

SANDRA STETS

**DESENVOLVIMENTO DE ROTINAS ESPECTROSCÓPICAS MULTIVARIADAS NA
REGIÃO DO VISÍVEL E MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**

CURITIBA

2011

SANDRA STETS

**DESENVOLVIMENTO DE ROTINAS ESPECTROSCÓPICAS MULTIVARIADAS NA
REGIÃO DO VISÍVEL E MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**

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.

Orientadora: Prof^a. Dra. Noemi Nagata

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Christiana A. Pessoa

CURITIBA

2011

TERMO DE APROVAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO DE ROTINAS ESPECTROSCÓPICAS MULTIVARIADAS NA
REGIÃO DO VISÍVEL E MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**

por

SANDRA STETS

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

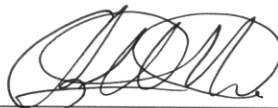
Orientador:



Prof^a Dr^a Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR



Prof^a Dr^a Maria Izabel Maretti Silveira Bueno
Instituto de Química - UNICAMP



Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 10 de fevereiro de 2010.

*Dedico este trabalho
a meus pais Antonio e Emilia,
a minha irmã Bel,
e a meu namorado Marcio
para mim exemplos de integridade, força e amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À minha orientadora: Professora. Dra. Noemi Nagata pela paciência, pelo apoio incondicional, por ter me acompanhado de tão perto em todos os momentos, por toda a atenção, carinho, pela sua amizade, amor, por sua ajuda nos momentos mais críticos, por acreditar em mim e no futuro deste projeto, por contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo de competência, dedicação e de pessoa a ser seguido.

À minha Co-orientadora Professora. Dra Christiana Andrade Pessoa por toda a sua dedicação, interesse, atenção, paciência e incentivo.

Ao Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora, pelo carinho, atenção e por compartilhar generosamente seus conhecimentos com excelentes recomendações que tornaram este documento mais completo.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate, pelo carinho, por estar sempre disposto a ajudar e por suas valiosas contribuições desde o projeto inicial, relatório e exame de qualificação, pela sua dedicação e leitura minuciosa que cooperaram no aperfeiçoamento deste documento.

À Professora. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno por ter aceitado prontamente o convite para participar da banca de defesa de mestrado.

Aos meus pais Antonio e Emilia Stets por todo esforço durante suas vidas dedicadas ao conforto, educação e bem estar de suas filhas, pelo amor, carinho, e, acima de tudo por seu exemplo de honestidade, força caráter e amor.

À minha irmã Maria Isabel Stets, pelo carinho, pela amizade, paciência em me ouvir, pelo incentivo e contribuições financeiras no início deste mestrado, seu apoio foi fundamental;

Ao meu namorado Marcio Odair Alves, pela compreensão, carinho, pelo tempo a mim dedicado, pelo sorriso e amor que superou a distância.

Aos amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando, especialmente aos amigos do grupo TECNOTRATER: Belisa, Terezinha, Marco, Marcus Vinícius, Loraine, Lutécia, Gilcélia, Caio, Bruna, Daniele, Giovane, Arlene, Fernanda e Ramon.

Agradecimento especial às IC's Bianca do Amaral, Talita Tavares, Sheila Slobodzian e Michele Almeida, pelas valiosas contribuições no laboratório, pela amizade e companheirismo.

À minha querida amiga Giselle, pelo carinho e orações.

Aos meus colegas do LABQAM e LABsens que sempre estiveram do meu lado dando força e apoio.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em especial ao Prof. Dr. Marcio F. Bergamini pelo convívio e aprendizado.

À secretaria de saúde do Estado do Paraná pelo fornecimento dos medicamentos analisados neste trabalho.

Ao secretário da pós-graduação Marcelino pela paciência e atenção.

A Capes pela bolsa concedida;

Enfim a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Louvado seja o nome de Nosso Senhor Jesus Cristo!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Doenças negligenciadas	17
2.1.1 Tuberculose	21
2.2 Métodos analíticos para a determinação de drogas tuberculostáticas.....	24
2.2.1 Espectrofotometria UV-Vis	25
2.2.1.1 Espectrofotometria Visível e Derivatização Química	27
2.2.2. Voltametria.....	29
2.2.2.1 Voltametria de onda quadrada	30
2.2.3 Determinação simultânea empregando-se métodos de calibração multivariada	33
2.3 Validação de Métodos Analíticos	36
3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	37
3.1 Objetivos Gerais	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Reagentes, equipamentos e programas computacionais	38
4.2 Preparo de soluções	39
4.3 Desenvolvimento do método empregando Cu (II) e NC para derivatização química. .	40
4.3.1 Preparo da amostra	40
4.3.2 Planejamento fatorial para otimização da reação de complexação Cu (I) - NC	40
4.3.3 Métodos de calibração convencional (Cu (II) e NC para derivatização química).....	42
4.3.4 Análise multivariada (Cu (II) e NC para derivatização química)	42
4.3.5- Validação da Metodologia Escolhida	43
4.3.6 Análise por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC).	44
4.3.7 Aplicação do método desenvolvido para a determinação de RIF e INH em matrizes biológicas	45
4.3.7.1 Análise de urina humana fortificada com RIF e INH.....	45
4.3.7.2 Aplicação do método desenvolvido em amostras de soro humano sintético	45
4.4 Desenvolvimento de método empregando Fe (III) e o-Fen para derivatização química.	46
4.4.1 Procedimento geral para o preparo das amostras.....	46
4.4.2 Análise multivariada (Fe (III) e o-Fen para derivatização química)	46
4.5 Método voltamétrico.....	46
4.5.1 Preparo do eletrodo de pasta de carbono	46
4.5.2 Estudo do comportamento eletrodo-solução (voltametria cíclica).....	47
4.5.3 Estudos utilizando Voltametria de Onda Quadrada (SWV)	47
4.5.4 Curva analítica e desenvolvimento do método de adição de padrão.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Estudos Espectrofotométricos Preliminares	49

5.2 Determinação Indireta de INH utilizando íons Cu (II) e Neocuproina (NC)	50
5.2.1 Planejamento Fatorial para otimização da reação de complexação Cu(I) - NC.....	52
5.2.2 Métodos de calibração convencionais (Cu (II) e NC para derivatização química)....	57
5.2.3 Método Multivariado (Cu (II) e NC para derivatização química).....	60
5.2.4. Validação do método empregando íons Cu (II) e NC na derivatização química.....	67
5.2.5 - Análise de amostras reais.....	71
5.2.6 Aplicação do método desenvolvido em amostras biológicas.....	74
5.2.6.1 Análise de urina humana fortificada com RIF e INH.....	74
5.2.6.2 Análise de soro sintético fortificado com RIF e INH.....	76
5.3 Método empregando Fe (III) e o-FEN para a derivatização química	76
5.3.1 Modelo Multivariado (Fe (III) e o-Fen para derivatização química)	77
5.4 Método Voltamétrico	81
5.4.1 Estudo do comportamento eletroquímico de RIF e INH em eletrodo de pasta de carbono.....	82
5.4.2 Estudos utilizando voltametria de onda quadrada (SWV).....	86
5.4.2.1 Otimização dos parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada.....	90
5.4.3 Aplicação analítica.....	91
5.4.3.1 Curva Analítica individual.....	91
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Comprimento de onda de máxima absorção e coeficiente de absorvidade molar dos principais quelatos formados com íons Cu (I) e Fe (II).....	29
Quadro 2. Medicamentos contendo isoniazida e rifampicina.....	38
Quadro 3. Constituição das fases móveis na análise cromatográfica por método padrão - HPLC.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Variáveis e níveis estudados na reação colorimétrica para a determinação de INH.....	41
Tabela 02: Planejamento experimental 2^2 composto central para a reação de complexação Cu (I) -NC que permite a determinação de INH.....	41
Tabela 03. Fatores e níveis otimizados no Planejamento Fatorial 2^3 para a otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada utilizada na determinação de RIF e INH.	47
Tabela 04: Ensaios experimentais para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados do planejamento fatorial 2^3 para a otimização dos parâmetros instrumentais da Voltametria de onda quadrada na determinação de RIF e INH.....	48
Tabela 05. Planejamento Fatorial 2^3 para a otimização da reação colorimétrica (formação de $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$).....	52
Tabela 06. Efeitos principais e de interação entre os fatores otimizados pelo planejamento fatorial 2^2	53
Tabela 07. Planejamento Fatorial 2^2 composto central para a otimização da reação colorimétrica (formação de $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$).	54
Tabela 08. ANOVA para o modelo quadrático construído a partir do planejamento fatorial 2^2 composto central para a otimização da reação colorimétrica que permite a determinação de INH.....	55
Tabela 09: Resposta prevista e erro obtidos pelo método de Vierordt para RIF e INH.	60
Tabela 10: Resposta prevista e erro obtidos pelo modelo multivariado PLSR para a previsão de RIF e INH.	67
Tabela 11: Capacidade de previsão dos modelos construídos para a determinação de INH e RIF.	67
Tabela 12. Resultados do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída) para o modelo multivariado.	70
Tabela 14. Análise de medicamentos pela metodologia farmacopeica e pelo método UV-Vis proposto acompanhado dos erros relativos.	73
Tabela 15. Comparação entre o método padrão e método proposto na análise de uma amostra contendo a associação estudada.....	74
Tabela 15. Resultados da previsão das concentrações das misturas sintéticas de RIF e INH, reservadas para validação, utilizando o melhor modelo multivariado encontrado para previsão. (concentrações expressas em mol L^{-1} e erro relativo em %).	81
Tabela 16. Resultados obtidos na determinação de RIF e INH por espectrofotometria UV-Vis em amostra de urina humana fortificada.....	75
Tabela 18: Planejamento Fatorial para a otimização dos parâmetros instrumentais para a determinação de RIF e INH por Voltametria de onda Quadrada em eletrodo de pasta de carbono.	90
Tabela 19: Efeitos dos fatores: Frequencia, amplitude de pulso e potencial de step para a determinação voltamétrica de RIF e INH em eletrodo de pasta de carbono utilizando Voltametria de onda quadrada e estimativa do desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata.	91
Tabela 20: Valores previstos pelo método voltamétrico desenvolvido e erro relativo médio em relação ao valor determinado pelo método padrão farmacopeico.	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular da Rifampicina	22
Figura 2: Estrutura molecular da Isoniazida	23
Figura 3: Regiões do espectro eletromagnético.	26
Figura 4: Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada.....	31
Figura 5: Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde – 1. Representa um processo redox de um sistema reversível e 2. de um sistema irreversível.....	31
Figura 6: Organização dos dados para a calibração multivariada	33
Figura 7: Composição do conjunto de calibração e validação no desenvolvimento de modelos multivariados – (□) amostras do conjunto de calibração, (●) amostras do conjunto de validação, (⊕) ensaios realizados em triplicata.	43
Figura 8: Comportamento espectral da solução de padrões de RIF ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e INH ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na região do UV-Vis.	49
Figura 9: Comportamento espectral do composto ($[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$) que permite a determinação indireta de INH e no detalhe a estrutura química do complexo.	51
Figura 10: Mudanças no comportamento espectral da RIF ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) quando na presença dos reagentes colorimétricos Cu(II) ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e NC ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).	51
Figura 11: Interpretação geométrica dos fatores significativos (pH e $C_{\text{Cu(II)}}$) no planejamento fatorial 2^3	53
Figura 12: Interpretação geométrica dos efeitos do planejamento fatorial 2^2 composto central.....	55
Figura 13: Superfície de resposta para o modelo quadrático $\text{Abs}_{(455 \text{ nm})} = 0,3446 + 0,1311 \text{ pH} + 0,0807 C_{\text{Cu(II)}} - 0,0576 \text{ pH}^2 - 0,0173 C_{\text{Cu(II)}}^2 + 0,0347 \text{ pH} \times C_{\text{Cu(II)}}$	56
Figura 14: Diagrama de distribuição das espécies para a INH.....	57
Figura 15: Comportamento espectral dos complexos envolvidos na determinação de INH (Complexo 1: $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$) e RIF (Complexo 2)).....	58
Figura 16: Primeira derivada dos dados espectrais (RIF) e curva analítica (INH)	58
Figura 17: Primeira derivada dos dados espectrais (INH) e curva analítica (RIF).	59
Figura 18: Comportamento espectral das 25 misturas sintéticas do conjunto de calibração utilizados na construção do modelo multivariado para a determinação de RIF e INH.	61
Figura 19: Evolução dos valores de RMSECV pelo número de variáveis latentes, no detalhe: porcentagem de variância capturada pelo modelo em cada variável latente.....	62
Figura 20: Gráfico do vetor de coeficiente de regressão para RIF e INH do modelo PLSR construído;.....	63
Figura 21:(A) Loadings das 3 primeiras VLs e no detalhe: comportamento espectral individual de (B) RIF e (C) INH na presença dos reagentes colorimétricos Cu (II) e NC.	64
Figura 22: Resíduos de Students vs leverage para o modelo multivariado construído.	65
Figura 23: Valores previstos (CV) vs. valores reais de (A) RIF; (B) INH.....	66
Figura 24: Gráfico dos resíduos (CV) vs concentração real para RIF	69
Figura 25: (A) Cromatogramas dos Padrões farmacêuticos obtidos pelo método padrão farmacopeico. Curva analítica construída a partir do método padrão para (B) INH; (C) RIF.....	72
Figura 26: Cromatogramas obtidos na análise dos medicamentos pelo método padrão farmacopeico.	73
Figura 27: Comportamento espectral da solução aquosa e amostra de urina fortificadas com quantidades apropriadas de RIF e INH após as reações colorimétricas.	75
Figura 28: Comportamento espectral de vários compostos formados com a RIF a partir das reações de derivatização empregando-se Fe (III) e o-Fen.	77

Figura 29: Espectros do conjunto de calibração utilizado na construção do modelo multivariado.	78
Figura 30: Evolução do RMSECV em função do número de variáveis latentes para o modelo utilizando dados originais e região espectral compreendida entre 380 e 800 nm.	78
Figura 31: Gráfico dos coeficientes de regressão na faixa espectral estudada para RIF e INH utilizando dados originais e 4 VL.	79
Figura 32: Gráfico de valores reais vs valores previstos para a validação cruzada, valores de coeficientes de regressão ($R^2(CV)$), RMSEC e RMSECV obtidos pelo modelo multivariado para: (A) RIF; (B) INH.	80
Figura 33: Influência do pH no comportamento voltamétrico da RIF ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), no detalhe: influência do pH no I_{pa} para o pico (1a) em 0,305V.	82
Figura 34: Esquema do primeiro processo de oxidação da RIF (em destaque vermelho) em eletrodo de pasta de carbono (pH = 4,00).	83
Figura 35: Esquema do segundo processo de oxidação da RIF (em destaque azul) em eletrodo de pasta de carbono (pH = 4,00).	83
Figura 36: Influência do pH na corrente de pico anódica (I_{pa}) para a INH ($5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) em eletrodo de pasta de carbono.	84
Figura 37: Esquema do processo de oxidação da INH (em destaque verde) em eletrodo de pasta de carbono (pH = 4,00).	84
Figura 38: Estudo da I_{pa} vs a raiz quadrada da velocidade de varredura; (A) INH; (B) RIF.	85
Figura 39: Comportamento voltamétrico (SWV) da RIF e INH em eletrodo de pasta de carbono.	86
Figura 40: Comportamento Voltamétrico (SWV) da RIF em diversos pHs em eletrodo de pasta de carbono.	87
Figura 41: Evolução do I (em azul) e do E (em preto) em função do pH para a resposta voltamétrica da RIF em eletrodo de pasta de carbono.	88
Figura 42: Comportamento Voltamétrico (SWV) da RIF em diversos pHs em eletrodo de pasta de carbono.	89
Figura 43: Evolução do I (em verde) e do E (em preto) em função do pH para a resposta voltamétrica da RIF.	89
Figura 44: Comportamento voltamétrico e curva analítica para a determinação individual de RIF em eletrodo de pasta de carbono nas condições: pH = 4,00; amplitude de pulso = 0,09 V; frequência = 30 Hz; potencial de step = 0,009 V.	92
Figura 45: Comportamento voltamétrico e curva analítica para a determinação individual de INH em eletrodo de pasta de carbono nas condições: pH = 4,00; amplitude de pulso = 0,09 V; frequência = 30 Hz; potencial de step = 0,009 V.	93
Figura 46: Comportamento voltamétrico da RIF e curva de adição de padrão em triplicata (no detalhe) para o medicamento MED A.	94
Figura 47: Comportamento voltamétrico da INH e curva de adição de padrão em triplicata (no detalhe) para o medicamento MED A.	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Ap	Área de pico
ANOVA	Análise de Variância
BCG	Vacina com o Bacilo de Calmette-Guérin
CMD	Concentração Média Determinada
CV	Coeficiente de Variação
DEC	Dietilcarbamazina
DNDi	Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DPR	Desvio Padrão Relativo
E_{pa}	Potencial de Pico Anódico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência
HPTLC	High Performance Thin layer chromatography
INH	Isoniazida
I_{pa}	Corrente de Pico Anódico
LQFEX	Laboratório Químico-Farmacêutico do Exército
M. tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MQep	Média Quadrática de erro puro
MQfaj	Média Quadrática de falta de ajuste
MQR	Média Quadrática de Regressão
MQr	Média Quadrática de resíduos
NC	Neocuproina
o-Fen	1,10 – fenantrolina
OMS / WHO	Organização Mundial da Saúde / World Health Organization
ONG	Organização não governamental
ONU	Organização das Nações Unidas
PAE	Princípio da Aditividade Espectrofotométrica
PCA	Análise de Componentes Principais
PLSR	Regressão de Mínimos Quadrados Parciais
r	Coeficiente de correlação
RIF	Rifampicina
RMSEC	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Calibração
RMSECV	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada
RMSEP	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Previsão

