

BARBARA DUARTE DA SILVA

Desenvolvimento de Metodologias
Espectroscópicas Multivariadas para Quantificação de Isoniazida e
Rifampicina em Medicamentos

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Química
Analítica, Programa de Pós-Graduação em
Química, Setor de Ciências Exatas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Patricio Peralta-Zamora

CURITIBA

2008

Dedico este trabalho
aos meus pais Duarte e Vanda,
minha filha Luana e meu esposo Luis,
por fortalecerem e iluminarem a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Como qualquer cristão, devo primeiramente agradecer a Deus e aos meus orixás (Odoyá mamãe), que presentes em todos os momentos de minha vida, me acompanham, protegem, guiam e iluminam todos os meus passos e minhas evoluções.

Aos meus pais, Duarte e Vanda, por todo o amor, esforço e companheirismo, por me ensinarem e por me darem estrutura, possibilitando “eu saber tudo o que sei”, fazendo sempre o melhor (o que seria de mim sem vocês).

A família que todos os dias eu construo: minha filha Luana e meu marido Luis. Estes que me ensinaram outras maneiras de amar, amar incondicionalmente, amar por só amar, e hoje, irradiam a luz do meu viver (amo vocês).

Ao meu orientador e amigo, Dr. Prof Patrício Guillermo Peralta-Zamora, por todo o precioso tempo dedicado, fios de cabelo branco, aceleramentos cardíacos e compreensão, me trilhando da melhor maneira possível e me ensinando muito mais do que ele mesmo possa imaginar...

À minha família, minha irmã Bianca, minha prima Juliana, meu afilhado Gabriel e em especial à minha tia Marlene, por todo o carinho, auxílios e “corridas”, a fim de que meus objetivos fossem alcançados.

Ao meu grupo de pesquisa TECNOTRATER, Adriane, Arlene, Elaine, Elenise, Fernanda (Longa), Gilcélia (1ª CP - primeira componente principal), Geovani, Juliana, Kelly, Luciana (2ª CP – segunda componente principal), Lutécia e Luiz (bendito fruto), que como verdadeiros irmãos correram e acompanharam cada passo desta minha caminhada, auxiliando e tornando este trabalho mais prazeroso.

Parágrafo Especial: À Gilcélia e sua grande contribuição, que me ensinou os primeiros passos da calibração multivariada, aprofundou o meu conhecimento em química analítica com toda a paciência do mundo e tornou-se uma grande amiga para todos os momentos (são pessoas como você que fazem o mundo melhor).

A Luciana (Luluzoca), que além de ser uma grande amiga, por diversas vezes me auxiliou, “estagiou” e validou minhas experimentações.

À professora Dra. Iara Messerschmidt, que me orientou desde a minha graduação, participou das bancas de qualificação e defesa do mestrado e serviu como uma grande apoio e dicionário químico-multivariado por diversas vezes (muito obrigada).

À professora Dra. Orliney Maciel Guimarães, que também me orientou na graduação, aprofundou meus conhecimentos na licenciatura e participou da banca de qualificação deste mestrado, realizando observações pertinentes.

À professora Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno, que enfrentando um momento de caos aéreo deslocou-se até Curitiba e realizou sábias e preciosas contribuições para com este trabalho.

Ao professor Dr. Roberto Pontarollo, que cedeu disposição, tempo, laboratório, materiais e valiosos conhecimentos (sou muito grata a você e ao seu grupo de pesquisa).

A Maria da Graça, que com seus conhecimentos técnicos em cromatografia auxiliou e muito a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Pereira Ramos que cedeu cordialmente seu laboratório e equipamentos espectrofotométricos, podendo assim validar nosso trabalho.

Ao professor Dr. Gilberto Abate, que mal chegou ao departamento e já foi escalado para corrigir meus relatórios (valeu pelas dicas).

Aos professores e colegas que durante o meu mestrado fizeram parte do Laboratório de Química Ambiental e de Materiais (LABQAM), compartilhando materiais, laboratório e momentos inesquecíveis. Ao professor Dr. Marco Tadeu Grassi e ao Grupo de Química Ambiental (GQA), Danielle, Elizabeth, Ramon e Vanessa. Ao professor Dr. Aldo J.G. Zarkin e ao Grupo de Química de Materiais (GQM), Aline, Edson (Salsicha), Eduardo (Mascote), Eryza, Humberto, Marcela e Willian.

Aos meus grandes amigos Aline (Tibum), Humberto, Luis (Lucca), Renan e Willian. Melhores amigos universitários que eu já tive (como é grande o meu amor por vocês).

Aos meus amigos da graduação (valeu turma de 2001), principalmente aqueles que mal temos contatos, Karen (Japinha), Didi (melhor assim), Elinton (Tainha), Leandro (Tosta), vocês estão todos no meu coração.

Aos demais professores e amigos que conheci nesta Universidade e que por algum motivo devo agradecer: professora Debora Guirriadi, Izaura Kuwabara, Harley Paiva, Tania (educação), Daniela (Farmácia), Dennis (ninja do computador), e outros.

Aos meus amigos e irmãos espirituais do Centro Energético de Umbanda Rompe-Mato e Ogum Beira-Mar, a sacerdotisa Vanda de Oxóssi (minha mãe duas vezes), comandos Fabiano de Ogum, Adriane de Ogum, Paulo de Xangô, Sirlene da Oxum, Luis de Oxalá (ninguém é tão forte quanto nós sete juntos), aos pais e mães pequenos Ariane de Omulu, Carlos da Oxum e Simone de Iemanjá (e suas infinitas contribuições espirituais), e demais irmãos de corrente por todas as orações e amparos.

Aos meus amigos que não pertencem a Universidade, amigos de teatro, amigos do inglês, amigos de escola, amigos do Bairro Alto, amigos e colegas professores, pedagogos e diretores e funcionários de escolas das quais trabalhei e que sempre auxiliaram.

Ao Centro Internacional de Idiomas (CII-Curitiba), que revisou o *abstracts* e insiste no meu contínuo aprendizado de inglês estrangeiras.

Devo agradecer as tiazinhas do Restaurante Universitário (RU), que por longos 7 anos me acolheram com simpatia e forneceram uma alimentação balanceada, boa e barata.

Ao laboratório Farmanguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz, pelo fornecimento de padrões analíticos utilizados neste trabalho.

Ao laboratório da CEMEPAR (Central de Medicamentos do Paraná), pelo fornecimento de medicamentos de estudo.

A todos os professores e ao funcionário da Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, Marcelino Câmara.

À CNPq, pelo suporte financeiro do projeto.

A esta grande Universidade, que com todas as dificuldades materiais e políticas que enfrenta, acolhe e de alguma forma ensina o que a vida espera de nós lá fora.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------|-----|
| TERMO DE APROVAÇÃO | ii |
| DEDICATÓRIO | iii |
| AGRADECIMENTOS | iv |

| | |
|--|------|
| LISTA DE QUADROS | x |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE FIGURAS | xiii |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS | xvii |
| RESUMO | xix |
| ABSTRACTS | xx |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 03 |
| 2.1. FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E ASSOCIAÇÕES | 03 |
| 2.2. TUBERCULOSE | 05 |
| 2.2.1. Isoniazida | 10 |
| 2.2.2. Rifamicinas / Rifampicina | 11 |
| 2.2.3. Análise de associações de isoniazida e rifampicina | 12 |
| 2.3. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS | 13 |
| 2.3.1. Espectroscopia Molecular na Região Ultravioleta (UV) Visível (Vis) | 14 |
| 2.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho | 15 |
| 2.3.2.1. Espectroscopia Infravermelho por Refletância Difusa | 16 |
| . | |
| 2.4. ANÁLISE MULTIVARIADA | 17 |
| 2.5. VALIDAÇÕES DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS | 20 |
| 3. OBJETIVOS | 22 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL | 22 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 4.1. MATERIAIS E REAGENTES | 23 |
| 4.2. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS | 24 |
| 4.3. EQUIPAMENTOS | 24 |
| 4.4. METODOLOGIA | 25 |
| 4.4.1. Desenvolvimento de modelos de calibração univariados convencionais por espectroscopia UV-Vis em solução | 25 |
| 4.4.2. Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados por espectroscopia UV-Vis em solução | 26 |
| 4.4.3. Análise de amostras comerciais por espectroscopia UV-Vis em solução | 27 |
| 4.4.4. Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados por | 28 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| | espectroscopia ultravioleta-visível em sólidos. | |
| 4.4.5. | Análise de amostras comerciais por ultravioleta-visível em sólidos | 29 |
| 4.4.6. | Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados por DRIFTS | 29 |
| 4.4.7 | Análise de amostras comerciais por DRIFT | 30 |
| 4.4.8. | Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 31 |
| 4.4.9. | Validação Da Metodologia Escolhida | 30 |
| 4.4.9.1 | Linearidade e Intervalo | 31 |
| . | | |
| 4.4.9.2 | Precisão e Exatidão | 31 |
| . | | |
| 4.4.9.3 | Robustez | 31 |
| . | | |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 5.1. | ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS SOLUÇÃO | 32 |
| 5.1.1. | Planejamento Experimental | 32 |
| 5.1.2. | Análise Univariada Convencional | 33 |
| 5.1.3. | Análise multivariada | 38 |
| 5.2. | ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM FASE SÓLIDA | 44 |
| 5.3. | ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA. | 49 |
| 5.4. | VALIDAÇÃO DO MELHOR MÉTODO ANALÍTICO | 53 |
| 5.4.1. | Linearidade e Intervalo | 55 |
| 5.4.2. | Precisão | 56 |
| 5.4.3. | Especificidade e Seletividade | 58 |
| 5.4.4. | Robustez da Metodologia | 58 |
| 5.4.4.1 | Avaliação da Estabilidade dos Fármacos – Tempos de Leitura | 59 |
| . | | |
| 5.4.4.2 | Avaliação dos Fármacos em Diferentes Temperaturas | 60 |
| . | | |
| 5.4.4.3 | Avaliação dos Fármacos em Diferentes pHs | 60 |
| . | | |
| 5.4.5. | Exatidão | 62 |
| 6. | CONCLUSÕES | 66 |
| 6.1. | Espectroscopia Eletrônica em Solução | 66 |
| 6.2. | Espectroscopia Eletrônica em Sólidos | 66 |

| | | |
|------|-----------------------------------|----|
| 6.3. | Espectroscopia no Infravermelho | 66 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 67 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|------------------|---|----|
| QUADRO 01 | RELAÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA TRATAMENTO DA TUBERCULOSE E DOSAGEM DE CADA FÁRMACO. | 09 |
| QUADRO 02 | DERIVADOS SINTÉTICOS DA RIFAMICINA | 12 |
| QUADRO 03 | REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO. | 15 |
| QUADRO 04 | FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ. | 21 |
| QUADRO 05 | MEDICAMENTOS CONTENDO ISONIAZIDA E RIFAMPICINA | 23 |
| QUADRO 06 | CONTITUIÇÃO DA FASE MÓVEL NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR MÉTODO PADRÃO | 24 |
| QUADRO 07 | PERCENTUAL DE VARIAÇÃO PERMITIDO PARA MEDICAMENTOS NÃO ASSOCIADOS, DE ACORDO COM FARMACOPÉIAS MUNDIAIS. | 32 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| TABELA 01. | MASSA DOS COMPRIMIDOS CONTENDO ISONIAZIDA E RIFAMPICINA | 35 |
| TABELA 02 | RESULTADOS DA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO-SE MÉTODOS CONVENCIONAIS DE CALIBRAÇÃO. | 37 |
| TABELA 03 | PERCENTUAL DE VARIÂNCIA CAPTURADO PELO MODELO DE REGRESSÃO COM DADOS CENTRADOS NA MÉDIA. | 39 |
| TABELA 04 | RESULTADOS DA ANÁLISE EM TRIPLICATA, DE MEDICAMENTOS, PELAS METODOLOGIAS DE CALIBRAÇÃO AVALIADAS NESTE ESTUDO. | 43 |
| TABELA 05 | PERCENTUAL DE VARIÂNCIA CAPTURADO PELO MODELO DE REGRESSÃO COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS POR MSC. | 45 |
| TABELA 06 | ERROS MÉDIOS DE PREVISÃO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO PARA TODOS OS MODELOS DESENVOLVIDOS. | 46 |
| TABELA 07 | ERRO MÉDIO DE PREVISÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA EM MEDICAMENTOS (MELHOR MODELO) | 49 |
| TABELA 08 | RESULTADOS DA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE MODELOS MULTIVARIADOS DESENVOLVIDOS POR DRIFT | 53 |
| TABELA 09 | COMPARAÇÃO DOS ERROS MÉDIOS DE PREVISÃO OBTIDOS PARA A ISONIAZIDA E A RIFAMPICINA ENTRE AS METODOLOGIAS ESPECTROSCÓPICAS DE ANÁLISE. | 54 |
| TABELA 10 | VALORES ENCONTRADOS NO TESTE DA LINEARIDADE E INTERVALO DO MODELO DE CALIBRAÇÃO POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO. | 55 |
| TABELA 11 | VALORES ENCONTRADOS REALIZANDO A SONICAGEM DAS AMOSTRAS PARA O MODELO DE VALIDAÇÃO POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO. | 56 |
| TABELA 12 | VALORES ENCONTRADOS NO TESTE DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO POR ESPECTROSCOPIA | 57 |

| | | |
|------------------|---|----|
| TABELA 13 | ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO VALORES ENCONTRADOS NO TESTE DE REPRODUTIBILIDADE DO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO POR ESPECTROSCOPIA | 58 |
| TABELA 14 | ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO CONCENTRAÇÕES DOS FÁRMACOS EM ESTUDO EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS, OBTIDAS POR MÉTODO ESPECTROSCÓPICO MULTIVARIADO E CROMATOGRÁFICO PADRÃO | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| FIGURA 01 | VIAS PERCORRIDAS PELO BACILO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> . | 07 |
| FIGURA 02. | DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA TUBERCULOSE NO BRASIL. | 07 |
| FIGURA 03 | ESTRUTURA QUÍMICA DA ISONIAZIDA. | 10 |
| FIGURA 04 | ESTRUTURA QUÍMICA DA RIFAMPICINA | 11 |
| FIGURA 05 | ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DA: (A) RIFAMPICINA; (B) ISONIAZIDA; (C) PIRAZINAMIDA. | 14 |
| FIGURA 06 | INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM O A SUPERFÍCIE DE MATERIAIS. | 16 |
| FIGURA 07 | CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MUTLIVARIADO PARA DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA RIFAMPICINA, UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO (AS AMOSTRAS CIRCULADAS CORRESPONDEM A MISTURAS UTILIZADAS NA FASE DE VALIDAÇÃO). | 26 |
| FIGURA 08 | CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MUTLIVARIADO PARA DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA, UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM FASE SÓLIDA (AS AMOSTRAS CIRCULADAS CORRESPONDEM A MISTURAS UTILIZADAS NA FASE DE VALIDAÇÃO). | 29 |
| FIGURA 09 | CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MUTLIVARIADO PARA DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA RIFAMPICINA, UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA DRIFT (AS AMOSTRAS CIRCULADAS CORRESPONDEM A MISTURAS UTILIZADAS NA FASE DE VALIDAÇÃO). | 29 |
| FIGURA 10. | ESPECTROS ELETRÔNICOS ORIGINAIS (A) E PRIMEIRA DERIVADA DOS SINAIS ESPECTRAIS PARA ISONIAZIDA (B) E RIFAMPICINA (C). | 34 |
| FIGURA 11. | EVOLUÇÃO DO RMSEC E RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES, NA MODELAGEM | 39 |

- DE RIFAMPICINA (A) E ISONIAZIDA (B) COM DADOS CENTRADOS NA MÉDIA
- FIGURA 12.** GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE OBTIDOS COM OS ERROS DE PREVISÃO DOS MODELOS DESENVOLVIDOS POR UV-VIS EM SOLUÇÃO PARA A ISONIAZIDA (A) E PARA A RIFAMPICINA (B). 40
- FIGURA 13.** GRÁFICO DOS PESOS (*LOADINGS*) DAS VARIÁVEIS ORIGINAIS (COMPRIMENTO DE ONDA) PARA CADA VARIÁVEL LATENTE (A) E ESPECTRO DOS SUBSTRATOS PUROS (B) 41
- FIGURA 14.** GRÁFICO DE *LEVERAGE* X *RESÍDUOS STUDENTIZADOS* PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA. 41
- FIGURA 15.** GRÁFICO DE VALORES DE REFERÊNCIA POR VALORES PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA. 42
- FIGURA 16** GRÁFICO DE VALORES DE REFERÊNCIA POR VALORES PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA. 43
- FIGURA 17.** ESPECTRO DAS MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA EM FASE SÓLIDA. 44
- FIGURA 18.** EVOLUÇÃO DO RMSEC E RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES, NA MODELAGEM DE RIFAMPICINA (A) E ISONIAZIDA (B) COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS POR MSC. 45
- FIGURA 19** GRÁFICO DOS *RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS "LEVERAGE"* PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VARIÁVEIS LATENTES E PRÉ-PROCESSAMENTO POR

| | | |
|-------------------|---|----|
| | MSC. | |
| FIGURA 20 | GRÁFICO DE VALORES DE REFERÊNCIA POR VALORES PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VARIÁVEIS LATENTES E PRÉ-PROCESSAMENTO POR MSC. | 47 |
| FIGURA 21 | GRÁFICO DE VALORES DE REFERÊNCIA POR VALORES PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VARIÁVEIS LATENTES E PRÉ-PROCESSAMENTO POR MSC. | 47 |
| FIGURA 22 | ESPECTROS DA ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM FASE SÓLIDA DOS MEDICAMENTOS. | 48 |
| FIGURA 23 | ESPECTROS INFRAVERMELHOS POR REFLETÂNCIA DIFUSA PARA PADRÕES - MISTURA SINTÉTICA (325 mg g ⁻¹ DE INH+425mg g ⁻¹ DE RIF) E MEDICAMENTO DE MESMA CONCENTRAÇÃO. | 50 |
| FIGURA 24 | EFEITO DO PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES NO VALOR MÉDIO DO ERRO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO. | 52 |
| FIGURA 25. | EVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE RIFAMPICINA EM DIVERSOS PERÍODOS DE ESTOCAGEM | 60 |
| FIGURA 26. | EVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE RIFAMPICINA DE 00H00 A 06H00 | 61 |
| FIGURA 27. | ANÁLISE DOS FÁRMACOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS | 61 |
| FIGURA 28. | ANÁLISE DOS FÁRMACOS EM DIFERENTES pHs | 62 |
| FIGURA 29. | CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES DESENVOLVIDOS PARA A CURVA ANALÍTICA PELO MÉTODO PADRÃO | 62 |
| FIGURA 30. | CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PELOS CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES | 63 |
| FIGURA 31. | CROMATOGRAMAS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS | 64 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| AIDS | SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (ACQUIRED IMMUNO DEFICIENCY SYNDROME) |
| ANVISA | AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA |
| BCG | VACINA COM O BACILO DE CALMETTE-GUÉRIN |
| BK | BACILO DE KOCH |
| CAS | CHEMISTRY ABSTRACTS SERVICE |
| CLAE | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA |
| CLS | REGRESSÃO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS CLÁSSICA (CLASSICAL LEAST SQUARES) |
| CMD | CONCENTRAÇÃO MÉDIA DETERMINADA |
| CP | COMPONENTES PRINCIPAIS |
| DOTS | ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO SUPERVISIONADO DA TUBERCULOSE (DIRECTLY OBSERVED THERAPY SHORTCOURSE) |
| DP | DESVIO PADRÃO |
| DPR | DESVIO PADRÃO RELATIVO |
| DRIFT | ESPECTROSCOPIA POR REFLETÂNCIA DIFUSA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (DIFFUSE REFLECTION INFRARED FOURIER TRANSFORM SPECTROSCOPY) |
| EMB | ETAMBUTOL |
| FEBRAFARMA | FEDERAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA |
| FIR | REGIÃO DO INFRAVERMELHO DISTANTE |
| HLA/XS | ANÁLISE POR MODIFICAÇÃO DO ORBITAL HÍBRIDO LINEAR (HIBRID LINEAR MODIFICATION ANALISYS) |
| HP | HEWLETT PACKARD |
| HPLC | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HIGH EFFICIENCY CROMATHOGRAPHY) |
| INH | ISONIAZIDA |
| IV | ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO |
| LAFEPE | LABORATÓRIO FARMACÊUTICO DO ESTADO DE PERNAMBUCO |
| LAQFA | LABORATÓRIO QUÍMICO-FARMACÊUTICO DA AERONÁUTICA |
| LQFEX | LABORATÓRIO QUÍMICO-FARMACÊUTICO DO EXÉRCITO |
| MDR-TB | MULTIRESISTENCIA A DROGAS QUE COMBATEM A TUBERCULOSE (MULTI-DRUG RESISTANT TUBERCULOSIS) |
| MID | REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO |
| MSC | EFEITO ESPALHAMENTO MULTIPLICATIVO |
| NIR | REGIÃO DO INFRAVERMELHO PRÓXIMO |
| PCA | ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PRINCIPAL COMPONENT ANALISYS) |
| PCR | COMPONENTE PRINCIPAL DE REGRESSÃO (PRINCIPAL COMPONENT REGRESSION) |
| pH | POTENCIAL HIDROGENIÔNICO |
| PLSR | REGRESSÃO DE MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PARTIAL LEAST SQUARE REGRESSION) |
| PPD | TESTE TUBERCULÍNICO |

| | |
|------------------|--|
| PZA | PIRAZINAMIDA |
| R | COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO |
| RIF | RIFAMPICINA |
| RMSEC | RAÍZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DE CALIBRAÇÃO (<i>Root Mean Standard Error of Calibration</i>) |
| RMSECV | RAÍZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DE CALIBRAÇÃO POR VALIDAÇÃO CRUZADA (<i>Root Mean Standard Error of Calibration with cross validation</i>) |
| RMSEP | RAÍZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO DE PREDIÇÃO (<i>Root Mean Standard Error of Prediction</i>) |
| SG | <i>Savitzky-Golay</i> |
| SM | ESTREPTOMICINA |
| SOBRAVIME | SOCIEDADE BRASILEIRA DE VIGILÂNCIA DE MEDICAMENTOS |
| TB | TUBERCULOSE |
| USP | FARMACOPÉIA AMERICANA (UNITED STATES PHARMACOPEIA) |
| UV | ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA |
| UV-Vis | ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL |
| Vis | ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO VISÍVEL |
| VL | VARIÁVEIS LATENTES |
| WHO | ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WORLD HEALTH ORGANIZATION) |

RESUMO

Dentro do contexto das doenças negligenciadas cabe à tuberculose um lugar de destaque, principalmente em função do elevado número de mortes que provoca no mundo todo, mesmo podendo ser prevenida e curada. No Brasil, eficazes antibióticos são distribuídos gratuitamente para o tratamento da doença, normalmente contendo a associação de isoniazida e rifampicina.

De acordo com normas definidas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o controle de qualidade de referidos medicamentos deve ser realizado por cromatografia líquida de alta eficiência, técnica que, além de onerosa, se mostra extremamente demorada e gera resíduos orgânicos tóxicos. Deste ponto de vista, o desenvolvimento de rotinas analíticas rápidas e de maior simplicidade se apresenta relevante, principalmente para facilitar operações de controle de qualidade.

O presente trabalho se propôs viabilizar a determinação da associação de Isoniazida (INH) e Rifampicina (RIF) por espectroscopia eletrônica (em solução e em fase sólida) e infravermelho por modo de refletância difusa (DRIFT), recorrendo-se a técnicas de calibração multivariada (regressão de mínimos quadrados parciais, PLSR).

Dentro do contexto da espectroscopia eletrônica em solução, observa-se a ineficiência dos sistemas convencionais de calibração (métodos univariados), em função da séria interferência espectral entre as espécies em estudo. Métodos de calibração multivariada contornam a referida interferência espectral, permitindo a obtenção de modelos com excelente capacidade de previsão. Em geral, erros de previsão inferiores a 1 e 8% foram observados na determinação de misturas sintéticas e medicamentos através do modelo selecionado, respectivamente.

Por sua vez, a técnica espectroscópica eletrônica em fase sólida permitiu o desenvolvimento de modelos que viabilizaram a determinação de ambas as espécies de interesse em amostras sintéticas, com erros de previsão entre 8 e 7%. Desafortunadamente, a análise de amostras comerciais foi seriamente comprometida pela presença de excipientes, espécies que modificam o perfil espectral das amostras e reduzem a capacidade de previsão dos modelos.

Modelos de calibração fundamentados em espectroscopia infravermelho (DRIFT) apresentaram uma excelente capacidade de previsão de amostras sintéticas e comerciais, com erros inferiores a 5%.

Finalmente, a metodologia fundamentada em espectroscopia eletrônica em solução foi validada de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA, encontrando nos ensaios de precisão e exatidão limites compatíveis as exigências estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores.

ABSTRACT

Within the neglected diseases tuberculosis occupies a prominent place mainly due to the great number of deaths that it causes all around the world, even when its prevention and treatment is well established. In Brazil, effective antibiotics are gratuitously distributed for the treatment of this disease, normally containing the combination of isoniazida and rifampicina.

According to the norms defined by ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency), the quality control of these medicines must be carried out by the onerous and time consuming liquid chromatography. From this point of view, the development of simple and faster analytical routines represents a relevant task, mainly to simplify the routines of quality control.

The present work was orientated make feasible the determination of the studied association isoniazida (INH) and rifampicina (RIF) by electronic (solution and solid phase) and infrared (DRIFT) spectroscopy, using multivariate calibration tools (Partial Least Squares Regression).

Within the context of the liquid electronic spectroscopy it was possible to observe inefficiency of traditional univariate calibration systems, on account of the serious spectral interference between the studied drugs. Referred spectral interferences were overcome with the use of multivariate calibration methods, a fact that permitted the settlement of models with high prevision capacity. In general, prevision errors lower than 1 and 8% were observed in the determination of synthetic and real samples, respectively.

The solid phase electronic spectroscopy permitted the development of models that allowed the determination of both studied drugs in synthetic mixtures, with prevision errors between 8 and 7%. Unfortunately, the analysis of medicines was seriously thwarted by the presence of excipients, chemicals that induce several changes in the spectra profile and reduce the prevision capacity of the models.

Calibration models based on infrared spectroscopy (DRIFT) have shown excellent prevision capacity of both synthetic and commercial samples, with prevision errors lower than 5%.

Finally, the methodology based on liquid electronic spectroscopy was validated according to ANVISA criteria's, showing limits of precision and accuracy compatible with inspector of organs.

1. INTRODUÇÃO

A química analítica é a ciência que estuda o desenvolvimento e a aplicação de métodos, instrumentos e estratégias, visando resolver problemas associados à identificação e à quantificação das espécies que compõem uma matriz de interesse. De acordo com a literatura (COSTA, 1998), os seus quatro grandes pilares estão representados pela espectroscopia, a cromatografia, o uso de sensores e de procedimentos quimiométricos, os quais deverão continuar evoluindo de maneira a atender os grandes desafios que surgem dia a dia.

