL para estudo de linearidade:

Nível	Concentração Nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Alíquota da solução concentrada (mL)	Acetonitrila na alíquota ( $\mu\text{L}$ )	Adição de Acetonitrila ( $\mu\text{L}$ )	Volume de Tampão diluente borato de sódio 10mM pH 9,85 (mL)
1	200	1,0	100,0	900,0	9,0
2	300	1,5	150,0	850,0	8,5
3	400	2,0	200,0	800,0	8,0
4	500	2,5	250,0	750,0	7,5
5	600	3,0	300,0	700,0	7,0
6	700	3,5	350,0	650,0	6,5
7	800	4,0	400,0	600,0	6,0

### 3.6.1.2. Teste de linearidade para rifampicina

Avaliou-se a linearidade da faixa de trabalho proposta para rifampicina nas mesmas condições seguidas para determinação da linearidade da faixa de trabalho proposta para isoniazida, com a verificação estatística de homogeneidade de variância dos resíduos, normalidade, correlação dos resíduos e regressão de resultados obtidos pela confecção de três curvas analíticas.

Procedimento: Para a avaliação de linearidade para rifampicina foram feitas três soluções concentradas independentes do padrão secundário de rifampicina gerando três curvas analíticas. Inicialmente, a faixa de trabalho proposta foi de 500 a 1100  $\mu\text{g/mL}$ . Segue-se o preparo das soluções concentradas e de trabalho.

Soluções concentradas: Pesar 450,00 mg do padrão de rifampicina e transferi-lo, quantitativamente com auxílio do solvente acetonitrila (25 mL), para balão volumétrico de 250 mL calibrado. Agitar a solução no vortex por 5 min. Acrescentar aproximadamente 180 mL de solução de tampão de borato de sódio 10 mM pH 9,85 e levar ao ultra-som por 5 min. Completar o volume do balão com o

mesmo tampão e homogeneizar a solução. Após as correções de pesagem e consideração dos volumes reais do balão utilizado, a concentração final da solução foi de aproximadamente 1800,0 µg/mL.

Preparo das soluções de trabalho: Foi realizada diluição sucessiva para cada nível de concentração com volume final de 50 mL, conforme a tabela 4:

Tabela 4 : Preparo das soluções de trabalho de rifampicina, em balão volumétrico de 50 mL, para o estudo da linearidade.

Nível	Concentração Nominal (µg/mL)	Alíquota da solução concentrada (mL)	Acetonitrila na alíquota (mL)	Adição de Acetonitrila (mL)	Volume de Tampão diluente borato de sódio 10mM pH 9,85 (mL)
1	500	12,50	1,25	3,75	37,5
2	600	15,00	1,50	3,50	35,00
3	700	17,50	1,75	3,25	32,50
4	800	20,00	2,00	3,00	30,00
5	900	22,50	2,25	2,75	27,50
6	1000	25,00	2,50	2,50	25,00
7	1100	27,50	2,75	2,25	22,50

### 3.6.2 Efeito Matriz

#### 3.6.2.1 Teste de efeito matriz para isoniazida:

Procedimento: Duas soluções estoques provenientes do mesmo padrão, em concentração de 2000 µg/mL. independentes de isoniazida foram utilizadas para preparar seis níveis de concentração para duas curvas analíticas: 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, 500 µg/mL e 600 µg/mL, uma com solução extratora e outra em matriz do comprimido. As diluições das soluções estoques independentes de isoniazida (2000 µg/mL) para os pontos de concentração foram realizadas em solução extratora de acetonitrila e tampão de borato de sódio 10 mM pH 9,85 na proporção de 1:9. A matriz do comprimido 2 em 1 para isoniazida é composta de placebo e rifampicina.

Preparo da matriz: O peso médio programado para o conteúdo de um comprimido DFC 2 em 1 é de 747,72 mg com as massas exatas dos seguintes componentes:

Princípios ativos – 500 mg (INH 200 mg + RMP 300 mg);

Placebo do núcleo – 200,00 mg (celulose microcristalina, crospovidona, amido pré-gelatinizado, ácido ascórbico, água purificada, gelatina, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio);

Revestimento do núcleo: 47,72 mg (opadry 80w56578 brown).

Adotando o peso médio verificado nos comprimidos analisados, foi preparada uma mistura dos componentes da matriz em concentrações equivalentes as da tomada de amostra, excluindo a isoniazida, simulando um branco de amostra para isoniazida correspondente a 20 comprimidos. Após a mistura uniforme, pesou-se aproximadamente 73 mg da amostra em branco para isoniazida em balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 5 mL de acetonitrila e completou-se o volume com a solução extratora e homogeneizou-se a solução contendo a matriz previamente extraída sem o princípio ativo isoniazida.

Preparo das soluções concentradas: Pesar 450,00 mg do padrão de isoniazida e transferir para balão volumétrico de 250 mL calibrado solubilizando com 25 mL de acetonitrila e e agitando a solução por 5 min, depois adicionar 200 mL da solução tampão de borato de sódio 10 mM pH 9,85. Agitar a solução no vortex por 5 min. Avolumar o balão com o mesmo tampão e homogeneizar a solução. Após as correções dos erros de pesagem e volumes reais do balão utilizado, a concentração final da solução é aproximadamente 2000 µg/mL.

Preparo das soluções de trabalho: Cada nível de concentração das curvas com matriz foi obtido pela diluição de alíquotas da solução concentrada contendo a matriz previamente extraída. Nessa avaliação do efeito matriz foi considerada a confecção de seis pontos da curva analítica tanto em matriz como em solvente (200, 300, 400, 500, 600 e 700 µg/mL). Para os pontos de concentração em solvente, as diluições foram realizadas somente em solução extratora (acetonitrila e tampão borato de sódio 1:9). Ambas diluições foram realizadas para um volume final de 50

mL. A tabela 5 apresenta as concentrações das soluções de trabalho e os volumes tomados da solução estoque.

Tabela 5: Preparo das soluções de isoniazida em matriz e em solvente para a avaliação do efeito matriz.

Nível	Conc. Nominal (µg/mL)	Alíquota da solução concentrada (mL)	Quantidade aproximada de matriz (mg)
M1	200	5,00	73,00
S1	200	5,00	-
M2	300	7,50	73,00
S2	300	7,50	-
M3	400	10,00	73,00
S3	400	10,00	-
M4	500	12,50	73,00
S4	500	12,50	-
M5	600	15,00	73,00
S5	600	15,00	-
M6	700	17,50	73,00
S6	700	17,50	-

M= solução de trabalho para o nível de concentração da curva com matriz.

S= solução de trabalho para o nível de concentração da curva com solvente.