RNA	Ácido Ribonucleico
s	Estimativa do desvio padrão
SPCE	Eletrodo de Carbono Impresso
SWV	Voltametria de Onda Quadrada
TB	Tuberculose
UPLC	Cromatografia em fase Líquida de Ultra Eficiência
USP	Farmacopéia Norte Americana
UV	Espectroscopia na Região do Ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível
VC	Voltametria cíclica
Vis	Espectroscopia na Região do Visível
VLs	Variáveis Latentes
Vs	Versus

RESUMO

A Tuberculose é uma doença negligenciada, multirresistente, contagiosa, com alta taxa de mortalidade. Seu tratamento consiste no uso de antibióticos, sendo que nos 4 últimos meses (fase de manutenção), utiliza-se uma dose fixa combinada da associação de isoniazida (INH) e rifampicina (RIF). A farmacopéia Norte Americana (USP) recorre à cromatografia em fase líquida de alta eficiência para o controle de qualidade destes medicamentos, técnica que, além de onerosa, se mostra extremamente demorada e geradora de resíduos orgânicos tóxicos. Em função destas características, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de três métodos para a determinação simultânea de RIF e INH. Os dois primeiros métodos utilizam a espectrofotometria na região do visível associada a métodos de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR). O primeiro consiste na derivatização química dos analitos, utilizando os reagentes colorimétricos neocuproina e Cu (II), sendo que o modelo multivariado construído com faixa espectral completa (350-800 nm), dados alisados em 5 pontos, utilizando 3 variáveis latentes (explica 100% da variância da matriz X e 99,99% da variância da matriz Y) apresentou um erro relativo médio de 1,63% para RIF e 1,82% para INH. Este método foi validado de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA, encontrando nos ensaios de precisão e exatidão limites compatíveis às exigências estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores. Este método foi ainda aplicado na análise de amostras de urina e soro humano sintético fortificados com RIF e INH, obtendo-se recuperações próximas a 100%. O segundo método utilizou como reagentes colorimétricos Fe (III) e o-fenantrolina, sendo que o modelo multivariado construído a partir dos dados originais e 4 variáveis latentes apresentou baixo erro relativo médio para a determinação de RIF (2,26%); no entanto, apresentou alto erro relativo médio para a determinação de INH (27,5%); mostrando a baixa capacidade de previsão para quantificação deste fármaco. O terceiro método desenvolvido utilizou a técnica de voltametria de onda quadrada e adição de padrão para a determinação dos analitos utilizando eletrodo de pasta de carbono. A melhor resposta foi obtida em pH 4,00 utilizando os parâmetros instrumentais fixos em 30 Hz para a frequência, 0,09 V para potencial de amplitude de pulso e 0,009 V para potencial de step. Nestas condições, a corrente de pico cresce linearmente com as seguintes faixas de concentração: $4,00 \times 10^{-7}$ a $5,40 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (RIF) e de $2,00 \times 10^{-4}$ a $5,80 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (INH). Este método apresentou erro relativo médio (4,43% para RIF e 13,6% para INH) superiores ao método espectrofotométrico utilizando íons Cu (II) e Neocuproina.

ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease, multiresistant, common in developing countries with high death rate. Treatment uses multiple antibiotics, and at 4 last months is treated with a isoniazid (INH) and rifampicin (RIF) combination. The North American Pharmacopoeia (USP) uses high performance liquid chromatography for quality control of these pharmaceutical products. But this technique presents high cost and time of analysis, generating toxic organic wastes. These characteristics motivated the development of three methods for simultaneous determination of RIF and INH. The first and second methods used spectrophotometry (visible region) associated with the Partial Least Squares Regression (PLSR). The method involves chemical derivatization of analytes using colorimetric reagents neocuproine and Cu (II), and the multivariate model was constructed with full spectral range (350-800 nm) smoothed by 5 points, using 3 latent variables (explaining 100% of the variance of X matrix and 99.99% of the variance Y matrix) generating an relative error (Er) 1.63% for RIF and INH to 1.82%. This method was validated in according to the standards set by ANVISA, meeting the tests of precision and accuracy limits compatible with the requirements established by the inspectors. This method was applied for serum synthetic human and urine samples analysis fortified with RIF and INH, yielding recoveries close to 100%. The second method used as colorimetric reagents Fe (III) and o-phenanthroline and the multivariate model constructed from the original data and 4 latent variables showed low mean relative error to RIF determination (2.26%), however, for the determination of INH presented high relative errors (average error of 27.5%) showing low predictive capacity for the quantification of these drugs. The third method developed used the technique of square wave voltammetry and standard addition to the determination of analytes using carbon paste electrode. The best response is obtained using the instrumental parameters fixed at 30 Hz for frequency, 0.09 V for potential pulse amplitude and 0.009 V for potential step. Under these conditions the peak current increases linearly with the following concentration ranges: 4.00×10^{-7} to 5.40×10^{-6} mol L⁻¹ (RIF) and 2.00×10^{-4} to 5.80×10^{-4} mol L⁻¹ (INH). But this method presented mean relative error (4.43% for RIF and 13.6% for INH) bigger than spectrophotometric method using Cu (II) and Neocuproine.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a Tuberculose (TB) como uma das doenças negligenciadas, ou seja, aquelas que afetam milhares de pessoas, mas que não apresentam atrativos econômicos para o investimento e desenvolvimento de fármacos, por atingir principalmente populações de países em desenvolvimento [MOREL, 2006]. De acordo com esta organização, o Peru e o Brasil respondem em conjunto, por 50% de todos os casos de TB na América Latina. Estima-se que 50 milhões de brasileiros estivessem infectados com *Mycobacterium tuberculosis* em 2004, fazendo com que o país ocupasse a 16ª posição na lista dos 22 países de mais alta incidência de TB [WHO, 2010].

O custo mensal no Brasil para o tratamento inicial de um caso de TB (sem cuidados anteriores) é de R\$ 78,00; mas aumenta drasticamente para R\$ 4.500,00 nos casos de TB multirresistente, sem levar em consideração os custos hospitalares, sociais e psicológicos [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002]. Dada à alta incidência, gravidade e reincidência da doença (que pode variar de 3% para pacientes HIV-negativos a 35% para pacientes HIV-positivos [PICON, 2007]), a TB é uma das doenças de notificação compulsória estabelecida pelo ministério da saúde.

Em função da importância que este assunto reveste, investimentos governamentais em pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas ao tema, são fundamentais para o controle e erradicação da doença. Em 2004, durante a 2ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde, foi considerado estratégico para o País, o investimento na produção de conhecimento científico sobre o tema [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011]. De acordo com o Ministério da Saúde, os investimentos nas ações de prevenção e controle da TB aumentaram 14 vezes, de 2002 (US\$ 5,2 milhões) a 2009 (US\$ 74 milhões) [MEDEIROS *et al*, 2004]. Em termos de investimento científico, o Ministério da Saúde criou um programa específico de financiamento para as pesquisas envolvendo doenças negligenciadas que apresentou um aumento de 4 vezes, de 2003 (US\$ 3,79 milhões) a 2008 (US\$ 17,91 milhões) [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009]. Mais especificamente, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose da Secretaria de Vigilância da Saúde iniciou em 2007 um projeto de financiamento em pesquisa para o controle da doença, totalizando até 2012 cerca de US\$ 27 milhões em investimentos [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009]

Nesse contexto, a proposta deste trabalho versa sobre o uso da espectrofotometria na região do visível associada a processos de derivatização química (para evitar a interferência de matriz dos medicamentos e amostras de urina) e calibração multivariada na determinação quantitativa simultânea de rifampicina e isoniazida utilizada

no tratamento da TB bem como o uso da voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de pasta de carbono. Estas técnicas instrumentais citadas são de grande interesse para a área de controle de fármacos, uma vez que propiciam a obtenção de dados relevantes de forma rápida, simples, segura e econômica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças negligenciadas

Em uma época em que a humanidade está dando passos gigantes em relação a avanços tecnológicos em saúde, tais como, clonagem, biotecnologia e nano medicina, soa estranho abordar um assunto de poucos progressos na área da saúde. Trata-se das doenças negligenciadas, enfermidades que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento dos países.

Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a ONG Médicos Sem Fronteiras propuseram a classificação das doenças em globais (ocorrem em todo o mundo), negligenciadas (mais prevalentes nos países em desenvolvimento) e mais negligenciadas (exclusivas dos países em desenvolvimento). Essa classificação representa uma evolução da denominação “doenças tropicais” por contemplar os contextos de desenvolvimento político, econômico e social. Ou seja, ultrapassa a visão herdada do colonialismo em que o determinismo geográfico seria a causa de doenças. Além disso, sinaliza que o combate a essas moléstias, que atingem particularmente as populações marginalizadas, é essencial para o cumprimento dos objetivos de desenvolvimento da Organização das Nações Unidas (ONU) para o milênio. [MOREL, 2006]

Embora haja esta classificação, a lista de doenças consideradas negligenciadas varia de um país para outro. Atualmente, a OMS concentra seus esforços em dois grandes grupos: doenças tratáveis e contra as quais existem meios de combate (como filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, AIDS e dengue), e doenças ainda sem tratamento e que exigem cuidados específicos (como leishmaniose e doença de Chagas).

Problemas como a carência de água potável, saneamento básico, escolaridade, moradia e acesso a tratamentos de saúde acentuam a proliferação de tais doenças, e, por justamente afligirem populações mais pobres, o investimento em pesquisas relacionadas ao tema (desenvolvimento de novos fármacos, sistemas de tratamentos mais modernos, vacinas, diagnóstico precoce e preciso na esfera da patologia e da

clínica, no controle de vetores, nas intervenções epidemiológicas, bem como na educação, campanhas de prevenção e promoção da saúde) ainda é insuficiente. Atualmente, os países e blocos que mais investem em pesquisas de doenças negligenciadas são os Estados Unidos, com US\$ 1.250.000 (70%). O Brasil aparece em sexto lugar com cerca de US\$ 22.000 (1,24%). Vale a pena ressaltar que os grandes financiadores são geralmente os governos desses países [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009]

Segundo dados da OMS, mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011]. No Brasil, o quadro de doenças negligenciadas é inquietante, já que o alto índice de pobreza contribui para que grande parte dos 40 milhões da população mais pobre do Brasil esteja infectada por uma ou mais doenças negligenciadas [HOLTEZ *et al*, 2002]. A seguir serão destacadas as doenças negligenciadas mais comuns do Brasil.

- Filariose Linfática (casos estimados no Brasil: 60.000 [HOLTEZ *et al*, 2002]): enfermidade causada no Brasil exclusivamente por helmintos da espécie *Wuchereria bancrofti*. O ser humano é o único hospedeiro vertebrado do parasito, albergando vermes adultos nos vasos linfáticos e microfilárias na circulação sanguínea, sendo o mosquito *Culex quinquefasciatus* o principal transmissor. Dentre os sintomas é possível citar as reações do sistema imunológico e em longo prazo, fibrose e obstrução dos vasos (formando nódulos palpáveis) que pode levar a acumulação de linfa, com dilatação de vasos linfáticos alternativos e espessamento da pele. Para o tratamento é utilizado o antiparasítico dietilcarbamazina (DEC) que elimina as microfilárias e o verme adulto. [MEDEIROS *et al*, 2004]

- Oncocercose: é uma parasitose causada pelo verme *Onchocerca volvulus* transmitido para o homem na forma de larva através da picada de insetos do gênero *Simulium*, popularmente conhecidos como borrachudos. No Brasil, a doença é considerada a segunda causa infecciosa de cegueira. O tratamento é realizado desde 1980 com ivermectina, medicamento que inibe a produção de novas larvas ou microfilárias, com os inconvenientes de a) tempo de tratamento - como a média de vida dos vermes adultos é de 9 a 12 anos, este é o período indicado para a duração do ciclo de tratamento, em duas doses anuais; b) ineficácia contra parasitas adultos; c) não pode ser usada por gestantes, crianças abaixo dos cinco anos de idade, pacientes com peso inferior a 15 kg ou com

complicações neurológicas. Atualmente, pesquisas investigam a ação da amorcizina (remédio eficaz no combate dos vermes adultos) e alguma forma de bloquear a atividade de uma bactéria simbiote da *O. volvulus*, o que impediria a atividade do parasita infectante [FIGUEIRÓ *et al*, 2010].

- Esquistossomose (casos estimados no Brasil: 1,5 milhões [HOLTZ, 2008]): doença crônica causada pelos parasitas multicelulares platelmintos do gênero *Schistosoma*. É a mais grave forma de parasitose por organismo multicelular, matando centenas de milhares de pessoas por ano. Existem seis espécies de *Schistosoma* que podem causar a esquistossomose ao homem, mas apenas a *S. mansoni* é encontrada no continente americano. Na fase inicial ou aguda, há disseminação das larvas pelo sangue, e principalmente o início da postura de ovos nas veias que vão para o fígado, ativando o sistema imunológico. Estes pacientes apresentam granulomas periovulares dispersos pelos intestinos, fígado e outros órgãos. O tratamento é feito com antiparasitários (praziquantel ou oxamniquine) para matar o parasita dentro do corpo e dura 1 ou 2 dias. Está em desenvolvimento uma vacina, com base no isolamento da proteína SM14. [KATZ, 2003]
- Dengue (casos estimados no Brasil: 350.000 [HOLTZ, 2008]): o mosquito *Aedes aegypti* é a principal espécie responsável pela transmissão do dengue. É um mosquito doméstico, antropofílico, com atividade hematofágica diurna e utiliza-se preferencialmente de depósitos artificiais de água limpa para colocar os seus ovos. A pessoa infectada tem febre alta (39° a 40°C), dores de cabeça, cansaço, dor muscular e nas articulações, indisposição, enjoos, vômitos, manchas vermelhas na pele, dor abdominal (principalmente em crianças), entre outros sintomas. Apesar de muito pesquisada, ainda não está disponível uma vacina preventiva, uma terapêutica ou quimioprofilaxia efetivas. No momento, o único elo vulnerável na cadeia de transmissão do dengue é o controle do vetor [TAUIL *et al*, 2002].
- Hanseníase (casos estimados no Brasil: 44.000 novos casos em 2006 [HOLTZ, 2008]): o Brasil continua sendo o segundo país em número de casos no mundo. Trata-se de uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, cuja principal via de transmissão é a respiratória. Seus sintomas sistêmicos variam, sendo as lesões e neurites as mais frequentes. Os nervos mais comprometidos são os ulnares e medianos nos membros superiores, fibular

comum e tibial posterior nos membros inferiores e facial, e grande auricular no segmento cefálico. Ao longo das últimas décadas, as taxas de prevalência têm declinado ano a ano, resultado da consolidação do tratamento poliquimioterápico [ARAÚJO *et al*, 2003].