Se atentarmos para o fato de que tudo o que existe na conjuntura material é constituído por elementos químicos, fica evidente o grande envolvimento da química analítica com o desenvolvimento de quase todas as áreas do conhecimento, principalmente aqueles que envolvem pesquisas, estudos científicos e industriais. Adicionalmente, a análise química provê suporte indispensável para áreas de importância social, como a de saúde e meio ambiente, e para o desenvolvimento e controle de qualidade do setor industrial, com evidente reflexo na economia do país.

Contar com rotinas analíticas que permitam um controle de qualidade rápido e confiável se mostra extremamente relevante em qualquer área de produção industrial. Na indústria farmacêutica esta necessidade se mostra especialmente importante, principalmente para garantir o acesso da população a produtos farmacêuticos seguros e de ação garantida. Com este propósito, inúmeras metodologias de análise têm sido desenvolvidas, de maneira a satisfazer as crescentes necessidades na área. Infelizmente, grande parte destes procedimentos se fundamenta em técnicas instrumentais onerosas e demoradas, com destaque para a cromatografia líquida de alta eficiência.

Em paralelo, observa-se que a utilização de métodos espectroquímicos poderia simplificar e agilizar muitas rotinas de análise, permitindo, inclusive, o controle *on-line*. Desafortunadamente, a baixa seletividade da espectroscopia eletrônica e a complexidade de sinal proporcionado pela espectroscopia infravermelho dificultam o estabelecimento de rotinas de análise de medicamentos, principalmente em razão das freqüentes interferências observadas entre os fármacos ou entre os fármacos e os excipientes (CORDEIRO, 2006).

Nos últimos anos, métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com sucesso na resolução de problemas como os anteriormente descritos, viabilizando o desenvolvimento de rotinas analíticas espectroscópicas, mesmo frente à severa interferência espectral. Contudo, relativamente poucas aplicações são encontradas na área de análise farmacêutica, o que faz com que aplicações neste campo correspondam a uma fecunda fonte de trabalho.

Neste trabalho objetiva-se o desenvolvimento de metodologias analíticas orientadas ao controle de qualidade dos principais medicamentos que combatem a tuberculose (associação isoniazida/rifampicina), utilizando-se técnicas espectroscópicas na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e do infravermelho (IV) e como ferramenta de calibração multivariada a regressão de mínimos quadrados parciais (PLSR).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E ASSOCIAÇÕES

É interessante que logo a princípio seja realizada a distinção das palavras remédios, fármacos e medicamentos. A origem da palavra latina *remediare*, significa remediar, ou seja, apenas atenua o mal ou a dor. O fármaco é a substância química ativa que apresenta capacidade para efetivamente curar a patologia associada. São os fármacos que mantêm muitas doenças crônicas sob controle, corrigem e resgatam o estado de saúde das populações e podem prorrogar a vida em casos de doenças. O medicamento é o produto farmacêutico que contem o fármaco, ou seja, a mistura de substâncias determinadas e dosificadas apropriadamente, para ser administrada no organismo e curar um transtorno ou prevenir a enfermidade (ANVISA, 1998).

Ao prescrever um medicamento o médico deve saber a exata finalidade desta prescrição, bem como as características farmacológicas da substância e sua indicação, em função de características do paciente e da enfermidade por ela apresentada. Deve ser estabelecida a posologia, a via de administração, o tempo de uso, as precauções e as advertências, de acordo com particularidades de cada um, incluindo o tipo e a gravidade do quadro clínico, a idade e o peso do enfermo, o estado de higidez de suas vias metabólicas e de absorção e excreção do medicamento, a existência de processos mórbidos concomitantes, idiosincrasias e hipersensibilidades individuais e a administração simultânea de outros medicamentos (ANVISA, 1996).

Os antibióticos são produtos de enorme importância, não apenas na área de saúde, mas também na economia, visto que apenas nos Estados Unidos cerca de 100.000 toneladas são produzidas anualmente. Embora aproximadamente 8.000 substâncias com atividade antimicrobiana sejam conhecidas e, a cada ano, centenas de novas substâncias sejam descobertas, pouquíssimas são efetivamente aproveitadas, visto que muitas destas não atendem aos requisitos mínimos para seu emprego terapêutico (KYAW, 2008).

De modo geral, o emprego de formulações contendo associações de fármacos em doses fixas sofre restrições, pois em toda associação de medicamentos existe o risco de se produzirem interações que podem modificar, favorável ou desfavoravelmente, a atividade das drogas, aumentarem a toxicidade e as reações adversas, elevarem o custo do tratamento e não permitir a flexibilidade da posologia, de acordo com o quadro clínico do paciente a que se destinam. Entretanto, deve-se ressaltar que, modernamente, determinadas associações são aprovadas para uso, como aquelas contendo

Sulfamídicos e Trimetoprim; Penicilinas e Probenecida, Benzatina e/ou Cristalina; e Rifampicina e Isoniazida (ANVISA, 1996).

O brasileiro está entre os povos que mais consomem medicamentos no mundo. O país ocupa a 10ª posição no *ranking* mundial do mercado farmacêutico (OLIVEIRA, 2007) e o primeiro lugar em número de farmácias: são 54,9 mil drogarias, o que corresponde a uma loja para cada 3,2 mil pessoas. De acordo com a Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos (SOBRAVIME), o número adequado de habitantes por farmácia seria de 8,5 mil/loja, o que representa um grande paradoxo nacional, uma vez que, mesmo com um número exagerado de farmácias e drogarias, cerca de 30 milhões de brasileiros não têm acesso a medicamentos (CALLEGARI, 2004).

Adicionalmente, estima-se que a renda da sociedade é o fator que determina o acesso aos produtos de última tecnologia (OHAMA, 2007). Em um país que apresenta uma péssima distribuição de renda, a demanda por produtos de maior preço, muitas vezes de melhor qualidade, é bastante reduzida, vindo a desestimular o investimento do setor. De acordo com a Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica (FEBRAFARMA), o Brasil reprime produtos de maior valor, inclusive medicamentos patenteados, postura que leva ao entendimento de que a inovação tecnológica não ocorrerá no país desestimulando a modernização por falta de recuperação dos investimentos com a pesquisa. (OHAMA, 2007).

Outro fator agravante na área farmacêutica é a estimativa de que 10% dos produtos comercializados no país sejam falsificados. O uso deste tipo de medicamentos, ou daqueles com desvios de qualidade, pode resultar em pacientes que não recebem a quantidade necessária de fármaco o que, conseqüentemente, compromete o tratamento proposto. Pior ainda, os produtos podem conter substâncias tóxicas, que não podem ser usadas na fabricação de medicamentos e causar danos ainda mais sérios (ANVISA, 2004).

A legislação brasileira, editada pelo Ministério da Saúde e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece prioridades e estratégias para a inspeção dos produtos farmacêuticos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). As normas estabelecidas são baseadas na Farmacopéia Brasileira, que sugere procedimentos analíticos que dependem da forma de apresentação do medicamento (comprimido, suspensão oral, injeção, outros). De maneira geral, as metodologias sugeridas são fundamentadas em técnicas espectroscópicas ou cromatográficas, sendo a última reconhecidamente dispendiosa e demorada.

2.2 TUBERCULOSE (TB)

Os historiadores retratam a tuberculose como uma das doenças mais antigas do mundo. Casos foram reportados na Grécia e na Roma antiga, mas algumas evidências demonstram que a tuberculose existe desde os tempos pré-históricos, uma vez que sinais da doença foram encontrados em múmias do antigo Egito (3.000 A.C.) e do Peru pré-colombiano.

Além de serem distinguidos pela Revolução Industrial, os séculos XVII e XVIII foram marcados pela “peste branca”, doença que atingiu altos índices de mortalidade na Europa (200 a 400 óbitos por ano a cada 100.000 habitantes), principalmente em função de deficiências nas condições de higiene, nutrição e habitação (DUARTE, 2007).

O termo tuberculose só começou a ser utilizado em 1839, sendo derivado do latim *tubercula* (protuberância pequena), que faz referência às pequenas cicatrizes observada em órgãos de indivíduos infectados. Em 1882, o bacteriologista inglês Robert Koch identificou o agente causador da enfermidade, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, também chamada de Bacilo de Koch (BK) em homenagem ao seu descobridor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

No decorrer do século XIX e até meados do século XX, a tuberculose era uma doença comum entre artistas e intelectuais, sendo relacionada a um estilo de vida boêmio e considerada uma “doença romântica”. Ainda hoje, a tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, voltando a ocupar papel de destaque entre as principais doenças infecto-contagiosas. Muitos foram os fatores que contribuíram para isso, podendo-se destacar a desigualdade social, os aglomerados populacionais, os movimentos migratórios, o envelhecimento da população, o aparecimento cada vez mais comum de cepas de bacilos resistentes aos fármacos conhecidos e o surgimento, na década de 80, da “Síndrome de Imunodeficiência Adquirida” (do inglês AIDS: *Acquired Immuno Deficiency Syndrome*) (SOUZA e VASCONCELLOS, 2005), que afeta o sistema imunológico permitindo o avanço da tuberculose.

A tuberculose é uma das doenças que mais mata no mundo. De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, nunca morreram tantas pessoas por tuberculose como morrem hoje, sendo o bacilo responsável por 7% de todas as mortes e 26% de todas as mortes causadas por doenças curáveis no mundo, a maioria ocorrendo em adultos do sexo masculino (SECRETARIA DE SAÚDE E DEFESA CIVIL/RJ, 2008).

Na última década, 300 milhões de pessoas foram infectadas, 90 milhões de novos casos da doença foram notificados e cerca de 30 milhões morreram. Em 1993, a tuberculose foi declarada emergência global pela *World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde (WHO) (RODRIGUES, *et al.*, 2004).

Dados mais recentes mostram que no ano de 2006 ocorreram 9,2 milhões de novos casos da doença, incluindo somente 700.000 casos de pessoas com AIDS e

500.000 casos de multi-resistência a drogas que combatem a tuberculose (*Multi-Drug Resistant TB*, representado pela sigla MDR-TB). Estima-se que 1,5 milhões de pessoas morreram, além de mais 200.000 casos de morte por AIDS associada a TB (WHO, 2008).

O Brasil ocupa o 13º lugar no *ranking* dos 22 países que concentram 80% dos casos de tuberculose no mundo. Em 2006 foram documentados 104.062 casos de tuberculose, 93.933 novos infectados (12% aidéticos) e 7.556 mortos (18,6% aidéticos). (WHO, 2008). O coordenador-geral de Doenças Endêmicas do Ministério da Saúde, Joseney Santos, contesta o critério adotado pela WHO para definir o *ranking*. Para ele, “nós pagamos o preço de termos a segunda maior população das Américas”. Enquanto a África do Sul têm mais de 500 casos a cada 100 mil habitantes, no Brasil são 45 por 100 mil (DOMINGUEZ, 2006). Para cumprir as metas internacionais estabelecidas pela WHO, que consiste em diagnosticar 70% dos casos de tuberculose e destes curar 85%, em 2006, o Brasil lançou a Campanha Nacional Contra a Tuberculose (OPAS, 2006).

A TB é transmitida basicamente pelo ar e pode atingir todos os órgãos do corpo, existindo várias formas de tuberculose (pulmonar, meníngea, biliar, óssea, renal, cutânea, genital, etc.). O pulmão é o principal órgão atingido pela doença (SOUZA E VASCONCELLOS, 2005). Um paciente pulmonar, se não tratado em um ano, pode infectar de 10 a 15 pessoas, enquanto que, uma vez iniciado o tratamento, o paciente normalmente deixa de transmitir a doença em no máximo 15 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

O sintoma mais freqüente da TB pulmonar no adulto é o Sintomático Respiratório, que corresponde à tosse por mais de três semanas. Outros sintomas são: febre, suores noturnos, falta de ar, falta de apetite (anorexia), emagrecimento e cansaço fácil (adinamia). Os exames usados na tentativa do diagnóstico são a baciloscopia do escarro, a radiologia do tórax e o teste tuberculínico (PPD), que evidencia o contato prévio com o bacilo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007)

Uma curiosidade refere-se ao desenvolvimento da tuberculose no infectado: estimativas apontam que dois bilhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pela tuberculose, mas que 90% delas não desenvolverão a doença. Sabe-se que diversos fatores vêm influenciar no desenvolvimento da doença, entre os quais se pode destacar: o organismo do doente que sofre a infecção, o tipo de doente e a duração da exposição.

Quando uma pessoa inala as gotículas contendo os bacilos de Koch, muitas delas ficam no trato respiratório superior (garganta e nariz), onde a infecção é improvável de acontecer. A infecção inicia após os bacilos atingirem os alvéolos, multiplicando-se e entrando na circulação sanguínea disseminando-se por todo o corpo (FIGURA 01). Até 10 semanas o sistema imune usualmente intervém, impedindo que os bacilos continuem a se multiplicar prevenindo disseminação posterior. As pessoas infectadas e que não

estão doentes não transmitem o bacilo. A doença ocorre quando o sistema imunológico não consegue conter a multiplicação dos bacilos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

O estigma de “mal social” deve-se ao fato que pessoas enfraquecidas, com a defesa imunológica comprometida e com baixa qualidade de vida, têm mais chance de adoecer (DOMINGUEZ, 2006). Estados brasileiros de grande porte e com grande quantidade de periferias pobres destacam-se nos casos de mortalidade por tuberculose (FIGURA 02) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

FIGURA 01. VIAS PERCORRIDAS PELO BACILO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

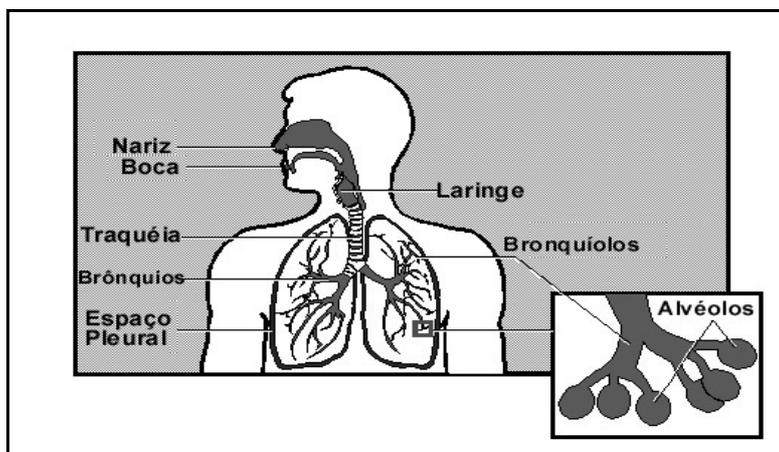
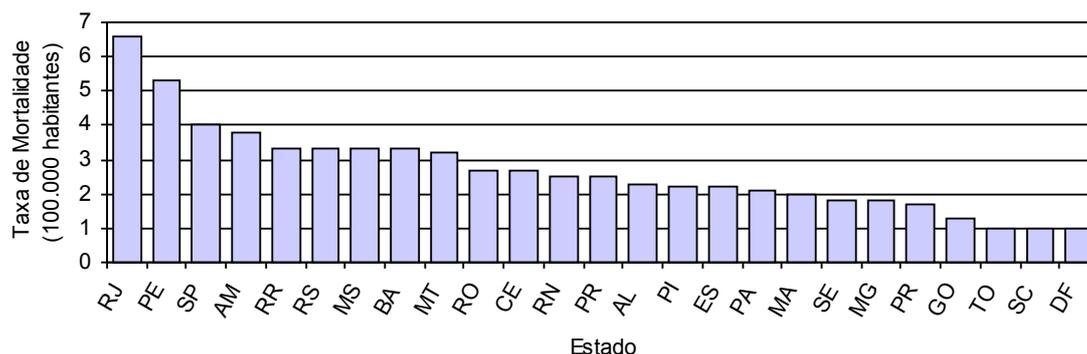


FIGURA 02. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA TUBERCULOSE NO BRASIL (FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).



A prevenção da doença se faz através de vacinas, que podem ser aplicadas por meio de injeção ou por via oral. Em 1908, os cientistas Albert Calmette e Camille Guérin conseguiram isolar uma cepa do bacilo da tuberculose, que recebeu o nome de Bacilo Calmette-Guérin (BCG), sendo aplicada pela primeira vez em crianças em 1921 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A BCG é aplicada por via intradérmica (injeção sob a pele) de preferência no braço direito. A vacina deve ser aplicada na criança de 0 a 4 anos e uma dose reforço deve ser administrada dos 6 aos doze anos, independente de ter a marca no braço (TOSCANO e KOSIM, 2003). Porém, estudos vêm sendo realizado a fim de substituir a BCG por outras vacinas, como as que codificam o antígeno 85 (Ag 85) e a proteína de choque térmico de 65 kDa (hsp65) (RODRIGUES, *et al.*, 2004).

Desde a descoberta da tuberculose, várias tentativas de tratamento foram feitas, desde a ingestão de preparados exóticos até a utilização de sangrias e a indução de vômitos. Alguns pacientes eram proibidos até mesmo de falar ou rir e deveriam permanecer deitados sem poder se movimentar. O mais comum deles se tornou a mudança de clima: os pacientes se deslocavam para regiões litorâneas ou montanhosas para se tratar e aqueles que não tinham forças para a viagem passavam a dormir com travesseiros de folhas de pinheiro ou colocar algas marinhas debaixo da cama. No final do Século XIX, pacientes abastados recebiam cuidados em sanatórios que eram como pousadas nas montanhas. Ao longo do tempo, esses lugares passaram a ser usados para isolamento dos doentes, tornando-se centros de tratamento para pessoas de qualquer classe social (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A maior dificuldade encontrada pelos médicos era firmar o diagnóstico da doença antes que ela provocasse a falha dos pulmões e dos ossos. Esse diagnóstico só foi possível a partir de 1824, após a invenção do estetoscópio. A invenção do raio X, no final do Século XIX, permitiu a produção das imagens das partes internas do corpo, facilitando o diagnóstico da tuberculose (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A descoberta dos fármacos no combate à tuberculose pode ser associada ao primeiro antibiótico a que o homem teve acesso, a penicilina, descoberta acidentalmente em 1928 por Alexander Fleming numa cultura do fungo *Penicillium*. No entanto, apenas em 1941 apareceu no mercado a primeira forma injetável para uso terapêutico. Apesar de a penicilina ser um fármaco extremamente eficaz contra diversas doenças, e a primeira defesa real contra infecções causadas por bactérias, mostrou-se curiosamente ineficaz contra a tuberculose (SOUZA E VASCONCELLOS, 2005).

Foram necessários quinze anos após a importante descoberta de Fleming para que Selman Waksman descobrisse, em 1944, a estreptomicina (SM). Produzida por um microrganismo encontrado na garganta da galinha (*Streptomyces griseus*), a estreptomicina (SM) foi o primeiro antibiótico capaz de atuar de maneira eficaz no combate à tuberculose (SOUZA E VASCONCELLOS, 2005). Hoje existe uma série de fármacos que combatem esta doença, os quais são fornecidos gratuitamente nos postos de saúde do Brasil (QUADRO 01) (ANVISA, 2002).

O tratamento convencional da tuberculose no Brasil separa os fármacos em duas categorias principais: agentes de primeira linha, que incluem a isoniazida (INH),

sintetizada em 1952; a rifampicina (RIF), sintetizada em 1965; o etambutol (EMB), sintetizado em 1960, e a Pirazinamida (PZA), sintetizada em 1936; e de segunda linha, como ofloxacinas, claritoromicina, etionamida e ácidos aminossalicílicos (GILMAN, *et.al.*, 2007).

Os fármacos de primeira linha combinam o máximo de eficácia com o grau aceitável de toxicidade, vindo a tratar uma boa parte dos infectados, com êxito em seis meses de tratamento: nos dois primeiros meses administram isoniazida, rifampicina e pirazinamida e nos próximos quatro meses isoniazida e rifampicina. Em caso de resistência bacteriana ou o paciente estar infectado com AIDS, em certas ocasiões utilizam-se os fármacos de “segunda linha”, sendo o tratamento iniciado com 5 ou 6 fármacos (GILMAN, *et.al.*, 2007).

QUADRO 01. RELAÇÃO DE MEDICAMENTOS PARA TRATAMENTO DA TUBERCULOSE E DOSAGEM DE CADA FÁRMACO (FONTE: ANVISA, 2002).

| LINHAS | FÁRMACO | FORMA DE APRESENTAÇÃO |
|-------------------|---------------------------|---|
| Primeira Linha | Etambutol, cloridrato | Comprimido 400mg,suspensão Oral 25mg.mL ⁻¹ |
| | Isoniazida | Comprimido 100 mg |
| | Pirazinamida | Comprimido 500 mg , solução oral 30 mg mL ⁻¹ |
| | Rifampicina | Suspensão oral 20 mg mL ⁻¹ |
| | Isoniazida+rifampicina | Cápsulas 100 mg+150 mg e 200mg+300 mg |
| Segunda Linha | Ciprofloxacino,cloridrato | Comprimido de 250 e 500 mg |
| | Claritromicina | Comprimido revestido 500 mg |
| | Estreptomicina, sulfato | Pó para solução injetável 1 g |
| | Etionamida | Comprimido rev. 250 mg |

* Todos os medicamentos são de uso restrito, conforme os critérios estabelecidos pela ANVISA

Para simplificar procedimentos e prescrições, prevenir as multi-resistências (MDR-TB) e facilitar a obediência do paciente ao tratamento, a WHO sugere a utilização de 2 a 4 drogas combinadas em doses fixas (DEKKER E LOTTER, 2003). Porém, o uso dos quatro fármacos no mesmo medicamento (75 mg de isoniazida + 150 mg de rifampicina + 400mg de pirazinamida + 275mg de etambutol) não vem sendo adotado no Brasil e em outros países do mundo, devido a estudos comprovarem a reação entre INH e RIF (SISHOO, *et al.*, 1999), decomposição que é catalisada pelo etambutol e pela pirazinamida (ELLARD E FOURIE, 1999; BHUTANI, *et al*, 2005; PRASAD, *et al*, 2006).

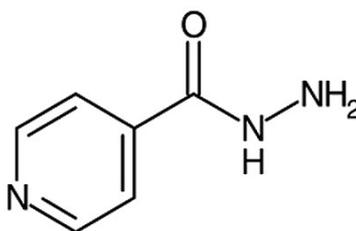
Em alguns Estados brasileiros, o índice de pacientes que abandonam o tratamento chega a 25%. Por este motivo, o Brasil adotou, em 1999, o *Dots*, sigla em

inglês para Estratégia de Tratamento Supervisionado da Tuberculose (*Directly Observed Therapy Shortcourse*). A ação consiste no acompanhamento do paciente desde o diagnóstico até a cura. Na primeira fase do tratamento, os dois primeiros meses, um profissional de saúde faz no mínimo três observações semanais. Na segunda, nos quatro meses seguintes, passa-se a uma observação semanal. Mas as atividades de supervisão ainda não estão presentes em todos os postos de saúde. Caso a pessoa não apareça nos postos em 30 dias, há intervenção destes profissionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

2.2.1. Isoniazida

Constituída de 99 a 101% de piridina-4-carbohidrazida, calculada sob referência da substância seca, a isoniazida (FIGURA 03), $C_6H_7N_3O$, tem massa molar $137,1 \text{ g mol}^{-1}$ e CAS 54-85-3. É um pó branco cristalino ou um cristal pouco colorido, solúvel em água, ligeiramente solúvel em álcool e muito pouco solúvel em éter. Em geral, contém de 95,0 a 105,0% da quantidade indicada (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2002).

FIGURA 03. ESTRUTURA QUÍMICA DA ISONIAZIDA.



Isoniazida é utilizada no tratamento e na profilaxia da tuberculose (em combinação com outros agentes). Considera-se que a sua ação bactericida reflete-se tanto sobre os bacilos na etapa de repouso quanto aqueles estão em fase de divisão rápida. Por sua excelente atividade, baixo custo e relativa boa tolerância, é considerado o melhor fármaco anti-tuberculostático de que se dispõe, pelo que sempre deveria estar incluído em qualquer regime terapêutico (CAÑADA, 2002).

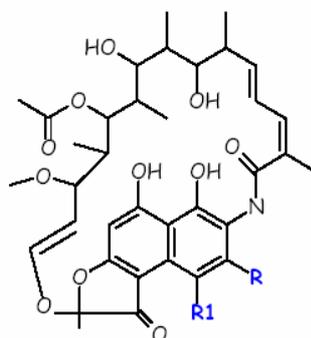
A absorção é completa quando em jejum e se excretam principalmente na urina e uma pequena porção nas fezes (CAÑADA, 2002).

2.2.2. Rifamicinas/Rifampicina

As rifamicinas (FIGURA 04) são antibióticos naturais que constituem um grupo de antibióticos macrocíclicos complexos, com atividade bactericida de amplo espectro. Foram obtidas pela primeira vez em 1957, sendo isolados cinco tipos (A, B, C, D e E). Destes, a rifamicina B foi a mais ativa. Posteriormente, por via sintética, diversos radicais foram incorporados na rifamicina B, o que deu origem as rifamicinas semi-sintéticas, de uso mais difundido: rifamicina SV, rifampicina e rifamida (QUADRO 02) (CAÑADA, 2002).

As rifamicinas são antibióticos semi-sintéticos que apresentam atividade primariamente bactericida de amplo espectro. A estrutura química geral das rifamicinas é apresentada na FIGURA 02. Foram obtidas pela primeira vez em 1957, sendo isolados cinco tipos (A, B, C, D e E). Destes, a rifamicina B foi a mais ativa. Posteriormente, por via sintética, diversos radicais foram incorporados na rifamicina B, o que deu origem as rifamicinas semi-sintéticas, de uso mais difundido: rifamicina SV, rifampicina e rifamida (Tabela 3) (Cañada, 2002).

FIGURA 04. ESTRUTURA QUÍMICA DA RIFAMICINA



QUADRO 02. DERIVADOS SINTÉTICOS DA RIFAMICINA

| PRINCIPIO ATIVO | R | R ₁ |
|----------------------|--|--|
| <i>Rifamicina B</i> | H | O-CH ₂ -COOH |
| <i>Rifamicina SV</i> | H | OH |
| <i>Rifamida</i> | H | OCH ₂ -CO-N(CH ₂ -CH ₃) ₂ |
| <i>Rifampicina</i> | -CH=N-N ₁  N-CH ₃ | OH |

A rifampicina é um antibiótico semi-sintético obtido da rifamicina SV. Não contém menos de 97% e mais que 102,0% de $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, calculado com referência na substância seca.

A rifampicina é um dos mais efetivos agentes antituberculose disponíveis. Inibe a síntese do RNA bacteriano, interferindo com a polimerase DNA (UCT, 2006). Ela é absorvida de forma rápida e quase total, sendo eliminada fundamentalmente pela via biliar e urinária. Durante o tratamento com rifamicinas, a saliva, fezes, esputos, lágrimas, leite e urina se pigmentam de uma cor rosa-alaranjado a avermelhado (CAÑADA, 2002).