### 3.6.2.2. Avaliação do Efeito Matriz para Rifampicina

Procedimento: Para avaliar a influência da matriz do comprimido DFC 2 em 1 na análise quantitativa de rifampicina, duas curvas analíticas foram realizadas com matriz (contendo placebo e isoniazida, nas concentrações da tomada de amostra) e duas curvas analíticas somente com presença do solvente (acetonitrila e solução tampão de borato de sódio 10 mM pH 9,85). Para a preparação dessas análises, foram utilizadas duas soluções concentradas de rifampicina (2000 µg/mL), provenientes do mesmo padrão, que por meio de diluições originou os pontos de concentração de toda faixa de trabalho (500 a 1000 µg/mL). As curvas analíticas em matriz foram preparadas por diluição da solução concentrada em uma solução

contendo matriz em mesma quantidade da tomada de amostra, previamente extraída em acetonitrila e tampão borato de sódio. A matriz do comprimido DFC 2 em 1 para rifampicina é constituída de placebo e isoniazida).

Preparo da matriz. O peso médio programado para o conteúdo de um comprimido DFC 2 em 1 é de 747,72 mg, com as massas dos seguintes componentes:

Princípios ativos – 500,00 mg (INH 200 mg + RMP 300 mg);

Revestimento do núcleo – 47,72 mg;

Placebo do núcleo - 200 mg.

Adotando o peso médio verificado nos comprimidos analisados, foi preparada uma mistura dos componentes da matriz em concentrações equivalentes a da tomada de amostra excluindo, dessa vez, rifampicina simulando um branco de amostra correspondente a 20 comprimidos. Após homogeneização desse branco de amostra para rifampicina, pesou-se aproximadamente 60,0 mg para cada ponto de concentração da curva analítica em matriz.

Preparo das soluções concentradas: As soluções concentradas de rifampicina foram preparadas da mesma maneira adotada para o teste de linearidade, resultando em uma concentração aproximada de 2000 µg/mL.

Preparo das soluções de trabalho: Cada nível de concentração das curvas com matriz foi obtido pela diluição da solução concentrada em uma pré-solução contendo a matriz previamente extraída. Para os pontos de concentração em solvente, as diluições foram realizadas somente em solução extratora. Ambas diluições foram realizadas para um volume final de 50 mL. A tabela 6 mostra os níveis de concentração da rifampicina no solvente e na matriz.

Tabela 6: Preparo das soluções de rifampicina em matriz e em solvente para a avaliação do efeito matriz.

Nível	Conc. Nominal (µg/mL)	Alíquota da solução concentrada (mL)	Quantidade aproximada de matriz (mg)
M1	500	12,50	60,00
S1	500	12,50	-
M2	600	15,00	60,00
S2	600	15,00	-
M3	700	17,50	60,00
S3	700	17,50	-
M4	800	20,00	60,00
S4	800	20,00	-
M5	900	22,50	60,00
S5	900	22,50	-
M6	1000	25,00	60,00
S6	1000	25,00	-

M= solução de trabalho pra o nível de concentração da curva com matriz.

S= solução de trabalho para o nível de concentração da curva com solvente.

### Homogeneidade da amostra

No teste de homogeneidade avaliam-se as condições homogêneas da amostra. Para esse teste foram tomados 20 comprimidos DFC 2 em 1 do mesmo lote como amostragem. Esses comprimidos foram triturados até se tornarem uma mistura de pós finamente divididos. Em seguida, foi realizado um processo de homogeneização por agitação mecânica durante, aproximadamente, uma hora. Para determinar a homogeneidade da amostra foram realizadas análises de amostras independentes retiradas de uma mesma amostragem.

Preparo das amostras: Foram preparadas dez amostras de aproximadamente 100 mg, tomadas da amostragem de 20 comprimidos triturados e homogeneizados. O procedimento para preparar as amostras está descrito no item 3.4.2. As análises do conjunto de dez amostras foram realizadas em três diferentes sequências

aleatórias com curto intervalo de tempo (no mesmo dia). Portanto, as corridas de análise geraram trinta resultados (resposta em área normalizada).

### ***Teste de homogeneidade para amostra simulada***

Para os testes de recuperação e precisão intermediária, foi preparada uma amostra de concentração conhecida como amostra de referência. Para utilizá-la nesses testes, verificou-se a sua homogeneidade e a repetibilidade de resultados apresentados pelo método para a mesma.

Preparo da amostra com concentrações conhecidas: Preparou-se 5 g de amostra simulando comprimido DFC 2 em 1 contendo revestimento, placebo do núcleo, rifampicina e isoniazida em concentrações conhecidas e proporcionais a amostra real. Essa mistura de componentes foi homogeneizada e analisada em dez amostras de aproximadamente 100 mg diluídas em balão volumétrico de 50 mL (com solução extratora), três vezes em sequências aleatórias. Essas análises geraram trinta resultados (respostas em área normalizada) e, a partir da equação da curva analítica, determinaram-se as concentrações de cada substância na amostra em percentual m/m. Avaliou-se homogeneidade do conjunto de dados pela ANOVA.

### ***Teste de repetibilidade analítica para quantificação de isoniazida e rifampicina no comprimido 2 em 1.***

Procedimento: O teste de repetibilidade da amostra foi obtido paralelamente ao teste de homogeneidade utilizando-se os dez primeiros resultados analíticos das dez primeiras corridas de amostras analisadas. Para avaliar a repetibilidade do método foi calculada a média e o desvio padrão dos resultados obtidos, para obter o valor do coeficiente de variação (CV).

### **Avaliação da precisão intermediária nas análises quantitativas dos princípios ativos do comprimido DFC 2 em 1.**

Procedimento: Realizaram-se oito análises da amostra simulada em três dias seguidos. Os resultados obtidos foram aplicados na equação da curva analítica para a determinação das concentrações de cada substância de interesse em percentual m/m. Antes de iniciar a avaliação estatística dos resultados para precisão intermediária, foram retirados os valores aberrantes através do teste de Grubbs (equação 1).

$$|G_{1cal}| = (x_n - \bar{x})/S \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$x_n$  é o valor a ser considerado como aberrante;

$\bar{x}$  é a média de todos os valores em questão;

S é o desvio padrão gerado pelos valores totais analisados.

Para esse teste, devido à existência de apenas um analista treinado e um equipamento, foi determinada a precisão intermediária pela variação de dias.

A diferença dos resultados obtida em diferentes dias foi utilizada para a avaliação da precisão intermediária nessa validação.