- Toxoplasmose: zoonose altamente disseminada causada pelo *Toxoplasma gondii*, com taxas de prevalências variáveis nas diversas partes do globo. Estudos sorológicos indicam que mais de 80% das infecções primárias por toxoplasmose são assintomáticas, em decorrência da efetividade do sistema imunológico. Como a doença pode ser transmitida ao feto, utiliza-se um esquema composto por pirimetamina somente após a 14ª semana de gravidez. Como drogas alternativas são utilizadas a associação sulfametoxazol/trimetoprima [CANTOS *et al*, 2000].
- Malária: causada pelo parasita *Plasmodium*, a malária é transmitida de pessoa a pessoa através da picada de mosquitos *Anopheles*. Os sintomas são semelhantes aos da gripe com febre, e pode levar a morte, causada por dano cerebral (malária cerebral) ou dano aos órgãos vitais. Os medicamentos a base de cloroquina já não são mais eficazes devido à resistência. Duas novas combinações lançadas ano passado pela DNDi (artesanato + mefloquina e artesunato + amodiaquina) ampliam as opções de tratamento [PONTES, 2010].
- Doença de Chagas: o parasita *Trypanosoma cruzi*, é transmitido principalmente por insetos conhecidos como barbeiros. Os sintomas na fase aguda são: febre, mal-estar, edema facial, linfadenopatia generalizada e hepatoesplenomegalia. Já a fase crônica pode ser assintomática, ou envolver problemas no coração ou o trato gastrintestinal. Os tratamentos atuais podem curar pacientes apenas na fase aguda da doença, utilizando-se medicamentos de difícil administração. Não há medicamentos para a fase crônica [PONTES, 2010].
- Leishmaniose (casos estimados no Brasil – visceral e cutânea: cerca de 30.000 [HOLTZ, 2008]): os protozoários *Leishmania* são transmitidas ao homem por cerca de 30 espécies de vetores *flebotomos*. A forma visceral provoca febre prolongada, baço e fígado aumentados, perda substancial de peso e anemia, sendo fatal se não tratada. Já a forma cutânea apresenta cura espontânea ou lesões crônicas na pele. O número de tratamentos aumentou na última década, mas ainda há vários inconvenientes, tais como, dificuldade de administração,

duração do tratamento, toxicidade, custo e crescente resistência dos parasitas aos medicamentos [PONTES, 2010].

- Doença do sono: transmitida ao homem pela mosca tsé-tsé, a doença do sono é causada por duas subespécies do protozoário *cinetoplastida Trypanosoma brucei*. Os sintomas vão desde dores de cabeça e surtos de febre até graves perturbações no ciclo do sono, paralisia, gradativa deterioração mental e em última instância morte, se não for tratada de forma eficaz. São dois os tratamentos disponíveis. Um deles é extremamente tóxico, matando 5% dos pacientes que fazem uso, e o outro é de difícil administração com necessidade de hospitalização do paciente por 14 dias [PONTES, 2010].

2.1.1 Tuberculose

A tuberculose é uma doença infecciosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* [WANG *et al*, 2009], que foi isolado pelo pesquisador Robert Koch, razão pela qual esse microrganismo é também conhecido como “bacilo de Koch”. Por se desenvolver em regiões com abundância de oxigênio, tem como alvos principais os pulmões. Essa patologia é mais frequentemente encontrada em países subdesenvolvidos, tais como Índia e países do continente Africano [SILVA *et al*, 2009]. Trata-se da segunda causa infecciosa mais comum de morte, ficando atrás apenas da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) [SARAOGI *et al*, 2010].

Segundo a OMS, os principais sintomas da tuberculose são: tosse, podendo ou não ser associada com muco ou sangue, dores no peito, fraqueza, perda de peso, febre e sudorese noturna, podendo levar o infectado a morte. No entanto, a tuberculose é curável com seis meses de um tratamento composto por antibióticos [WHO, 2010].

Depois da descoberta do bacilo causador da doença, a era da quimioterapia anti-tuberculose foi iniciada com a introdução da estreptomina. Em 1970, a estreptomina, o ácido p-aminossalicílico e a isoniazida (INH) eram os principais fármacos utilizados na terapêutica da tuberculose. Mas somente com a inclusão da rifampicina (RIF) e pirazinamida (PIR) é que se conseguiu a redução das taxas de reincidência da doença e do tempo de tratamento [PANCHAGNULA e AGRAWAL, 2004].

A RIF cuja estrutura está representada na Figura 1 é um fármaco semissintético, derivado da rifamicina B. Esta molécula é caracterizada por conter uma cadeia alifática formando uma ponte entre duas posições não adjacentes de um núcleo aromático.

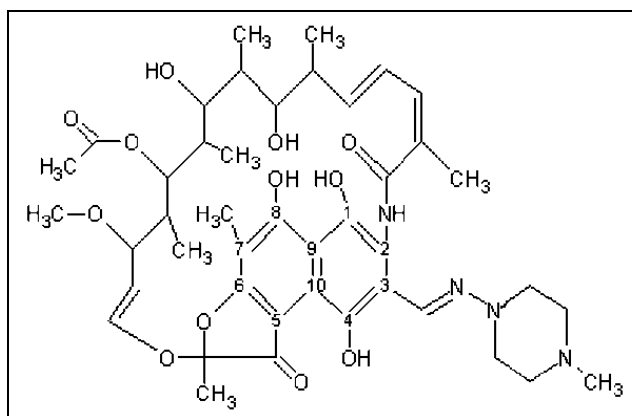


Figura 1: Estrutura molecular da Rifampicina

Sua fórmula química ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$) possui massa molar de 822,94 g/mol; e seu nome oficial é 3-[[[4-metil- 1-piperazinil]imino]metil]rifamicina. Apresenta-se como um pó cristalino, vermelho-alaranjado. Pouco solúvel em água e acetona, moderadamente solúvel em acetato de etila, metanol, tetrahydrofurano (THF) e facilmente solúvel em clorofórmio e dimetilsulfóxido (DMSO). Apresenta absorção máxima em 237, 255, 334 e 475 nm (0,002 mg/mL em tampão fosfato pH 7,4). Suas suspensões de 1% em água apresentam pH entre 4,5 a 6,5. Possui dois valores de pKa, sendo o primeiro de 1,7 referente à hidroxila da posição quatro, e o segundo de 7,9 referente ao nitrogênio três da piperazina. Suas soluções em DMSO são muito estáveis, enquanto que as soluções em H_2O são pouco estáveis. [MERCK, 2000; United States Pharmacopeia, 2007].

A degradação da RIF é pH dependente, ou seja, em meio ácido hidrolisa formando 3-formil-rifamicina, que apresenta atividade *in vitro*, mas não *in vivo*. Já em contato com ar e em meio alcalino oxida a 7-rifampicina quinona que também é inativa [SHISHOO *et al.*, 1999]. Não suporta altas temperaturas e deve ser armazenada ao abrigo da luz [MARTINDALE, 2002].

Este fármaco é extremamente efetivo contra o *M. Tuberculosis*, por possuir uma atividade bactericida rápida, eliminando bactérias resistentes [BLANCHARD, 1996]. Age ligando-se à subunidade β da RNA polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, inibindo a etapa de transcrição [LEVIN e HATFULL, 2006].

Após ingestão da RIF na dose oral ocorrem concentrações plasmáticas máximas em 2 a 4 horas. O antibiótico se distribui por todo o líquido e tecidos do organismo em concentrações significativas, as quais determinam uma coloração amarelo-avermelhada na urina, fezes, saliva, suor e lágrimas. Ela é eliminada pela bile e sofre uma circulação êntero-hepática com meia vida variando entre 1 a 5 horas. A substância é metabolizada por desacetilação, estando presente nessa forma desacetilada na bile. Aproximadamente 30% da dose são eliminado na urina de forma inalterada [SOHRANI *et al.*, 1995].

A INH é a hidrazida do ácido isonicotínico, descoberta em 1945 por Chorine [MANDEL e PETRI, 1996]. Sua fórmula química ($C_6H_7N_3O$) possui massa molar de 137,139 g/mol e sua nomenclatura oficial é 4-hidrazida ácida piridincarboxílica. A estrutura da INH está apresentada na Figura 2.

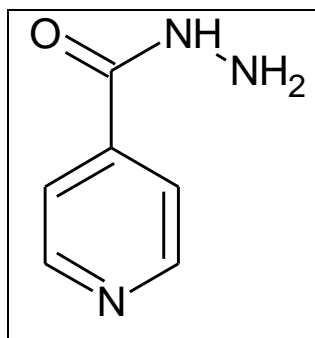


Figura 2: Estrutura molecular da Isoniazida

Apresenta-se como um pó cristalino branco, solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter e benzeno. Suas soluções em água a 1% possuem pH de 5,5 a 6,5. Apresenta valores de pKa de 2,0 e 3,5. É pouco estável em água e muito estável em DMSO. Possui absorção máxima em 266 e 265 nm (0,01 mg/mL em HCl 0,01 mol L⁻¹) [MERCK, 2000; United States Pharmacopeia, 2006]. É incompatível com açúcares e deve ser armazenado ao abrigo da luz [MARTINDALE, 2002].

O mecanismo de ação da INH (ácido 4-piridinocarboxílico hidrazina) é complexo e pouco entendido. Evidências sugerem que esse fármaco inibe a biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular do microrganismo, tornando a bactéria suscetível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio [ROSSETTI *et al*, 2002].

A INH é rapidamente absorvida por via oral e parenteral. As concentrações plasmáticas máximas de 3 a 5 µg/mL são atingidas uma a duas horas após a aplicação. O fármaco se difunde por vários líquidos e tecidos do organismo. São encontrados teores significativos nos líquidos pleural, ascítico e no líquido cefalorraquidiano. O metabolismo da INH apresenta variações genéticas que determinam nas populações humanas o aparecimento de indivíduos que acetilam rapidamente e lentamente. Nestes últimos, a INH tem sua meia vida aumentada de 1,5 horas para 3 horas. Nos adultos com função renal normal, mais de 75% da dose oral de isoniazida é excretada na urina, em 24 horas, cerca de metade desta porcentagem sob a forma inalterada. Pequenas quantidades de fármaco são ainda excretadas na saliva e nas fezes [SOHRANI *et al*, 1995].

No Brasil, o Ministério da Saúde propôs um novo sistema de tratamento da doença, a partir de 2009 [MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009]. Basicamente, as mudanças ocorridas promovem unicamente a utilização do esquema de tratamento básico, que

consiste na utilização nos dois primeiros meses do medicamento “Coxcip 4” (comprimido contendo em dose fixa combinada RIF, INH, pirazinamida e etambutol); e nos quatro últimos meses por um medicamento composto apenas por RIF e INH (cápsula contendo 300 mg e 200 mg ou 150 mg e 100 mg de RIF e INH, respectivamente). Este último, já utilizado anteriormente na rede pública de saúde.

Situações como a monoterapia, prescrição imprópria dessa associação ou falta de colaboração do paciente para o uso deste sistema terapêutico podem levar ao surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos [DUCATTI *et al*, 2006].

Além disso, medicamentos com especificações similares dos fabricantes em termos de concentração dos princípios ativos, podem apresentar perfis de bioequivalência e biodisponibilidade diferentes de marca para marca, ou mesmo entre lotes, devido a diversos fatores inerentes à fabricação do mesmo (p. ex. qualidade das matérias-primas utilizadas, adoção de boas práticas de fabricação, tamanho das partículas dos componentes, métodos de produção adotados, entre outros). Por esta razão, é evidente a necessidade da disponibilização de metodologias analíticas rápidas, confiáveis e de baixo custo, de maneira a facilitar as operações de controle de qualidade destes medicamentos bem como assegurar a qualidade dos mesmos que em consequência auxilia na eficácia do tratamento.

2.2 Métodos analíticos para a determinação de drogas tuberculostáticas

A Organização Mundial de Saúde (WHO) recomenda o uso combinado de fármacos para minimizar a ocorrência de casos multirresistentes. Por esta razão, doses combinadas de duas ou mais associações de drogas tuberculostáticas em uma única formulação farmacêutica são utilizadas no tratamento da doença em todo o mundo. Esta prática diminui consideravelmente o tempo de tratamento, o risco de resistência, o custo, erros na administração e distribuição dos medicamentos [WHO, 2001]. A combinação de fármacos propicia muitas vantagens terapêuticas, mas exige estudos quanto à estabilidade e controle de qualidade dessas associações farmacêuticas. Muitos procedimentos têm sido descritos para a análise dessas drogas em misturas farmacêuticas e/ou fluidos biológicos.

Um grande número de trabalhos reportados na literatura envolve a determinação quantitativa destes fármacos através de técnicas cromatográficas. Os métodos mais frequentes envolvem a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) para separação e posterior quantificação de INH, RIF e PIR por densitometria e detecção por UV-Vis [ARGEKAR *et al*, 1996], cromatografia em fase líquida de alta eficiência

(HPLC) acoplada a detector UV-Vis [GAITONDE e PATHAK, 1991; PANCHAGNULA et al, 1999; CALLERI et al, 2002; ESPINOSA-MANSILLA et al, 2002; KHUHAWAR et al, 2002] ou tandem massa [FANG et al, 2010], determinação de daptomicina e RIF por cromatografia em fase líquida de ultra eficiência (UPLC) acoplada a um detector UV e utilizando 4-nitrofenol como padrão interno [GIKAS et al, 2010].

Alguns autores, ao comparar métodos analíticos, apontam as técnicas espectrofotométricas como alternativas viáveis para a substituição da HPLC, pois quando comparadas, apresentam vantagens como diminuição no consumo de solventes, no pré-tratamento da amostra, no tempo de análise, e, principalmente nos custos envolvidos no processo.

2.2.1 Espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria na região UV-VIS é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função da sua robustez, custo relativamente baixo, pequeno tempo de análise e grande número de aplicações desenvolvidas. Os procedimentos podem envolver medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas de espécies que somente absorvem radiação após derivatização química, além do acoplamento deste tipo de espectroscopia a diversas técnicas ou processos, como a cromatografia, eletroforese e análises em fluxo. Além disso, pode ser utilizada como uma importante ferramenta para determinação de parâmetros físico-químicos, tais como, constantes de equilíbrio e velocidade de reações [ROCHA, TEIXEIRA, 2004].

O fundamento desta técnica instrumental baseia-se no fato de que quando a energia eletromagnética luminosa atravessa uma solução, parte desta radiação é absorvida e o restante é transmitido. A radiação absorvida, por sua vez, depende da quantidade de moléculas presentes (concentração) e da estrutura destas moléculas. Dependendo da técnica, equipamentos e principalmente a frequência de energia eletromagnética utilizada como fonte a ser absorvida, têm-se as denominações de regiões de luz ultravioleta, visível, raios X ou infravermelho [SKOOG, 2002].

O espectro eletromagnético abrange um enorme intervalo de comprimentos de onda e frequências (e, portanto energias). A Figura 3 mostra qualitativamente as regiões espectrais mais importantes. As divisões estão baseadas nos métodos requeridos para gerar e detectar as diferentes espécies de radiação.