Esta substância tem massa molar de $822\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ é apresentada como um pó cristalino marrom avermelhado, ligeiramente solúvel na água, álcool, éter e acetona e solúvel no metanol. Para identificá-la podem-se utilizar espectros de infravermelho comparando-se com espectro padrão, observando-se absorções características em 237, 254, 334 e 475 nm no espectro ultravioleta e também podem ser utilizados testes cromatográficos (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2002). Uma de suas principais características é ser sensível à luz (CAÑADA, 2002).

2.2.3. Análise de associações de isoniazida e rifampicina

Em grande parte das farmacopéias consultadas não se faz menção à determinação simultânea dos fármacos em estudo. Na Farmacopéia Americana (USP) é relatada uma metodologia simultânea, a qual envolve Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se eluição por gradiente.

De 1997 a 2007, a literatura científica com palavras chaves *isoniazid* e *rifampicin* tem apresentado 120 artigos envolvendo a determinação de isoniazida, 73 artigos envolvendo a quantificação de rifampicina e apenas 20 relatos de metodologias orientadas à quantificação da associação.

Normalmente, a análise de associações é viabilizada pelo uso de métodos cromatográficos, envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal (WALUBO, 1994; PANCHAGNULA, *et. al.*, 1999; SHISHOO, 2001; KHUHAWAR e RIND, 2002; AGRAWAL *et. al.*, 2002 e 2004), em fase reversa (CALLERI, *et. al.*, 2002), com eluição por gradiente (ESPINOSA-MANSILLA, 2002), por formação de pares iônicos (PATEL, *et. al.*, 1998), em camada fina (ARGEKAR, *et. al.*, 1996) e por métodos de electrocinética micelar (VALENZUELA, *et. al.*, 2002).

Análises colorimétricas envolvendo cápsulas e comprimidos da associação de isoniazida + rifampicina vêm sendo estudadas, junto com outras formas do ácido isocotínico (MARIAPPAN *et. al.*, 2004), assim como métodos de voltametria têm sido propostos para a determinação da associação em medicamentos, plasma, sangue e urina (HAMMAM, *et.*

al., 2004). Práticas de polarografia de pulso diferencial com calibração multivariada (LOMILLO, *et al.*, 2001) e métodos de extração em amostras de plasma e urina têm sido também descritos, apresentando boa precisão e exatidão nas análises (ELLARD, 1999).

Métodos espectroscópicos associados à análise univariada foram reportados por Benetton e colaboradores (1998), que compara métodos com e sem tratamentos matemáticos (derivação).

2.3. ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

As técnicas analíticas evoluem de acordo com as necessidades da época. Nos dias atuais, por exemplo, percebe-se a necessidade de um monitoramento contínuo dos processos de produção de fármacos e medicamentos. Por se tratar de produtos orientados a atender as necessidades de pessoas já debilitadas por uma doença ou sintoma particular, a premência de um rigoroso controle de qualidade é mais do que evidente.

As normas estabelecidas pela ANVISA para a análise de medicamentos são baseadas na Farmacopéia Brasileira, que em geral sugere metodologias fundamentadas em técnicas cromatográficas ou espectroscópicas, e procedimentos analíticos que dependem da forma de apresentação do medicamento (comprimido, suspensão oral, injeção, outros). Muitos dos procedimentos analíticos que têm sido propostos apresentam metodologias fundamentadas em técnicas com alta sensibilidade e exatidão, porém, nem sempre disponíveis.

A análise espectrofotométrica é um processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética, em alguma região do espectro eletromagnético. Sendo uma técnica consolidada, de fácil implementação e ampla aplicabilidade, boa exatidão, baixo custo e sensibilidade compatível com outras técnicas analíticas, torna-se uma grande aliada no controle de qualidade de produtos farmacêuticos ou nas demais áreas da análise química (SKOOG, *et al.* 2006).

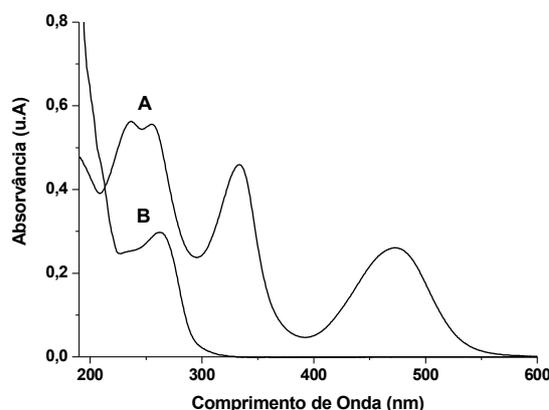
2.3.1. Espectroscopia Molecular na Região Ultravioleta (UV) e Visível (vis)

Medidas de absorção baseadas em radiação ultravioleta encontram vasta aplicação para identificação e determinação de espécies inorgânicas e orgânicas, sendo talvez, a mais utilizada dentre todas as técnicas de análise quantitativas em laboratórios químicos e clínicos em todo o mundo.

Grande parte dos fármacos apresenta um sinal bastante intenso na região ultravioleta-visível, o que faz com que a sua determinação seja viável, mesmo em concentrações traços. Adicionalmente, a sua validação costuma ser mais simples e efetiva, em relação, por exemplo, a métodos fundamentados em cromatografia líquida de alta eficiência (MADAN *et al.*, 2005). Infelizmente, a seletividade da técnica é negativamente influenciada pela freqüente interferência espectral (FIGURA 05), fato que obriga à utilização de processos de separação prévia (FERNÁNDEZ, *et. al.*, 2003), que normalmente acrescentam etapas que afetam a repetibilidade e reprodutibilidade da determinação.

Normalmente, técnicas univariadas de calibração não permitem contornar este problema de interferência, o que inviabiliza o seu uso para quantificação de misturas complexas que apresentem sobreposição espectral. Nestes casos, ferramentas multivariadas apresentam grande utilidade, viabilizando inúmeras metodologias analíticas, mesmo em situações de severa interferência espectral.

FIGURA 05. ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DA: (A) RIFAMPICINA; (B) ISONIAZIDA



2.3.2. Espectroscopia na Região do Infravermelho

A região do infravermelho (IV) situa-se na porção do espectro compreendida entre 10 a 12.800 cm^{-1} . Frequentemente, esta região é dividida em três partes principais, conforme QUADRO 03.

QUADRO 03. REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO.

| Região Espectral | Abreviação | Comprimento de Onda | |
|------------------------|------------|---------------------|-----------------|
| | | cm^{-1} | nm |
| Infravermelho Próximo | NIR | 12.800 a 4.000 | 700 – 2.500 |
| Infravermelho Médio | MID | 4.000 a 200 | 2.500 – 15.000 |
| Infravermelho Distante | FIR | 200 a 10 | 14.300 – 50.000 |

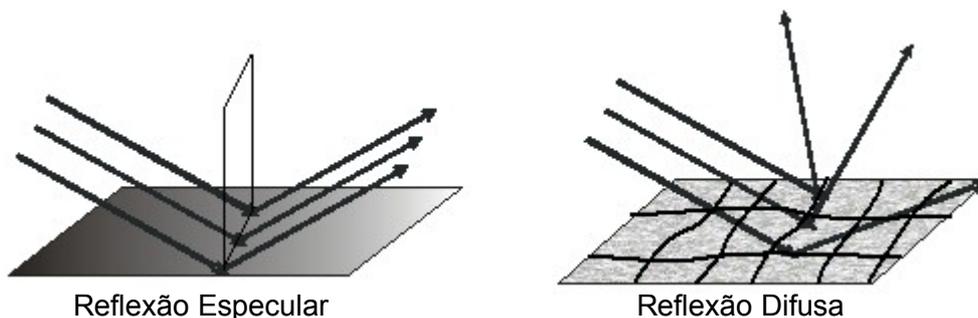
A região do infravermelho médio é a área que concentra o maior interesse dos químicos, embora as regiões do infravermelho próximo e do distante venham angariando maior atenção. Como no caso do infravermelho próximo, onde estudos envolvendo análises farmacêuticas vêm sendo mais freqüentes, devido a sua boa determinação qualitativa e quantitativa de parâmetros físicos e químicos, habilidade no processo, além de ser compatível com a fibra ótica, fator este que acaba por facilitar as análises (PARISOTTO, *et. al.*, 2005; REICH, 2005).

A aplicação da espectroscopia no infravermelho como ferramenta analítica começou apenas no período da segunda guerra mundial, no setor de controle de qualidade em algumas indústrias químicas alemãs. Apesar de fornecer uma gama de informações espectrais, devido à maior complexidade nos espectros, menor largura das bandas e as limitações instrumentais do aparelho, determinações quantitativas eram praticamente impossíveis de serem extraídas, restringindo-se basicamente a aplicações qualitativas ou para reforçar hipóteses propostas sobre a estrutura química das espécies (SKOOG, *et. al* 2006).

Uma das grandes dificuldades apresentadas pelo método diz respeito a grande parte do número de dados que não possui informações correlacionadas diretamente com o analito de interesse, sendo utilizadas diversas metodologias de pré-processamento, como escalamento, utilização de cálculos de derivadas e filtragem digital para remoção de ruído afim de evitar distorções no modelo, e conseqüentemente a conclusões errôneas nas análises. Para minimizar o ruído, vários trabalhos optam pelo uso do filtro de média móvel, transformada de Fourier, transformada de Wavelet ou Savitsky-Golay. (POPPI e COSTA, 2002).

2.3.2.1 Espectroscopia Infravermelho por Refletância Difusa

A técnica que utiliza a reflexão difusa da radiação infravermelha é conhecida como DRIFT (Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy) (FULLER e GRIFFITHS, 1978). A reflexão difusa ocorre em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado. Neste processo de reflexão, o feixe incidente penetra a superfície da amostra interagindo com a matriz, retornando à superfície da mesma, após absorção parcial e múltiplos espalhamentos, conforme FIGURA 06. Com isto, a radiação que sofre a reflexão difusa fornece informações qualitativas e quantitativas, sobre a natureza química da amostra (MESSERSCHMIDT, 1999).

FIGURA 06. INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO COM O A SUPERFÍCIE DE MATERIAIS.

Na reflexão difusa também poderá ser observada a reflexão especular, que ocorre na interface ar/superfície da matriz, apresentando sérias distorções em certas regiões do espectro. O tamanho das partículas, o espaço livre entre elas e o grau de compactação interferem significativamente na resposta espectral, devendo o preparo das amostras serem de melhor qualidade possível, assegurando os resultados obtidos (ROSSIGNOLI, 2006).

Uma das precauções durante o experimento envolvendo a reflexão difusa é a homogeneidade e tamanho das partículas. O efeito do tamanho das partículas pode causar o deslocamento da linha de base, principalmente em comprimentos de onda de grande absorção pela amostra. Amostras formadas por partículas finas podem absorver mais feixes incidentes, e a correta quantificação de analitos nas amostras depende do efetivo poder de penetração, sendo grande o suficiente para providenciar um espectro representativo da amostra por inteiro.

Quanto à associação de isoniazida e rifampicina, não foi localizado nenhum relato na literatura sobre as suas quantificações por infravermelho, apenas a determinação da estrutura molecular da associação (FAVILA, *et. al.*, 2007).

2.4. ANÁLISE MULTIVARIADA APLICADA A MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Dois grandes aspectos podem vir a ilustrar motivos para os avanços nas análises instrumentais: os avanços tecnológicos e a preocupação ambiental, visto que resultados são obtidos de maneira mais rápida, não destrutiva e invasiva, assim como não há geração de subprodutos químicos tóxicos (POPPI e COSTA, 2002).

Entretanto, o tratamento dos dados obtidos passou a exigir modelos mais complexos que iam além da tradicional calibração univariada. O problema da modelagem destes dados foi solucionado com a aplicação de técnicas quimiométricas, considerada como uma das fortes razões que contribuíram para a utilização da espectroscopia como uma ferramenta de análise na química analítica.

Assim, com a informatização e os avanços nas áreas da quimiometria, as análises químicas atingiram um alto grau de sofisticação, podendo ser determinadas várias

variáveis numa única amostra. Em geral, na análise espectroscópica univariada as concentrações dos compostos de interesse numa amostra são determinados através da resolução de um sistema de equações simultâneas oriundas pela lei de Lambert-Beer, em tantos comprimentos de onda quantos forem os analitos de interesse, estabelecendo constantes de proporcionalidade individuais entre concentração e intensidade de absorção. Porém, quando ocorre a sobreposição de espectros dos componentes da matriz, existem grandes dificuldades de extrair as diferentes informações relevantes do sistema, sendo mais adequados os métodos multivariados por permitirem um estudo com várias espécies presentes ao mesmo tempo, não importando a existência ou ausência de diferenças espectrais marcantes entre elas, nem a existência de alta correlação nos dados (FERREIRA, *et al.*, 1999).

O princípio da calibração multivariada tem como objetivo principal a redução da variância na predição de uma variável resposta, vindo a explorar toda a informação instrumental utilizada. A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas, sendo, geralmente, realizada em duas fases: a calibração e a previsão.

O processo de calibração se relaciona com a correlação de duas matrizes X e Y. A matriz X é formada quando são obtidos os espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida, produzindo “n” linhas (que representam as amostras) e “p” colunas (comprimentos de ondas ou energias diferentes para a espectroscopia). A matriz Y é formada por “n” linhas, correspondendo aos valores de concentração de cada amostra da matriz X. Desta forma, as matrizes X e Y devem sempre ter o mesmo número de linhas.

Antes da previsão, deve-se desenvolver um modelo matemático apropriado a partir do método selecionado, determinando-se um vetor dos coeficientes de regressão (b) que melhor possa reproduzir Y a partir dos dados da matriz X (Eq. 01).

$$\mathbf{X} = \mathbf{b} * \mathbf{Y} \qquad \text{Eq. 01}$$

A partir de novos espectros (Xteste), esse modelo é utilizado na fase de validação para estimar as concentrações já conhecidas das amostras (Yteste) e posteriormente o modelo passa a ser utilizado na fase de previsão, onde se estima concentrações para um novo conjunto de dados (Eq. 02). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator Y da equação 1 para a obtenção da equação 2, implica a utilização da matriz transposta de X, ou seja, (Xteste)^t.

$$\mathbf{Y}_{\text{teste}} = (\mathbf{X}_{\text{teste}})^t * \mathbf{b} \qquad \text{Eq. 02}$$

Métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com bastante frequência na resolução de problemas de interferência espectral e atestam o grande potencial dos processos de calibração multivariada para a resolução deste tipo de problemas, sem a necessidade de recorrer à separação dos constituintes da amostra, metodologia química freqüentemente associada à contaminação ou perda da amostra de interesse (BENAMOR, *et al.*, 2000; BOERIS, *et. al*, 2000; CRIADO, *et al.*, 2000).

Para lidar com os dados obtidos através de técnicas espectroscópicas, ferramentas como a Análise de Componentes Principais (PCA) vêm sendo utilizadas. O método PCA é a base para o PCR (*Principal Component Regression*) e PLSR (*Partial Least Squares Regression*), métodos que incluem todas as variáveis relevantes, desprezando interferentes. PCR e PLSR são considerados mais eficientes para lidar com ruídos, colinearidades e não linearidades e seus parâmetros praticamente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração (FERREIRA, *et al.*, 1999).

O PLSR difere do PCR por utilizar da covariância entre dados espectrais (valores de absorvância) e da concentração na decomposição, além de procurar no fator que explica a variação elevada o sentido das respostas, conduzindo a modelos preditivos mais eficientes (MADAN *et al.*, 2005). A base do método consiste em decompor a matriz de dados X em termo da soma das várias matriz M, que não podem ser mais expandidas, e mais uma matriz de erros E, que corresponde a parte não modelada de X (eq. 03). As matrizes M constituem as Componentes Principais (CP), e são formadas pelo produto dos vetores t (*scores*) e p (*loadings*), conforme equação 04 (CORDEIRO, 2006).

$$\mathbf{X} = \mathbf{M}_1 + \mathbf{M}_2 + \mathbf{M}_3 + \dots + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 03}$$

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \cdot \mathbf{p}_1 + \mathbf{t}_2 \cdot \mathbf{p}_2 + \mathbf{t}_3 \cdot \mathbf{p}_3 + \dots + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 04}$$

Os *scores* representam a projeção dos dados no novo conjunto de CP: *scores* similares representam amostras similares. Os *loadings* representam o peso de cada variável original na elaboração das novas CP (MADAN *et al.*, 2005). Tanto a matriz X quanto a Y podem ser representadas por *scores* e *loadings* (Eq. 05 e 06) (CORDEIRO, 2006).

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad \text{Eq. 05}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad \text{Eq. 06}$$

A relação entre as duas matrizes X e Y podem ser construídas correlacionando os *scores* de cada bloco, utilizando um modelo linear (Eq. 07).

$$\mathbf{U} = \mathbf{b} \cdot \mathbf{T} \quad \text{Eq. 07}$$

A seleção do número adequado de variáveis é de extrema importância para a construção de um modelo eficiente. Geralmente na seleção utilizam-se técnicas baseadas na minimização da variação residual como a soma residual preditiva dos erros, visto que as últimas componentes principais tendem a explicar ruídos espectrais. Detalhes relacionados com o processamento do PLS podem ser encontrados na literatura recente (MADAN *et al.*, 2005).

O primeiro relato de aplicação de sistemas multivariados para a quantificação espectrofotométrica de misturas contendo rifampicina e isoniazida data de 1989 (MAHLANOBIS *et al.*, 1989), trabalho que consistiu na elaboração de modelos por mínimos quadrados clássicos (CLS, do inglês *Classical Least-Squares*) na região do ultravioleta-visível.

Mais recentemente, vários trabalhos têm reportado a determinação de misturas de isoniazida/rifampicina/pirazinamida, recorrendo à análise multivariada e técnicas espectroscópicas em solução (GOICOECHEA, 1999; ESPINOSA-MANSILLA, *et al.*, 2001; CAÑADA, 2002; MADAN, *et al.*, 2005; YOUSSEF e MAHER, 2007).

Apenas uma metodologia fundamentada em Espectroscopia no Infravermelho Próximo com Refletância Difusa (DRIFT) foi encontrada, proposta orientada à determinação de isoniazida + rifampicina + pirazinamida em comprimidos, utilizando-se calibração por redes neurais artificiais (DU, *et al.*, 2007).

2.5 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Os estudos de validação constituem uma exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), principalmente para controlar variações que podem vir a ocorrer numa nova metodologia analítica, desde que esta apresente respostas compatíveis com métodos já descritos na legislação.

O objetivo último da validação é assegurar a reprodutibilidade dos resultados e o estabelecimento de limites de aceitação do erro analítico, através da aplicação sistemática de testes de precisão e exatidão (ARAGÃO, 2002).

Os ensaios exigidos pela ANVISA são classificados de acordo com categorias já estabelecidas (ANVISA, 2003):

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

Devido ao presente trabalho pertencer a Categoria I, os parâmetros a serem analisados estão descritos conforme legislação (ANVISA, 2003):

- **Especificidade e Seletividade:** Capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. No caso das amostras quantitativas a especificidade pode ser determinada comparando os resultados obtidos com amostras armazenadas sob condição de estresse.

- **Linearidade:** Capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se no mínimo 5 concentrações diferentes e coeficiente de correlação (R) igual a 0,99.

- **Intervalo:** É a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior do método. Seu alcance deve variar de 80 a 120% da concentração teórica do teste.

- **Precisão:** Avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla. Esta deve ser expressa em desvio padrão relativo (DPR), que consiste na razão do desvio padrão (DP) pela concentração média determinada (CMD) expressa em porcentagem. A precisão é considerada em três níveis:

- **Repetibilidade:** Concordância do resultado realizado pelo mesmo analista em um mesmo instrumento, sendo realizada em triplicata em concentrações baixa, média e alta.

- **Precisão Intermediária:** Resultados obtidos em um mesmo laboratório, mas com dias, analista e/ou equipamentos diferentes.

- **Reprodutibilidade:** Concordância obtida em laboratórios diferentes.

Se houver comprovação da reprodutibilidade, não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

- **Limites de Detecção:** determina a mínima quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado.

- Limite de Quantificação: É a menor quantidade de analito que pode ser determinada com exatidão e precisão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas.

- Exatidão: Proximidade dos resultados em comparação com um valor verdadeiro, aplicando a metodologia proposta na legislação.

- Robustez: Capacidade de resistência a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (QUADRO 04). Indica a sua confiança no uso normal.

QUADRO 04. FATORES QUE DEVEM SER CONSIDERADOS NA DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ (FONTE: ANVISA, 2003).

| | |
|-----------------------|--|
| Preparo das Amostras | · Estabilidade das soluções analíticas |
| Espectrofotometria | · Variação do pH da solução |
| | · Temperatura |
| | · Diferentes fabricantes de solventes |
| Cromatografia Líquida | · Variação do pH da fase móvel |
| | · Variação na composição da fase móvel |
| | · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas |
| | · Temperatura |
| | · Fluxo da fase móvel |

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo objetiva o desenvolvimento de metodologias analíticas orientadas ao controle de qualidade de produtos farmacêuticos de relevância, utilizando técnicas espectroscópicas e processos de calibração multivariada. Os objetos deste estudo correspondem a fármacos de medicamentos tuberculostáticos, espécies cuja determinação envolve sérios problemas de interferência espectral mútua.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base nos objetivos apresentados anteriormente, surgem os objetivos específicos descritos abaixo:

- Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para determinação simultânea de rifampicina e isoniazida, utilizando-se espectroscopia UV-Vis em solução e em fase sólida;
- Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para determinação simultânea de rifampicina e isoniazida, utilizando-se espectroscopia no infravermelho por refletância difusa (DRIFT);
- Seleção dos modelos de melhor desempenho e validação de acordo com os critérios da legislação pertinente (ANVISA);
- Utilização dos modelos no controle de qualidade de medicamentos e comparação de resultados com os fornecidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), recomendada pela *United States Pharmacopeia* (USP).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS E REAGENTES.

Padrões de Isoniazida e Rifampicina foram fornecidos pelo Laboratório Farmacêutico Far-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz, apresentando as seguintes especificações:

Isoniazida: Teor de 100,8%, fabricado por Zhejiang Jiangbei/CAQ, válido até Novembro de 2007, lote: 20050306.

Rifampicina: Teor de 99,7%, fabricado por Lupin/Ciel Confiança, válido até Janeiro de 2008, lote: 042040101.

Para cada forma de apresentação, duas amostras de medicamentos diferenciados por fabricante e/ou lote foram gentilmente fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (QUADRO 5).

QUADRO 5. MEDICAMENTOS CONTENDO ISONIAZIDA E/OU RIFAMPICINA.

| FÁRMACO | APRESENTAÇÃO | PROCEDÊNCIA | SIMBOLOGIA |
|---|--------------|-------------|------------|
| Isoniazida 100mg | Comprimidos | IQUECO | MED100A |
| | | LAQFA | MED100B |
| Isoniazida 100mg + Rifampicina 150mg | Cápsulas | GreenPharma | MED250A |
| | | LQFEx | MED250B |
| Rifampicina 300mg | Comprimidos | IQUECO | MED300A |
| | | LQFEx | MED300B |
| Isoniazida 200mg + Rifampicina 300mg | Cápsulas | LAFEPE | MED500A |
| | | LAFEPE | MED500B |

Todos os demais reagentes (tampões, ácidos e solventes) foram de grau analítico PA, enquanto que a água deionizada foi de qualidade ultrapura (Milli-Q® - 18,2MΩ).

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica, incluindo balões, buretas e pipetas volumétricas previamente calibradas, de acordo com procedimentos descritos na literatura (BACCAN *et al*, 2003).

4.2. PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Para a montagem de matrizes de dados utilizou-se o software Origin Pro 6.1[®], enquanto que para a elaboração dos modelos empregou-se o programa PLS-toolbox 3.0, que opera em ambiente Matlab v.6.5.

Os gráficos de superfície de resposta foram construídos no programa Statiscal 6.0.

4.3. EQUIPAMENTOS

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica digital Bio-Precisa, modelo FA 210N ($\pm 0,0001g$).

O aquecimento das soluções para os ensaios de validação foi realizado em agitadores magnéticos com aquecimento (Vertex).

Espectros de absorção UV-Vis em solução foram efetuados em espectrofotômetro Shimadzu (2410 PC), utilizando-se o software UVPC v.3.91 (Shimadzu) e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Na fase de validação da metodologia proposta foram utilizados adicionalmente os espectrofotômetros Hewlett Packard (modelo 8452 A) e Varian (modelo Cary 100 Scan).

Para misturas em fase sólida a leitura ocorreu no espectrofotômetro da Ocean Optics, modelo USB 4000, com fonte de radiação DH-2000 e sonda de fibra óptica, operando de 200 a 600 nm.

Para análises envolvendo DRIFT, utilizou-se o espectrofotômetro Excalibur, modelo FTS – 4000 Bio-Rad, equipado com acessório de refletância difusa. Os espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm^{-1} , acumulando-se 64 varreduras.

A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em um Cromatógrafo Varian Pró-Star, equipado com coluna C-18 (CHROMPACK) e detector de arranjo de fotodiodo (238 nm). A eluição por gradiente foi aplicada de acordo com as informações apresentadas no QUADRO 06. Curvas analíticas individuais foram preparadas a partir de padrões recomendados pela USP (*United States Pharmacopeia*).

QUADRO 06. CONTITUIÇÃO DAS FASES MÓVEIS NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA POR MÉTODO PADRÃO - CLAE. (FONTE: USP, 2006)

| Tempo (minutos) | Solução A (%)* | Solução B (%)** | Eluição |
|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|
| 0 | 100 | 0 | Equilíbrio |
| 0 – 05 | 100 | 0 | Isocrática |
| 05 – 06 | 100 \Rightarrow 0 | 0 \Rightarrow 100 | Gradiente Linear |
| 06 – 15 | 0 | 100 | Isocrática |

* Solução A: Solução Tampão Fosfato de Sódio Dibásico: Acetonitrila (96:4)

** Solução B: Solução Tampão Fosfato de Sódio Dibásico: Acetonitrila (45:55)

4.4. METODOLOGIA

4.4.1. Desenvolvimento de modelos de calibração univariados convencionais por espectroscopia UV-Vis em solução

Para o desenvolvimento de modelos univariados convencionais foram elaboradas curvas de calibração para cada fármaco, no comprimento de onda de máxima absorção apresentado por cada substrato. Cada curva analítica foi composta de 5 valores de concentração, cobrindo-se a faixa de 8,0 a 12,0 mg L⁻¹ para isoniazida, e de 12,0 a 18,0 mg L⁻¹ para rifampicina.

Modelos univariados foram também elaborados no modo derivativo. Neste caso, curvas analíticas para isoniazida foram elaboradas nos comprimentos de onda em que rifampicina apresenta uma derivada da absorvância igual à zero. O mesmo procedimento foi utilizado para a elaboração das curvas analíticas de rifampicina.