### Teste de Recuperação Analítica

Com os resultados obtidos no teste de precisão intermediária avaliou-se a recuperação através da equação 2, pois as concentrações dos analitos na amostra eram conhecidas.

$$R \% = \frac{C_{achado}}{C_{fortificada}} \times 100, \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

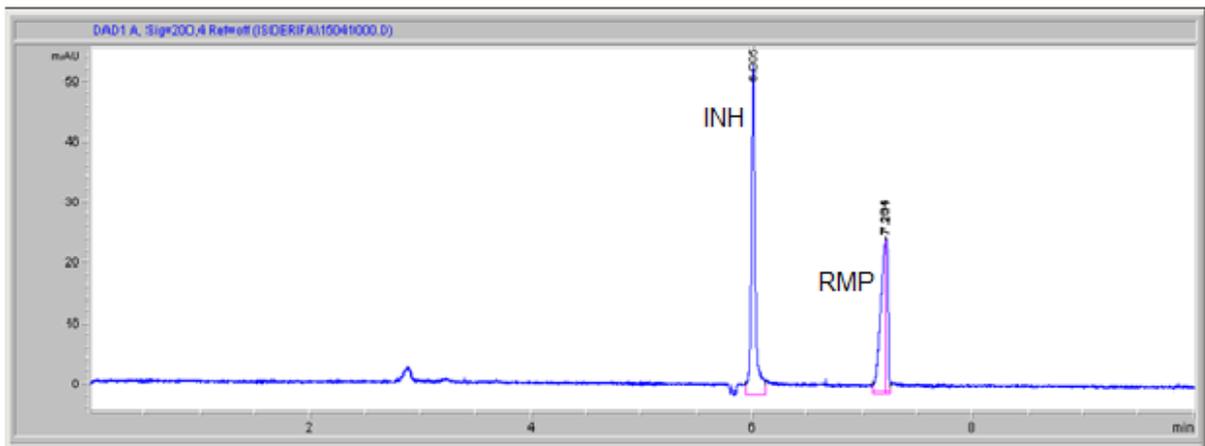
$C_{achado}$  = concentração achada pelas análises.

$C_{fortificada}$  = concentração adicionada na amostra.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 5 representa a separação de isoniazida e rifampicina por eletroforese capilar apresentada no eletroferograma gerado pela análise de matriz e princípios ativos do medicamento DFC 2 em 1.

Figura 5: Análise de isoniazida 200µg/ml (primeiro pico) e rifampicina 800 µg/ml (segundo pico), nas condições analíticas descritas no item 3.4.2.



### ***Avaliação dos resultados referentes aos testes de linearidade para os princípios ativos da formulação DFC 2 em 1***

Com o auxílio da “Planilha de Curva Analítica” (Bazílio, 2012) elaborada no programa Microsoft Excel versão 12.0 (Office 2007), os dados analíticos obtidos foram avaliados. Os valores aberrantes foram desconsiderados e os testes estatísticos referentes às premissas de linearidade foram efetuados.

### ***Resumo dos resultados referente à faixa de análise linear para isoniazida***

A Tabela 7 apresenta as concentrações corrigidas das soluções de trabalho utilizadas na confecção da curva analítica e suas respectivas respostas de análise em área normalizada. Já a tabela 8, apresenta o resumo da avaliação de linearidade para os dados da Tabela 7.

Tabela 7: Concentrações de trabalho e resposta analítica para isoniazida.

Nível	Concentração µg/mL	Resposta Área Normalizada
1	196	0,108815
	<b>196</b>	<b>0,119248</b>
	194	0,112597
2	298	0,174826
	300	0,177065
	296	0,178979
3	<b>400</b>	<b>0,237058</b>
	399	0,240675
	397	0,245021
4	<b>499</b>	<b>0,325747</b>
	502	0,310161
	496	0,313444
5	603	0,383720
	604	0,390531
	599	0,382500
6	702	0,445466
	706	0,459394
	697	0,449772

Os dados em negrito na tabela foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores aberrantes (outliers). Esses dados não foram considerados na avaliação das premissas.



Tabela 8: Resumo da avaliação de linearidade dos dados de concentração e resposta analítica.

Resumo da Avaliação de linearidade para isoniazida	
Homogeneidade de variância	
<b>Há homoscedasticidade: (<math>p &gt; 0,05</math>)</b>	
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
<b>Regressão é significativa: (<math>p &lt; 0,001</math>)</b>	
<b>Não há desvio de linearidade: (<math>p &gt; 0,05</math>)</b>	
Autocorrelação dos resíduos ( $\alpha = 0,05$ )	
<b>Não há autocorrelação (<math>d &gt; dU</math>)</b>	
<b>Teste de Normalidade: (<math>\alpha = 0,05</math>)</b>	
<b>Segue a normal: (<math>Req &gt; Rcrit</math>)</b>	

As tabelas 9 e 10 apresentam o estudo de ajuste e regressão, respectivamente, para a curva analítica de isoniazida.

Tabela 9: ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)

Fonte	G.L.	SQ	MQ	F	P
Regressão	1	2,14E-01	2,14E-0,1	1,27E+04	7,89E-21
Resíduos	13	2,18E-04	1,68E-05		
Falta de Ajuste	4	4,87E-05	1,22E-05	6,45E-01	6,44E-01
Erro puro	9	1,70E-04	1,89E-05		
Total	14	2,14E-01			

Tabela 10: Estatística da regressão

Inclinação (b)	6,78E-04	Interseção (a)	-2,44E-02
R	0,9995	R <sup>2</sup>	0,9990
N	15	Graus de Liberdade	13

As Tabelas 11, 12 e 13 a seguir apresentam dados do estudo das premissas de linearidade:

Tabela 11: Normalidade dos resíduos

Req	0,97
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,94

Tabela 12: Autocorrelação dos resíduos

d (calculado)	2,65
dL (Limite Inferior) ( $\alpha = 0,05$ )	1,08
dU (Limite Superior) ( $\alpha = 0,05$ )	1,36

Tabela 13: Homogeneidade da variância dos resíduos

Variância Combinada	1,66E-05
$t_L$ calculado	-1,08E-01
$t_{\text{tabelado}}$ ( $\alpha = 0,05$ )	2,16E+00
P	9,16E-01

Gráfico 1: Curva Analítica de Isoniazida

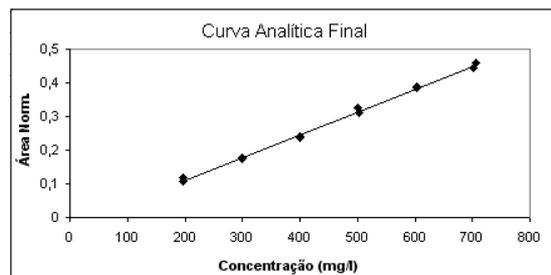


Gráfico representativo para curva analítica: concentração de isoniazida (mg/L) x área normalizada.

$$\text{Equação da reta: } y = 6,78 \times 10^{-4}x - 2,44 \times 10^{-2}.$$



Gráfico 2: Resíduos

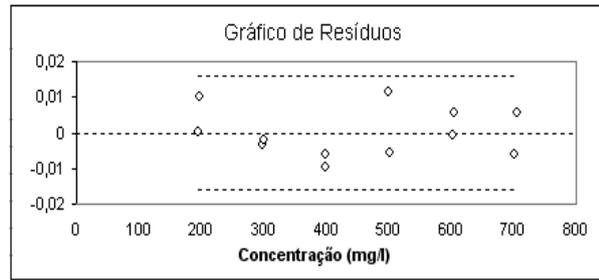


Gráfico representativo para concentração de isoniazida (mg/L) x resíduos.