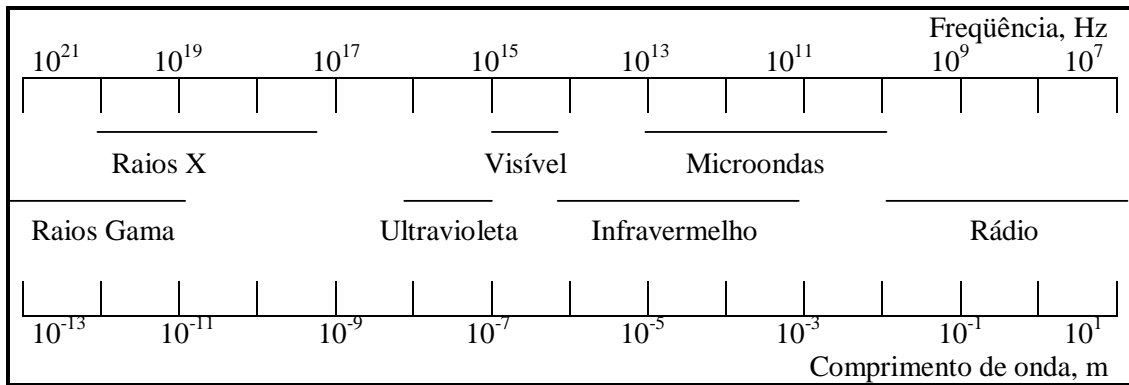


Figura 3: Regiões do espectro eletromagnético.

Quando uma molécula é irradiada com luz ultravioleta ou visível, há energia suficiente para promover transições eletrônicas, durante a qual a molécula absorve um quantum de energia e os elétrons são excitados do orbital que ocupam no estado fundamental a outro orbital de maior energia. Esta região está compreendida entre 160 e 780 nm e as medidas nessa região tem ampla aplicação na determinação quantitativa de espécies inorgânicas e orgânicas [SKOOG, 2002].

A análise espectrofotométrica quantitativa tem como princípio a relação proporcional existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da solução da substância, Lei de Lambert-Beer. Considerando-se uma solução diluída de uma substância capaz de absorver luz em dado comprimento de onda em solvente transparente, verifica-se que o decréscimo da luz ao atravessar a solução é diretamente proporcional à intensidade da radiação incidente, à concentração da substância absorvente e à espessura (distância percorrida pela luz na solução) [SKOOG, 2002].

Um grande número de trabalhos reporta a utilização da espectrofotometria na região do UV-Vis para determinação e estudo de dissolução de fármacos. Recentemente, MOURA (2009) caracterizou os parâmetros físico-químicos da olanzapina acompanhado do desenvolvimento e validação de um método analítico de doseamento e dissolução deste fármaco antipsicótico. Embora a aplicação desta técnica seja muito difundida, poucos trabalhos relatam a aplicação direta de espectrofotometria na região do ultravioleta sem aplicação de estratégias para contornar os problemas relacionados à sobreposição espectral. Além disso, a falta de seletividade da técnica na região UV dificulta a sua aplicação na determinação de fármacos em amostras biológicas, em decorrência do intenso sinal dos componentes da matriz, motivo que justifica o uso de ferramentas matemáticas e/ou reações de derivatização química para resolver estes problemas.

Dentre as ferramentas matemáticas mais utilizadas para viabilizar a determinação quantitativa de fármacos por espectrofotometria UV-Vis é possível citar, a derivada dos

dados espectrais [MARTINS et al, 2007; SABNIS et al, 2008; VETUSCHI et al, 2005; REGO et al, 2010] e métodos de calibração multivariada [NI et al, 2006; GHASEMI e NIAZI, 2005; SAMADI-MAYBODI e NEJAD-DARZI, 2010].

Outras inovações relacionadas à análise por espectrofotometria UV-Vis consistem na adoção de estratégias para aumento de sensibilidade, visando ampliação da faixa de aplicação da técnica e permitindo, em alguns casos, que medidas de concentrações da ordem de $n \text{ mol L}^{-1}$ sejam efetuadas [ROCHA e TEIXEIRA, 2004].

2.2.1.1 Espectrofotometria na região do Visível e Derivatização Química

Um grande número de espécies (inorgânicas e orgânicas) apresenta sinal bastante intenso na região ultravioleta, o que faz com que a sua determinação seja viável, mesmo em pequenas concentrações. Adicionalmente, a validação deste método costuma ser mais simples e efetiva, quando comparados, por exemplo, a métodos fundamentados em cromatografia em fase líquida de alta eficiência. [MADAN *et al*, 2005] Infelizmente, a seletividade da região UV é negativamente influenciada pela frequente interferência espectral, fato que obriga a utilização de processos de separação prévia [FERNÁNDEZ, *et. al*, 2003] que normalmente acrescentam etapas que afetam a repetibilidade e reprodutibilidade da determinação.

Uma das possibilidades mais simples para minimizar a interferência dos componentes da matriz é a utilização de reações de derivatização química diretas (empregando-se compostos que complexam diretamente com o analito) [BENAMOR, AGUERSSIF, 2007] ou indiretas (utilizando compostos que pela ação do analito sofrem alguma modificação química – p.ex. oxidação, redução – gerando uma espécie absorvedora [AL-MOMANI, 2006] ou uma espécie de fácil complexação) [LAVORANTE *et al*, 2006]. Em ambas, o objetivo principal é obter compostos coloridos que possibilitem a determinação dos analitos na região do visível (380 a 800 nm), excluindo a possível interferência dos demais compostos absorvedores presentes na matriz e que absorvem na região ultravioleta (190 a 380 nm).

O aumento de sensibilidade também é outro objetivo dos processos de derivatização química. Como a absorvidade molar (ϵ), empiricamente assume valores máximos da ordem de $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e sua magnitude para um determinado comprimento de onda, depende da seção transversal de captura (S) da espécie e da probabilidade de ocorrência da transição eletrônica (P), relacionada à absorção de radiação (Equação 01), é possível planejar modificações estruturais nos reagentes, de modo a maximizar S e/ou P, visando o aumento da absorvidade molar da espécie. Sendo assim, espécies que absorvem fracamente podem ser convertidas em compostos

com maior absorvidade molar, visando à determinação de menores quantidades do analito.

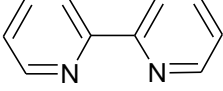
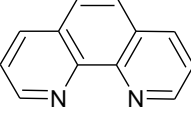
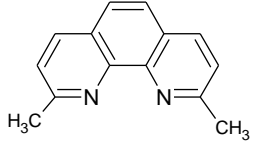
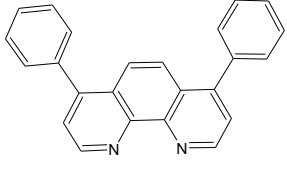
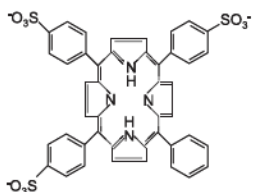
$$\epsilon = 8,7 \times 10^{19} \text{ P x S} \quad \text{Eq. 01}$$

A sensibilidade e a seletividade dos reagentes denominados cromogênicos usados para determinação espectrofotométrica podem ser modificadas pela incorporação de diferentes substituintes na molécula. Por exemplo, dentre os vários reagentes disponíveis para determinações espectrofotométricas de íons metálicos, os compostos heterocíclicos contendo a estrutura α,α -diamina (-N=C-C=N-), conhecida como grupo funcional ferroína, é uma das classes de reagentes cromogênicos mais estudadas. Os compostos mais conhecidos desta classe são a 1,10-fenantrolina e a 2,2'-bipiridina, que formam quelatos estáveis e intensamente coloridos com ferro (II) e cobre (I). Várias modificações nas estruturas desses reagentes foram realizadas com o objetivo de melhorar a sensibilidade nas determinações espectrofotométricas e alguns exemplos são mostrados no Quadro 1.

Da mesma forma, podem ser citados os reagentes da família da cuproína, conhecidos pela alta seletividade para a determinação de cobre (I). Exemplos de reagentes dessa família, que geram complexos de cobre com diferentes absorvidades molares são 2,2'-biquinolina ($\epsilon = 6220 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 546 nm), neocuproína ($\epsilon = 7950 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 445 nm) e batocuproína ($\epsilon = 13900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 479 nm) [STEPHEN e ISLAM, 1993].

Alguns trabalhos utilizando reações de derivatização química foram desenvolvidos para a determinação de INH através de derivatização química utilizando os reagentes Cu (II) e Neocuproína [SAFAVI et al, 2004], ferricianeto de potássio [ZHANG et al, 2008], 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol na presença de tetraborato de sódio em metanol absoluto [TAN, 2006], 1,10-fenantrolina e Fe(III) [EL-BRASHY et al, 1991].

Quadro 1. Comprimento de onda de máxima absorção e coeficiente de absorvidade molar dos principais quelatos formados com íons Cu (I) e Fe (II). [STEPHEN e ISLAM, 1993]

Ligante (L)	CuL ₂ ⁺		FeL ₃ ²⁺	
	λ_{MAX} / nm	ϵ / L mol ⁻¹ cm ⁻¹	λ_{MAX} / nm	ϵ / L mol ⁻¹ cm ⁻¹
 2,2' – bipyridina	435	4500	522	8650
 1,10 – fenantrolina	435	7000	510	11100
 Neocuproina	454	7950	-	-
 Batofenantrolina	457	12140	533	22350
 Sulfonato de $\alpha,\beta,\gamma, \gamma$ -tetrafenilporfirina	434	480000	395	140000

2.2.2. Voltametria

Um conjunto de técnicas instrumentais de análises, conhecido pela denominação abrangente de técnicas eletroanalíticas, já há alguns anos, têm recebido grande atenção de pesquisadores de diversas áreas do conhecimento, tais como, medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química [BRAININA, 1987], com o objetivo

de se obter informações que caracterizam eletroquimicamente as propriedades intrínsecas das substâncias. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, extensão dos processos de adsorção em superfícies, mecanismo de transferência de elétrons, obtenção da velocidade e constantes de equilíbrio de reações químicas, exemplificam algumas das numerosas aplicações atuais das chamadas técnicas eletroanalíticas [SKOOG, 2002].

Particularmente, os métodos voltamétricos se fundamentam na medida de corrente que se desenvolve em uma célula eletroquímica (que contém a solução do analito), em função da aplicação de um potencial, sempre em condições de polarização do eletrodo de trabalho. [SKOOG, 2002] Uma das grandes vantagens dos métodos voltamétricos consiste na possibilidade da medida ser realizada diretamente na amostra, sem necessidade de etapas de pré-purificações ou de separações prévias, além de tornar possível a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas [RUPP e ZUMAN, 1992].

Estas vantagens, aliadas ao curto tempo na realização das análises, ao baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados, se comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas, e à baixa sensibilidade ou inatividade que as técnicas apresentam em relação à presença de interferentes, fizeram com que houvesse um aumento do interesse na sua aplicação. Este crescente interesse gerou o desenvolvimento de técnicas cada vez mais sensíveis às espécies em estudo (como é o caso dos métodos de redissolução), algumas inclusive com limites de detecção tão baixos que já podem ser comparados aos das técnicas tradicionais utilizadas na análise de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais, biológicas e em alimentos.

2.2.2.1 *Voltametria de onda quadrada*

A técnica voltametria de onda quadrada foi desenvolvida em 1952 por Baker e no decorrer dos anos apresentou algumas modificações instrumentais aliadas ao desenvolvimento de novas teorias que foram responsáveis pelo estabelecimento da técnica para a análise de traços e na obtenção de dados relacionados à cinética e ao mecanismo de reações químicas sob as mais variadas condições [SOUZA *et al*, 2003]. Dentre as vantagens desta técnica, pode-se citar a sua rapidez de aplicação frente a outras técnicas de pulso (p. ex. pulso diferencial), excelente sensibilidade e diminuição das correntes residuais, menor consumo da espécie eletroativa e diminuição dos problemas associados ao bloqueio da superfície do eletrodo por produtos de reações [RAMALEY *et al*, 1969].

Nesta técnica (Figura 4), ocorre a aplicação de potenciais de altura ΔE_s (incremento da varredura de potenciais), que variam de acordo com uma escada de potencial com largura ΔE_p (amplitude do pulso de potencial) e duração τ (período). As correntes são medidas no final dos pulsos diretos (1) e reversos (2) e o sinal obtido é a intensidade da corrente resultante de forma diferencial [SOUZA *et al*, 2003].

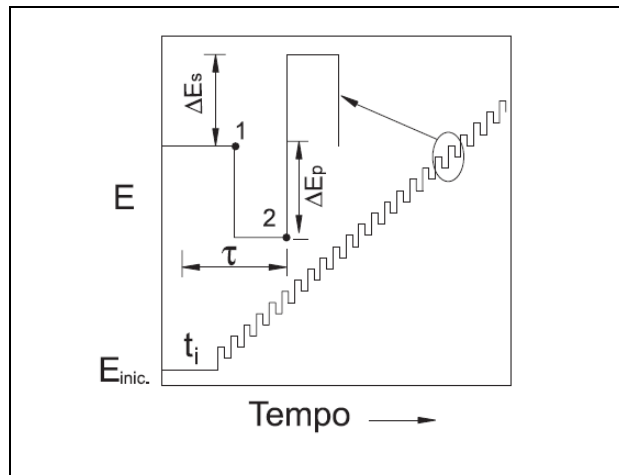


Figura 4: Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada. [SOUZA *et al*, 2003]

Na Figura 5, são apresentados voltamogramas de onda quadrada típicos de sistemas reversíveis e irreversíveis, juntamente com as suas respectivas correntes direta, reversa e resultante. Como é possível observar em ambos os voltamogramas, a corrente resultante apresenta maior sensibilidade, uma vez que este tipo de voltametria minimiza a contribuição da corrente capacitiva [SOUZA *et al*, 2003].

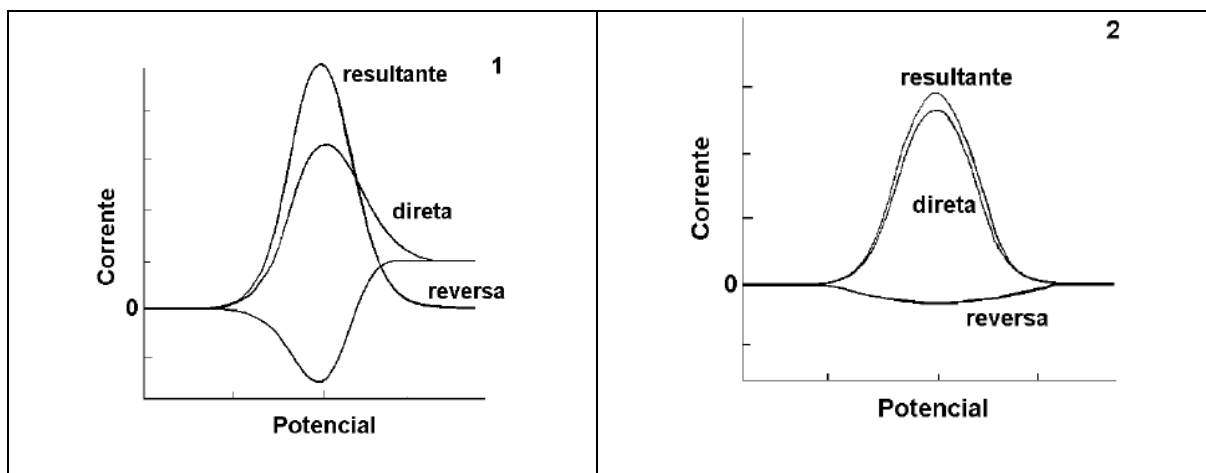


Figura 5: Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde – 1. Representa um processo redox de um sistema reversível e 2. de um sistema irreversível [SOUZA *et al*, 2003]

A separação das correntes é uma ferramenta muito utilizada para diagnosticar o grau de reversibilidade de um sistema eletroquímico. Para sistemas reversíveis, quanto maior for a contribuição da corrente reversa, maior será a corrente resultante, pois ela é a diferença entre as correntes direta e reversa. Já para sistemas irreversíveis, a corrente reversa é mínima e, conseqüentemente, a sua contribuição para a intensidade da corrente resultante é mínima.