4.4.2. Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados por espectroscopia UV-Vis em solução

Para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada foram produzidas 35 misturas, contendo 8,0 a 12,0 mg L⁻¹ de isoniazida e 12,0 a 18,0 mg L⁻¹ de rifampicina (FIGURA 07). Esta faixa de trabalho foi definida levando-se em consideração o teor nominal dos fármacos presentes nos medicamentos comercialmente disponíveis, e os valores de absorvância obtidos pelo modelo univariado.

O modelo multivariado foi desenvolvido utilizando-se 28 misturas, sendo que as 7 misturas restantes foram reservadas para a fase de validação por estarem dispersas e cobrirem todos os valores de concentração (mínimos, medianos e máximos para cada fármaco).

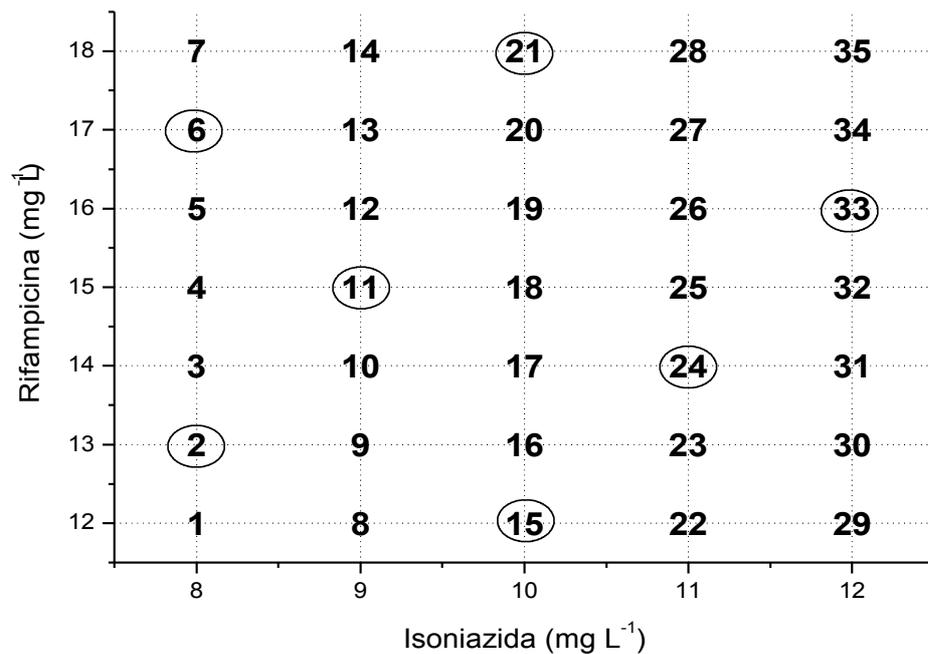
Os espectros foram registrados entre 190 e 600 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e intervalos de 0,5 nm, sendo processados integralmente.

Visando melhorar a capacidade preditiva dos modelos, algumas técnicas de pré-processamento de sinais foram utilizadas. Dentre as principais contam-se:

1. Dados centrados na média: subtraindo o valor de cada elemento da coluna pelo valor médio dos elementos dessa coluna, resultando em uma matriz com média igual a zero.
2. Auto-escalamento: evidenciando sinais de menor intensidade

3. Alisamento sem derivação: pelo método *Savitzky-Golay* (SAVITZKY-GOLAY , 1994) para diminuir ruídos espectrais
4. Alisamento com derivação: processada para separar sinais não totalmente sobrepostos.

FIGURA 07. CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO PARA DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA, UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO (AS AMOSTRAS CIRCULADAS CORRESPONDEM A MISTURAS UTILIZADAS NA FASE DE VALIDAÇÃO).



O primeiro critério utilizado para a seleção do número de Variáveis Latentes (VL) corresponde ao menor RMSECV, parâmetro que corresponde à raiz quadrada do somatório dos erros de previsão ao quadrado, obtidos na fase de validação cruzada. Como sistema de validação cruzada foi utilizado uma rotina de *leave-one-out*, procedimento que consiste na retirada de uma das amostras do conjunto de calibração e a sua utilização com o elemento de previsão. Este processo é repetido n vezes, de maneira a permitir que todos os padrões de calibração (n) participem como elementos de previsão. Finalmente, o erro de previsão é obtido comparando-se a concentração prevista para cada padrão (Y_1) com o seu valor verdadeiro (Equação 8), indicado na matriz de concentração (Y).

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y - Y_1)^2}{n}} \quad \text{Eq. 08}$$

Adicionalmente, e objetivando-se evitar o desenvolvimento de modelos superestimados, utilizou-se o critério do menor número possível de VL, excluindo-se aquelas responsáveis por parcelas pouco significativas da variância total.

Após elaboração dos modelos, a presença de anomalias (*outliers*) no conjunto de calibração foi avaliada utilizando-se os critérios de *Resíduos Studentizados* e *Leverage*.

Neste estudo, estas anomalias representam erros grosseiros quando comparados com a maioria dos dados, oriundos de diversas formas como preparo das amostras e limpeza de materiais. Os resíduos de *Studentizados* indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, enquanto que o *Leverage* mede a influência de uma amostra no conjunto de calibração, através da distância entre cada espectro e o centróide do conjunto de espectros. No primeiro caso considera-se um valor limite de 2,5, enquanto que no segundo, um valor de $3 \text{ VL} / n$, em que VL corresponde ao número de variáveis latentes e n ao número de amostras utilizadas.

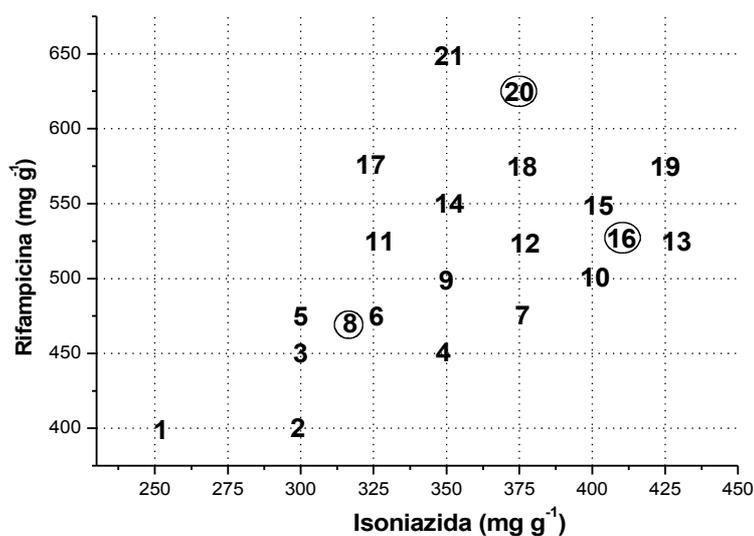
4.4.3 Análise de amostras comerciais por espectroscopia UV-Vis em solução.

Na análise por espectroscopia UV-Vis, 20 comprimidos (ou cápsulas) foram triturados e homogeneizadas em almofariz. Massas de aproximadamente 0,06 g foram tomadas e dissolvidas em 1.000,0 mL de água destilada. Desta solução foram tomados vol.s de 20,0 a 50,0 mL, dependendo da concentração dos substratos em estudo, sendo finalmente diluídos até 100,0 mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.4 Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados por espectroscopia ultravioleta-visível em sólidos.

Para o desenvolvimento de modelos de calibração multivariada foram preparadas 21 misturas sintéticas, contendo 250 a 450 mg g⁻¹ de isoniazida e 400 a 650 mg g⁻¹ de rifampicina e utilizando-se sulfato de bário como diluente. Os modelos foram construídos a partir de 18 misturas, enquanto que as 3 restantes foram reservadas para a fase de validação (TABELA 01). Os espectros foram registrados entre 200 e 600 nm utilizando sonda de fibra ótica, sendo processados integralmente.

FIGURA 08. CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO PARA DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA, UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM FASE SÓLIDA (AS AMOSTRAS CIRCULADAS CORRESPONDEM A MISTURAS UTILIZADAS NA FASE DE VALIDAÇÃO).



Como técnicas de pré-tratamentos foram utilizadas rotinas de dados centrados na média, correção do efeito espalhamento multiplicativo (MSC), auto-escalamento e alisamento com e sem derivação.

O MSC assume um coeficiente de espalhamento para todos os comprimentos de onda, o que corrige as variações de espalhamento de luz para as medidas de refletância. Os demais pré-tratamentos foram justificados na metodologia multivariada no ultravioleta-visível (Seção 4.4.2).

4.4.5 Análise de amostras comerciais por espectroscopia ultravioleta-visível em sólidos

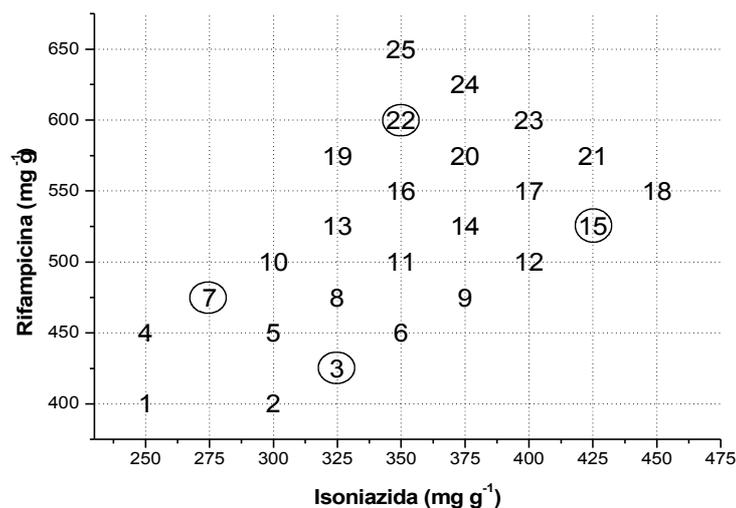
Na análise dos medicamentos utilizaram-se as mesmas especificações do equipamento utilizado na análise das misturas sintéticas. Separadamente, todos os comprimidos foram triturados e homogeneizados, sendo duas amostras utilizadas a sonda de fibra ótica para leitura e a detecção ocorrendo de 200 a 600nm, sendo o espectro processado integralmente.

4.4.6 Desenvolvimento de modelos de calibração multivariados por DRIFT.

Para as análises no infravermelho por refletância difusa, prepararam-se as amostras de forma similar ao ultravioleta-visível em sólidos, sendo os espectros registrados entre 400 e 7.000 cm^{-1} , com auxílio de um espectrofotômetro Excalibur (FTS-4000 Bio-Rad), equipado com acessório de refletância difusa, com resolução de 4 cm^{-1} , acumulando 64 varreduras. Os espectros foram processados integralmente (NIR-MID) e separados em regiões do infravermelho próximo (NIR) e infravermelho médio (MID).

As 21 misturas utilizadas na fase de calibração e as 4 reservadas para validação são apresentadas na FIGURA 09.

FIGURA 09. CONCENTRAÇÃO DAS MISTURAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DO MODELO MULTIVARIADO PARA DETERMINAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA, UTILIZANDO-SE ESPECTROSCOPIA DRIFT (AS AMOSTRAS CIRCULADAS CORRESPONDEM A MISTURAS UTILIZADAS NA FASE DE VALIDAÇÃO).



4.4.7 Análise de amostras comerciais por DRIFT

Na análise por espectroscopia no infravermelho por refletância difusa, 20 comprimidos e cápsulas de cada amostra foram moídos e homogeneizadas em almofariz. Quantidades suficientes foram colocadas no porta-amostra para uma leitura direta do medicamento em fase sólida.

4.4.8 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As soluções para curva analítica foram preparadas com concentrações que variavam de 0,08 a 0,12 mg L⁻¹ de isoniazida e 0,13 a 0,20 mg L⁻¹ de rifampicina, conforme método descrito na Farmacopéia Americana (USP, 2006). A dissolução dos fármacos ocorre em uma mistura de tampão fosfato de sódio dibásico:metanol grau HPLC (96:4), no máximo 10 minutos antes da leitura. A solução tampão era preparada em torno de 12 horas antes do uso, diluindo 1,4 gramas do tampão fosfato de sódio dibásico para cada litro de água ultrapura (Milli-Q®). Acertava-se o pH até 6,8 com ácido fosfórico e este era filtrado com membrana Millipore de 0,45µm e sonicado por 10 minutos.

As amostras foram preparadas em duplicata, triturando-se 20 comprimidos de cada medicamento, sendo pesado de 0,008 a 0,012g para a diluição com solução tampão em uma balão volumétrico de 25 ou 50 mL, conforme teor nominal da amostra. O valor esperado após diluição era de 0,10 mg L⁻¹ de isoniazida e 0,15 mg L⁻¹ de rifampicina (proporção de medicamentos brasileiros). Conforme metodologia USP, a amostra era sonificada por 10 minutos e a leitura ocorria no máximo duas horas após preparo das amostras.

4.4.9 Validação da Metodologia Escolhida

A partir da análise comparativa dos modelos de calibração desenvolvidos com INH e RIF, o melhor modelo foi validado segundo critérios estabelecidos pela ANVISA (ANVISA, 2003). Para verificação da validade do modelo foram realizados testes de intervalo, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Testes referentes ao limite de detecção e quantificação não são adequadas em metodologias multivariadas.

4.4.9.1 *Linearidade e Intervalo*

Com o intuito de definir a faixa de trabalho (intervalo), 3 amostras foram preparadas, para cada um dos padrões, considerando-se concentração nominal dos medicamentos e a variação máxima permitida por órgãos regulamentadores ($\pm 20\%$) (ANVISA, 2003).

Estas soluções, contendo 8, 10 e 12 mg L⁻¹ de isoniazida e 12, 15 e 18 mg L⁻¹ de rifampicina, foram analisadas por espectroscopia UV-Vis e a concentração dos fármacos interpolada em uma curva analítica convencional com coeficiente de regressão superior a 0,99. A validez deste intervalo foi avaliada em função do erro experimental observado se comparado com a concentração nominal do medicamento.

4.4.9.2 *Precisão e Exatidão*

Os testes de precisão foram considerados em dois níveis: Precisão intermediária e Reprodutibilidade.

A precisão intermediária foi avaliada por análise em triplicata de três misturas sintéticas, contendo 8 mgL⁻¹ de INH e 12 mgL⁻¹ de RIF, 10 mgL⁻¹ de INH e 15 mgL⁻¹ de RIF e 12 mgL⁻¹ de INH e 18 mgL⁻¹ de RIF, utilizando-se espectrofotômetros diferentes (Varian e Shimadzu). A precisão é aceita quando o desvio padrão relativo foi inferior a 5%.

Para avaliação da reprodutibilidade, as amostras acima foram analisadas por dois analistas, em dias diferentes e em aparelhos diferentes. Este teste foi viabilizado pela participação da analista Luciana M. Fontoura, utilizando o espectrofotômetro da Hewlett Packard (modelo 8452 A).

A exatidão foi avaliada com o mesmo conjunto amostral, avaliando-se o erro percentual em relação ao valor nominal. A exatidão mostra-se satisfatória quando o erro percentual varia até $\pm 2\%$ do valor nominal (ANVISA, 2003).

4.4.9.3 Robustez

A robustez da metodologia foi avaliada, analisando-se o comportamento espectral das amostras em diferentes condições de temperaturas (5, 20, 40, 50 e 70° C), pH (4, 5, 7 e 9) e tempos de leitura (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM SOLUÇÃO

5.1.1. Planejamento Experimental

Para estabelecer os limites da modelagem, três argumentos foram utilizados: composição do medicamento, limites vigentes por lei e valor de absorvância dos fármacos.

O primeiro argumento considera a concentração de cada um dos fármacos nos medicamentos disponíveis para o estudo. De acordo com informações da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), os medicamentos disponíveis no país apresentam teores de isoniazida entre 100 e 200 mg e de rifampicina entre 150 e 300 mg, por cápsula ou comprimido.

O segundo está relacionado com a variabilidade da composição de cada medicamento, estabelecido a partir de normas apresentadas por diversas farmacopéias. Em medicamentos contendo associações, apenas a farmacopéia americana propõe método de análise e estipula teores percentuais permitidos (90 a 130% para rifampicina e 90 a 110% para isoniazida). Para medicamentos não associados, os teores permitidos pelas diversas farmacopéias consultadas são apresentados no QUADRO 07. Entretanto, órgãos nacionais de controle estipulam em 10% a variação máxima permitida para comprimidos de isoniazida (DIÁRIO OFICIAL, 2005).

QUADRO 07 – PERCENTUAL DE VARIAÇÃO PERMITIDO PARA MEDICAMENTOS NÃO ASSOCIADOS, DE ACORDO COM MONOGRAFIAS DE FARMACOPÉIAS MUNDIAIS.

| Farmacopéia | Isoniazida | Rifampicina |
|----------------------|------------|---------------|
| Brasileira | 99 – 101% | Mínimo 90% |
| Americana | 93 – 107% | 90- 100 % |
| Britânica e Japonesa | 95 – 105% | 92,5 – 107,5% |
| Portuguesa | 99 – 101% | 99 – 101% |

Com base em todos os argumentos anteriores e nas respostas espectrais verificadas ao se utilizar diferentes concentrações de fármacos, definiram-se faixas de concentração de trabalho de 8,0 a 12,0 mg L⁻¹ para a isoniazida e 12,0 a 18,0 mg L⁻¹ para a rifampicina.

5.1.2. Análise Univariada Convencional

A partir dos espectros das substâncias puras (FIGURA 10A), é possível verificar que a isoniazida apresenta apenas uma banda de absorção, centrada em 262 nm, a qual é intensamente sobreposta pelo sinal da rifampicina. Para este segundo fármaco observam-se duas bandas praticamente livres de interferência, centradas em 472 e 333 nm.

Em primeira análise, a quantificação convencional de rifampicina parece possível, principalmente utilizando-se o sinal registrado em 472 nm, enquanto que para isoniazida a necessidade de métodos diferenciados é bastante evidente. Para verificar esta possibilidade, curvas analíticas individuais foram elaboradas, observando-se excelente linearidade, com coeficientes de regressão da ordem de 0,99.

Procurando aprimorar o modelo univariado, processos espectroscópicos derivativos foram avaliados. Nestas condições, observamos que o espectro da isoniazida (FIGURA 10B) apresenta um ponto de inflexão em 262 nm, ponto em que a derivada do sinal de absorvância é zero, para qualquer valor de concentração. Em função desta característica, uma curva analítica livre de interferência pode ser elaborada para rifampicina, utilizando-se valores de absorvância em 262 nm.

De maneira análoga, rifampicina apresenta um ponto de inflexão de derivada zero em 295 nm (FIGURA 10C), comprimento de onda que pode ser usado para elaboração de uma curva analítica para isoniazida.

Embora no modo derivativo o sinal espectral diminua drasticamente, curvas analíticas de alta linearidade foram conseguidas, com coeficientes de correlação da ordem de 0,99.

Finalmente, estudos de aplicabilidade do sistema fundamentado no princípio da aditividade das absorvâncias foram também desenvolvidos, de acordo com a seqüência de expressões (EQUAÇÃO 09 a 12) apresentadas a seguir:

$$A (262 \text{ nm}) = A (\text{INH}_{262 \text{ nm}}) + A (\text{RIF}_{262 \text{ nm}}) \quad \text{Eq. 09}$$

$$A (472 \text{ nm}) = A (\text{INH}_{472 \text{ nm}}) + A (\text{RIF}_{472 \text{ nm}}) \quad \text{Eq. 10}$$

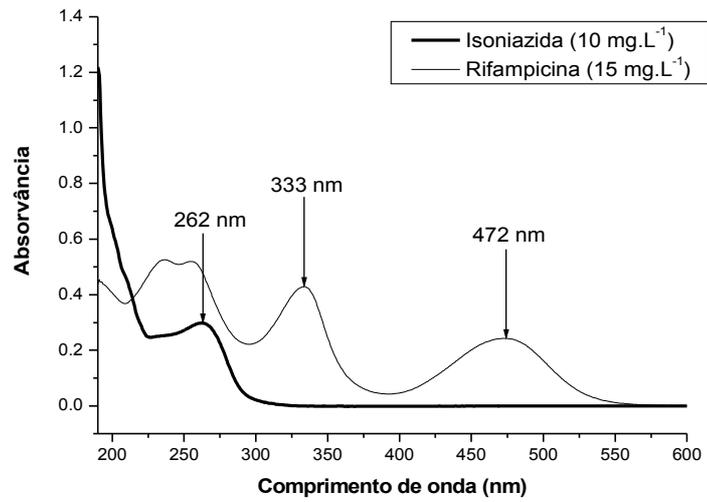
Ou:

$$A (262 \text{ nm}) = (a_{\text{INH}, 262 \text{ nm}} \times C_{\text{INH}}) + (a_{\text{RIF}, 262 \text{ nm}} \times C_{\text{RIF}}) \quad \text{Eq. 11}$$

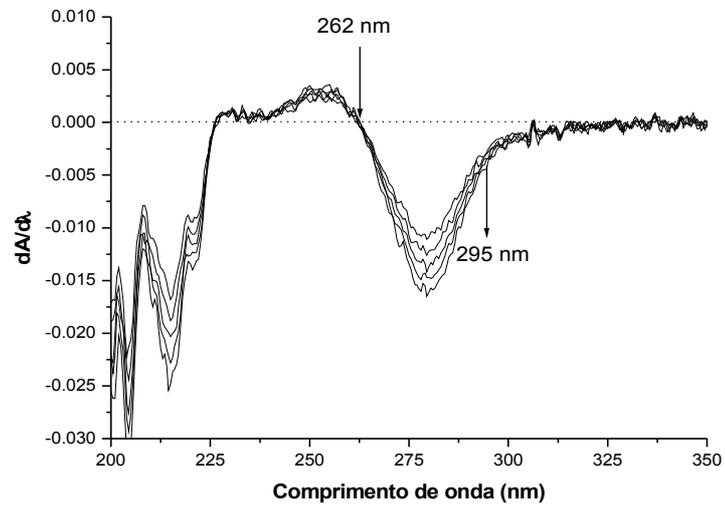
$$A (472 \text{ nm}) = (a_{\text{INH}, 472 \text{ nm}} \times C_{\text{INH}}) + (a_{\text{RIF}, 472 \text{ nm}} \times C_{\text{RIF}}) \quad \text{Eq. 12}$$

Onde, A: Absorvância, a: absortividade ($\text{L mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$), C: concentração (mg L^{-1})

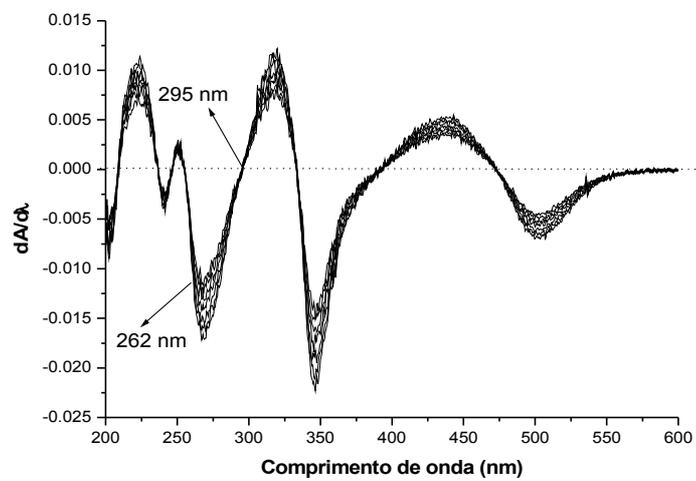
FIGURA 10. ESPECTROS ELETRÔNICOS ORIGINAIS (A) E PRIMEIRA DERIVADA DOS SINAIS ESPECTRAIS PARA ISONIAZIDA (B) E RIFAMPICINA (C).



A



B



C

Registrando-se os valores de absorvância para a mistura de substratos, em ambos os comprimentos de onda, e conhecendo-se os valores de absorvidade, é possível calcular as concentrações, resolvendo-se um sistema de duas equações.

Antes de se analisar os resultados proporcionados pelos sistemas convencionais de calibração, é importante salientar que as 20 cápsulas e comprimidos analisados tiveram suas massas pesadas, sendo moídos e homogeneizados (TABELA 01). Uma vez que a formulação informada no rótulo dos medicamentos é dada na forma de massa de fármaco por comprimido (ou cápsula), variações podem ser encontradas somente por conta da heterogeneidade da massa dos comprimidos e cápsulas.

TABELA 01. MASSA DOS COMPRIMIDOS CONTENDO ISONIAZIDA E RIFAMPICINA

| Parâmetro | Isoniazida (100mg) | | Rifampicina (300mg) | | INH (100 mg) + RIF (150 mg) | | INH (200 mg) + RIF (300 mg) | |
|----------------|-----------------------|-------------|------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| | Med. 1 | Med. 2 | Med. 1 | Med. 2 | Med. 1 | Med. 2 | Med. 1 | Med. 2 |
| | Massa (g) | | Massa (g) | | Massa (g) | | Massa (g) | |
| Menor valor | 0,14 | 0,19 | 0,35 | 0,40 | 0,31 | 0,28 | 0,46 | 0,51 |
| Maior valor | 0,17 | 0,21 | 0,44 | 0,48 | 0,33 | 0,33 | 0,58 | 0,54 |
| DP | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 0,02 | 0,00 | 0,02 | 0,04 | 0,01 |
| Média | 0,15 | 0,20 | 0,39 | 0,45 | 0,32 | 0,31 | 0,54 | 0,53 |
| DPR (%) | 3,44 | 2,13 | 6,61 | 3,94 | 1,49 | 5,28 | 6,61 | 2,02 |

Para avaliar a capacidade preditiva destes sistemas convencionais de calibração, oito amostras de medicamentos foram analisadas, encontrando-se os resultados apresentados na TABELA 02, sendo os erros médios expressos em módulos.

Conforme esperado, o sistema de calibração convencional e o método fundamentado na aditividade de absorvâncias proporcionaram excelentes resultados para a previsão dos medicamentos que contém os fármacos isolados. Diferentemente, o modo derivativo levou à obtenção de erros extremamente elevados, provavelmente em razão da significativa perda de sensibilidade que caracteriza os sistemas deste tipo.

Na análise de medicamentos que contém a mistura de substratos, o método de calibração univariada convencional (método 1) fornece erros de previsão extremamente elevados para isoniazida (erro médio da ordem de 140%), por conta da forte interferência espectral ocasionada pela rifampicina. Para rifampicina a situação é completamente diferente, em razão da inexistência de efeitos interferentes por parte do segundo fármaco. Nestas condições, o erro médio de previsão é da ordem de 7%, o que demonstra a possibilidade de determinações específicas deste substrato.

No Método Univariado Derivativo, o erro médio associado à determinação de ambos os fármacos se apresenta extremamente elevado (aproximadamente 300% para isoniazida e 60% para rifampicina). De maneira geral, este tipo de procedimento viabiliza a determinação de um ou dois substratos presentes em uma mistura com interferência espectral (Kapoor *et al.*, 2006; Abdellatef *et al.*, 2006). Desta vez, entretanto, a perda de sensibilidade do modo derivativo impediu a obtenção de resultados satisfatórios.