Comprovou-se que a faixa de trabalho é linear apenas para o intervalo de concentração de 200 a 700  $\mu\text{g/mL}$  e o ponto central de 500  $\mu\text{g/mL}$  (equivalente à concentração da solução final de isoniazida na tomada de amostra do comprimido), mostrando-se necessária a retirada do último nível de concentração (800  $\mu\text{g/mL}$ ) para que houvesse linearidade.

***Resumo dos resultados referentes à faixa de análise linear para a rifampicina***

A tabela 14 apresenta as concentrações corrigidas das soluções de trabalho utilizadas na confecção da curva analítica de rifampicina e as respectivas respostas de análise em área normalizada. O resumo da avaliação das premissas de linearidade dos referentes dados é apresentado na tabela 15.

Tabela 14: Concentração das soluções de trabalho de rifampicina e respostas analíticas em área normalizada.

Nível	Concentração µg/mL	Resposta Área Normalizada
1	501	0,169
	501	0,182
	501	0,174
2	602	0,205
	602	0,198
	602	0,200
3	701	0,230
	702	0,229
	702	0,243
4	<b>801</b>	<b>0,248</b>
	801	0,270
	<b>801</b>	<b>0,286-</b>
5	901	0,288
	902	0,292
	<b>902</b>	<b>0,310</b>
6	1000	0,319
	1000	0,326
	<b>1000</b>	<b>0,359</b>

Os dados em negrito na tabela foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores aberrantes (outliers). Esses dados não foram considerados na avaliação das premissas.

Tabela 15: Resumo da avaliação da linearidade dos dados de concentração e resposta analítica

Resumo da avaliação da linearidade para rifampicina	
Homogeneidade de variância	
<b>Há Homoscedasticidade:</b> ( $p > 0,05$ )	
Regressão e Teste de Desvio de Linearidade	
<b>A regressão é significativa:</b> ( $p < 0,001$ )	
<b>Não há desvio de Linearidade:</b> ( $p > 0,05$ )	
<b>Autocorrelação dos Resíduos:</b> ( $\alpha = 0,05$ )	
<b>Não há autocorrelação:</b> ( $d > dU$ )	
<b>Teste de Normalidade:</b> ( $\alpha = 0,05$ )	
<b>Segue a Normal:</b> ( $Req > Rcrit$ )	

Os dados referentes aos estudos das premissas de linearidade para rifampicina estão presentes nas tabelas 16, 17 e 18 a seguir:

Tabela 16: Normalidade dos resíduos

Req	0,95
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,94

Tabela 17: Autocorrelação dos resíduos

d (calculado)	2,02
dL (Limite Inferior) ( $\alpha = 0,05$ )	1,05
dU (Limite Superior) ( $\alpha = 0,05$ )	1,35

Tabela 18: Homogeneidade das variâncias dos resíduos

Variância Combinada	3,38E-05
$tL_{\text{calculado}}$	1,90E-01
$t_{\text{tabelado}} (\alpha = 0,05)$	2,18E+00
$p$	8,52E-01

As tabelas 19 e 20 a seguir apresentam o estudo de regressão linear e ajuste para os dados obtidos na confecção da curva analítica da rifampicina.

Tabela 19: Análise de regressão linear.

Inclinação ( <i>b</i> )	2,96E-04	Interseção	2,57E-02
<i>r</i>	0,9953	<i>R</i> <sup>2</sup>	0,9907
<i>N</i>	14	Graus de Liberdade	12

Tabela 20: ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste).

Fonte	G.L.	SQ	MQ	F	<i>p</i>
Regressão	1	3,67E-02	3,67E-02	1,28E+03	1,46E-13
Resíduos	12	3,44E-04	2,87E-05		
Falta de Ajuste	4	7,98E-05	2,00E-05	6,04E-01	6,71E-01
Erro Puro	8	2,64E-04	3,30E-05		
Total	13	3,70E-02			

$$\text{Equação da reta: } y = 2,96 \times 10^{-4}x - 2,57 \times 10^{-2}.$$

A faixa de trabalho proposta nas concentrações de 500 a 1100 µg/mL, com ponto central 800 µg/mL (equivalente à concentração da solução final da amostra), não apresentou linearidade. Retirou-se, então o último nível de concentração e avaliou-se novamente as premissas de linearidade obtendo-se bons resultados. A faixa de trabalho entre 500 a 1000 µg/mL apresentou linearidade com intervalo de 100 µg/mL entre os níveis de concentração.

### **Avaliação dos resultados referentes aos testes de efeito matriz dos princípios ativos da formulação DFC 2 em 1**

Com o auxílio da “Planilha de Curva Analítica” elaborada no programa Excel, os dados analíticos obtidos foram avaliados por método dos mínimos quadrados e os testes estatísticos referentes às premissas de linearidade foram efetuados de

acordo com a determinação de linearidade para os valores obtidos nas curvas analíticas. As comparações estatísticas entre as inclinações e interseções foram realizadas com o auxílio da “Planilha de Efeito de Matriz” também elaborada no programa Excel por Bazilio, (2012).

### **Resumo dos resultados referentes ao estudo do efeito matriz para isoniazida:**

A tabela 21 demonstra os valores referentes ao estudo de homogeneidade das variâncias dos resíduos representado pelo teste F.

Tabela 21: Teste da variância dos resíduos, referentes às curvas analíticas de isoniazida.

Teste F	
F calc	1,1406801
F tab	1,0548211

$$\text{Heteroscedástico} = F \text{ calc} > F \text{ tab}$$

As tabelas 22 e 23 representam a avaliação estatística das inclinações e interseções para o estudo de efeito matriz na análise de isoniazida.

Tabela 22 : Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de isoniazida no solvente.

Estatísticas (solvente)	
Inclinação	0,0006288
Interseção	0,0251787
Sxx <sub>1</sub>	176272,69
S <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	0,0001771
n <sub>1</sub>	8
Σx <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1312727,9
X <sub>1</sub> med	376,90437

Resultados analíticos obtidos da “Planilha de Curva Analítica”, a partir das concentrações de isoniazida na presença de solvente.

Tabela 23: Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de isoniazida na matriz

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	0,0006597
Interseção	-0,0022214
Sxx <sub>2</sub>	175778,41
S <sup>2</sup> res <sub>2</sub>	0,000202
n <sub>2</sub>	8
Σx <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1311803,2
X <sub>2</sub> med	376,83298

Resultados analíticos obtidos da “Planilha de Efeito Matriz”, a partir das concentrações de isoniazida na presença de matriz de comprimidos.