Muitos trabalhos reportam o uso de técnicas voltamétricas para a determinação de fármacos, pois os métodos são de baixo custo, rápidos, sensíveis e com boa seletividade. Em função destas características, é comum encontrar trabalhos envolvendo a análise de formulações farmacêuticas [GARCIA *et al*, 1993; CARVALHO *et al*, 2007; TOLEDO *et al*, 2005] e amostras biológicas [EL-HEFNAWEY *et al*, 2004, GOYAL, *et al*, 2007].

A aplicação dos métodos voltamétricos na análise de INH e/ou RIF também podem ser encontrados. Para estes casos, é possível utilizar eletrodos preparados à base de pasta de carbono [HAMMAM *et al*, 2004], eletrodo de carbono vítreo modificado com ácido poliamido sulfônico [YANG *et al*, 2008], nanotubos de carbono [SHAHROKHIAN e AMIRI, 2007] ou ainda utilizar um eletrodo *screen-printed* (SPCE) modificado com poli-L-histidina [BERGAMINI *et al*, 2010]. Todos estes métodos apresentaram desempenho reprodutível e alta sensibilidade.

2.2.3 Planejamento Fatorial

O planejamento fatorial é uma metodologia que apresenta características vantajosas para estudar a influencia de variáveis em processos, pois requer um pequeno número de ensaios, funciona bem na presença de erros aleatórios e principalmente avalia as interações entre as variáveis, permitindo verificar os efeitos sinérgicos ou antagônicos relacionados às respostas obtidas.

Para executar um planejamento fatorial, escolhem-se as variáveis a serem estudadas e efetuam-se experimentos em diferentes valores destes fatores, sendo realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados (BRUNS *et al*, 2003). De modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por b^a , onde a é o número de fatores e b são os níveis estudados. É evidente que com um número reduzido de níveis não é possível explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis. Entretanto, é possível observar tendências importantes para a realização de investigações posteriores (EIRAS *et al*, 1999).

2.2.3 Determinação simultânea empregando-se métodos de calibração multivariada

A determinação de dois ou mais componentes de fármacos associados é sempre um desafio. Este problema é ainda mais complicado quando tais componentes estão presentes em uma mesma formulação farmacêutica, podendo ser agravado pela presença de excipientes que apresentem resposta analítica similar aos analitos.

A calibração multivariada, fundamentada em técnicas de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), corresponde a uma ferramenta poderosa para a análise química [BRO *et al*, 2003], com grande potencial de aplicação em problemas de análise ambiental [GARRIDO *et al*, 2003, DURÁN MERÁS *et al*, 2005; LI *et al*, 2008], análise de alimentos [ÖZGÜR, *et al*, 2001; MILCZAREKA *et al*, 2009; WU *et al*, 2011; NI *et al*, 2011, MAZUREK, SZOSTAK, 2011], industrial [GUARRIGUES *et al*, 1995; PEINADO, *et al*, 2011; LEE *et al*, 2011], incluindo a área farmacêutica [SENA *et al*, 2000; MEDINA *et al*, 1999; BORDBAR *et al*, 2009; ZEAITER *et al*, 2011].

Basicamente, ela é composta de duas fases: a calibração e a previsão (Figura 6). Na fase de calibração, "n" espectros de misturas dos analitos são obtidos em "p" comprimentos de onda diferentes, formando uma matriz X, com "n" linhas e "p" colunas, para um conjunto de amostras com composição conhecida. Também uma matriz Y com os valores de concentração deve ser formada contendo "n" linhas, correspondendo às diferentes amostras, e "q" colunas, indicando o teor dos diferentes analitos presentes nas amostras [NAGATA *et al*, 2001].

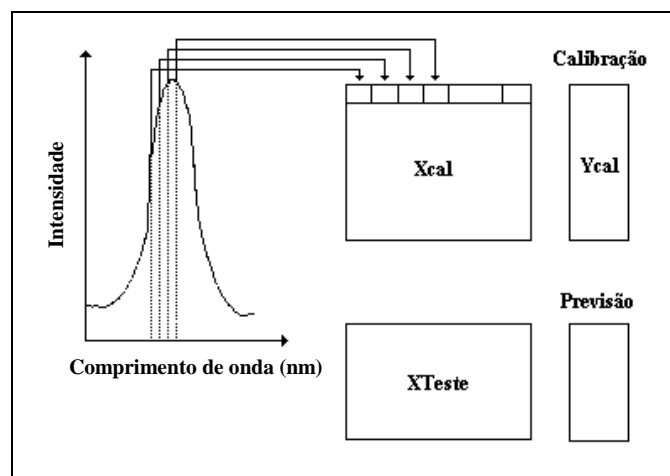


Figura 6: Organização dos dados para a calibração multivariada. [NAGATA *et al*, 2001]

Inicialmente, o método consiste na decomposição de cada uma das matrizes de dados (X e Y), em termos da soma de várias matrizes M (tantas quantas forem os números originais de dimensões da matriz de dados). Cada uma dessas matrizes M é o produto de vetores chamados "scores" e "loadings". As amostras ficam então

representadas pelos “scores” (novas coordenadas das amostras no novo sistema de eixos) enquanto as variáveis ficam representadas pelos “loadings” (peso que cada variável antiga contribui para formar as novas coordenadas do sistema de eixos). Posteriormente, realiza-se uma relação entre os “scores” das duas matrizes (X e Y), utilizando um modelo linear para a obtenção do vetor de regressão, que será utilizado na etapa de previsão. Nesta etapa o modelo construído utilizará um conjunto teste para estimar as concentrações Y_{teste} , dos analitos. O melhor modelo é aquele em que se consegue obter os menores erros de previsão e a melhor relação linear entre os “scores” de X e Y. No PLSR isto é alcançado por meio de uma ligeira mudança nos valores dos “scores”, de forma a produzir a melhor relação possível [SENNA *et al*, 2000].

A utilização de métodos de calibração multivariada na quantificação de drogas tuberculostáticas tem sido realizada principalmente associada a técnicas espectrofotométricas. Dois métodos para a determinação espectrofotométrica de RIF, pirazinamida e INH foram desenvolvidos por ESPINOSA-MANSILLA e colaboradores (2001) utilizando a região do UV acoplada PLSR-1 e uma modificação da análise linear híbrida (método de HLA/XS). Para ambos os métodos, o número de variáveis latentes (VLs) selecionados foram 6 e 8 para RIF e INH, respectivamente. No entanto, o número de VLs selecionados para a pirazinamida foi de 7 para PLSR-1 e 3 para HLA/XS. Os coeficientes de correlação encontrados foram semelhantes para ambas as modelagens, sendo superiores a 0,9951. A melhor precisão foi obtida usando o modelo PLSR-1 com valores de RSD de 1,44, 0,76 e 0,90 % que foram obtidos para a repetibilidade de uma amostra contendo 12,6, 16,0 e 8,40 mg mL⁻¹ de RIF, INH e pirazinamida, respectivamente.

No trabalho de SILVA (2008), a técnica espectroscópica UV-Vis em solução permitiu o desenvolvimento de modelos que viabilizaram a determinação de RIF e INH em amostras sintéticas, sendo o melhor modelo elaborado com 4 VLs e dados centrados na média. Nestas condições, os erros médios de validação observados foram de 2,8% para INH e 5,7% para RIF. Modelos de calibração fundamentados em espectroscopia em fase sólida, necessitaram de 8 VLs e pré-processamento por correção do espalhamento multiplicativo (MSC). Nestas condições, erros inferiores a 10% foram observados, para ambas as espécies em estudo, mas a análise de amostras comerciais foi seriamente comprometida pela presença de excipientes que modificam o perfil espectral das amostras e reduzem a capacidade de previsão dos modelos. Neste mesmo trabalho, utilizou-se técnica de espectroscopia no infravermelho com refletância difusa (DRIFT), apresentando uma excelente capacidade de previsão de amostras sintéticas e comerciais, com erros inferiores a 5%. Utilizando-se a região espectral completa (DRIFT) observam-se menores erros de validação para modelos construídos com 4 VLs e dados

centrados na média, o que permitiu erros médios de validação de 2,5 e 3,4% para INH e RIF, respectivamente. 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 às exigências estabelecidas pelos órgãos fiscalizadores.

No trabalho realizado por GOICOECHEA e colaboradores (1999) RIF, INH e pirazinamida, foram simultaneamente determinados utilizando espectroscopia de absorção eletrônica associada ao PLSR-1, em amostras sintéticas e comprimidos. As regiões espectrais selecionadas foram: RIF 273-500 nm, INH 220-337 nm e pirazinamida 220-347 nm, necessitando-se de 7 VLs para minimização dos erros de validação cruzada. Os erros relativos de previsão obtidos foram: 2,06% para RIF, 5,40% para INH e 1,17% para pirazinamida, com excelentes recuperações em todos os casos.

DU e colaboradores (2007) reportam um método para a determinação de RIF, INH e pirazinamida, em comprimidos, utilizando a técnica NIR acoplada a métodos de calibração multivariada (PLSR, redes neurais com *backpropagation* - BPNN ou função de base radial - RBFNN). Uma análise por componentes principais (PCA) foi realizada para avaliar a faixa espectral e o pré-tratamento de dados, a fim de reduzir as dimensões dos dados de entrada e conseqüentemente reduzir o número de neurônios da camada de entrada. Os melhores valores de RMSEP foram obtidos via RBFNN para a determinação simultânea do conteúdo de RIF, INH e pirazinamida.

A utilização de métodos de calibração multivariada associados a métodos eletroanalíticos, apesar de ser um assunto ainda muito pouco explorado na literatura, é bastante promissora para determinação simultânea de espécies cujos sinais analíticos são sobrepostos [CARVALHO *et al*, 2000; SAURINA *et al*, 2000; NI *et al*, 2002]. Esta intensa sobreposição de picos voltamétricos, geralmente ocorre porque grande parte dos fármacos sofre oxidação e/ou redução em potenciais muito próximos, o que inviabiliza a determinação simultânea de dois ou mais componentes eletroativos presentes em amostras farmacêuticas comerciais sem a utilização de procedimentos de modificação de eletrodos de trabalho ou ferramentas como a calibração multivariada.

LOMILLO e colaboradores (2001) utilizaram a polarografia de pulso diferencial para a determinação de RIF, INH e pirazinamida em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos, utilizando PLSR para a definição dos sinais polarográficos sobrepostos. Um algoritmo genético (GA) foi usado para selecionar os potenciais do polarograma. Selecionou-se 6 VLs para a RIF, 5 para a INH e 4 para a pirazinamida, sendo que o erro relativo de calibração obtido foi de 1,53% para RIF, 1,30% para INH e 1,77% para pirazinamida.

2.3 Validação de Métodos Analíticos

As normas estabelecidas pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) 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) [SILVA, 2008]. Os estudos de validação constituem uma exigência da ANVISA, principalmente para controlar variações que possam vir a ocorrer em uma nova metodologia analítica proposta. A metodologia proposta só é considerada válida se respostas compatíveis com os métodos descritos na legislação forem obtidos.

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 desempenho, tais como: dissolução, liberação do princípio ativo) e categoria IV (testes de identificação). No caso dos parâmetros a serem analisados para a categoria I, a ANVISA recomenda:

- **Especificidade e Seletividade:** Capacidade de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análises quantitativas este parâmetro pode ser avaliado comparando-se os resultados obtidos de amostras contaminadas ou não com outros componentes. Outra maneira é comparar os resultados do teste com os de um segundo método validado e bem caracterizado (ANVISA, 2003).
- **Linearidade:** Capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomendam-se no mínimo cinco concentrações diferentes e um coeficiente de correlação (r) igual ou superior 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. 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.

Esses parâmetros devem ser expressos em termos de coeficiente de variação (CV), que consistem na razão do desvio padrão (DP) pela concentração média determinada (CMD) expressa em porcentagem.

- Exatidão: Proximidade dos resultados em comparação com um valor verdadeiro, aplicando a metodologia proposta na legislação.
- Robustez: avaliação dos resultados com base em pequenas e deliberadas variações de temperatura, pH, diferentes fabricantes de solventes.

3 OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho propõe o desenvolvimento de métodos simples e de baixo custo para o controle de qualidade de medicamentos que apresentam a associação RIF e INH.

3.2 Objetivos Específicos

1. Otimizar as reações de complexação dos analitos de interesse (tipo de complexante, pH, concentração);
2. Desenvolver modelos de calibração convencional (princípio da aditividade espectrofotométrica, derivada dos dados espectrais) para determinação de RIF e INH via reações de complexação;
3. Desenvolver modelos de calibração multivariada para determinação simultânea de RIF e INH via reações de complexação;

4. Estudar o comportamento voltamétrico dos fármacos (pH, tipo de eletrólito, faixa de potencial e concentração) pela técnica de voltametria cíclica, utilizando-se o eletrodo de pasta de carbono;
5. Desenvolver modelo de calibração através da técnica de voltametria de onda quadrada;
6. Escolher o sistema de melhor desempenho e validá-lo de acordo com as especificações da ANVISA;
7. Aplicar o método de calibração de melhor desempenho na determinação das espécies de interesse em amostras farmacêuticas e comparar estes resultados com a técnica cromatográfica padrão;
8. Verificar a potencialidade do melhor método de calibração na aplicação em amostras biológicas;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes, equipamentos e programas computacionais

Foram utilizados reagentes de grau PA da marca Vetec e padrões gentilmente cedidos pelo laboratório farmanguinhos de RIF (teor 99,7%) e INH (teor 100,8 %) de grau farmacêutico em todos os experimentos.

Para cada forma de apresentação, duas amostras de medicamentos em associação diferenciados por fabricante e/ou quantidade de RIF e INH foram gentilmente fornecidos pela Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (Quadro 2).

Quadro 2. Medicamentos contendo isoniazida e rifampicina.

SIMBOLOGIA	FÁRMACO	APRESENTAÇÃO	PROCEDÊNCIA
MED A	300 mg RIF/ 200 mg INH	Cápsulas	NUPLAM
MED B	150 mg RIF/ 100 mg INH	Cápsulas	LQFEx
MED C	300 mg RIF/ 200 mg INH	Comprimidos	Medopharm
MED D	150 mg RIF/ 100 mg INH	Comprimidos	Medopharm

Os procedimentos de pesagem foram efetuados em balança analítica digital Bioprecisa FA 2104N, com incerteza de $\pm 0,0001$ g.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 2401 PC, em cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho ótico.

A análise cromatográfica foi realizada em Cromatógrafo em fase Líquida de Alta Eficiência Varian (modelo 900-LC), equipado com uma coluna C18 (4,6 mm x 25 cm, 5

µm) com injeção automática e sistema de detecção DAD (detector de arranjos de diodos), os dados foram adquiridos utilizando-se o software Galaxie.

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato PalmSens (PSTrace 1.2), utilizando-se uma cela eletroquímica de 10 mL contendo um eletrodo de pasta de carbono (eletrodo de trabalho), um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um contra eletrodo de platina.

Os dados do planejamento fatorial (análise de efeitos e superfícies de resposta) foram realizados no programa Statistica 6.1. Para o desenvolvimento dos modelos convencionais de calibração, os dados foram organizados no Origin Pro 6.1. Já os modelos de calibração multivariada foram construídos no programa PLS-toolbox 3.0, que opera em ambiente Matlab v.7.0.1.

4.2 Preparo de soluções

Solução de isoniazida $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: cerca de 0,0686 g de INH ($137,139 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvida e posteriormente diluída com água destilada em balão volumétrico de 25,0 mL.

Solução de rifampicina $2,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: cerca de 0,1131 g de RIF ($822,94 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvida em metanol (20% do volume total da solução) e posteriormente diluída com água destilada em balão volumétrico de 50,0 mL.

Solução de Fe (III) $1,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: cerca de 0,0243 g de cloreto férrico ($162,30 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvido e diluído com água destilada em balão volumétrico de 100,0 mL.

Solução de 1,10-fenantrolina (o-Fen) $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: cerca de 0,1982 g de o-Fen ($198,22 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvida em etanol (5% do volume total da solução) e posteriormente diluída com água destilada em balão volumétrico de 100,0 mL.