Para o Método Univariado Aditivo, os resultados demonstram uma excelente capacidade do sistema para correção da interferência espectral, o que permite a obtenção de erros médios de previsão variando de 7,0 a 9,8%, para os substratos em estudo. Desta forma, dos métodos univariados estudados, o método aditivo apresentou o melhor resultado para as misturas sintéticas.

Observa-se que os valores encontrados para a rifampicina no método convencional e no aditivo são similares. Isto se deve a utilização das mesmas amostras na análise e a não interferência espectral da isoniazida

TABELA 02. RESULTADOS DA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO MÉTODOS CONVENCIONAIS DE CALIBRAÇÃO.

| AMOSTRA | Concentração (mg L ⁻¹) | | | | | | Erro (%) | | | | | | | |
|---|------------------------------------|-------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|------|-------|
| | Referência | | Experimental | | | | MÉTODO 1 | | MÉTODO 2 | | MÉTODO 3 | | | |
| | INH | RIF | MÉTODO 1 | MÉTODO 2 | MÉTODO 3 | MÉTODO 1 | MÉTODO 2 | MÉTODO 3 | MÉTODO 1 | MÉTODO 2 | MÉTODO 3 | | | |
| Isoniazida 100mg (A) | 10,61 | - | 11,60 | - | 43,93 | - | 11,70 | - | 9,3 | - | 314,1 | - | 10,2 | - |
| Isoniazida 100mg (B) | 9,82 | - | 10,98 | - | 41,37 | - | 11,08 | - | 11,8 | - | 321,3 | - | 12,8 | - |
| Isoniazida 100mg + Rifampicina 150mg (A) | 10,48 | 16,35 | 30,32 | 15,13 | 41,98 | 10,45 | 11,26 | 15,13 | 189,3 | 7,5 | 300,6 | 54,4 | 7,4 | -7,5 |
| Isoniazida 100mg + Rifampicina 150mg (B) | 9,91 | 15,05 | 29,92 | 15,13 | 42,04 | 10,00 | 10,85 | 15,13 | 201,9 | -0,6 | 324,3 | 103,7 | 9,5 | 0,6 |
| Rifampicina 300mg (A) | - | 15,05 | 16,84 | 13,47 | 0,00 | 9,73 | 0,00 | 13,47 | - | 10,5 | 0,0 | 30,3 | 0,0 | -10,5 |
| Rifampicina 300mg (B) | - | 13,88 | 16,56 | 12,78 | 0,00 | 9,64 | 0,00 | 13,97 | - | -0,7 | 0,0 | 104,8 | 0,0 | 0,7 |
| Isoniazida 200mg + Rifampicina 300mg (A) | 10,26 | 16,00 | 33,75 | 17,58 | 47,90 | 10,58 | 11,45 | 17,58 | 228,9 | -9,9 | 366,9 | 161,8 | 11,6 | 9,9 |
| Isoniazida 200mg + Rifampicina 300mg (B) | 9,89 | 15,69 | 27,80 | 13,66 | 2,73 | 10,37 | 10,60 | 13,66 | 181,1 | 13,0 | -72,4 | 17,4 | 7,2 | -13,0 |
| Erro Médio Relativo (%) | | | | | | | | | 137,1 | 7,03 | 283,2 | 78,7 | 9,8 | 7,0 |

Legenda: Método 1: Univariado convencional, Método 2: Univariado Derivativo, Método 3: Univariado Aditivo

5.1.3. Análise multivariada

O primeiro critério utilizado para seleção do número de variáveis latentes (VL) está relacionado com o erro de previsão das amostras que fazem parte do conjunto de calibração (RMSEC) e com o erro observado no processo de validação cruzada (RMSECV). A evolução destes parâmetros em função do número de variáveis latentes (VLs) é apresentada na FIGURA 11, evidenciando um comportamento levemente diferenciado para os dois fármacos em estudo.

Para rifampicina (FIGURA 11A) o erro de previsão diminui significativamente até a introdução da terceira VL. A partir deste ponto, a introdução de novas VLs não induz significativos ganhos de capacidade de previsão. Para isoniazida (FIGURA 11B), o fármaco que sofre maior interferência e de menor intensidade de sinal, o comportamento é similar. Desta vez, entretanto, a introdução de variáveis latentes adicionais (5 ou 6) parece induzir leves melhoras na capacidade de previsão do modelo.

Adicionalmente, os resultados apresentados na TABELA 03 indicam que apenas duas variáveis latentes são necessárias para explicar 99,00% da variância dos dados de concentração (matriz Y), utilizando-se 99,89 % da variância dos dados espectrais da matriz X. Trata-se de um argumento importante, uma vez que, de maneira geral, não é recomendável a utilização de modelos que se fundamentem em uma elevada parcela da variância dos dados espectrais, exceto se todas as componentes fossem explicadas pelos *loadings*. Nestas condições a modelagem pode incluir flutuações ou ruídos instrumentais, o que superestima o modelo, diminuindo a sua robustez e aplicabilidade.

FIGURA 11. EVOLUÇÃO DO RMSEC E RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES, NA MODELAGEM DE RIFAMPICINA (A) E ISONIAZIDA (B) COM DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.

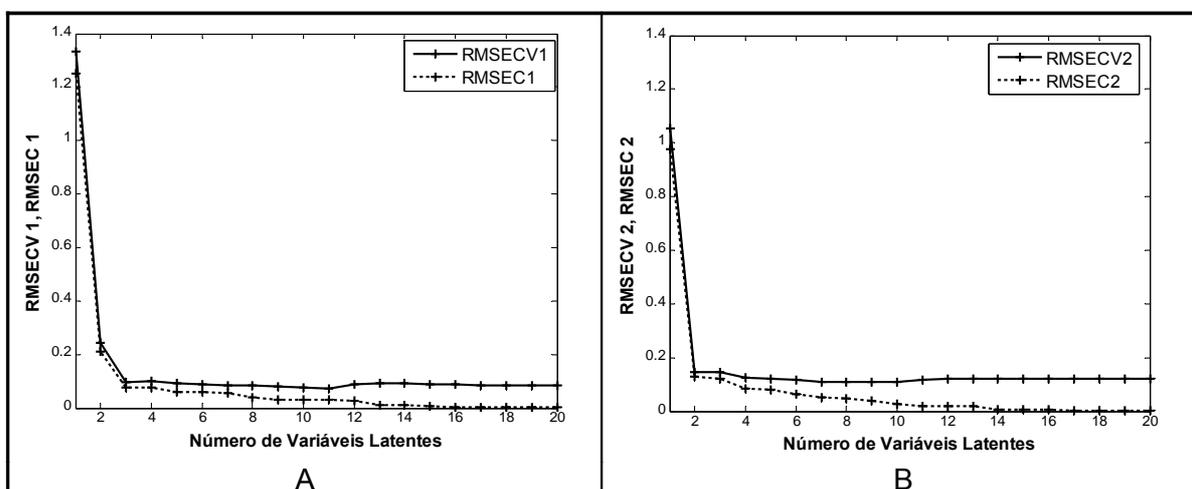


TABELA 03. PERCENTUAL DE VARIÂNCIA CAPTURADO PELO MODELO DE REGRESSÃO COM DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.

| VL | Matriz X | | Matriz Y | |
|----|----------|---------|----------|---------|
| | % da VL | % Total | % da VL | % Total |
| 1 | 85,31 | 85,31 | 59,00 | 59,00 |
| 2 | 14,58 | 99,89 | 40,01 | 99,02 |
| 3 | 0,07 | 99,96 | 0,65 | 99,67 |
| 4 | 0,01 | 99,97 | 0,12 | 99,79 |
| 6 | 0,01 | 99,98 | 0,04 | 99,88 |
| 8 | 0,00 | 99,99 | 0,02 | 99,96 |
| 12 | 0,00 | 100,00 | 0,01 | 99,98 |
| 14 | 0,00 | 100,00 | 0,00 | 100,00 |

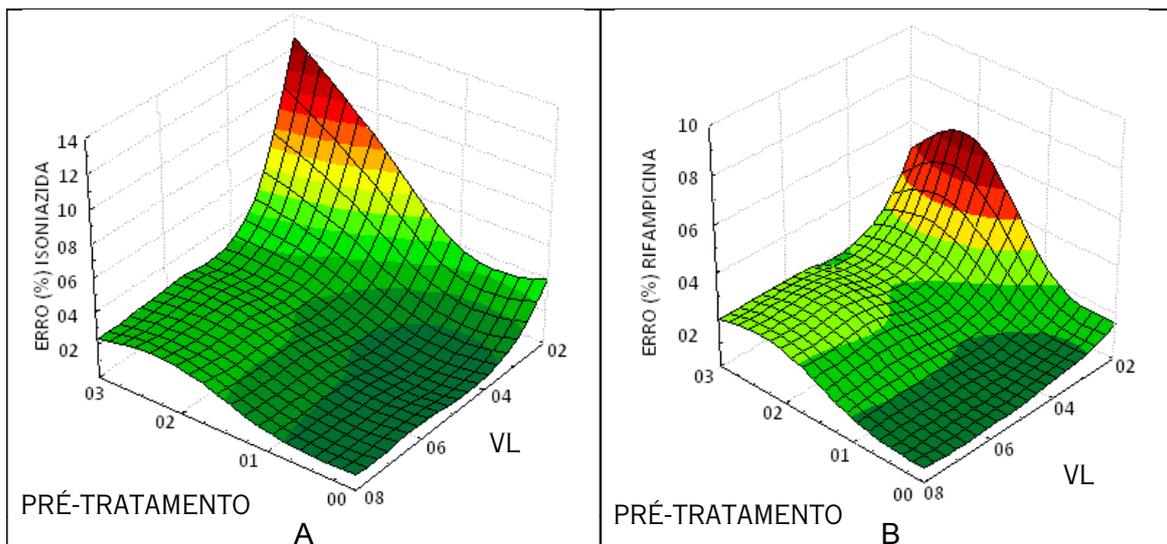
Embora os argumentos preliminares sugerissem a utilização de 2 a 4 VLs, modelos foram desenvolvidos com um número significativamente maior (8, 6, 4, 3 e 2 VLs), apenas para fins de comparação.

O efeito do número de variáveis latentes e dos diversos tipos de pré-processamento utilizados, na capacidade de previsão dos modelos, foi graficamente representada na FIGURA 12. Os resultados desta fase de validação demonstram uma boa capacidade preditiva de praticamente todos os modelos desenvolvidos, com erros médios de previsão inferiores a 5% (exceção feita ao modelo desenvolvido com 2 VLs e pré-processamento por alisamento e derivação).

A partir da figura verifica-se que a melhor capacidade dos modelos desenvolvidos com 4 a 8 VLs, envolvendo o uso de espectros centrados na média. Nestas condições, erros médios de previsão inferiores a 1% são observados, para ambas as espécies em estudo.

Em razão da maior robustez propiciada pelo uso de poucas variáveis latentes, optou-se pela utilização do modelo desenvolvido com quatro variáveis latentes e dados centrados na média.

FIGURA 12. GRÁFICOS DE SUPERFÍCIE OBTIDOS COM OS ERROS DE PREVISÃO DOS MODELOS DESENVOLVIDOS POR UV-VIS EM SOLUÇÃO PARA A ISONIAZIDA (A) E PARA A RIFAMPICINA (B).



LEGENDA REFERENTE AOS PRÉ-TRATAMENTOS:

00 = CENTRADO NA MÉDIA

01 = AUTOESCALADOS

02 = ALISAMENTO POR SAVITZKY-GOLAY

03 = ALISAMENTO POR SAVITZKY-GOLAY COM PRIMEIRA DERIVADA

Analisando-se o peso (*loadings*) que cada variável original teve na elaboração das variáveis latentes (FIGURA 13A) é possível observar uma grande semelhança entre o perfil deste parâmetro e os espectros individuais apresentados na FIGURA 13B. Trata-se de uma observação de extrema relevância, uma vez que demonstra a complementaridade de ambas VL, além da correspondência existente entre a primeira variável latente e o sinal espectral da rifampicina e entre a segunda variável latente e o sinal da isoniazida.

A presença de anomalias (*outliers*) no conjunto de calibração foi avaliada utilizando-se os critérios de *Resíduos Studentizados* e *Leverage* (FIGURA 14). Os *Resíduos Studentizados* indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, enquanto que o *Leverage* representa a distância entre cada espectro e o centróide do conjunto de espectros. No primeiro caso considera-se um valor limite de 2,5, enquanto que no segundo, um valor de $3 \text{ VL}/n$, em que VL corresponde ao número de variáveis latentes e n ao número de amostras utilizadas. No modelo em questão todas as amostras se apresentaram dentro dos limites definidos pelo *Resíduos Studentizados* (2,5), enquanto que somente a amostra 24 apresentou valores de *Leverage* superiores ao limite estabelecido (0,45).

FIGURA 13. GRÁFICO DOS PESOS (*LOADINGS*) DAS VARIÁVEIS ORIGINAIS (COMPRIMENTO DE ONDA) PARA CADA VARIÁVEL LATENTE (A) E ESPECTRO DOS SUBSTRATOS PUROS (B).

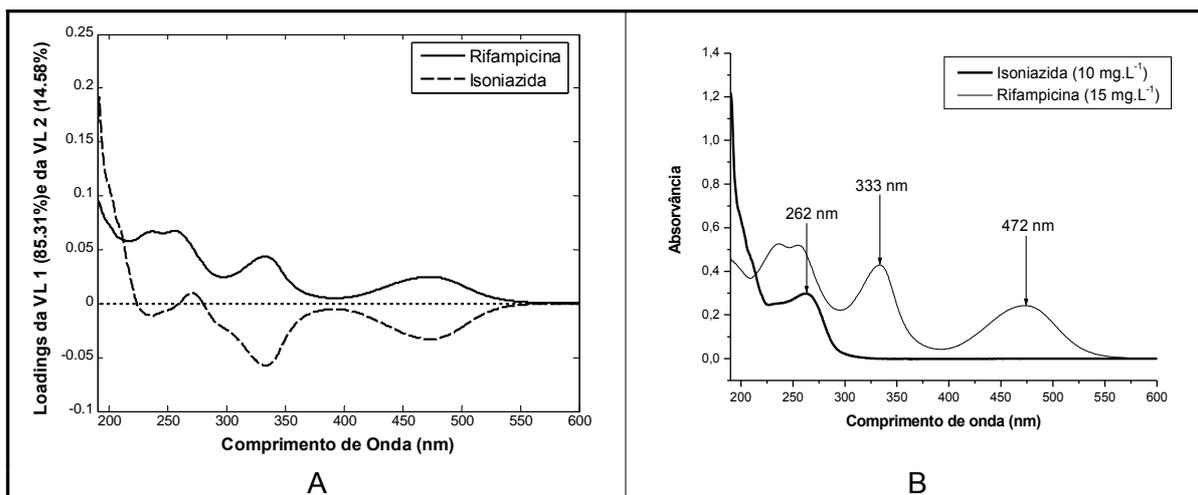
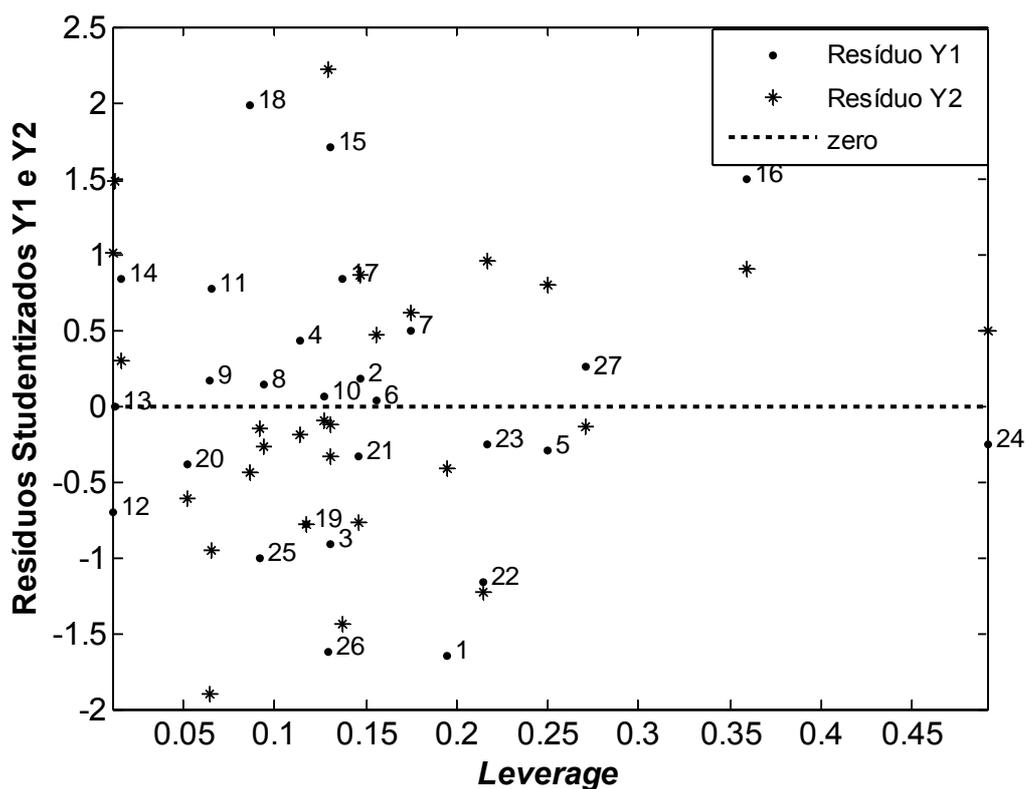


FIGURA 14. GRÁFICO DE *LEVERAGE X RESÍDUOS STUDENTIZADOS* PARA O MODELO DESENVOLVIDO COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.



O fato da referida amostra se apresentar como anômala levou a elaboração de um novo modelo sem a sua presença. Em função desta modificação não ter introduzido significativas mudanças na capacidade de previsão do modelo a amostra 24 foi mantida e sua anomalia pode ser justificada devido à sua elevada concentração das espécies em estudo (amostra 24 refere-se a amostra 7 do planejamento – FIGURA 07).

A excelente linearidade do modelo pode ser avaliada a partir das Figuras 16 e 17, que mostram a relação entre valores de referência e previstos para os conjuntos de calibração e validação, respectivamente. De maneira geral, uma excelente correlação pode ser observada, o que atesta, pelo menos *a priori*, a boa capacidade preditiva do modelo proposto.

Finalmente, o modelo de melhor desempenho foi utilizado na análise de amostras comerciais (medicamentos), conforme os resultados demonstrados na TABELA 04. Para comparação, os resultados obtidos por aplicação do sistema fundamentado no conceito de aditividade das absorvâncias são também apresentados.

Uma análise comparativa destes resultados permite comprovar a melhor eficiência de previsão do sistema multivariado, especialmente na análise de medicamentos contendo a mistura de fármacos em estudo. Adicionalmente, observa-se que todos os resultados fornecidos pelo modelo multivariado se encontram dentro da faixa de variabilidade permitida pela legislação vigente, tomando como referência os valores declarados na bula.

FIGURA 15. GRÁFICO DE VALORES DE REFERÊNCIA POR VALORES PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.

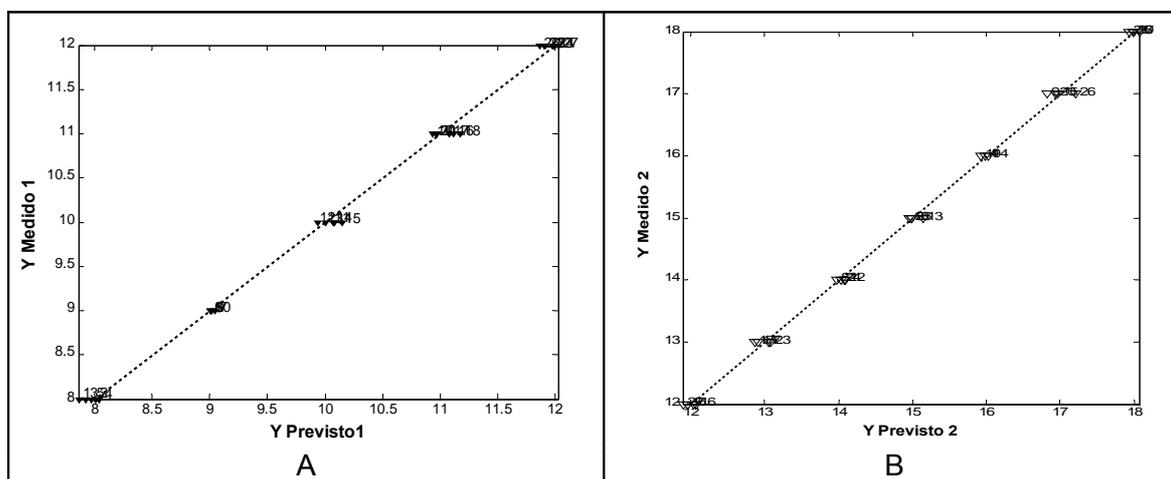


FIGURA 16. GRÁFICO DE VALORES DE REFERÊNCIA POR VALORES PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 4 VARIÁVEIS LATENTES E DADOS CENTRADOS NA MÉDIA.

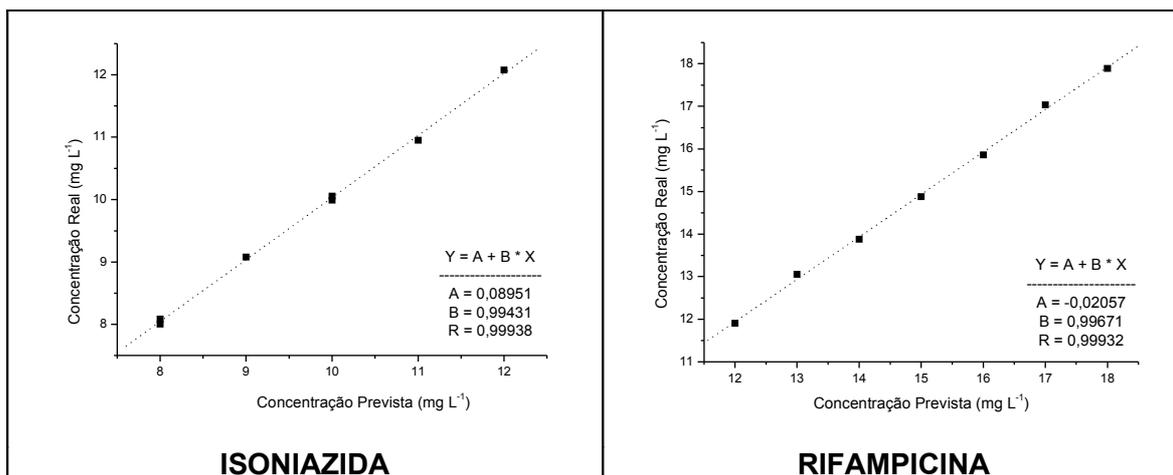


TABELA 04. RESULTADOS DA ANÁLISE EM DUPLICATA, DE MEDICAMENTOS, PELAS METODOLOGIAS DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDAS NESTE ESTUDO.

| Medicamentos | Concentração (mg L ⁻¹) | | | | | | Erro (%) | | | |
|--------------|------------------------------------|------|------------|------|--------------|------|------------|------|--------------|-----|
| | Real | | Univariado | | Multivariado | | Univariado | | Multivariado | |
| | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF |
| MED100A | 10,6 | - | 11,7 | - | 10,2 | - | 10,3 | - | 4,3 | - |
| MED100B | 9,8 | - | 11,1 | - | 10,0 | - | 12,8 | - | 2,0 | - |
| MED250A | 10,5 | 16,4 | 11,3 | 15,1 | 10,9 | 15,7 | 7,4 | 7,5 | 4,4 | 4,2 |
| MED250B | 9,9 | 15,1 | 10,9 | 15,1 | 10,6 | 15,0 | 9,5 | 0,5 | 6,7 | 0,1 |
| MED300A | - | 15,1 | - | 13,5 | - | 14,9 | - | 10,5 | - | 0,7 |
| MED300B | - | 13,9 | - | 14,0 | - | 12,9 | - | 0,6 | - | 7,3 |
| MED500A | 10,3 | 16,0 | 11,5 | 17,6 | 10,4 | 15,1 | 11,6 | 9,9 | 0,9 | 5,8 |
| MED500B | 9,9 | 15,7 | 10,6 | 13,7 | 10,2 | 14,5 | 7,2 | 12,9 | 3,2 | 7,8 |

5.2. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS EM FASE SÓLIDA

Para o desenvolvimento destes modelos foram preparadas 24 misturas sólidas, contendo 250 a 425 mg g⁻¹ de isoniazida e 400 a 650 mg g⁻¹ de rifampicina. Os espectros das 18 misturas utilizadas para desenvolvimento dos modelos são apresentados na FIGURA 17, na qual, além de se observar a presença de sinais característicos das

espécies em estudo, é possível observar bandas finas que são peculiares no modo de aquisição utilizado (refletância difusa com sonda de fibra ótica).

A evolução do RMSECV (FIGURA 18) indica que, para rifampicina, os modelos de melhor capacidade de previsão podem ser conseguidos com o uso de 2 ou 3 variáveis latentes. Para Isoniazida, entretanto, este parâmetro decresce até o limite de 8VLs.

Adicionalmente, os antecedentes apresentados na TABELA 05 indicam que grande parte da variância dos dados de concentração podem ser representados por apenas 2 VL (99,38%), utilizando-se uma grande parcela da variância dos dados espectrais (99,97%).

FIGURA 17. ESPECTRO DAS MISTURAS SINTÉTICAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA EM FASE SÓLIDA.

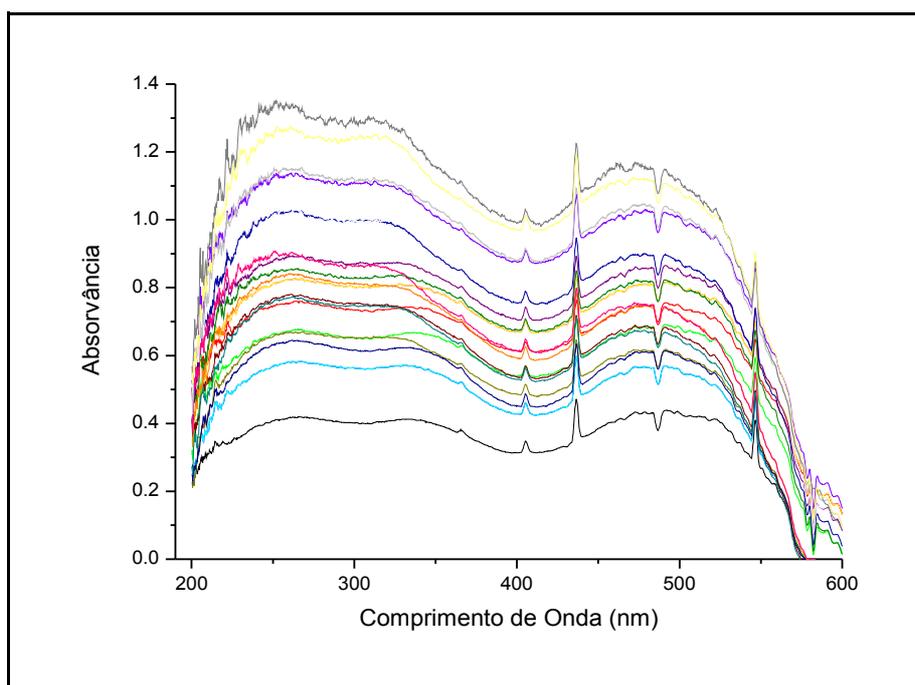


FIGURA 18. EVOLUÇÃO DO RMSEC E RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES, NA MODELAGEM DE RIFAMPICINA (A) E ISONIAZIDA (B) COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS POR MSC.