Os dados obtidos nas avaliações estatísticas das curvas analíticas em solvente e em matriz foram comparados pelo teste t de variâncias distintas para determinar o efeito matriz, onde o t crítico se dá por t (1 – α/2; v). A avaliação deste teste está resumida na tabela 24.

Tabela 24: Estatísticas do teste t para avaliação do efeito matriz para análise de isoniazida.

Avaliação ( $F_{calc} > F_{tab}$ )	
s <sup>2</sup> p	0,0001895
t <sub>b</sub>	0,6654059
t <sub>α</sub>	1,4578864
GL <sub>(v)</sub>	252190,88
α	0,05
t <sub>(1-α/2;GL)</sub>	0,0313378

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2}{S_{xy}} + \frac{s_p^2}{S_{xx}}}}$$

$$t_\alpha = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2 \sum x_1^2}{n_1 S_{xx}} + \frac{s_p^2 \sum x_2^2}{n_2 S_{xx}}}}$$

Sendo os índices 1 e 2 referentes as curvas preparadas no solvente e na matriz

Figura 6: Curva Analítica de isoniazida com solvente

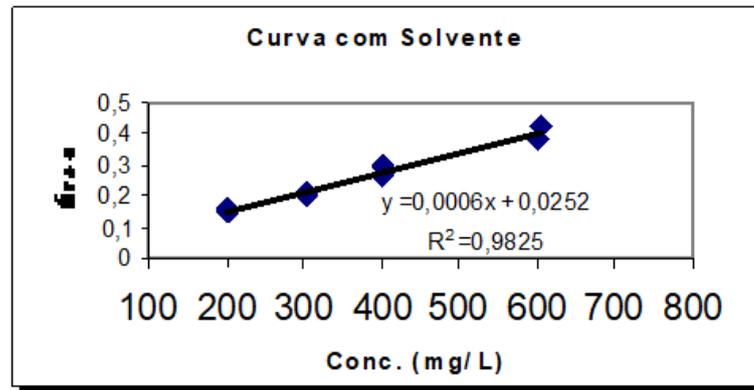
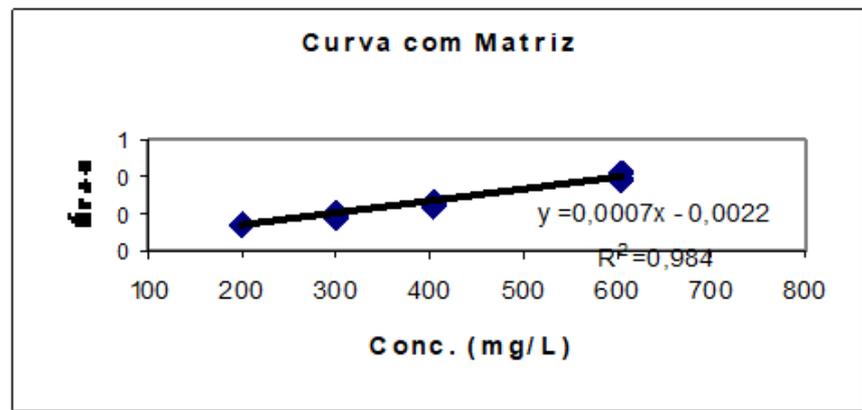


Figura 7: Curva Analítica de isoniazida com matriz



De acordo com as avaliações estatísticas, pôde-se constatar que a matriz do comprimido 2 em 1 não influencia nas respostas obtidas para análise de isoniazida. As variâncias dos resíduos das curvas analíticas em solvente e em matriz demonstraram-se heterogêneas. O valor calculado para t foi menor do que o valor crítico de t na comparação de inclinação e interseção das curvas analíticas.

## Resumo dos resultados referentes ao estudo do efeito matriz para rifampicina

O estudo da homogeneidade de variâncias dos resíduos das curvas analíticas de rifampicina com matriz e com solvente está representado na tabela 25 pelo teste F.

Tabela 25: Teste da variância dos resíduos para rifampicina.

Teste F	
F calc	1,7700473
F tab	1,0468089

$$\text{Heteroscedástico} = F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$$

As avaliações estatísticas das inclinações e interseções apresentadas pelas curvas analíticas em solvente e em matriz estão presentes nas tabelas 26 e 27.

Tabela 26: Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de rifampicina no solvente.

Estatísticas (Matriz)	
Inclinação	0,0003094
Interseção	0,0190485
Sxx <sub>2</sub>	303148,86
S <sup>2</sup> res <sub>2</sub>	5,598E-05
n <sub>2</sub>	10
Σx <sub>2</sub> <sup>2</sup>	5486017,2
X <sub>2</sub> med	721,72133

Tabela 27: Estatísticas dos dados relacionados à confecção da curva analítica de rifampicina na matriz.

Estatísticas (Solvente)	
Inclinação	0,0003269
Interseção	0,0011631
Sxx <sub>1</sub>	321260,85
S <sup>2</sup> res <sub>1</sub>	9,909E-05
n <sub>1</sub>	10
Σx	6276001,3
Xmed	7771,66965

A avaliação do efeito matriz para a análise de rifampicina está representada na tabela 28.

Tabela 28: Avaliação do efeito matriz pelo teste t de variâncias distintas, onde t crítico  $t_{(1-\alpha/2;v)}$ .

Avaliação ( $F_{calc} > F_{tab}$ )	
$t_b$	0,7836088
$t_a$	1,0409469
GL <sub>(v)</sub>	957786,95
$\alpha$	0,05
$t_{(1-\alpha/2;GL)}$	0,7143677

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2}{S_{x_1}} + \frac{s_p^2}{S_{x_2}}}}$$

$$t_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2 \sum x_1^2}{n_1 S_{x_1}} + \frac{s_p^2 \sum x_2^2}{n_2 S_{x_2}}}}$$