Solução de Cu (II) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: cerca de 0,1208 g de nitrato de cobre ($241,60 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvido e diluído com água destilada em balão volumétrico de 50,0 mL.

Solução de neocuproína (NC) $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: cerca de 0,1086 g de Neocuproína ($217,27 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvido em metanol (20% do volume total da solução) e posteriormente diluída com água destilada em balão volumétrico de 50,0 mL.

Solução pH = 3,00 (Clack-Lubs): cerca de 7,4550 g de KCl ($74,55 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvido em aproximadamente 490 mL de água destilada. Gotejou-se ácido clorídrico $0,2 \text{ mol L}^{-1}$

até que fosse atingido o pH 3,00. Transferiu-se esta solução para um balão volumétrico de 500,0 mL, e o volume foi completado com água destilada [adaptação: MORITA e ASSUMPÇÃO, 1972].

Solução tampão Acetato (pH = 5,00): cerca de 4,115 g de acetato de sódio ($82,03 \text{ g mol}^{-1}$) e 1,630 mL de ácido acético foram diluídos em balão volumétrico de 500,0 mL com água destilada.

Solução tampão Britton-Robinson (pH 2-10): cerca de 3,740 mL de ácido o-fosfórico, 2,473 g de ácido bórico e 2,290 mL de ácido acético foram dissolvidos em um balão volumétrico de 1000,0 mL com água destilada. A partir desta solução, alíquotas foram tratadas com solução de NaOH $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ até atingir o pH desejado.

Solução tampão Fosfato (pH = 6,80): Cerca de 1,800 g de hidrogenofosfato de sódio ($142,96 \text{ g mol}^{-1}$) foi dissolvido em cerca de 1990,0 mL de água ultra-pura, posteriormente adicionou-se ácido o-fosfórico até que se atingisse o pH = 6,80 e dilui-se em um balão volumétrico de 2,0 L. Esta solução foi filtrada com membrana de acetato de celulose (Millipore) com tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e sonicada por 10 minutos em banho de ultra-som (Ultra Cleaner 1400).

4.3 Desenvolvimento do método empregando Cu (II) e NC para derivatização química.

4.3.1 Preparo da amostra

Em todos os ensaios, quantidades apropriadas de solução de RIF e INH foram adicionadas em uma pequena quantidade de solução tampão acetato (pH = 5,00) contida em balão volumétrico de 10,0 mL. Posteriormente, acrescentou-se 1000 μL de NC ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$), 1000 μL da solução de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ($1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e completou-se o volume com a própria solução tampão utilizada anteriormente.

4.3.2 Planejamento fatorial para otimização da reação de complexação Cu (I) - NC

Para otimizar a reação colorimétrica Cu (I) - NC que permite a determinação indireta de isoniazida, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 avaliando-se as seguintes variáveis: pH 4,0 (nível -1) e 6,0 (nível +1); concentração de Cu (II) $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (nível -1) e $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (nível +1); e concentração de NC $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (nível -1) e $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (nível +1). A resposta monitorada foi a banda de absorção em 455 nm. Foram realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis

selecionados com triplicata do ponto central. Foram calculados os efeitos principais e de interação, observando-se a presença ou a ausência de efeitos significativos.

Posteriormente, um segundo planejamento composto central foi realizado mantendo-se fixa a concentração de INH ($4,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e NC ($2,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), no qual se estudaram as variáveis significativas para a reação de complexação e os níveis apresentados na Tabela 01.

Tabela 01: Variáveis e níveis estudados na reação colorimétrica para a determinação indireta de INH

Fatores	-√2	-1	0	+1	+√2
Níveis					
pH	3,60	4,00	5,00	6,00	6,40
C _{Cu(II)} / mol L ⁻¹	$3,96 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-5}$	$7,50 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^{-4}$	$1,10 \times 10^{-4}$

Foram realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados para cada uma das reações, com quintuplicata do ponto central (destinado ao cálculo da estimativa do desvio), totalizando treze ensaios como é mostrado na Tabela 02.

Tabela 02: Planejamento experimental 2² composto central para a reação de complexação Cu (I) - NC que permite a determinação de INH.

Fatores	pH	Concentração de Cu (II)
Ensaio		
01	-1	-1
02	+1	-1
03	-1	+1
04	+1	+1
05	-√2	0
06	√2	0
07	0	-√2
08	0	√2
09	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

4.3.3 Métodos de calibração convencional (Cu (II) e NC para derivatização química)

Uma vez que a proposta prevê a determinação da associação de fármacos (RIF e INH), e os agentes colorimétricos (Cu (II) e NC) para determinação indireta da INH também reagem com a RIF, foi preparada uma curva analítica para o composto formado variando-se a concentração de RIF de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $7,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Uma curva analítica para a determinação indireta da INH também foi construída na faixa de concentração de $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $5,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Em ambos os casos, manteve-se a concentração de Cu (II) constante e em excesso, com pH controlado (pH = 5,00) através do uso de solução tampão acetato.

Todas as soluções preparadas foram analisadas por espectrofotometria na região do visível. Esses mesmos espectros foram utilizados para a metodologia derivativa através do ponto de anulação. Nesta última, os espectros foram derivados com 9 pontos de alisamento ($\partial A/\partial \lambda$), e as curvas analíticas da derivada da absorbância vs a concentração de RIF ou INH foram obtidas.

Para complementar os métodos de calibração convencionais, foi desenvolvido um sistema de equações simultâneas, fundamentado no princípio da aditividade espectrofotométrica, também conhecido como método de Vierordt [MEDINA *et al*, 1999] de acordo com a sequência de expressões apresentada a seguir:

$$A_{450 \text{ nm}} = A_{\text{RIF}(450 \text{ nm})} + A_{\text{INH}(450 \text{ nm})} = (\epsilon_{\text{RIF}(450 \text{ nm})} \times b \times C_{\text{RIF}}) + (\epsilon_{\text{INH}(450 \text{ nm})} \times b \times C_{\text{INH}})$$

$$A_{455 \text{ nm}} = A_{\text{RIF}(455 \text{ nm})} + A_{\text{INH}(455 \text{ nm})} = (\epsilon_{\text{RIF}(455 \text{ nm})} \times b \times C_{\text{RIF}}) + (\epsilon_{\text{INH}(455 \text{ nm})} \times b \times C_{\text{INH}})$$

Onde, A: absorbância; ϵ : absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); b: caminho ótico (1 cm) e C: concentração (mol L^{-1}).

4.3.4 Análise multivariada (Cu (II) e NC para derivatização química)

Para o desenvolvimento dos modelos multivariados, foram preparadas 25 misturas sintéticas na faixa de concentração de $1,00 \times 10^{-5}$ a $7,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a RIF e $1,00 \times 10^{-5}$ a $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a INH e 7 misturas (3 delas realizadas em triplicata) que foram utilizadas na etapa de validação, conforme mostrado na Figura 7. Posteriormente, adicionou-se solução tampão acetato (que também foi utilizada para acertar o menisco), 1000 μL de solução de neocuproina $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 1000 μL de solução de nitrato de cobre $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em balões volumétricos de 10,0 mL. Estas amostras foram conduzidas para a análise espectrofotométrica na região do visível.

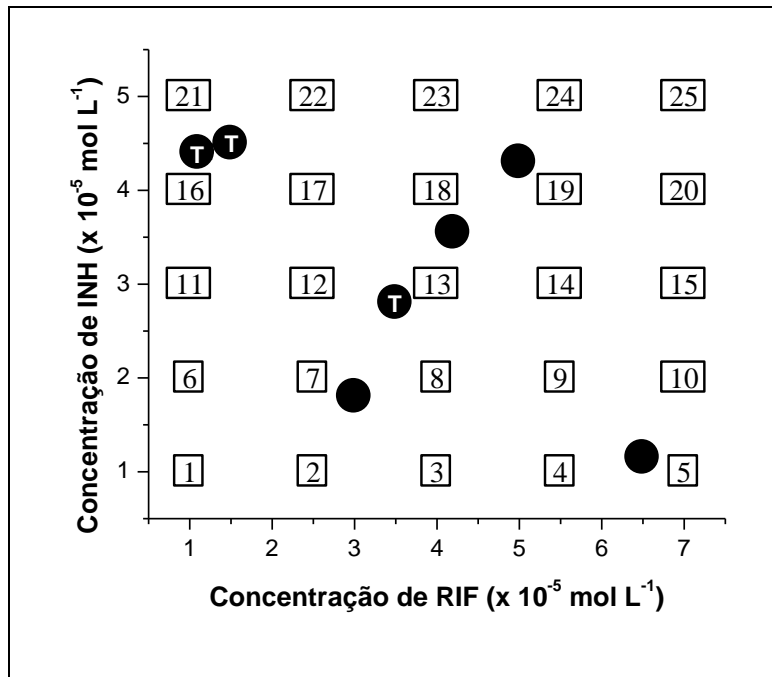


Figura 7: Composição do conjunto de calibração e validação no desenvolvimento de modelos multivariados – (□) amostras do conjunto de calibração, (●) amostras do conjunto de validação, (T) ensaios realizados em triplicata.

Em seguida, foram elaborados modelos de calibração multivariada, que foram otimizados pela seleção de número de variáveis latentes e variância explicada, ausência de anomalias, erros de validação cruzada e validação externa para a obtenção do melhor vetor de coeficiente de regressão na análise desejada. Para avaliar a capacidade de previsão deste modelo, bem como dos modelos univariados construídos, utilizou-se o conjunto de validação externa contendo sete amostras sintéticas, sendo três delas realizadas em triplicatas como já mostrado na Figura 7. Este mesmo conjunto foi aproveitado para a validação segundo os critérios da ANVISA [ANVISA, 2003].

4.3.5- Validação da Metodologia Escolhida

O melhor modelo desenvolvido foi validado segundo critérios estabelecidos pela ANVISA (Resolução RE nº 899) [ANVISA, 2003]. Foram avaliados os parâmetros linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez. Para os ensaios de precisão, exatidão e robustez, foi utilizado o mesmo conjunto de validação externa descrito na Figura 7.

Precisão e Exatidão: Os testes de precisão foram considerados em dois níveis: Precisão intermediária (inter-corridas) e reprodutibilidade (intra-corrída). A precisão intermediária foi avaliada, utilizando o conjunto de triplicatas contemplando o intervalo linear do método. No ensaio para a reprodutibilidade, o mesmo conjunto foi analisado por dois

analistas, em dias diferentes em um mesmo equipamento. A precisão foi expressa na forma de desvio padrão relativo e coeficiente de variação, considerando-se satisfatórios valores inferiores a 5% para ambos os parâmetros. Com os resultados das previsões para as amostras sintéticas do conjunto de validação externa, foi possível verificar a exatidão da metodologia multivariada utilizando-se a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão (RMSEP) e erro relativo médio.

Robustez: A robustez do método foi avaliada, analisando-se o comportamento espectral dos compostos resultantes das reações colorimétricas em diferentes condições de temperaturas (5 a 55° C), e tempos de leitura (0, 1 e 2 horas).

Análise de amostras reais: Para a avaliação do modelo multivariado foram analisadas amostras reais contendo a associação em estudo. Para tanto, 10 comprimidos (ou cápsulas) foram triturados e homogeneizadas em almofariz. Massas de aproximadamente 0,4400 g foram tomadas e dissolvidas em 25,0 mL de metanol e diluídas a um volume de 100,0 mL com água destilada. Destas soluções foram tomadas alíquotas de 440,0 µL onde se adicionou solução tampão acetato (que também foi utilizada para acertar o menisco), 1000 µL de solução de neocuproina $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e 1000 µL de solução de Cu (II) $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, completou-se o volume em balões volumétricos de 10,0 mL e realizou-se a leitura espectrofotométrica não necessitando de filtração prévia. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.6 Análise por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

A análise por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência foi realizada conforme método descrito na Farmacopéia Norte Americana [USP, 2007]. A eluição por gradiente foi aplicada de acordo com as informações apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3. Constituição das fases móveis na análise cromatográfica por método padrão – HPLC [USP, 2007].

Tempo (min)	Solução A (%)*	Solução B (%)**	Eluição
0 – 05	100	0	Isocrática
05 – 06	100 → 0	0 → 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)

As soluções para curva analítica foram preparadas com concentrações que variavam de $1,21$ a $2,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de RIF e de $2,92$ a $8,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de INH. Para

tanto, a dissolução dos padrões foi realizada em uma mistura de tampão fosfato de sódio:metanol grau HPLC (96:4), no máximo 10 minutos antes da leitura.

As análises dos medicamentos foram realizadas em triplicata, triturando-se 10 formulações de cada forma de apresentação do medicamento, sendo pesado cerca de 0,0122 g a 0,0328 g e dissolvido com solução tampão em um balão volumétrico de 100,0 mL, esta solução foi sonicada por 10 minutos e analisada no máximo 2 horas após o preparo das amostras.

4.3.7 Aplicação do método desenvolvido para a determinação de RIF e INH em matrizes biológicas

4.3.7.1 Análise de urina humana fortificada com RIF e INH

Em uma alíquota (10,0 mL) da urina de dois voluntários saudáveis adicionaram-se quantidades apropriadas das soluções de padrão de RIF e INH de forma que a concentração final ficasse na ordem de $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para ambos os analitos. Uma alíquota de 3000 μL desta amostra foi preparada conforme procedimento descrito em 4.3.1, sendo posteriormente submetida à análise espectrofotométrica e previsão do modelo multivariado desenvolvido e validado.

4.3.7.2 Aplicação do método desenvolvido em amostras de soro humano sintético

As amostras de soro humano sintético (pH 7,60) foram preparadas de acordo com o método proposto por PARHAM e colaboradores (2001). Uma mistura contendo cerca de 1,27 g de NaCl, 0,16 g de NaHCO_3 , $2,6 \times 10^{-3}$ g de glicina, $3,50 \times 10^{-3}$ g de triptofano, $3,70 \times 10^{-3}$ g de tirosina, $3,20 \times 10^{-3}$ g de serina, $6,60 \times 10^{-3}$ g de fenilalanina, $9,10 \times 10^{-3}$ g de lisina, $6,30 \times 10^{-3}$ g de histidina, $2,90 \times 10^{-2}$ g de ácido aspártico, $1,00 \times 10^{-2}$ g de arginina e $9,10 \times 10^{-3}$ g de alanina foram adicionados a um balão de 250,0 mL e completou-se o volume com água destilada. Uma alíquota de 10,0 mL deste soro sintético preparado foi fortificada com uma quantidade adequada de solução padrão de RIF e INH obtendo-se a concentração final de $4,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para a RIF e $6,10 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para INH. Posteriormente, uma alíquota de 1000 μL desta amostra foi preparada conforme procedimento descrito em 4.3.1, sendo posteriormente conduzida à análise espectrofotométrica e previsão do modelo multivariado desenvolvido e validado.

4.4 Desenvolvimento de método empregando Fe (III) e o-Fen para derivatização química.

4.4.1 Procedimento geral para o preparo das amostras

Adicionaram-se quantidades apropriadas das soluções de RIF e INH, 1000 μL da solução $1,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de FeCl_3 , 1000 μL da solução $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de o-FEN e completou-se o volume dos balões volumétricos de 10,0 mL com solução Clark Lubs (pH=3,00). Em seguida, essas soluções foram submetidas à leitura espectrofotométrica na região do visível.

4.4.2 Análise multivariada (Fe (III) e o-Fen para derivatização química)

Para análise da associação RIF e INH através da segunda proposta de reação de colorimétrica, construiu-se um conjunto de calibração constituído por 25 misturas sintéticas na faixa de concentração de $2,00 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para a RIF e $1,50 \times 10^{-5}$ a $9,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a INH, semelhante ao conjunto de calibração já apresentado na Figura 7 (seção 4.3.4). O conjunto de validação externa constitui-se por 7 misturas, sendo 03 dessas em triplicata, dentro da faixa de concentração utilizada no conjunto de calibração.