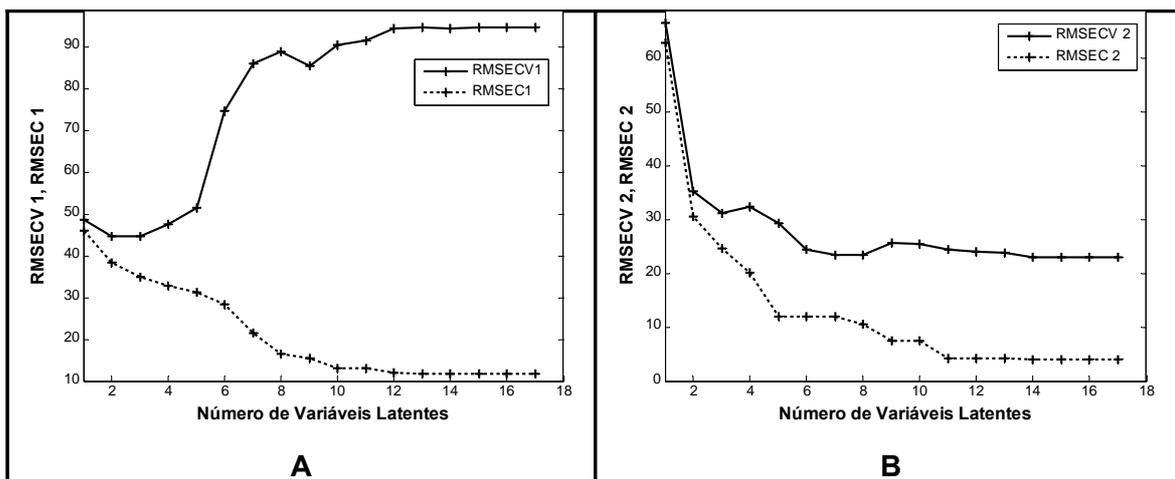


TABELA 05. PERCENTUAL DE VARIÂNCIA CAPTURADO PELO MODELO DE REGRESSÃO COM DADOS PRÉ-PROCESSADOS POR MSC.

| VL | Matriz X | | Matriz Y | |
|----|----------|---------|----------|---------|
| | % da VL | % Total | % da VL | % Total |
| 1 | 99,89 | 99,89 | 98,44 | 98,44 |
| 2 | 0,08 | 99,97 | 0,94 | 99,38 |
| 4 | 0,00 | 99,99 | 0,08 | 99,62 |
| 6 | 0,00 | 100,00 | 0,04 | 99,76 |
| 8 | 0,00 | 100,00 | 0,06 | 99,90 |
| 10 | 0,00 | 100,00 | 0,02 | 99,94 |
| 12 | 0,00 | 100,00 | 0,01 | 99,96 |

Com base nestes argumentos, modelos foram desenvolvidos com 2 a 12 VLs, utilizando-se diversas formas de pré-processamento de sinais. Os resultados da fase de validação, apresentados na TABELA 06, indicam um melhor desempenho do modelo desenvolvido com 8 VLs e pré-processamento por MSC. Nestas condições, erros inferiores a 10% foram observados, para ambas as espécies em estudo.

TABELA 06. ERROS MÉDIOS DE PREVISÃO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO PARA TODOS OS MODELOS DESENVOLVIDOS.

| Tratamento | Erro de Previsão na Validação (%) | | | | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------------|------|------|-----|------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | 2 VL | | 4 VL | | 6 VL | | 8 VL | | 10 VL | | 12 VL | |
| | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF |
| AU | 10,0 | 5,8 | 12,5 | 6,0 | 13,5 | 4,3 | 15,8 | 7,8 | 13,7 | 9,0 | 14,7 | 9,4 |
| CM | 9,9 | 6,3 | 11,5 | 6,4 | 12,3 | 5,4 | 12,7 | 6,8 | 10,7 | 8,0 | 10,1 | 8,1 |
| MSC | 10,2 | 6,9 | 12,1 | 7,7 | 12,8 | 7,0 | 8,1 | 7,3 | 5,9 | 7,5 | 5,9 | 7,4 |
| SG | 13,6 | 10,8 | 13,6 | 3,8 | 11,9 | 5,9 | 13,5 | 7,5 | 11,7 | 8,3 | 12,0 | 7,0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
| SG1 ^a | 12,9 | 8,0 | 8,7 | 8,0 | 8,3 | 10,1 | 8,2 | 10,7 | 8,4 | 11,4 | 7,6 | 11,0 |
|------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|

LEGENDA:

AU = AUTOESCALADOS

CM = CENTRADOS NA MÉDIA

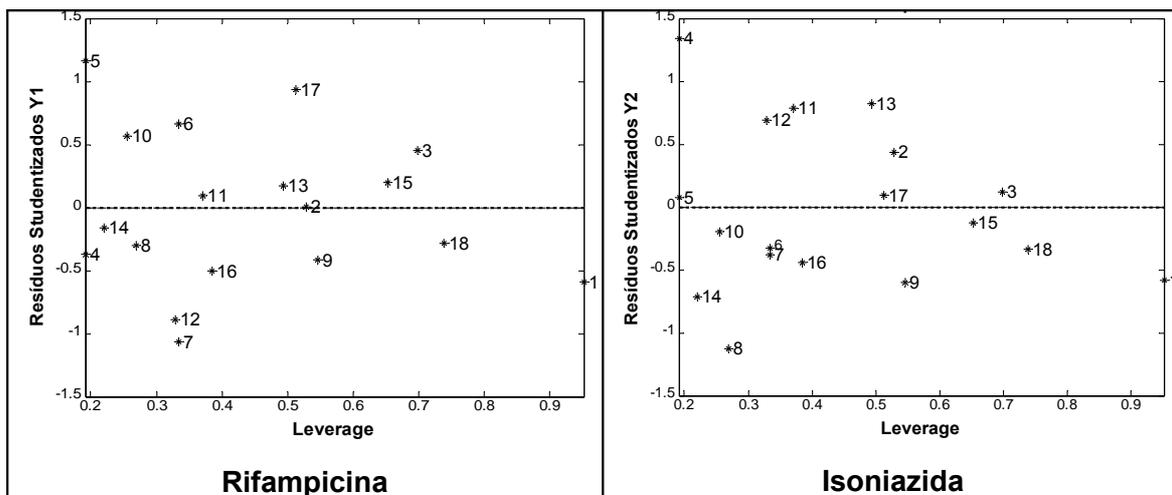
MSC = CORREÇÃO MULTIPLICATIVA DE SINAL

SG = ALISAMENTO (SAVITZKY-GOLAY)

SG1^a = ALISAMENTO (SAVITZKY-GOLAY) SEGUIDO DE DERIVAÇÃO

A verificação de anomalias através dos parâmetros *Resíduos Studentizados* e *Leverage* é apresentada através da FIGURA 19, onde o conjunto de calibração se mostrou isento de anomalias.

FIGURA 19. GRÁFICO DOS *RESÍDUOS STUDENTIZADOS VERSUS “LEVERAGE”* PARA MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VARIÁVEIS LATENTES E PRÉ-PROCESSAMENTO POR MSC.



A capacidade de previsão do modelo, em relação ao conjunto de calibração (FIGURA 20), se mostra reduzida, principalmente para o fármaco que se apresenta em menor concentração (isoniazida). Ao mesmo tempo, a capacidade de previsão frente às amostras do conjunto de validação (FIGURA 21) se mostra inadequada, com índices de correlação inferiores (0,95) a os estipulados pela legislação (0,99).

FIGURA 20. GRÁFICO DE Y MEDIDO POR Y PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO

DE CALIBRAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VARIÁVEIS LATENTES E PRÉ-PROCESSAMENTO POR MSC.

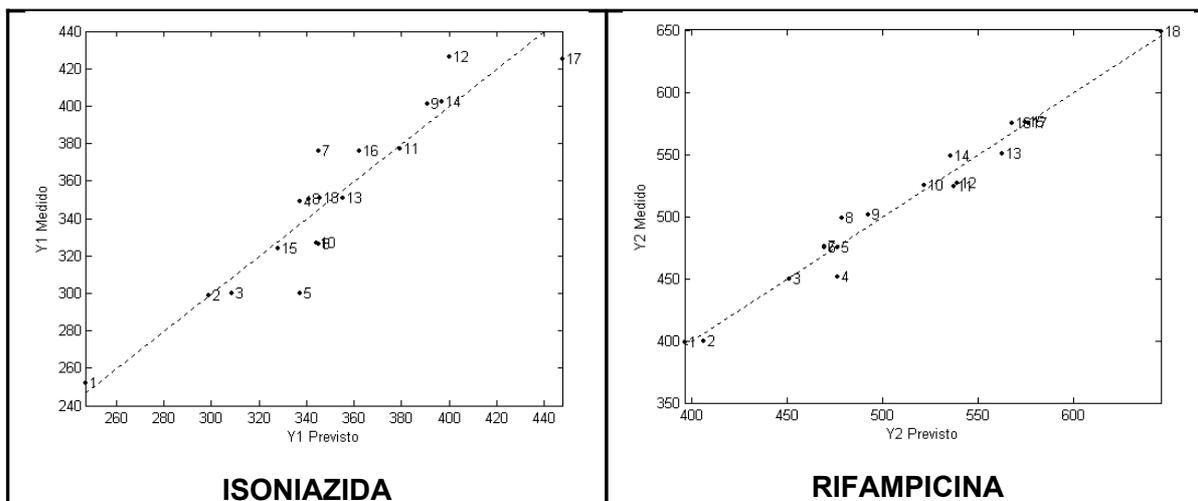
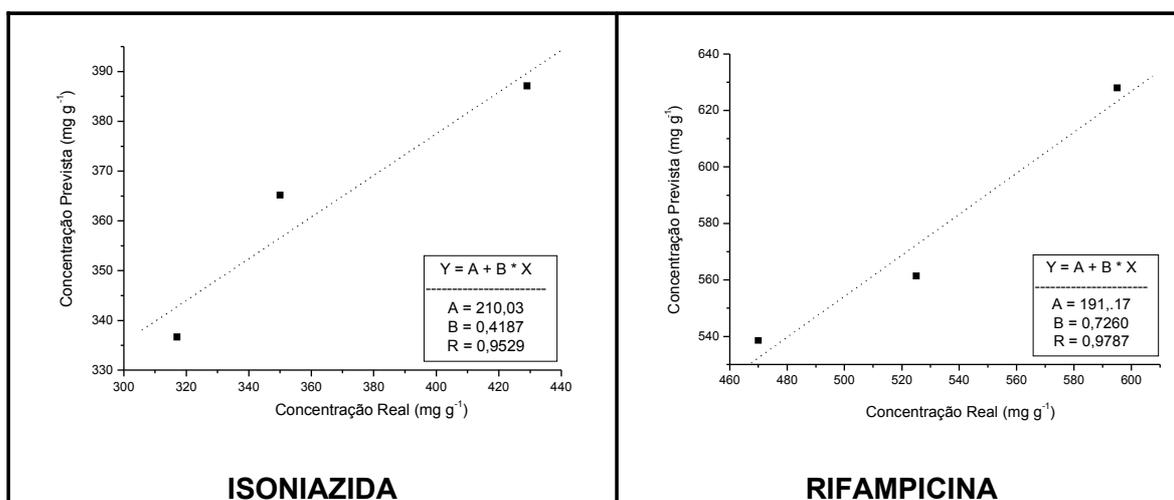


FIGURA 21. GRÁFICO DE VALORES DE REFERÊNCIA POR VALORES PREVISTOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA NAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO, UTILIZANDO-SE MODELO DESENVOLVIDO COM 8 VARIÁVEIS LATENTES E PRÉ-PROCESSAMENTO POR MSC.



Embora a eficiência do modelo desenvolvido possa ser questionada, a sua eficiência na quantificação de amostras comerciais (medicamentos) foi avaliada.

Os espectros dos medicamentos (FIGURA 22) são bastantes similares aos dos padrões de calibração (FIGURA 17). Entretanto, os resultados fornecidos pelo modelo se mostram discrepantes, em relação aos valores informados na bula dos medicamentos analisados. Em geral, erros superiores a 10% foram encontrados na análise de associações (TABELA 07), valores que podem ser justificados pela presença de excipientes que modificam o espectro.

Observa-se discrepância dos sinais quando comparadas a região de 550-600nm de isoniazida 100mg com as demais amostras analisadas. Esta região não fora

descartada do modelo, pois a intenção real deste trabalho é obter uma nova proposta para a análise dos fármacos em associação. O uso dos fármacos isolados no medicamento serve apenas como um complemento, visto que a facilidade em elaborar um modelo de calibração.

FIGURA 22. ESPECTROS DA ANÁLISE POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM FASE SÓLIDA DOS MEDICAMENTOS.

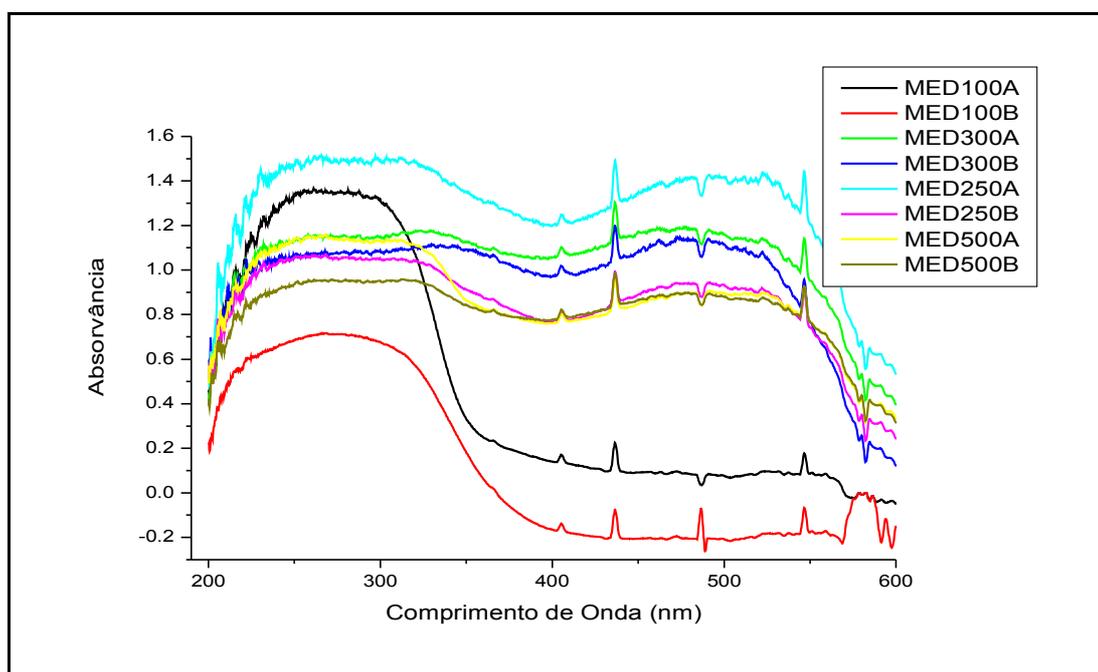


TABELA 07. ERRO MÉDIO DE PREVISÃO DE ISONIAZIDA E RIFAMPICINA EM MEDICAMENTOS (MELHOR MODELO)

| Medicamentos | Conc. Real (mg L ⁻¹) | | Erro (%) | |
|----------------|----------------------------------|--------|------------|------|
| | | | MSC - 8 VL | |
| | INH | RIF | INH | RIF |
| MED100A | 654,36 | - | 90,4 | - |
| MED100B | 502,56 | - | 62,9 | - |
| MED250A | 324,91 | 487,06 | 21,1 | 30,1 |
| MED250B | 300,36 | 496,57 | 31 | 6,8 |
| MED300A | - | 460,84 | - | 3,3 |

| | | | | |
|----------------|--------|--------|------|------|
| MED300B | - | 471,04 | - | 6,9 |
| MED500A | 387,22 | 604,37 | 14,9 | 4,2 |
| MED500B | 382,7 | 606,9 | 9,8 | 22,7 |

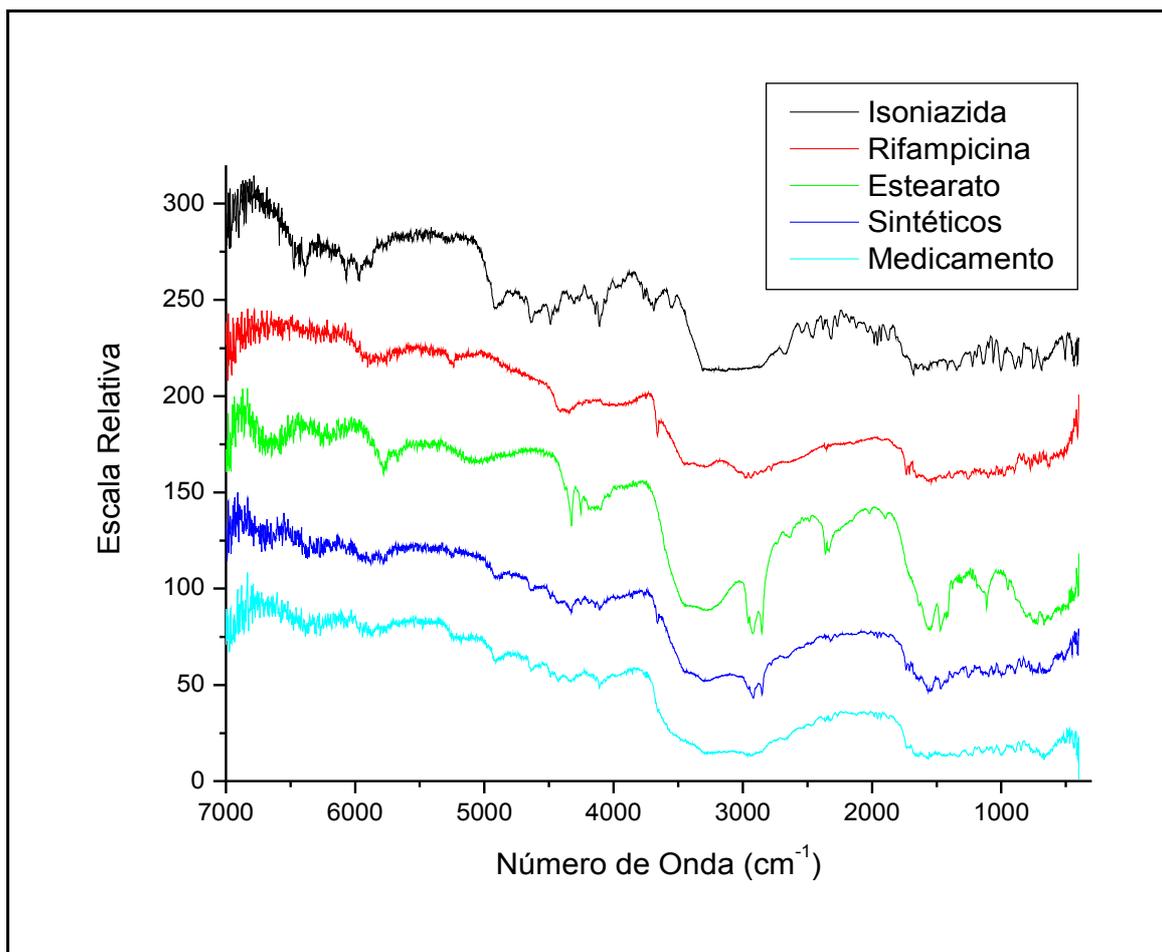
5.3. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM REFLETÂNCIA DIFUSA.

A seqüência de espectros apresentada na FIGURA 23 demonstra a complexidade de sinais da região do infravermelho, fato que justifica as dificuldades encontradas na elaboração de modelos convencionais de calibração.

Como diluente dos padrões utilizou-se do estearato de magnésio, já que entre tantos excipientes, foi aquele encontrado em todas as amostras analisadas.

Em primeiro lugar, é possível observar na FIGURA 23 que grande parte das principais bandas apresentadas pelos fármacos isolados aparecem nos espectros de medicamentos e misturas sintéticas. Adicionalmente, observa-se uma boa correspondência entre medicamentos e misturas sintéticas, com algumas discrepâncias associadas, principalmente, ao grau de umidade.

FIGURA 23. ESPECTROS INFRAVERMELHOS POR REFLETÂNCIA DIFUSA PARA PADRÕES - MISTURA SINTÉTICA (325 mg g⁻¹ DE INH+425mg g⁻¹ DE RIF) E MEDICAMENTO DE MESMA CONCENTRAÇÃO.



Para rifampicina foi possível identificar bandas próximas a 1.700 cm^{-1} (C=O), 1.730 cm^{-1} (grupo Furanona), $1650\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$ (amidas próximas a C=O), 1.566 cm^{-1} (C=C), 1.500 cm^{-1} (amida próxima a C=C), 1.250 cm^{-1} (C-O-C próximo a grupo acetil) e em $3.000\text{--}3.400\text{ cm}^{-1}$ (anel aromático acoplado a OH). (LU e ZANG, 2006; RAO, et al 2006; NEBULONI, ET AL, 1995).

Para a isoniazida apenas atribui-se as bandas localizadas entre 1.650 e 1.680 cm^{-1} , correspondentes a grupo amida próximo de C=O (AKALIN e AKYUZ, 2007).

Novamente pelo fato de que modelos elaborados com o menor número possível de variáveis latentes desde que expliquem boa parte da variância dos dados devem ser utilizados para manter a robustez do método, desenvolveram-se modelos de calibração com 10, 8, 6, 4 e 2 variáveis latentes (VL), utilizando-se diversos tipos de pré-processamento de sinais. Desta vez, a informação espectral foi dividida em 3 conjuntos: $400\text{--}7.000\text{ cm}^{-1}$ (DRIFT), $400\text{--}4.000\text{ cm}^{-1}$ (DRIFT - MID) e $4000\text{--}7.000\text{ cm}^{-1}$ (DRIFT - NIR).

Para facilitar a escolha do número de variáveis e do tipo de pré-processamento, os resultados são apresentados na forma de uma superfície de resposta (FIGURA 24).

Analisando-se o efeito da região espectral processada, é possível observar erros de previsão semelhantes, os quais, entretanto, evoluem de maneira diferente para cada pré-processamento utilizado.

Utilizando-se a região espectral completa (DRIFT) observam-se menores erros de validação para modelos construídos com 04 a 06 VL e com dados centrados na média. Em primeira análise, é possível descartar o uso de um grande número de VL em razão da ênfase que pode ser dada a pequenas mudanças espectrais ocasionadas pela presença de excipientes. Sendo assim, foi preferida a seleção de modelos mais simples, fundamentados em 4 VL e com dados centrados na média, que permitiram erros médios de validação de 2,5 e 3,4% para isoniazida e rifampicina, respectivamente.

Para os dados da região do MID, os menores erros de previsão são observados em modelos que envolvem 6 VL e dados auto-escalados.

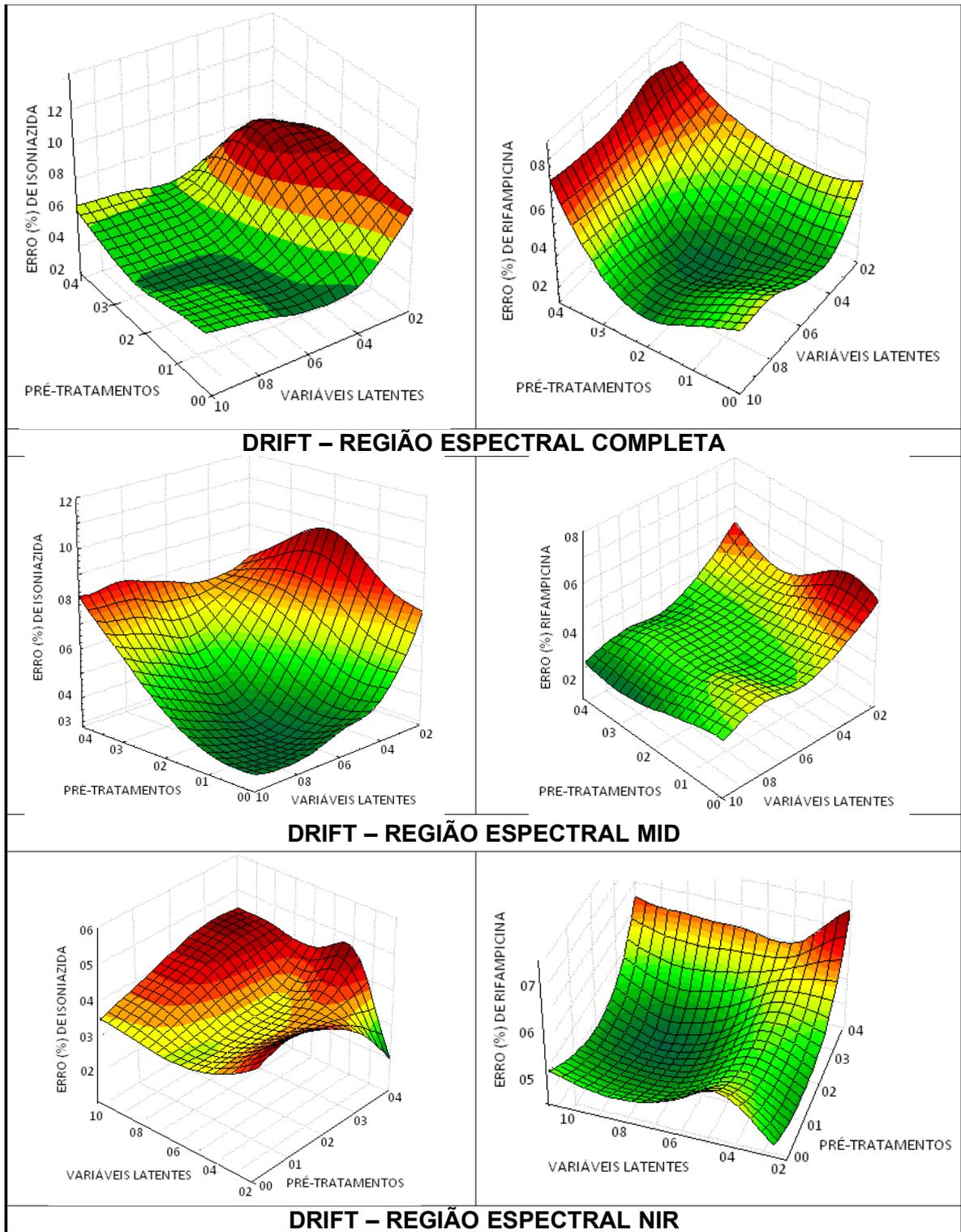
No caso da região NIR, erros de validação próximos são observados para qualquer tipo de pré-processamento. Objetivando-se, novamente, a simplificação do modelo, foi selecionado aquele elaborado com 6VL, com espectros pré-processados por MSC. Nestas condições, os erros médios de validação observados foram de 2,8% para isoniazida e 5,7% para rifampicina.