Sendo os índices 1 e 2 referentes as curvas preparadas no solvente e na matriz

Figura 8: Curva analítica de rifampicina na presença de matriz

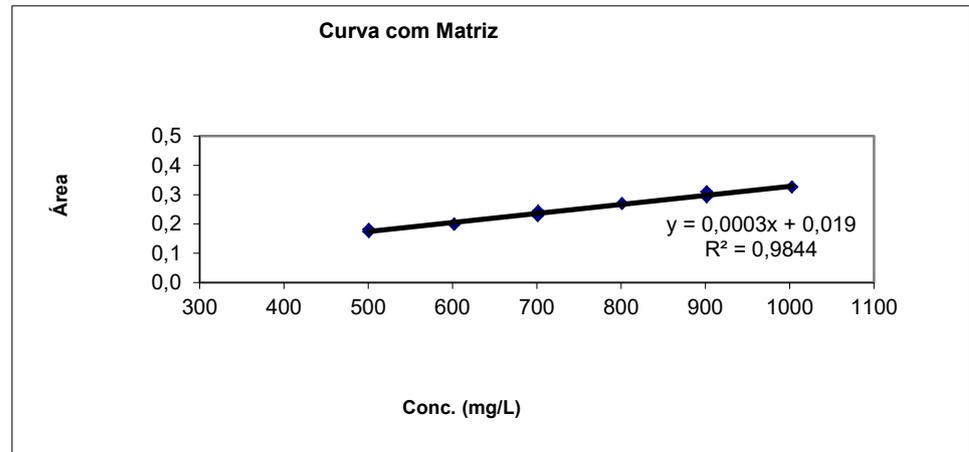
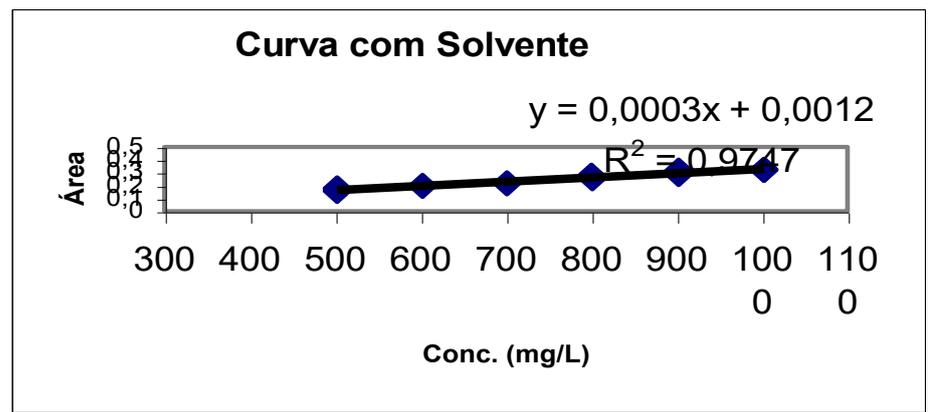


Figura 9: Curva analítica de rifampicina na presença de solvente.



Não houve interferência significativa da matriz nos resultados analíticos para a análise de rifampicina, uma vez que o valor do t calculado foi inferior ao valor do t crítico na comparação de inclinação e interseção das curvas analíticas.

***Avaliação dos resultados referentes ao teste de homogeneidade da amostra com respeito ao doseamento dos princípios ativos da formulação DFC 2 em 1.***

Através da equação da curva analítica para isoniazida e para rifampicina, puderam-se determinar as concentrações de cada substância na amostra em

percentual m/m pelas respostas em área normalizadas obtidas nas análises. Com isso, avaliou-se homogeneidade do conjunto de dados pela ANOVA.

***Resumo dos resultados referentes ao estudo da homogeneidade da amostra para dosagem de rifampicina:***

Os resultados do percentual m/m de rifampicina na amostra estão na tabela 29.

Tabela 29: Resultados dos ensaios analíticos para o teste de homogeneidade em percentual m/m de rifampicina no comprimido

Replicata	Teor de rifampicina em % m/m no comprimido		
	1	2	3
1	42,03	40,07	37,81
2	40,92	39,92	36,65
3	41,81	39,52	40,54
4	44,69	41,73	38,68
5	42,76	40,84	39,23
6	41,58	40,19	39,03
7	43,41	39,27	36,10
8	41,78	39,56	37,31
9	42,93	40,11	39,19
10	39,91	38,32	36,25

Os testes estatísticos para a avaliação de homogeneidade dos dados apresentados na tabela anterior estão na tabela 30.



Tabela 30: Resultados da Análise de Variância (ANOVA)

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor - p	F crítico
Entre grupos	19,73931	9	2,1932	<b>0,8726192</b>	0,57627	<b>3,02038</b>
Dentro dos grupos	25,138	10	2,5134			
Total	44,8735	19				

***Resumo dos resultados referentes ao estudo da homogeneidade da amostra para dosagem de isoniazida***

A tabela 31 apresenta os percentuais m/m de isoniazida na amostra que serão utilizados no teste de homogeneidade da amostra.

Tabela 31: Teor de isoniazida em percentual m/m apresentado nas análises do comprimido

Replicata	Teor de isoniazida em % m/m no comprimido		
	1	2	3
1	28,22	25,37	25,27
2	26,06	26,06	25,64
3	26,43	25,49	24,78
4	27,41	26,17	25,84
5	26,37	25,81	25,77
6	27,17	25,82	25,58
7	26,38	25,74	24,88
8	26,39	25,57	25,46
9	26,18	25,25	24,87
10	26,08	25,29	25,49

Os testes estatísticos para determinação da homogeneidade da amostra para as análises de isoniazida são apresentados na tabela 32.

Tabela 32: Resultados para Análise de Variância (ANOVA)

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor – p	F crítico
Entre grupos	1,81681105	9	0,201867895	<b>2,250676</b>	0,111195	<b>3,020382</b>
Dentro dos grupos	0,89692101	10	0,089692101			
Total	2,71373207	19				

SQ: soma quadrática

GL: Número de graus de liberdade

MQ: Média quadrática

F: Razão entre as variâncias

p: Valor da significância

A variância dos resultados foi homogênea para ambas substâncias em questão, pois os valores obtidos do F calculado foram menores que o F crítico.

### **Avaliação da repetibilidade analítica**

#### ***Resumo dos resultados referentes ao estudo da repetibilidade analítica para dosagem de rifampicina:***

Tabela 33: Teor em percentual m/m de rifampicina na amostra.

Replicata	Concentração na amostra ( % m/m)
1	42,03
2	40,92
3	41,81
4	44,69
5	42,76
6	41,58
7	43,41
8	41,78
9	42,93
10	39,91

No quadro 4, apresentam-se os cálculos necessários para avaliação de repetibilidade analítica da rifampicina.

Quadro 4: Avaliação da repetibilidade analítica para rifampicina

Desvio Padrão	1,34
Média	42,18
CV ( %)	<b>3,17</b>
CV Limite	2,50 a 3,30
Hor Rat	0,96

***Resumo dos resultados referentes ao estudo da repetibilidade analítica para dosagem de isoniazida:***

Tabela 34: Teor em percentual m/m de isoniazida na amostra encontrados nas análises realizadas para avaliar a repetitividade analítica.

Replicata	Concentração na amostra ( % m/m)
1	28,21
2	26,06
3	26,43
4	27,40
5	26,36
6	27,16
7	26,38
8	26,39
9	26,17
10	26,08

No quadro 5 apresentam-se os cálculos necessários para avaliação da repetibilidade analítica.

Desvio Padrão	0,70
Média	26,67
CV ( %)	<b>2,64</b>
CV Limite	2,50 a 3,30

O método mostrou-se repetitivo para ambas substâncias analisadas da amostra do comprimido DFC 2 em 1.