Em seguida elaboraram-se modelos de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), os quais foram otimizados (número de variáveis latentes, variância explicada, ausência de anomalias, erros de validação cruzada e validação externa) para a obtenção do melhor vetor de coeficiente de regressão na determinação desejada.

4.5 Método voltamétrico

4.5.1 Preparo do eletrodo de pasta de carbono

O eletrodo de pasta de carbono foi preparado através da mistura (1:4 m/m) de óleo mineral (Nujol) e grafite em pó (Fluka). Esta pasta foi homogeneizada e colocada na extremidade do eletrodo que contém uma cavidade. Tal cavidade consiste de um tubo de vidro com diâmetro interno de 0,5 cm, contendo no seu interior (com uma profundidade de 0,2 cm) um disco de platina conectado a um fio de platina para contato elétrico.

As medidas voltamétricas foram realizadas utilizando-se uma cela eletroquímica (10 mL) contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho (o eletrodo de pasta de carbono), eletrodo de referência (Ag/AgCl) e contra eletrodo de platina.

4.5.2 Estudo do comportamento eletrodo-solução (voltametria cíclica)

O estudo do efeito do pH sobre os sinais voltamétricos de RIF dissolvida em metanol ($5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e INH ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em eletrodo de pasta de carbono utilizando a técnica de voltametria cíclica foi realizado na faixa de pH 2-10, dentro do intervalo de potencial de 0,00 a 1,00 V e velocidade de varredura de $0,05 \text{ V s}^{-1}$. Para verificar o tipo de processo envolvido na interface eletrodo-solução, foram realizadas medidas voltamétricas em diferentes velocidades de varredura obtidas na faixa de 0,01 a $0,10 \text{ V s}^{-1}$ para a INH e na faixa de 0,01 a $0,12 \text{ V s}^{-1}$ para a RIF. Posteriormente foram construídas curvas i_{pa} vs a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

4.5.3 Estudos utilizando Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

Todos os ensaios a seguir foram realizados empregando-se soluções de RIF $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Para tal, dissolveu-se cerca de 0,082 g do padrão de grau farmacêutico em um balão de 100,0 mL com água destilada, essa solução foi sonicada por 40 minutos até dissolução completa da RIF.

Realizou-se a otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (frequência, potencial de amplitude de pulso e potencial de step – Tabela 03), utilizando soluções de $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de RIF e $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de INH, ambas preparadas em solução tampão Britton-Robinson (pH = 4,00).

Tabela 03. Fatores e níveis otimizados no Planejamento Fatorial 2^3 para a otimização dos parâmetros instrumentais da voltametria de onda quadrada utilizada na determinação de RIF e INH.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Frequência (Hz)	10	20	30
$E_{\text{Amplitude}}$ (V)	0,03	0,06	0,09
E_{Step} (V)	0,005	0,007	0,009

Foram realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados para cada analito, com triplicata do ponto central (destinado ao cálculo da estimativa do desvio), totalizando onze ensaios como é mostrado na Tabela 04.

Tabela 04: Ensaios experimentais para todas as combinações possíveis dos níveis selecionados do planejamento fatorial 2^3 para a otimização dos parâmetros instrumentais da Voltametria de onda quadrada na determinação de RIF e INH

Ensaio	Parâmetro	Frequência (Hz)	$E_{\text{Amplitude}}$ (V)	E_{step} (V)
01		-1	-1	-1
02		+1	-1	-1
03		-1	+1	-1
04		+1	+1	-1
05		-1	-1	+1
06		+1	-1	+1
07		-1	+1	+1
08		+1	+1	+1
09		0	0	0
10		0	0	0
11		0	0	0

Todos os estudos posteriores foram realizados nas condições otimizadas.

Em seguida, realizou-se um novo estudo do pH (2,00 a 8,00). Para este fim, soluções de RIF ($1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e INH ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foram preparadas em solução tampão Britton-Robinson nos pHs estudados e submetidas a leitura voltamétrica nas condições previamente otimizadas. Gráficos da corrente de pico (I) e potencial de pico (E) foram construídos vs os pHs estudados.

4.5.4 Curva analítica e desenvolvimento do método de adição de padrão

Para a construção das curvas analíticas de RIF e INH, foram preparadas diluições a partir das respectivas soluções trabalho ($1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para RIF e $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para INH), em balões volumétricos de 10,0 mL. A faixa de concentração estudada para RIF foi entre $4,09 \times 10^{-7}$ a $5,39 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto para INH foi de $1,00 \times 10^{-4}$ a $5,79 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão Britton-Robinson (pH = 4,00). Em seguida, as soluções foram conduzidas à análise voltamétrica.

As análises dos medicamentos foram realizadas em triplicata, triturando-se 10 formulações de cada forma de apresentação do medicamento, sendo pesado cerca de 0,0203 g a 0,0363 g do medicamento que foi dissolvido com solução tampão Britton-Robinson (pH = 4,00) em um balão volumétrico de 100,0 mL. Esta solução foi sonicada por 40 minutos.

Para a construção do método de adição de padrão para a determinação de INH, uma alíquota de 200 μL da solução dos medicamentos foi diluída em 10,0 mL de tampão Britton-Robinson ($\text{pH} = 4,00$). A esta solução foram realizadas sucessivas adições de 100,0 μL da solução do padrão de INH ($3,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), sendo que em cada adição a mistura foi homogeneizada com auxílio de um agitador magnético e posteriormente a medida voltamétrica de onda quadrada foi realizada.

Já para a construção do método de adição de padrão para a determinação de RIF, uma alíquota de 20 μL da solução dos medicamentos foi diluída em 10,0 mL de tampão Britton-Robinson ($\text{pH} = 4,00$). A esta solução foram adicionadas 100,0 μL da solução padrão de RIF $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que em cada adição a mistura foi homogeneizada com auxílio de um agitador magnético e posteriormente realizou-se a medida voltamétrica de onda quadrada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos Espectrofotométricos Preliminares

Para atender ao objetivo principal do trabalho, que visa a determinação da associação farmacêutica RIF e INH através de espectrofotometria na região do visível, estudos preliminares foram realizados. Para tanto, duas soluções, uma contendo $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de INH e outra contendo $1,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de RIF foram submetidas à análise espectrofotométrica, conforme é observado na Figura 8.

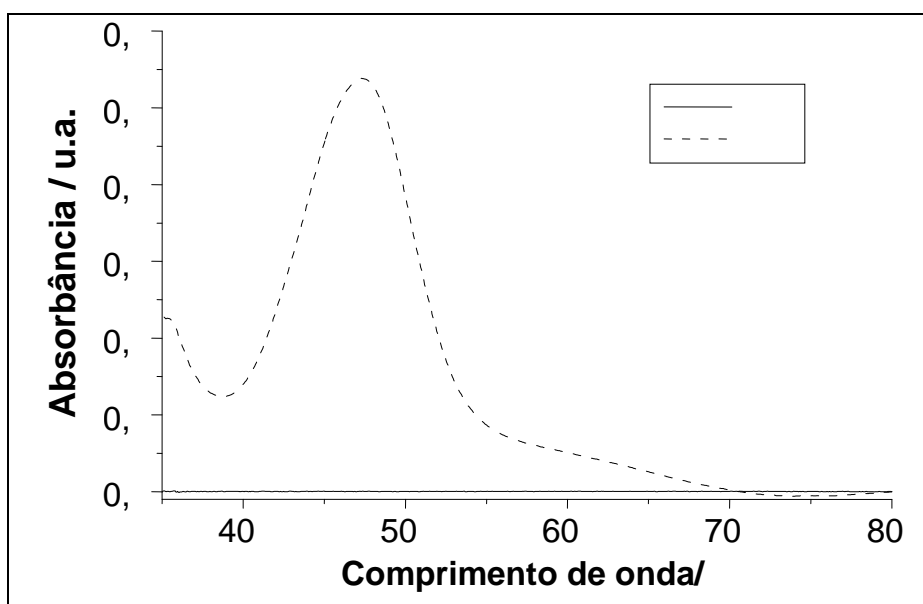
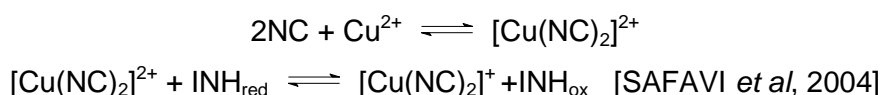


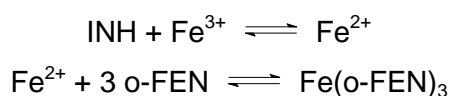
Figura 8: Comportamento espectral da solução de padrões de RIF ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e INH ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na região do UV-Vis.

A RIF apresenta uma banda de absorção bem definida com valor máximo próximo a 470 nm, enquanto que a INH não apresenta nenhuma banda na faixa de comprimento de onda do visível (350 a 800 nm). Desse modo, fica evidente a necessidade de se recorrer ao uso de reações que resultem em compostos coloridos e permitam a determinação de INH nesta região do espectro eletromagnético.

Em função desses resultados, duas reações colorimétricas indiretas foram avaliadas quanto à possibilidade de utilização para a determinação indireta de INH via espectrofotometria na região do visível. Na primeira, o reagente neocuproina complexa com íons Cu (II) formando o composto incolor $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^{2+}$, que por sua vez é reduzido pela INH a $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$, que apresenta coloração amarelo-alaranjada, e portanto pode ser utilizada para a determinação de INH.



Na segunda proposta, a INH reduz os íons Fe (III) a Fe (II), que por sua vez são facilmente determinados através da reação colorimétrica com o-fenantrolina, conforme reação abaixo.



5.2 Determinação Indireta de INH utilizando íons Cu (II) e Neocuproina (NC)

O método desenvolvido por SAFAVI e colaboradores (2004) está baseado na formação de um complexo de transferência de carga entre Cu (I) e NC (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) conforme apresentado anteriormente.

O comportamento espectral deste complexo ($[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$) está representado na Figura 9, e sua formação está diretamente relacionada com a concentração de INH, o que permite a determinação deste fármaco na região do visível.

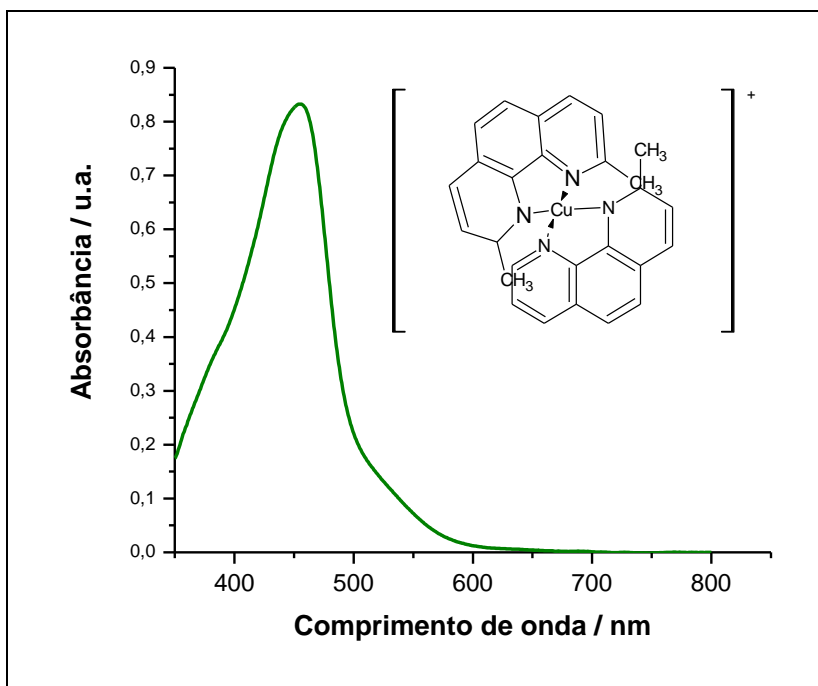


Figura 9: Comportamento espectral do composto $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$ que permite a determinação indireta de INH e, no detalhe, a estrutura química do complexo.

Como o objetivo deste trabalho é a determinação simultânea de INH e RIF, estudaram-se as possíveis reações secundárias de RIF com estes reagentes colorimétricos. A Figura 10 ilustra o comportamento espectral da RIF na presença de Cu (II) e NC.

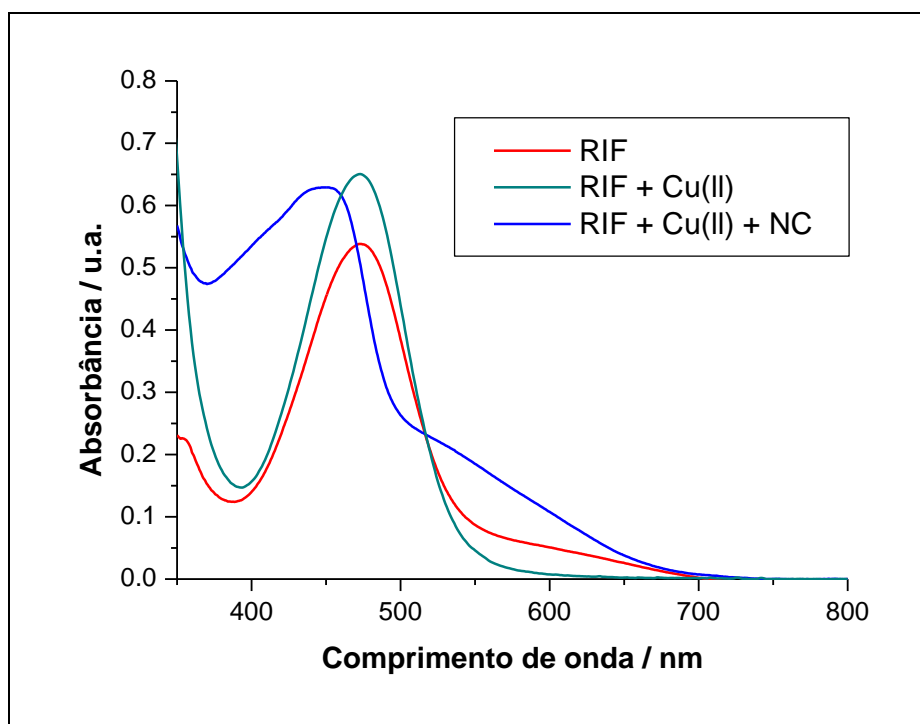


Figura 10: Mudanças no comportamento espectral da RIF ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) quando na presença dos reagentes colorimétricos Cu(II) ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e NC ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Nesta figura é possível observar duas mudanças significativas no comportamento espectral da RIF, sendo que na primeira (adição apenas de Cu (II)) ocorre basicamente um aumento no sinal de absorção da RIF (mais pronunciado na região UV do espectro), enquanto na segunda (adição de Cu (II) e NC) o máximo de absorção se desloca para região de menor comprimento de onda, provavelmente decorrente da formação de um complexo.

5.2.1 Planejamento Fatorial para otimização da reação de complexação Cu(I) - NC

Inicialmente, construiu-se um planejamento fatorial 2^3 para revelar as melhores condições da reação de complexação Cu (II) – NC, seguida da posterior redução do complexo pela INH. Os fatores estudados foram: pH (4,00 e 6,00), concentração de íons Cu (II) ($5,00 \times 10^{-5}$ e $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e concentração de NC ($2,00 \times 10^{-4}$ e $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). Os ensaios foram realizados conforme mostrado na Tabela 05, sendo que a resposta monitorada foi o sinal de absorção do complexo formado (455 nm).

Tabela 05. Planejamento Fatorial 2^3 para a otimização da reação colorimétrica (formação de $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$)

Ensaio	Fatores			Absorbância (u.a.)
	pH	C _{Cu(II)}	C _{NC}	$\lambda = 455\text{nm}$
01	-1	-1	-1	0,1418
02	+1	-1	-1	0,2901
03	-1	+1	-1	0,2239
04	+1	+1	-1	0,4340
05	-1	-1	+1	0,2255
06	+1	-1	+1	0,3381
07	-1	+1	+1	0,3318
08	+1	+1	+1	0,4805
09	0	0	0	0,5173
10	0	0	0	0,5270
11	0	0	0	0,5391

Através dos cálculos dos efeitos e considerando-se a estimativa do desvio de 0,0469 ($\delta \times t_{95\%, \sigma=2}$), pode-se constatar que os efeitos principais (concentração de Cu (II) e pH) e o efeito de interação entre eles são significativos. Já o efeito principal da

concentração de NC, bem como os efeitos de interação que envolve este fator não são significativos no nível de 95% de confiança (Tabela 06).