A capacidade de previsão dos três modelos selecionados foi avaliada em relação à determinação dos fármacos em estudo, em amostras de medicamentos contendo a associação em estudo. Medicamentos isolados não foram avaliados devido as suas concentrações extrapolarem o limite máximo dos modelos desenvolvidos.

Os resultados (TABELA 08) demonstram uma excelente capacidade de previsão dos modelos desenvolvidos com 4 VLs, envolvendo a região espectral completa e dados centrados na média. Nestas condições, erros de previsão inferiores a 5% foram observados para ambas as espécies em estudo, em todas as formulações analisadas.

FIGURA 24. EFEITO DO PRÉ-PROCESSAMENTO E DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES NO VALOR MÉDIO DO ERRO DE PREVISÃO NA FASE DE VALIDAÇÃO.

| ISONIAZIDA | RIFAMPICINA |
|------------|-------------|
|------------|-------------|



LEGENDA: PRÉ-PROCESSAMENTOS:

- 0: DADOS CENTRADOS NA MÉDIA
- 1: MSC
- 2: AUTO-ESCALAMENTO
- 3: ALISAMENTO SAVISTZ-GOLAY (SG)
- 4: SG SEGUIDO DE PRIMEIRA DERIVADA.

TABELA 08. RESULTADOS DA ANÁLISE DE MEDICAMENTOS UTILIZANDO-SE MODELOS MULTIVARIADOS DESENVOLVIDOS POR DRIFT

| Medicamentos | DRIFT – CM 4 VL | | | DRIFT MID – AU 6VL | | | DRIFT NIR – MSC 6VL | | |
|-----------------------|-----------------|-----|------------|--------------------|-----|------------|---------------------|------|-------------|
| | INH | RIF | Erro (%) | INH | RIF | Erro (%) | INH | RIF | Erro (%) |
| MED250A | 2,9 | 3,7 | 3,3 | 2,2 | 3,8 | 3,0 | 19,4 | 20,2 | 19,8 |
| MED250B | 8,7 | 4,1 | 6,4 | 15,8 | 4,5 | 10,1 | 9,9 | 7,9 | 8,9 |
| MED500A | 0,8 | 5,9 | 3,3 | 4,2 | 6,3 | 5,2 | 11,5 | 11,2 | 11,4 |
| MED500B | 3,7 | 7,7 | 5,7 | 6,6 | 9,0 | 7,8 | 13,6 | 12,5 | 13,1 |
| Erro Médio (%) | * | * | 4,7 | * | * | 6,6 | * | * | 13,3 |

5.4. VALIDAÇÃO DO MELHOR MÉTODO ANALÍTICO

Para facilitar a comparação entre as diversas técnicas instrumentais e os diferentes modos de calibração, todos os resultados obtidos na análise de medicamentos são apresentados na Tabela 09. A partir destes resultados é possível verificar uma melhor capacidade de previsão dos modelos multivariados fundamentados em espectroscopia eletrônica em solução, utilizando-se 4 variáveis latentes e dados centrados na média. Nestas condições, erros de previsão inferiores a 5% são observados para ambos os fármacos em estudo.

Em função destes resultados, este modelo foi validado conforme normas da ANVISA.

Limites de Detecção e Quantificação não são avaliados em modelos multivariados.

TABELA 10. COMPARAÇÃO DOS ERROS MÉDIOS DE PREVISÃO OBTIDOS PARA A ISONIAZIDA E A RIFAMPICINA ENTRE AS METODOLOGIAS ESPECTROSCÓPICAS DE ANÁLISE.

| Medicamentos | Erro (%) | | | | | | | | | | | |
|----------------|----------------------|------|------------|------------|----------|------|-----------------|-----|-------------|-----|-----------|------|
| | ULTRAVIOLETA-VISÍVEL | | | | | | INFRAVERMELHO | | | | | |
| | SOLUÇÃO | | | | SÓLIDOS | | REGIÃO COMPLETA | | MID | | NIR | |
| | Univariado | | CM – 4VL | | CM - 2VL | | CM - 4VL | | MID – AU6VL | | MSC - 6VL | |
| | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF |
| MED100A | 10,3 | * | 4,3 | * | 34,5 | * | * | * | * | * | * | |
| MED100B | 12,8 | * | 2,0 | * | 30,4 | * | * | * | * | * | * | |
| MED250A | 7,4 | 7,5 | 4,4 | 4,2 | 16,7 | 13,4 | 2,9 | 3,7 | 2,2 | 3,8 | 19,4 | 20,2 |
| MED250B | 9,5 | 0,5 | 6,7 | 0,1 | 31 | 11,6 | 8,7 | 4,1 | 15,8 | 4,5 | 9,9 | 7,9 |
| MED300A | * | 10,5 | * | 0,7 | * | 10,9 | * | * | * | * | * | * |
| MED300B | * | 0,6 | * | 7,3 | * | 9,4 | * | * | * | * | * | * |
| MED500A | 11,6 | 9,9 | 0,9 | 5,8 | 13,6 | 26,2 | 0,8 | 5,9 | 4,2 | 6,3 | 11,5 | 11,2 |
| MED500B | 7,2 | 12,9 | 3,2 | 7,8 | 11,9 | 22,9 | 3,7 | 7,7 | 6,6 | 9 | 13,6 | 12,5 |
| ERRO MÉDIO (%) | 9,8 | 7,0 | 3,6 | 4,3 | 23,0 | 15,7 | 4,0 | 5,4 | 7,2 | 5,9 | 13,6 | 13,0 |

5.4.1. Linearidade e Intervalo.

O intervalo foi definido em função da concentração das espécies de interesse nas amostras analisadas e dos limites de variabilidade impostos por lei ($\pm 20\%$). Com base nestas informações, o intervalo foi estabelecido entre 8 e 12 mg L⁻¹ para a isoniazida e entre 12 e 18 mg L⁻¹ para a rifampicina.

A linearidade foi avaliada dentro deste intervalo, desenvolvendo-se curvas analíticas com cinco pontos para isoniazida e sete pontos para a rifampicina. Os coeficientes de correlação obtidos foram 0,999 e 0,998, respectivamente, valores superiores ao limite imposto pelos critérios da ANVISA (0,99) (ANVISA, 2003).

Com base nestes resultados, três amostras sintéticas foram preparadas em triplicata, sendo analisadas pelo modelo proposto. Os resultados (TABELA 10) indicam uma excelente exatidão (erro médio inferior a 1,0%) e precisão (desvio padrão relativo médio inferior a 1,5%), dentro do intervalo previamente definido.

TABELA 10. VALORES ENCONTRADOS NO TESTE DA LINEARIDADE E INTERVALO DO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO.

| Concentração Real (mg L ⁻¹) | | Concentração Experimental (mg L ⁻¹) | |
|---|------|---|--------------|
| INH | RIF | INH | RIF |
| 8,2 | 12,1 | 8,29 | 12,08 |
| 8,2 | 12,0 | 8,19 | 11,97 |
| 8,3 | 12,1 | 8,39 | 12,10 |
| Média | | 8,29 | 12,05 |
| DPR (%) | | 1,20 | 0,58 |
| Erro médio (%) | | 0,18 | 0,70 |
| 10,1 | 15,0 | 10,25 | 14,72 |
| 10,2 | 15,1 | 10,29 | 14,99 |
| 10,3 | 15,1 | 10,33 | 15,16 |
| Média | | 10,29 | 14,96 |
| DPR (%) | | 0,39 | 1,48 |
| Erro médio (%) | | 1,00 | 0,75 |
| 12,2 | 18,2 | 12,20 | 18,24 |
| 12,3 | 18,1 | 12,38 | 17,96 |
| 12,2 | 18,1 | 12,06 | 17,96 |
| Média | | 12,21 | 18,05 |
| DPR (%) | | 1,31 | 0,89 |
| Erro médio (%) | | 0,70 | 0,65 |

De acordo com algumas referências bibliográficas, a sonicação das amostras permitiria melhores resultados nas análises. Desta forma, 10 novas amostras foram preparadas: sendo 5 sonicadas e 5 homogeneizadas normalmente, sendo previstas utilizando-se a mesma curva analítica. Seus resultados foram expressos na TABELA 11, demonstrando pouca influência da sonicação, ficando ao critério do preparador o uso da aparelhagem.

TABELA 11. VALORES ENCONTRADOS REALIZANDO A SONICAGEM DAS AMOSTRAS PARA O MODELO DE CALIBRAÇÃO POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO.

| Concentração Real (mg L ⁻¹) | | Sem Sonicação | | | | Com Sonicação | | | |
|---|------|---|------|------------|------------|---|------|------------|------------|
| | | Concentração Experimental (mg L ⁻¹) | | Erro (%) | | Concentração Experimental (mg L ⁻¹) | | Erro (%) | |
| INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF |
| 8,0 | 12,0 | 8,4 | 11,7 | 4,5 | 2,5 | 8,1 | 11,9 | 1,4 | 1,0 |
| 9,0 | 14,0 | 9,4 | 13,9 | 4,1 | 0,9 | 8,8 | 13,7 | 2,4 | 2,4 |
| 10,0 | 15,0 | 10,0 | 14,6 | 0,2 | 2,4 | 9,8 | 14,6 | 1,6 | 2,7 |
| 11,0 | 16,0 | 11,2 | 16,1 | 1,4 | 0,6 | 10,8 | 15,4 | 1,9 | 4,0 |
| 12,0 | 18,0 | 12,0 | 17,8 | 0,2 | 1,1 | 12,1 | 17,9 | 0,7 | 0,8 |
| Erro Médio (%) | | | | 2,1 | 1,5 | * | * | 1,6 | 2,2 |

5.4.2. Precisão.

O teste de precisão avalia a proximidade dos resultados obtidos através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade foi avaliada por análise em triplicata, realizada pelo mesmo analista e utilizando-se o mesmo aparelho (Shimadzu). Os resultados (TABELA 10) indicam baixos valores de desvio padrão relativo (inferiores a 1,5), portanto dentro das normas estabelecidas pela ANVISA (DPR máximo de 5%).

A precisão intermediárias foi avaliada na análise das mesmas misturas sintéticas consideradas no estudo anterior, análise esta efetuada em dias diferentes, pelo mesmo analista e utilizando-se aparelhagem diferente (Varian). Os resultados (TABELA 12) indicam baixos valores de desvio padrão relativo, valores que se encontram dentro das especificações editadas pela ANVISA.

Finalmente, o teste de reprodutibilidade foi realizado por dois analistas (participação da aluna de IC Luciana Fontoura), trabalhando em dias diferentes e utilizando equipamento diferente (Hewlett Packard). Os resultados apresentados na TABELA 13 atestam a excelente reprodutibilidade da metodologia, que proporciona desvios padrão relativos inferiores a 2%.

TABELA 12. VALORES ENCONTRADOS NO TESTE DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO.

| Concentração Real (mg L ⁻¹) | | Concentração Experimental (mg L ⁻¹) | |
|--|-------|--|--------------|
| INH | RIF | INH | RIF |
| 8,00 | 12,00 | 7,82 | 12,10 |
| | | 7,85 | 12,05 |
| | | 7,57 | 12,10 |
| Média | | 7,75 | 12,08 |
| DPR (%) | | 1,98 | 0,24 |
| Erro médio (%) | | 3,20 | 0,67 |
| 10,00 | 15,00 | 10,22 | 14,48 |
| | | 10,22 | 14,46 |
| | | 10,28 | 14,69 |
| Média | | 10,24 | 14,54 |
| DPR (%) | | 0,34 | 0,88 |
| Erro médio (%) | | 2,40 | 3,07 |
| 12,00 | 18,00 | 11,31 | 18,58 |
| | | 11,33 | 18,54 |
| | | 11,40 | 18,62 |
| Média | | 11,35 | 18,58 |
| DPR (%) | | 0,42 | 0,22 |
| Erro médio (%) | | 5,47 | 3,20 |

TABELA 13. VALORES ENCONTRADOS NO TESTE DE REPRODUTIBILIDADE DO MODELO DE CALIBRAÇÃO DESENVOLVIDO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL EM SOLUÇÃO.

| AMOSTRA | Concentração de INH (mg L ⁻¹) | | | Concentração de RIF (mg L ⁻¹) | | |
|--------------------|--|--------------|--------------|--|--------------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| Analista 01 | 8,29 | 10,20 | 12,10 | 12,08 | 14,70 | 18,20 |
| | 8,19 | 10,24 | 12,20 | 11,97 | 15,00 | 18,00 |
| | 8,39 | 10,32 | 11,90 | 12,10 | 15,20 | 18,00 |
| Analista 02 | 8,10 | 10,25 | 12,20 | 11,80 | 14,50 | 18,00 |
| | 8,00 | 10,29 | 12,38 | 11,70 | 14,70 | 17,90 |
| | 8,20 | 10,33 | 12,06 | 12,00 | 15,00 | 17,70 |
| Média | 8,20 | 10,27 | 12,14 | 11,94 | 14,85 | 17,97 |
| DPR (%) | 1,67 | 0,49 | 1,33 | 1,33 | 1,74 | 0,91 |

5.4.3. Especificidade e Seletividade.

Os ensaios de especificidade e de seletividade visam verificar a capacidade preditiva do modelo em relação a impurezas, outros componentes da matriz e produtos de degradação. Quanto à especificidade e à seletividade do método frente a impurezas e outros componentes da matriz, o método se mostra eficiente, visto que mesmo com excipientes qualitativamente diferentes obtiveram-se aceitáveis resultados na análise de medicamentos, conforme demonstra testes de precisão e exatidão, e como veremos no ensaio de robustez.

5.4.4. Robustez da Metodologia.

O método de robustez permitiu que fosse analisada a capacidade preditiva do modelo frente a pequenas e deliberadas variações. Para análises espectrofotométricas, é importante que seja feita a avaliação do método frente a variações do pH, diferentes temperaturas e solventes.

De acordo com informações extraídas da farmacopéia brasileira, ambos os fármacos em estudo apresentam sensibilidade à luz e à temperatura. Um artigo mais recente (Prasad *et.al*, 2006) alerta, inclusive, sobre a degradação destes princípios em meio alcalino, degradação esta que parece ser catalisada pela presença de pirazinamida e etambutol, princípios comumente associados em outros países.

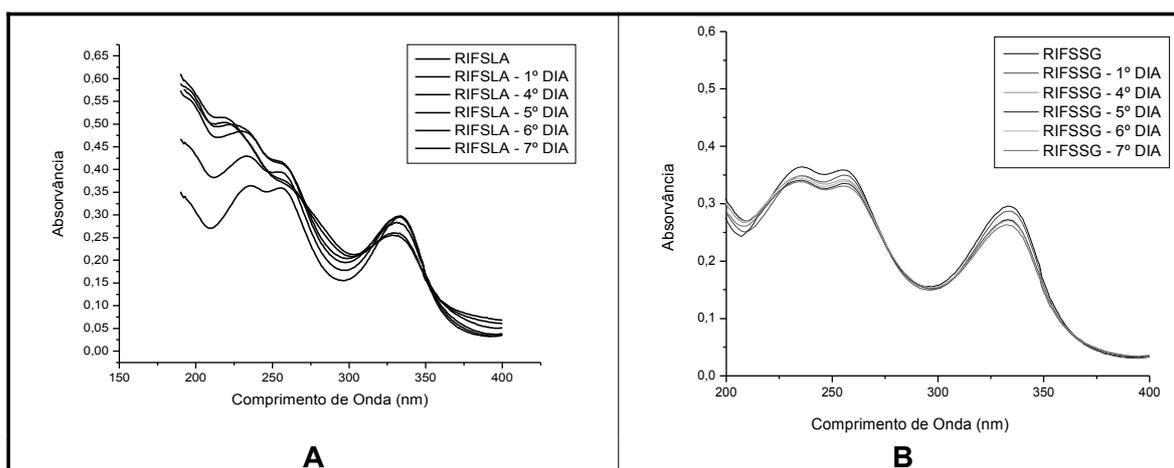
Em função destes argumentos, um estudo preliminar foi sistematicamente realizado, de maneira que pudessem ser definidas as condições e o tempo máximo de estocagem das soluções utilizadas como padrão.

Assim, a análise de robustez consistiu em analisar o comportamento das substâncias em diferentes temperaturas (5, 20, 40, 50 e 70° C), pH em 4, 5, 7 e 9 e tempos de leitura (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas). O teste relativo a solventes não é necessário visto que para estes utiliza-se apenas água destilada.

5.4.4.1. Avaliação da Estabilidade dos Fármacos – Tempos de Leitura

Neste estudo foi verificada uma importante modificação do perfil espectral da rifampicina (FIGURA 25A), efeito que conforme demonstrado pode ser suprimido pela adição de ácido ascórbico (GOICOECHEA, 1999). Entretanto, o efeito estabilizante do ácido ascórbico pode ser conseguido por estocagem no escuro e em baixas temperaturas (FIGURA 25B), condição que foi adotada neste estudo. Nestas condições, os padrões aquosos de rifampicina se mantêm inalterados por pelo menos 7 dias, o que viabiliza a rotina de trabalho. As soluções de isoniazida apresentaram boa estabilidade em todas as condições de estocagem ensaiadas. Mesmo assim, a sua estocagem foi feita a baixas temperaturas e na ausência de luz, respeitando-se um prazo de validade de, no máximo, uma semana.

FIGURA 25. EVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE RIFAMPICINA EM DIVERSOS PERÍODOS DE ESTOCAGEM.



LEGENDA:

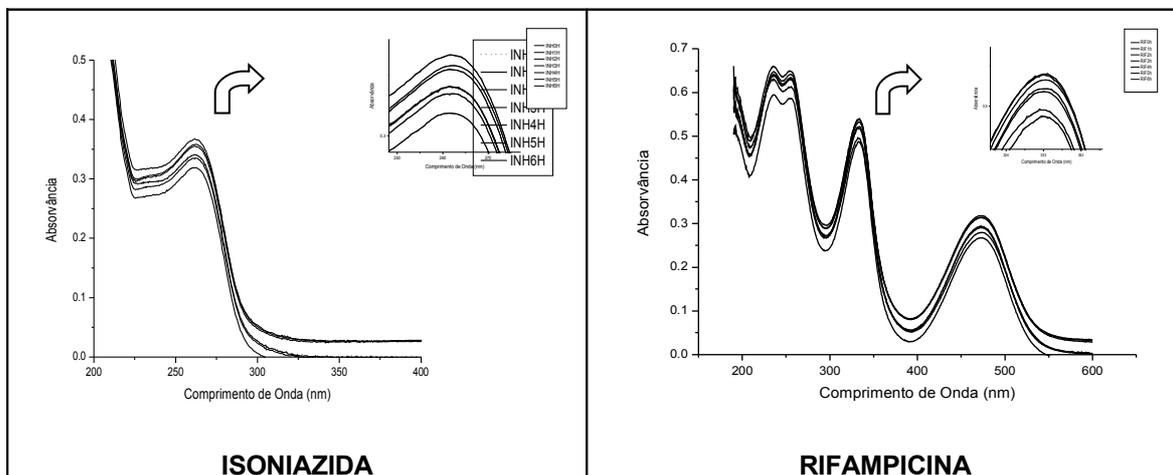
RIFSLA: RIFAMPICINA SEM ÁCIDO, EXPOSTA À LUZ E A TEMPERATURA AMBIENTE (A)

RIFSSG: RIFAMPICINA SEM ÁCIDO, PROTEGIDA DA LUZ E ESTOCADA EM GELADEIRA (B)

Outra análise envolvendo tempos de leitura que variavam de 0 a 6 horas foi realizada a fim de se verificar modificações espectrais para ambos os compostos (FIGURA 26). Estas análises demonstram pequenas diferenças nas absorvâncias de

ambos os substratos, sendo sugerido que todas as análises quantitativas sejam realizadas no momento do preparo da amostra.

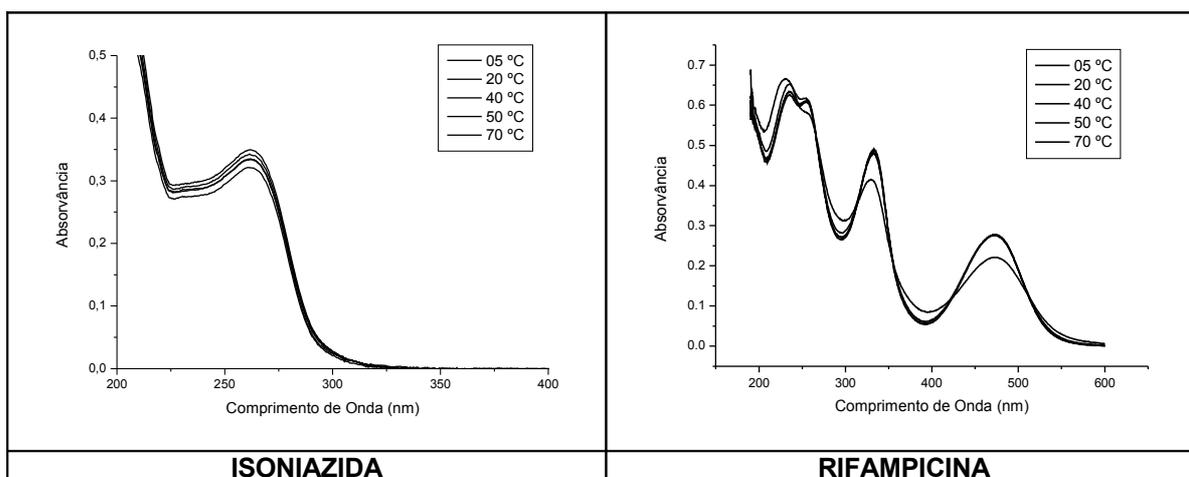
FIGURA 26. EVOLUÇÃO DOS ESPECTROS DE RIFAMPICINA DE 00 HORAS A 06 HORAS.



5.4.4.2. Avaliação dos Fármacos em Diferentes Temperaturas

Devido a observações de armazenagem dos padrões, foi verificado o comportamento das substâncias em diferentes temperaturas que variavam de 5 a 70°C (FIGURA 27). No caso da isoniazida, não se observa grande variância espectral, porém para a rifampicina diferenças significativas são observadas a partir do 50°C.

FIGURA 27. COMPORTAMENTO ESPECTRAL DOS FÁRMACOS EM ESTUDO, EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

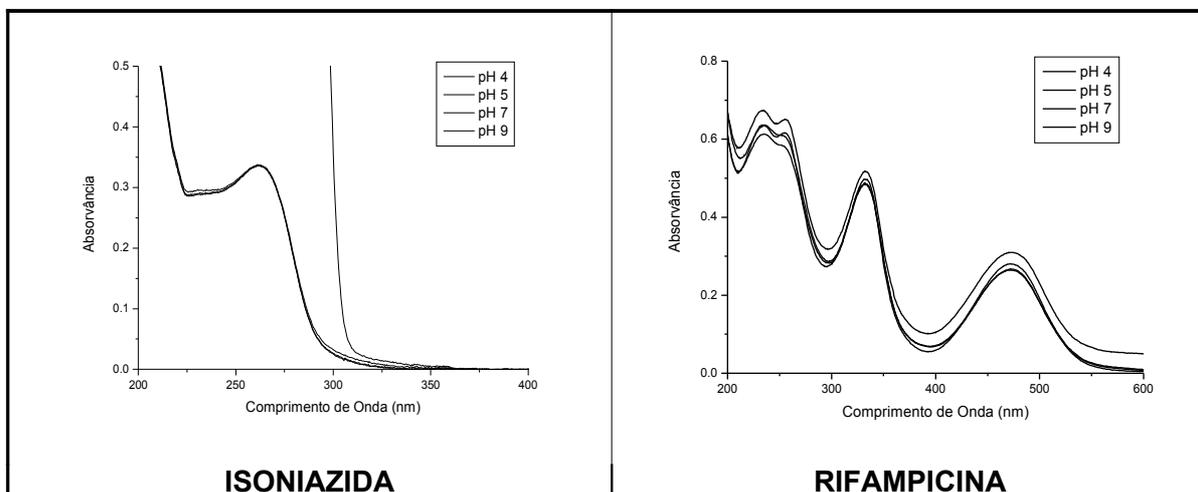


5.4.4.3. Avaliação dos Fármacos em Diferentes pHs

A leitura dos fármacos teve como faixa de variação pHs de 4 a 9, conforme FIGURA 28. Para a obtenção de um pH inferior ao da amostra (5,8), adicionou-se ácido

ascórbico em ambos os substratos. Em meio ácido, houve o aumento da banda de absorção da isoniazida, não sendo viável em rotinas de análise a sua utilização. Quanto à rifampicina este problema não foi verificado, mas observa-se que a rifampicina em meio básico sofre mudanças espectrais que podem vir a influenciar na análise dos medicamentos. Desta forma, pode-se concluir que o pH da amostra e pequenas variações na ordem de ± 1 não vêm a interferir na análise, variações estas que devem ser respeitadas em qualquer tipo de análise.

FIGURA 28. COMPORTAMENTO ESPECTRAL DOS FÁRMACOS EM ESTUDO, EM DIFERENTES pHs.



5.4.5. Exatidão

A exatidão da metodologia multivariada proposta foi avaliada em relação aos resultados obtidos por aplicação da metodologia cromatográfica padrão, na análise de medicamentos. Os cromatogramas dos padrões de calibração são apresentados na FIGURA 29, enquanto que as curvas analíticas na FIGURA 30.