#### **Avaliação da homogeneidade da amostra simulada**

##### ***Resumo dos resultados referentes ao estudo da homogeneidade da amostra simulada de concentração conhecida para dosagem de isoniazida:***

A tabela 35 descreve as concentrações de isoniazida em percentual m/m determinadas pelas análises de homogeneidade da amostra simulada.

Tabela 35 Concentrações de isoniazida na amostra simulada.

Replicata	Teor de isoniazida em % m/m nas amostras		
	1	2	3
1	28,22	25,37	25,27
2	26,06	26,06	25,64
3	26,43	25,49	24,78
4	27,41	26,17	25,84
5	26,37	25,81	25,77
6	27,17	25,82	25,58
7	26,38	25,74	24,88
8	26,39	25,57	25,46
9	26,18	25,25	24,87
10	26,08	25,29	25,49

A avaliação estatística da homogeneidade da amostra simulada está descrita nos testes apresentados nas tabelas 36 e 37.

Tabela 36: ANOVA

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor - p	F crítico
Entre grupos	1,816811	9	0,201867895	<b>2,2506764</b>	0,111195	<b>3,020382167</b>
Dentro dos grupos	0,896921	10	0,089692101			
Total	2,713732	19				

SQ: soma quadrática

GL: Número de graus de liberdade

MQ: Média quadrática

F: Razão entre as variâncias

p: Valor da significância

***Resumo dos resultados referentes ao estudo da homogeneidade da amostra simulada de concentração conhecida para dosagem de rifampicina***

Tabela 37: Concentrações de rifampicina na amostra simulada.

Replicata	Teor de rifampicina em % m/m na amostra simulada.		
	1	2	3
1	42,03	40,07	37,81
2	40,92	39,92	36,65
3	41,81	39,52	40,54
4	44,69	41,73	38,68
5	42,76	40,84	39,23
6	41,58	40,19	39,03
7	43,41	39,27	36,10
8	41,78	39,56	37,31
9	42,93	40,11	39,19
10	39,91	38,32	36,25

A avaliação estatística da homogeneidade da amostra simulada está descrita nos testes apresentados na tabela 38.

Tabela 38: ANOVA

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	Valor - p	F crítico
Entre grupos	19,7393	9	2,193257	<b>0,8726192</b>	0,5762773	<b>3,020382167</b>
Dentro dos grupos	25,1341	10	2,513418			
Total	44,8735	19				

A amostra preparada no laboratório simulando uma amostra de concentração conhecida dos analitos se mostrou homogênea.

### **Avaliação da precisão intermediária**

Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermediária, em variação de tempo de análise, para isoniazida:

Os dados analíticos utilizados na determinação da precisão intermediária para isoniazida encontram-se na tabela 39.

Tabela 39: Dados necessários para avaliar a precisão intermediária da análise de isoniazida.

Replicata	Análise					
	1	$(y_1 - \bar{y}_1)^2$	2	$(y_2 - \bar{y}_2)^2$	3	$(y_3 - \bar{y}_3)^2$
1	25,68	0,0289	25,50	0,0625	25,76	0,0961
2	25,13	0,1444	25,55	0,0400	25,30	0,5929
3	25,32	0,0361	25,57	0,0324	26,06	0,0001
4	25,66	0,0225	26,55	0,6400	26,39	0,1024
5	25,81	0,0900	25,83	0,0064	26,51	0,1936
6	25,45	0,0036	25,86	0,0121	26,43	0,1296
7	25,49	0,0004	25,38	0,1369	26,05	0,0004
Médias	25,51		25,75		26,07	
$\Sigma(y_i - \bar{y}_i)^2$		<b>0,3259</b>		<b>0,9303</b>		<b>1,115</b>

Os cálculos referentes ao teste de avaliação da precisão intermediária estão apresentados na tabela 40.

Tabela 40: Cálculos de precisão intermediária para isoniazida.

$\Sigma\Sigma(y_i - \bar{y}_i)^2$	2,37
Si	0,36
Média dos resultados	25,78
CV %	1,41
CV limite	1,97
Hor Rat	0,71

**Resumo dos resultados obtidos no estudo da precisão intermediária, em variação de tempo de análise, para rifampicina:**

Os estudos dos dados analíticos necessários à avaliação da precisão intermediária para rifampicina encontram-se na tabela 41.

Tabela 41: Dados necessários para avaliar a precisão intermediária da análise de rifampicina.

Replicata	Análise					
	1	$(y_1 - \bar{y}_1)^2$	2	$(y_2 - \bar{y}_2)^2$	3	$(y_3 - \bar{y}_3)^2$
1	40,23	0,2209	40,51	0,0009	40,74	0,4900
2	39,75	0,9025	40,44	0,0100	39,05	0,9801
3	40,76	0,0036	39,82	0,5184	39,92	0,0144
4	42,12	2,0164	40,97	0,1849	39,92	0,0144
5	41,38	0,4624	41,63	1,1881	40,86	0,4096
6	40,61	0,0081	40,00	0,2916	39,99	0,0025
7	40,08	0,3844	40,37	0,0289	39,77	0,0729
Médias	40,70		40,54		40,04	
$\Sigma(y_i - \bar{y}_i)^2$		<b>3,9983</b>		<b>2,2228</b>		<b>1,9839</b>

Os cálculos referentes ao teste de avaliação da precisão intermediária estão apresentados na tabela 42.

Tabela 42: Cálculos de precisão intermediária para rifampicina

$\Sigma\Sigma(y_i - \bar{y}_i)^2$	9,03
Si	0,68
Média dos resultados	40,43
CV %	1,67
CV limite	1,67

Os resultados mostraram-se satisfatórios, pois estão coerentes em relação ao valor de referência adotado, estipulado de acordo com estudos elaborados por Horwitz em validação intralaboratorial onde, para cada concentração estimada pode-se obter um valor limite de reprodutibilidade.

### Resultados da avaliação da recuperação analítica

Resumo dos resultados na avaliação da recuperação analítica do método em questão, referente à quantificação de isoniazida:

A tabela 43 resume os resultados obtidos nos testes de recuperação analítica de isoniazida.

Tabela 43: Resumo dos resultados de recuperação analítica de isoniazida.

Recuperação	Percentual Recuperado	Massa Nominal	Recuperação	Percentual Recuperado	Massa nominal	Recuperação	Percentual Recuperado	Massa Nominal
25,68	89,36	28,74	25,50	88,83	28,71	25,76	92,91	27,72
25,13	90,82	27,67	25,55	93,15	27,43	25,30	92,25	27,42
25,32	92,70	27,32	25,57	92,89	27,53	26,06	95,13	27,39
25,66	93,53	27,44	26,55	96,80	27,43	26,39	95,78	27,56
25,81	94,19	27,40	25,83	93,48	27,63	26,51	96,53	27,46
25,45	92,10	27,64	25,86	93,28	27,72	26,43	97,00	27,25
25,49	92,43	27,57	25,38	91,99	27,59	26,05	95,41	27,31
Médias	92,16			92,92			95,00	

A faixa de concentração de 92,16 a 95,00 % determinada pelo teste de recuperação é aceitável pelo critério do ICH.