FIGURA 29. CROMATOGRAMAS DOS PADRÕES UTILIZADOS NA ELABORAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

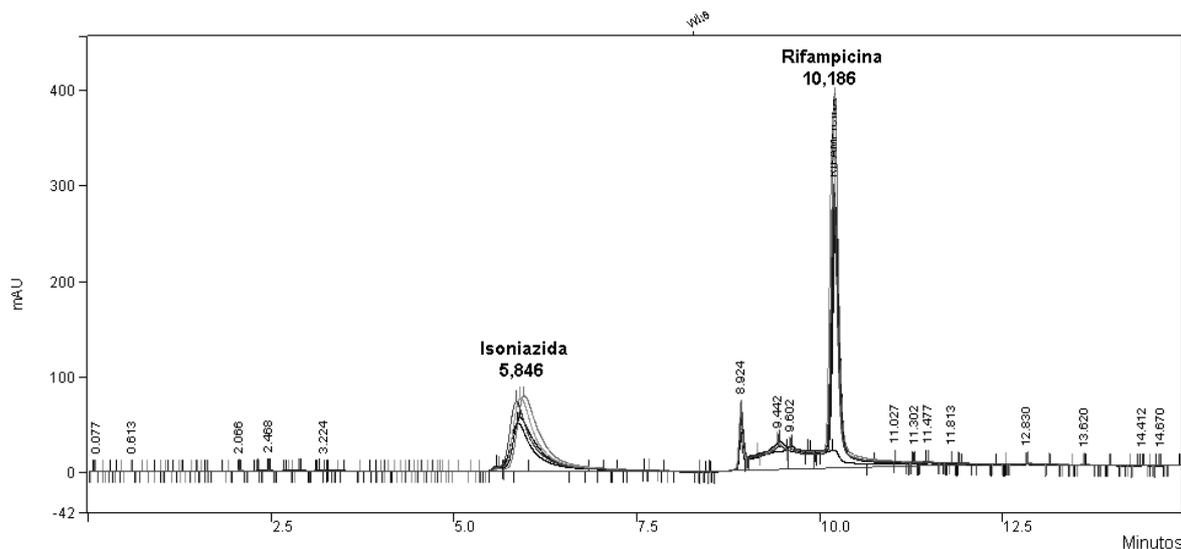
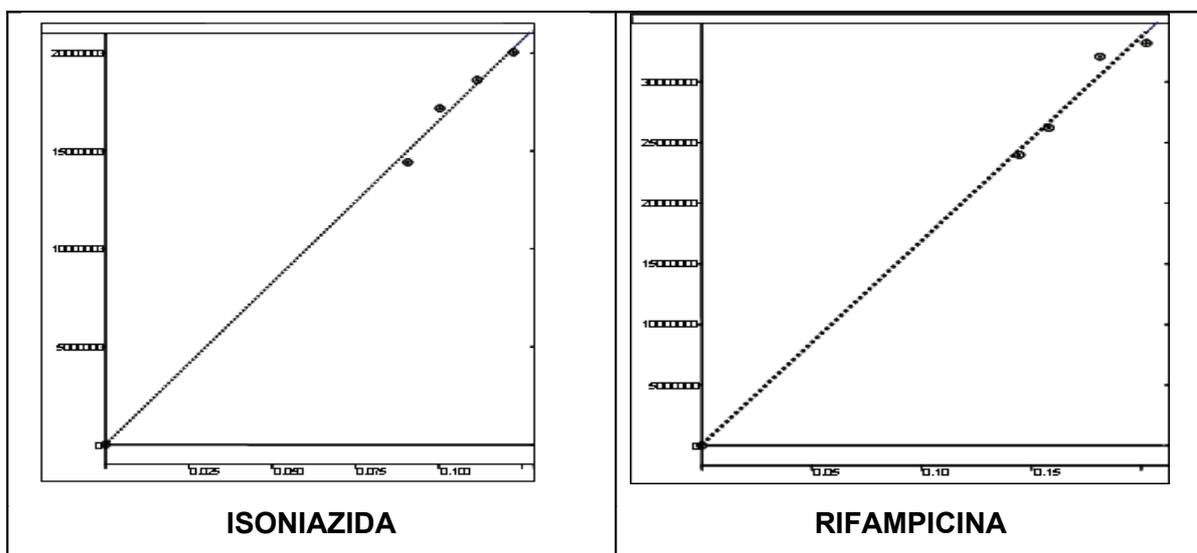


FIGURA 30. CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA MÉTODO CROMATOGRÁFICO PADRÃO.



Através das curvas analíticas desenvolvidas encontraram-se as equações da reta (EQUAÇÃO 13), que de acordo com a legislação deve ter como coeficiente de correlação valor superior a 0,99, tanto para a isoniazida (EQUAÇÃO 14) quanto para a rifampicina (EQUAÇÃO 15).

$$Y = A.X + B \quad R \geq 0,99 \quad (\text{Eq. 13})$$

$$Y = 1,6517.10^8 . X \quad R = 0,9971 \quad (\text{Eq. 14})$$

$$Y = 1,6826.10^8 . X \quad R = 0,9951 \quad (\text{Eq. 15})$$

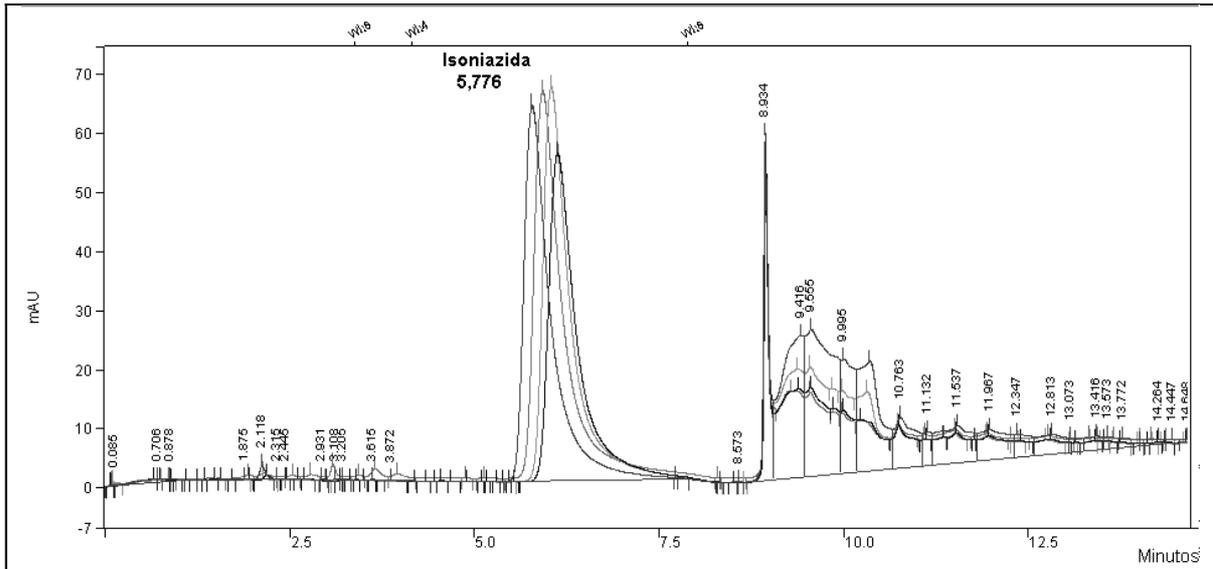
Os cromatogramas das amostras de medicamentos são apresentados na (FIGURA 31), enquanto que os resultados obtidos por método espectroscópico multivariado e cromatográfico padrão na TABELA 14.

Estes resultados demonstram uma excelente coerência com os níveis de exatidão da metodologia proposta. Assim, a análise multivariada por espectroscopia no ultravioleta-visível pode ser utilizados na determinação de ambos os substratos em medicamentos associados ou isolados.

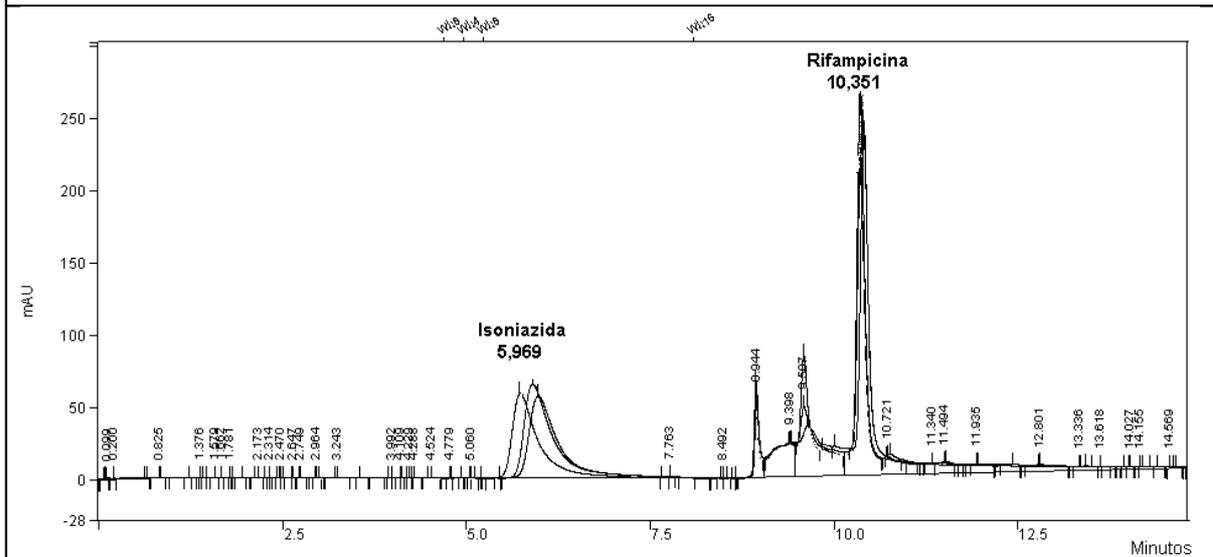
TABELA 14. CONCENTRAÇÕES DOS FÁRMACOS EM ESTUDO EM AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS, OBTIDAS POR MÉTODO ESPECTROSCÓPICO MULTIVARIADO E CROMATOGRÁFICO PADRÃO.

| Amostra | Concentração (mg g ⁻¹) | | | | Erro (%) | | | |
|----------------|------------------------------------|-------|-----------------|-------|---------------|-------|----------------|-----|
| | Previsto | | Medido - Padrão | | Cromatografia | | Espectroscopia | |
| | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF | INH | RIF |
| MED100A | 101,5 | * | 100,9 | * | -0,6 | * | 4,3 | * |
| MED100B | 104,8 | * | 102,2 | * | -2,5 | * | 2,0 | * |
| MED250A | 98,7 | 148,1 | 102,8 | 154,2 | 4,2 | 4,1 | 4,4 | 4,2 |
| MED250B | 110,2 | 150,1 | 101,5 | 152,1 | -7,9 | 1,3 | 6,7 | 0,1 |
| MED300A | * | 304,2 | * | 325,4 | * | 7,0 | * | 0,7 |
| MED300B | * | 307,4 | * | 275,0 | * | -10,6 | * | 7,3 |
| MED500A | 249,4 | 359,6 | 258,4 | 387,7 | 3,6 | 7,8 | 0,9 | 5,8 |
| MED500B | 250,8 | 355,8 | 253,4 | 380,1 | 1,1 | 6,8 | 3,2 | 7,8 |

FIGURA 31. CROMATOGRAMAS DOS MEDICAMENTOS ANALISADOS.



MEDICAMENTOS 100 (ISONIAZIDA 100mg)



MEDICAMENTOS 250 (ISONIAZIDA 100mg + RIFAMPICINA 150mg).

6. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que:

6.1. Espectroscopia Eletrônica em Solução

Os processos de calibração univariados, fundamentados em curvas analíticas convencionais e derivativas, se apresentam inadequados para a quantificação de fármacos sujeitos a significativa interferência espectral.

Dos métodos convencionais, o sistema fundamentado no princípio de aditividade de absorvâncias permite contornar os problemas de interferência espectral, permitindo resultados relativamente coerentes com as informações de bula.

Praticamente todos os modelos multivariados desenvolvidos apresentaram uma excelente capacidade de previsão. Os modelos selecionados apresentaram-se particularmente eficientes, permitindo resultados coerentes com os limites estabelecidos pela legislação vigente.

A simplicidade operacional das metodologias merece especial destaque, principalmente porque favorece o estabelecimento de rotinas analíticas orientadas ao controle de qualidade deste tipo de produtos.

6.2. Espectroscopia Eletrônica em Sólidos

Em relação à determinação por espectroscopia no ultravioleta-visível, verifica-se elevados erros médios porcentuais nas análises, demonstrando a ineficiência do método na determinação de isoniazida e rifampicina em fármacos tuberculostáticos.

6.3. Espectroscopia no Infravermelho

Embora de extrema complexidade, observa-se que todas as regiões espectrais utilizadas contêm informação que permite a elaboração de modelos de calibração.

De maneira geral, observou-se que a região do infravermelho médio ou a utilização da região do infravermelho por completo viabilizou a obtenção de modelos de calibração com maior capacidade de previsão, o que sugere a adoção desta região para a análise de amostras deste tipo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLATEF, H.E.; AYAD, M.M.; SOLIMAN, S.M.; YOUSSEF, N.F. Spectrophotometric and spectrodensitometric determination of paracetamol and drotaverine HCl in combination. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 66, **2007**, pgs. 1147-1151.
- AGRAWAL, S.; KAUR, K.J.; SINGH, I.; BHADRE, S.R.; KAUL, C.L. ; PANCHAGNULA, R. Assessment of bioequivalence of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in a four drug fixed dose combination with separate formulations at the same dose levels. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 233, **2002**, pgs. 169-177.
- AGRAWAL, S.; ASHOKRAJ, Y.; BHARATAM, P.V.; PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 22; **2004**, Pgs. 127-144.
- KALIN; E.; AKYUZ, S. Vibrational structure of free and hydrogen bonded complexes of isoniazid: FT-IR, FT-Raman and DFT study. [*Journal of Molecular Structure*](#), vol.s 834-836, **2007**, pgs. 492-497.
- ARGEKAR, A.P.; KUNJIR, S.S.; PURANDARE, K.S.; Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamid by high performance thin layer chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 14, **1996**, pgs. 1645.
- ANVISA - Portaria nº. 54, de 18 de Abril de 1996. Publica o parecer do Grupo Técnico de Estudos de Medicamentos Antibióticos, **1996**.
- ANVISA - Portaria nº. 3.916/MS/GM, de 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos, **1998**.
- ANVISA - Portaria nº. 1.587, de 3 de setembro de 2002. Revisa a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, **2002**.
- ANVISA - Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, **2003**.
- ANVISA - Fórum Nacional: Prevenção e Combate à falsificação e fraude de medicamentos: uma responsabilidade compartilhada. Brasília, 06 Jul. **2004**.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.; BARONE, J.S. *Química Analítica Quantitativa Elementar – 3ª Edição*. Editora Edgard Blücher Ltda. Campinas - S.P, **2003**.
- BENAMOR, M.; BELHAMEL, K.; DRAA, M.T. Use of xylenol orange and cetylpyridinium chloride in rapid spectrophotometric determination of zinc in pharmaceutical

- products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 23, **2000**, pgs. 1033.
- BENETTON, S.A.; HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M.; BORGES, V.M. Visible spectrophotometric and first-derivative UV spectrophotometric determination of rifampicin and isoniazid in pharmaceutical preparations. *Talanta*, vol. 47, Nov **1998**, pgs. 639-643.
- BHUTANI, H.; SINGH, S.; JINDAL, K.; CHAKRABORTI, A.K. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 39, **2005**, pgs. 892–899.
- BOERIS, M.S.; LUCO, J.M.; OLSINA R.; Simultaneous spectrophotometric determination of phenobarbital, phenytoin and methylphenobarbital in pharmaceutical preparations by using partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 24, **2000**, pg. 259.
- BRITISH PHARMACOPOEIA. European Pharmacopoeia - 4th Edition, **2002**.
- CALLEGARI, L. Farmácias & Drogarias: Limites na Baixa Capacidade de Consumo. *Gazeta Mercantil*, 22 Mar. **2004**.
- CALLERI, E.; DE LORENZI, E.; FURLANETTO, S.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA, G.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 29, **2002**, pg. 1089.
- CAÑADA, F.C. Estudios Analíticos de Quimioterápicos. Nuevos Métodos de Determinación Simultánea de Principios Activos Coadministrados, en Fármacos y Fluidos Biológicos. *Tese de Doutorado*. Departamento de Química Analítica da Universidad de Extremadura – Badajoz, **2002**.
- CORDEIRO, G.A. Desenvolvimento de Metodologias Espectroscópicas Multivariadas para a Quantificação de Fármacos em Formas Farmacêuticas. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná – Paraná, Brasil. **2006**.
- COSTA, A.C.S.. 21ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Conferência Plenária: “A Química Analítica na Próxima Década: Perspectivas”. Poços de Caldas – Minas Gerais. 25 Mai. **1998**.
- CRIADO, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M.; Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis. *Talanta*, vol. 53, **2000**, pg. 417.
- DEKKER, T.G.; LÖTTER, A.P. Anti-tuberculosis 4FDC Tablets — Mystery to Chemistry. *Int Journal Tuberculosis Lung Dis*, vol. 7; **2003**, pgs. 205-206.

- DOMINGUEZ, B.C. Tuberculose - A cura está nas políticas públicas. *Revista RADIS – Comunicação em Saúde*. N.º 48. Rio de Janeiro, RJ. Ago. **2006**.
- DUARTE, R.S. Tuberculose: antigo problema e novos desafios. Sessão Científica do Setor de Ciências Biológicas. Departamento de microbiologia Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, Brasil. 04 Jun. **2007**
- DU, L.; WU, L.; LU, J.; GUO, W.; MENG, Q.; JIANG, C.; TENG, S. Application of near infrared diffuse reflectance spectroscopy with radial basis function neural network to determination of rifampicin isoniazid and pyrazinamide tablets. [*Chemical Research in Chinese Universities*](#), vol. 23, Set. **2007**, pgs. 518-523
- ELLARD, G.A. The colorimetric analysis of anti-tuberculosis fixed-dose combination tablets and capsules. *Int Journal Tuberculosis Lung Dis*, vol. 3, **1999**, pgs. 343–346.
- ELLARD, G.A.; FOURIE, P.B. Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. *Int Journal Tuberculosis Lung Dis*, vol. 3; **1999**, pgs. 301–308.
- ESPINOSA-MANSILLA, A.; ACEDO-VALENZUELA, M. I.; PEÑA, A.M.; CAÑADA, F.C.; MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH, S. Determination of antitubercular drugs in urine and pharmaceuticals by LC using a gradient flow combined with programmed diode array photometric detection. *Talanta*, vol. 58, 23 Ago. **2002**, pgs. 273-280.
- ESPINOSA-MANSILLA, A.; VALENZUELA, M.I.A.; PEÑA, A.M.; SALINAS, F.; CAÑADA, F.C. Comparative study of partial least squares and a modification of hybrid linear analysis calibration in the simultaneous spectrophotometric determination of rifampicin, pyrazinamide and isoniazid. *Analytica Chimica Acta*, vol. 427, 19 Jan. **2001**, pgs. 129-136.
- FAVILA, A.; GALLO, M.; GLOSSMAN-MITNIK, D. Chih-Dft Determination Of The Molecular Structure Infrared Spectra, Uv Spectra And Chemical Reactivity Of Three Antitubercular Compounds: Rifampicin, Isoniazid And Pyrazinamide. *Journal of Molecular Modeling*, – vol. 13, n.º 4, Abril, **2007**.
- FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; BARRALES, P.O.; RODRÍGUEZ, T.G.; DÍAZ, A.M.; A flow injection sensor for simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by using Sephadex SP C-25 for continuous on-line separation and solid phase UV transduction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 31, **2003**, pg. 669.
- FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O.; Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, vol. 22, **1999**, pg. 724.

- FULLER, M.P.E; GRIFFITHS, P.R.; Diffuse Reflectance Measurements by Infrared Fourier Transform Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, vol. 50, **1978**, pg. 1906.
- GILMAN, G.A.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; *As Bases Farmacológicas da Terapêutica* - 10ª edição. Editora Mcgraw-Hill, **2007**.
- GOICOECHEA, H.C.; OLIVIERI, A.C.; Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide in tablet preparations by multivariate spectrophotometric calibration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 20, **1999**, pgs. 681–686.
- HAMMAM, E.; BELTAGIB, A.M.; GHONEIMA, M.M. Voltammetric assay of rifampicin and isoniazid drugs, separately and combined in bulk, pharmaceutical formulations and human serum at a carbon paste electrode. *Microchemical Journal*, vol. 77, 2004, pgs. 53–62.
- KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R.; Simultaneous determination of lamivudine and stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, **2006**, pgs. 761-765.
- KHUHAWAR, M.Y.; RIND, F.M.A. Liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 766, 25 Jan. **2002**, pgs. 357-363.
- KYAW, C.M.; Antibióticos e Quimioterápicos – Texto de Microbiologia disponibilizado através do site <http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/index.html>, acesso ao site em Abril de **2008**.
- LOMILLO, M.A.A.; RENEDO, O.D.; MARTÍNEZ, M.J.A.; Resolution of ternary mixtures of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by differential pulse polarography and partial least squares method. *Analytica Chimica Acta*, volume 449, **2001**, pgs. 167–177.
- MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH S.; Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, vol. 538, **2005**, pgs. 345–353.
- MAHLANOBIS, K.K.; BASU, D.; ROY, B.; *Analyst*, vol. 114, **1989**, pgs. 1311.
- MARIAPPAN, T.T.; JINDALB, K.C.; SINGH, S. Overestimation of rifampicin during colorimetric analysis of anti-tuberculosis products containing isoniazid due to formation of isonicotinyl hydrazone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 36, **2004**, pgs. 905–908.
- MESSERSCHMIDT, IARA. Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada. *Tese de Doutorado*. Instituto de Química de Campinas – São Paulo, Brasil. **1999**.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE – Vigilância Epidemiológica. <http://portal.saude.gov.br/saude>
Acesso ao site em 01 de Agosto de **2007**.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – Programa Nacional de Controle da Tuberculose: Tuberculose no Brasil. **2005**
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica. Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica. – 6. Edição. Brasília, **2002**
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Redação dada pela Lei nº 9.787, de 10 de Fev. **1999**.
- NEBULONI, M.; OCCELLI, E.; CAVALLERI - Pure Crystalline Form Of Rifapentine, European Patent EP0536197. Publicado 26 de Julho de 1995. Acesso pelo site <http://www.freepatentsonline.com>, em julho de **2007**.
- OHAMA, EDUARDO FELIPE. Estudos FEBRAFARMA: Comparativo Internacional de Preços de Produtos Farmacêuticos em 2004. FEBRAFARMA - Federação Brasileira da Indústria Farmacêutica, São Paulo, SP. 2005. Acesso pelo site www.febrafarma.org.br em julho de **2007**.
- OLIVEIRA, A.. Os remédios, que deveriam curar, são campeões em casos de intoxicação no Brasil. Artigo 19 de Novembro, 1993. Acesso pelo site http://www.radiobras.gov.br/especiais/remedios_intoxicacao/remediosintoxicacao_capa.html, em Julho de **2007**.
- OPAS -ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Acesso ao site www.opas.org.br em 06 de Abril de **2006**.
- PANCHAGNULA, R.; SOOD, A.; SHARDA, N.; KAUR, K.; KAUL, C.L.; Determination of rifampicin and its main metabolite in plasma and urine in presence of pyrazinamide and isoniazid by HPLC method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 18, **1999**, pgs. 1013-1020.
- PARISOTTO, G.; SOUZA, J.S.; FERRÃO, M.F.; FURTADO, J.C.; MOLZ, R.F. Análise Exploratória Aplicada no Estudo de Medicamentos Contendo Piroxicam. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* nº. 4, vol. 41, out / dez. **2005**.
- PATEL, Y.P.; SHAH, N.; BHOIR, I.C.; SUNDARESAN, M. Simultaneous determination of five antibiotics by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 828, **1998**, pgs. 287–290.
- POPPI, R.J.; COSTA FILHO, P.A. Aplicação de algoritmos genéticos na seleção de variáveis em espectroscopia no infravermelho médio - Determinação simultânea de glicose, maltose e frutose. *Química Nova*, vol. 25, n.º 01, **2002**, pgs. 46-52.
- PRASAD, K.V.R.; RISTIC, R.I.; SHEEN, D.B.; SHERWOOD, J.N.; Crystallization of paracetamol from solution in the presence and absence of impurity. *Int. Journal. Pharmaceutical*, vol. 215, **2006**, pg. 29.

- RAO, K.R.; BHANUMATHI, N.; YADAV, J.S.; KRISHNAVENI, N.S. Inclusion complex of Rifampicin, an anti-tubercular drug, with β -cyclodextrin or 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin and a process thereof - United States Patent 7001893. Publicado em 21 de Fevereiro de 2006. Acesso através do site: <http://www.freepatentsonline.com/7001893.html> em Jul. **2007**.
- REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, **2005**; pgs. 1109 – 1143.
- RODRIGUES, J.M.JR; LIMA, K.M.; CASTELO, A.A.M.; MARTINS, V.L.D.B.; SANTOS, S.A.; FACCILOLO, L.H.; SILVA, C.L. É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?. *Jornal Brasileiro Pneumologia*, n.º 04, São Paulo, vol. 30, Jul/Ago **2004**.
- ROSSIGNOLI, P.S. Determinação de Glucosamina e Condroitina em Forma Farmacêutica por Espectroscopia no Infravermelho com Reflectância Difusa e Calibração Multivariada. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná – Paraná, Brasil, **2006**.
- SAVITZ, A.; GOLLAY, M.J.E.; Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Square Procedures, *Anal. Chem*, vol. 36, **1994**, pg. 1627.
- SECRETARIA DE SAÚDE E DEFESA CIVIL/RJ – link sobre Tuberculose. Estado do Rio de Janeiro / RJ. Acesso ao site: <http://www.saude.rj.gov.br/HESM/Tuber.shtml> em abril de **2008**.
- SHISHOO, C.J.; SHAH, S. A.; RATHOD, I.S.; SAVALE, S.S.; VORA, M.J. Compared bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 228, 9 Out **2001**, pgs. 53-67.
- SHISHOO, C.J.; SHAH, S.A.; RATHOD, I.S.; SAVALE, S.S.; KOTECHA, J.S.; SHAH, P.B. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 190; **1999**; pgs. 109–123.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Fundamentos da Química Analítica. Tradução 8ª edição Americana, São Paulo: Ed. ThWHOon, **2006**.
- SOUZA, M.V.N.; VASCONCELLOS, T.R.A. Fármacos no Combate à Tuberculose: Passado, Presente e Futuro. *Química Nova*, vol. 28, n.º. 4, **2005**, pgs. 678-682.
- TOSCANO, C.; KOSIM, L. Cartilha de vacinas: para quem quer mesmo saber das coisas - Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília. **2003**.
- UCT - UNIVERSITY OF CAPE TOWN - The South African Medicines Formulary – Antimycobacterials. Acesso pelo site <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/jmoodie/j04html.html>, em 06 de Abril de **2006**.
- USP - The United States Pharmacopoeia, U.S. Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, **2006**.

- VALENZUELA, M.I.A.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; LA PEÑA, A.M.; CAÑADA, F.C. Determination of antitubercular drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2002**
- WALUBO, A.; SMITH, P.; FOLB, P.I.; Comprehensive assay for pyrazinamide, rifampicin and isoniazid with its hydrazine metabolites in human plasma by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 658, 19 Ago **1994**, pgs. 391-396
- WHO – World Health Organization. Progress in TB diagnosis and control slowing. Reportagem publicada em 17 de Março de 2008. Acesso pelo site: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/annex_3/en/index.html em Abr. **2008**.
- YOUSSEF, R.M.; MAHER, H.M.; A new hybrid double divisor ratio spectra method for the analysis of ternary mixtures. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 9 Nov. **2007**.