Tabela 44: Resumo dos resultados na avaliação da recuperação analítica do método em questão, referente à quantificação de rifampicina:

Recuperação	Percentual Recuperado	Massa Nominal	Recuperação	Percentual Recuperado	Massa nominal	Recuperação	Percentual Recuperado	Massa Nominal
40,23	93,63	42,96	40,51	94,42	42,91	40,74	98,31	41,44
39,75	96,10	41,36	40,44	98,65	41,00	39,05	95,26	40,99
40,76	99,82	40,83	39,82	96,79	41,14	39,92	97,48	40,95
42,12	102,69	41,01	40,97	99,95	41,00	39,92	96,92	41,19
41,38	101,03	40,96	41,63	100,79	41,31	40,86	99,54	41,05
40,61	98,31	41,31	40,00	96,53	41,44	39,99	98,17	40,74
40,08	97,24	41,22	40,37	97,26	41,51	39,77	97,44	40,82
Médias	98,41			97,77			97,59	

Discussão: A faixa de concentração de 97,59 a 98,41 % é aceitável pelo critério do ICH.

## 5 CONCLUSÃO

A metodologia analítica empregada de eletroforese capilar provou ser aplicável para a determinação quantitativa de isoniazida e rifampicina nos comprimidos de DFC. Comprovou-se que a faixa de trabalho é linear para o intervalo de concentração de 200 a 700 µg/mL e 500 a 1000 µg/mL para isoniazida e rifampicina, respectivamente. A matriz do comprimido 2 em 1 não influencia nas respostas obtidas para análise de isoniazida e rifampicina. A repetibilidade da rifampicina e isoniazida de 3,17 % e 2,64 %, respectivamente, foram aceitáveis quando comparadas com o critério de aceitação de 3,30 % obtido para o coeficiente de variação de repetibilidade calculado pela equação de Horwitz. A precisão intermediária da isoniazida e rifampicina de 1,41 % e 1,67 %, respectivamente, foram aceitáveis quando comparadas ao coeficiente de variação de reprodutibilidade de 1,97 % e 1,67 % para isoniazida e rifampicina, respectivamente, calculados pela equação de Horwitz. As faixas de recuperação de 92,16-95,00 % para isoniazida e 97,59-98,41 % para rifampicina também foram aceitáveis para o critério de aceitação do International Conference Harmonization.

Por ter sido possível sua validação, o método analítico empregado pode ser utilizado como método alternativo no doseamento dos fármacos estudados, em substituição ao método farmacopeico de CLAE, nas condições e concentrações avaliadas, vantajosamente com a utilização de pequenos volumes de solventes orgânicos, além de outras características, como alto desempenho, menos poluente e de menor custo, comparativamente aos métodos cromatográficos existentes. Numa perspectiva mais ampla, o uso de uma técnica como essa, menos onerosa, tem potencial de ocasionar a melhoria da distribuição de tuberculostáticos para o povo brasileiro.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia Para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56.

ALTRIA K. D. Overview of capillary electrophoresis and capillary Electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam ,v. 856, p. 443– 463, set. 1999.

AZEVEDO, M.L.G.; SIMÕES, A.C.; ABRANTES, S. Análise de isoniazida por eletroforese capilar: confecção de uma curva analítica. **Revista Analytica**, v. 32, p. 50-55, 2008.

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

BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**, v. 59, p. 60-67, 2012. Disponível em: <[http://www.revistaanalytica.com.br/ed\\_anteriores/59/analytica.pdf](http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/59/analytica.pdf)>.

BLUMBERG HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):603-62.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Seção 1, p. 18055.

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

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

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. Brasília, [2008]. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_tecnica\\_versao\\_28\\_de\\_agosto\\_v\\_5.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf) >. Acesso em: 29 jan. 2012.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Tuberculose**. Brasília, [2002]. Disponível em: <[http://www.sba.com.br/comunicacao/nota\\_de\\_esclarecimentos\\_de\\_boatos\\_ms\\_24\\_03.pdf](http://www.sba.com.br/comunicacao/nota_de_esclarecimentos_de_boatos_ms_24_03.pdf)>. Acesso em: 07 dez. 2011.

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

BRASIL. Secretaria Estadual de Saúde. **Secretaria de Estado de Saúde apresenta plano de ação contra Tuberculose e AIDS**. Rio de Janeiro, 2013b. Disponível em <http://www.saude.rj.gov.br/imprensa-noticias/18537-secretaria-de-estado-de-saude-lanca-plano-de-acao-contra-tuberculose-e-aids.html>. Acesso em 05 mar 2015.

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

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

BWIRE, R. Product costs of fixed-dose combination tablets in comparison with separate dispensing and/or co-blistering of antituberculosis drugs. World Health Organization, 2003.

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

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

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

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

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

HEIGER, D. N. **High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction**. 3. Ed. França: Hewlet Packard Company, 1997.

ICH International Conference On Harmonization. **Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, Geneva, 2005.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2011.

INOUE, S. **Yakugaku Zasshi**. 91: 81-7 (1971); C.A. **74** 111385b (1971).

INOUE, S. e ONO, Y.; **IBID** **91** 88-94 (1971); C.A. **74** 111386c (1971).

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

LANDERS, J. P. **Handbook of Capillary Electrophoresis**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1996.

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

MANDELL, G L; PETRI JUNIOR, W. A. Fármacos Antimicrobianos. In: HARDMAN, J. G., et.al.. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. México DF: Mc. GrawHill Interamericana S.A., 1996.

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

RAMASWAMY S, MUSSER JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998;79(1):3-29.

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

RIBEIRO, F. A. D. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000100029&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000100029&nrm=iso)>.

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

SLAYDEN RA, Barry CE 3rd. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. **Microbes Infect**. 2000;2(6):659-69.

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

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

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

THE INTERNATIONAL Pharmacopoeia. 4. ed. 4st suppl. Geneva: WHO, 2014.

THE UNITED States Pharmacopoeia 37. National Formulary 32: 2014. Rockville: U.S. Pharmacopoeia, 2014. v.3.

THOMPSON, M. et al. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 145-196, 2006.

TIMMINS, G S; MASTER, S; RUSNAK, F; DERETIC, V. Requirements for nitric oxide generation from isoniazid activation in vitro and inhibition of mycobacterial respiration in vivo. **Journal of Bacteriology**, v.186, l.16, p. 5427-5431, 2004.

VALENTINI. S.R. Atributos da validação da metodologia analítica do captopril num programa de garantia de qualidade. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

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

ZHANG Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:529-64.