Tabela 06. Efeitos principais e de interação entre os fatores otimizados pelo planejamento fatorial 2^2 .

Fatores	Efeitos Principais	Efeitos de interação
$C_{Cu(II)}$	0,1187	
pH	0,1549	
C_{NC}	0,02454	
$C_{Cu(II)} \times \text{pH}$		0,0715
$C_{NC} \times \text{pH}$		-0,0243
$C_{NC} \times C_{Cu(II)}$		0,0057
$C_{NC} \times C_{Cu(II)} \times \text{pH}$		-0,0064

Em função desta constatação, o planejamento fatorial completo 2^3 pode ser transformado em um planejamento fatorial completo 2^2 com duplicata de cada um dos ensaios, gerando a interpretação geométrica mostrada na Figura 11 evidenciando que os maiores valores de absorvância são obtidos quando se utilizam as condições estudadas no ponto central.

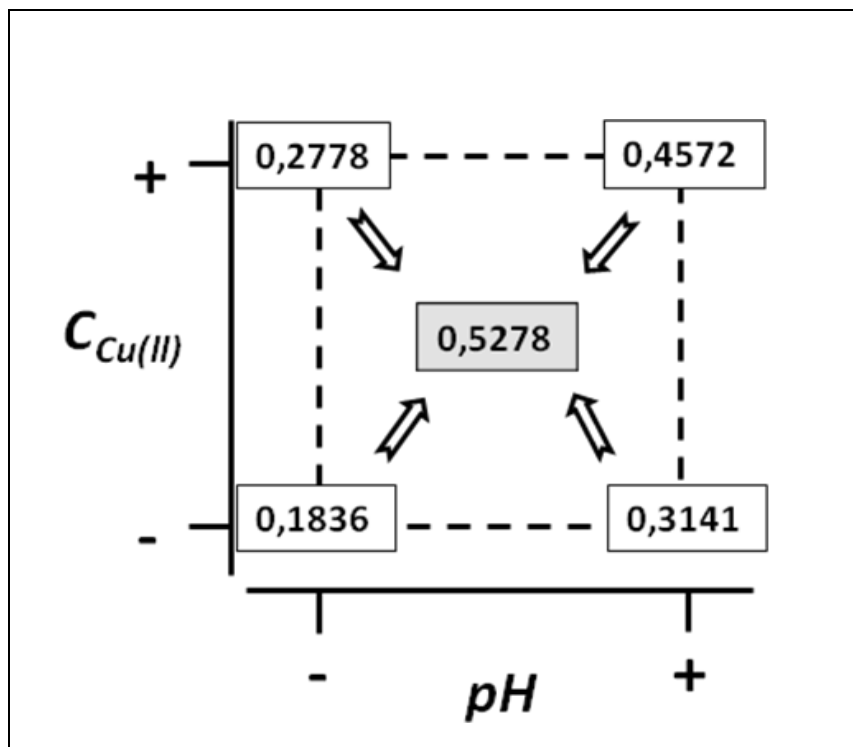


Figura 11: Interpretação geométrica dos fatores significativos (pH e $C_{Cu(II)}$) no planejamento fatorial 2^3 .

Como os resultados indicam uma convergência de maior sensibilidade para o ponto central, nenhum deslocamento em termos de pH e concentração de Cu (II) foi realizado no segundo planejamento fatorial 2^2 composto central com quintuplicata do ponto central para obtenção da superfície de resposta. Neste planejamento, manteve-se constante a concentração de NC em $2,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (concentração um pouco superior ao nível -1 do planejamento fatorial 2^3) e INH no valor de $4,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A resposta monitorada foi a banda de absorção em 455 nm cujos valores podem ser observados na Tabela 07.

Tabela 07. Planejamento Fatorial 2^2 composto central para a otimização da reação colorimétrica (formação de $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$).

Fatores			
Ensaio	pH	Concentração de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Absorbância (u.a.) $\lambda = 455 \text{ nm}$
01	-1	-1	0,0834
02	+1	-1	0,2730
03	-1	+1	0,1704
04	+1	+1	0,4989
05	$-\sqrt{2}$	0	0,0549
06	$\sqrt{2}$	0	0,4302
07	0	$-\sqrt{2}$	0,2057
08	0	$\sqrt{2}$	0,4408
09	0	0	0,3618
10	0	0	0,3367
11	0	0	0,3376
12	0	0	0,3404
13	0	0	0,3464

Novamente, os efeitos principais e de interação mostraram-se significativos (pH = 0,2591, concentração de Cu (II) = 0,15650 e pH x concentração de Cu (II) = 0,0695) com nível de 95% de confiança ($s = 0,0103 \times t_{95\%, \sigma=4} = 0,0287$). A partir desses resultados, um modelo quadrático foi construído e validado estatisticamente pela ANOVA (Tabela 08).

Tabela 08. ANOVA para o modelo quadrático construído a partir do planejamento fatorial 2^2 composto central para a otimização da reação colorimétrica que permite a determinação de INH.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F _{CALCULADO}
Regressão	0,2182	5	$4,36 \times 10^{-2}$	160,983
Resíduos	0,0019	7	$2,71 \times 10^{-4}$	
Falta de Ajuste	0,0017	3	$5,67 \times 10^{-4}$	4,576
Erro Puro	0,0004	4	$1,00 \times 10^{-4}$	
Total	0,1101	12		

% de Variância Explicada = 99,10

% de Máxima Variância Explicável = 99,80

O modelo apresentou boa porcentagem de variância explicada (99,10%) em comparação à porcentagem de máxima variância que poderia ter sido explicada. A regressão mostrou-se significativa com 95% de confiança ($MQR/MQr \gg F_{5,7} = 3,97$) e baixa falta de ajuste ($MQfaj/MQep \ll F_{3,4} = 6,59$). Todos estes dados foram confirmados pelos baixos valores de resíduos e sua distribuição aleatória.

Uma vez que o efeito de interação é significativo, os efeitos principais não podem ser interpretados individualmente. Assim, o efeito de interação (pH x concentração de Cu (II)) pode ser melhor visualizado na interpretação geométrica mostrada na Figura 12.

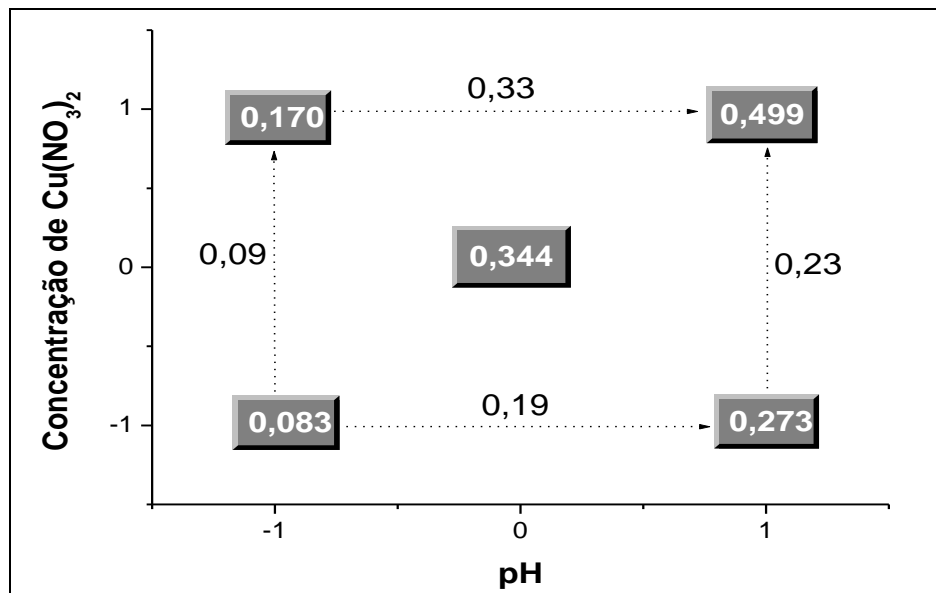


Figura 12: Interpretação geométrica dos efeitos do planejamento fatorial 2^2 composto central.

Nesta figura é possível observar que em pH 4,0 (nível -) um aumento de 0,09 u.a. ocorre quando é variada a concentração de Cu (II) do nível menor para o nível maior. No entanto, em pH 6,0 (nível +) um aumento maior (0,23 u.a.) no valor de absorvância é observado quando é variada a concentração de Cu (II), evidenciando que o efeito do pH depende da concentração de Cu (II) utilizada. Interpretação similar pode ser realizada fixando-se a concentração de Cu (II), evidenciando novamente a dependência entre as duas variáveis estudadas.

A Figura 13 mostra uma representação tridimensional da absorvância vs os fatores codificados otimizados.

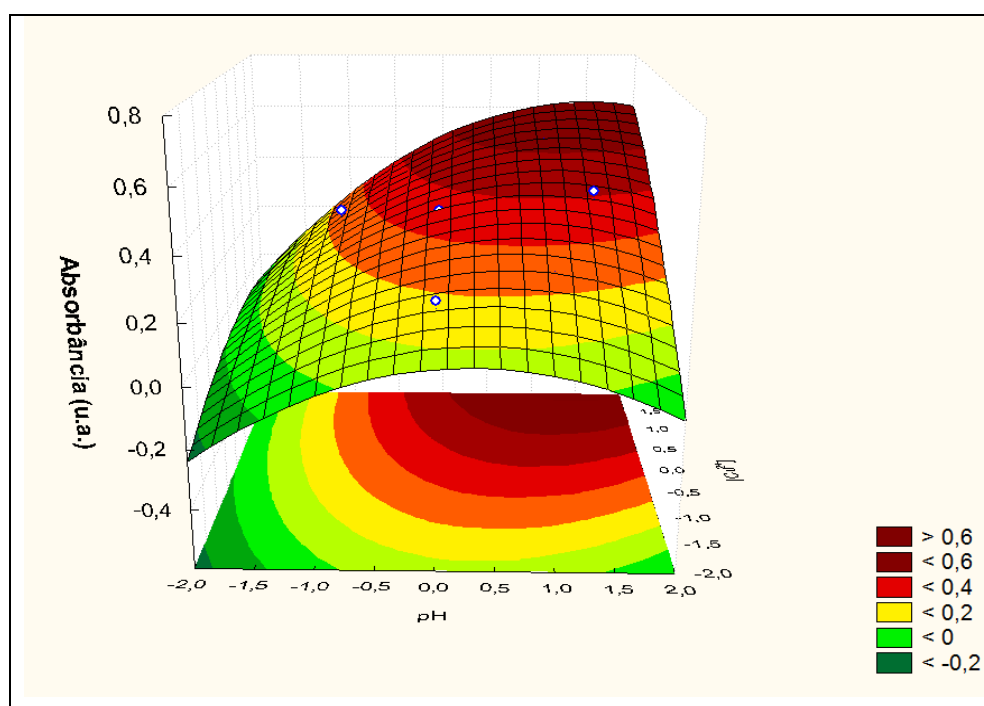


Figura 13: Superfície de resposta para o modelo quadrático $Abs_{(455\text{ nm})} = 0,3446 + 0,1311\text{ pH} + 0,0807 C_{Cu(II)} - 0,0576\text{ pH}^2 - 0,0173 C_{Cu(II)}^2 + 0,0347\text{ pH} \times C_{Cu(II)}$.

A superfície de resposta mostra que a maior sensibilidade para a determinação foi obtida em pH 6,0 e em altas concentrações de Cu (II). A influência do pH sobre a redução do Cu (II) pela INH foi descrita por SAFAVI e colaboradores (2004), que relata o favorecimento do processo de oxidação do grupo hidrazina em pH maior do que 5,0. Observando-se os valores de pKa da INH ($pK_{a1} = 1,85$ referente ao grupo $-NH_2$, $pK_{a2} = 3,54$ referente ao N do anel aromático e $pK_{a3} = 10,77$ referente ao grupo $-NH$ [KLOPMAN *et al*, 1996]) e o gráfico de distribuição das espécies (Figura 14); os demais ensaios o pH = 5,0 para evitar a possibilidade de hidrólise dos íons Cu (II) e Cu (I).

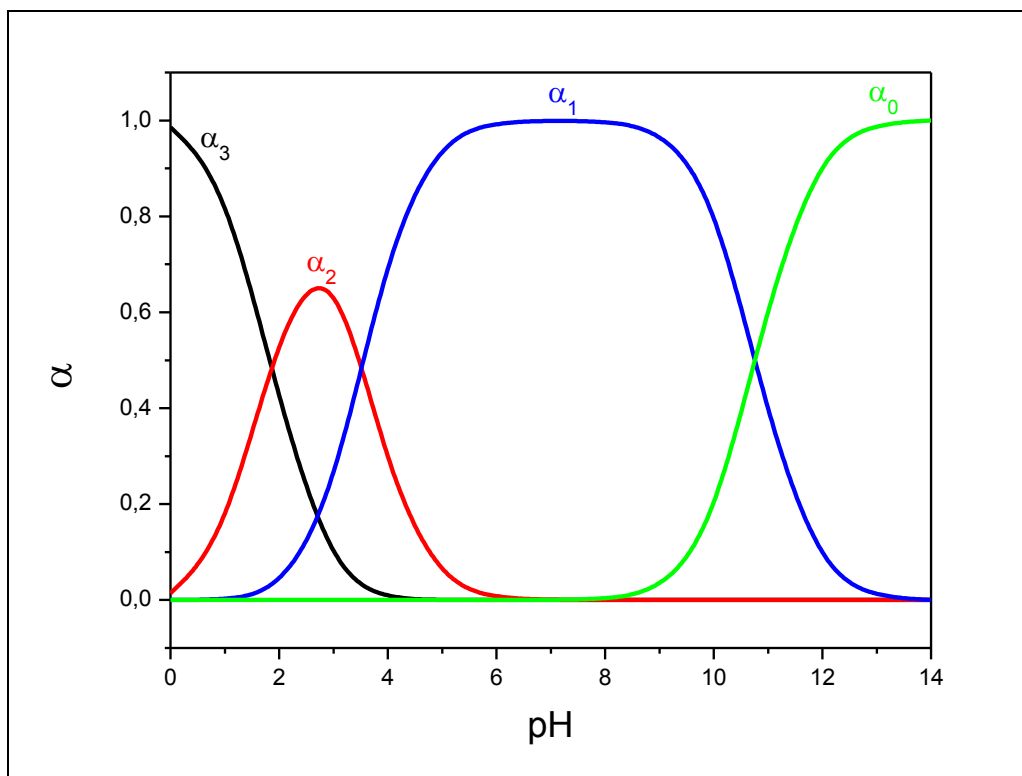


Figura 14: Diagrama de distribuição das espécies para a INH.

Analisando o diagrama de distribuição das espécies para a INH é possível concluir que a molécula de INH no pH otimizado não tem mais os 2 prótons mais facilmente ionizáveis o que pode favorecer a reação colorimétrica utilizada. Vale a pena ressaltar, que embora a superfície de resposta sugira o pH = 6,0 como condição otimizada para o processamento da reação colorimétrica, utilizar-se-á em todos os ensaios o pH ajustado em 5,00 para evitar a possível hidrólise do íon cúprico.

5.2.2 Métodos de calibração convencionais (Cu (II) e NC para derivatização química)

Devido à proximidade dos comprimentos de onda de máxima absorção dos complexos formados (Figura 15), ou seja, 450 nm para a o composto que envolve a determinação direta de RIF e 455 nm para o complexo $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$ (que envolve a determinação indireta da INH), torna-se inviável a resolução dos sinais de absorbância, o que dificulta a determinação simultânea dos analitos, sem nenhuma manipulação dos dados espectrais.

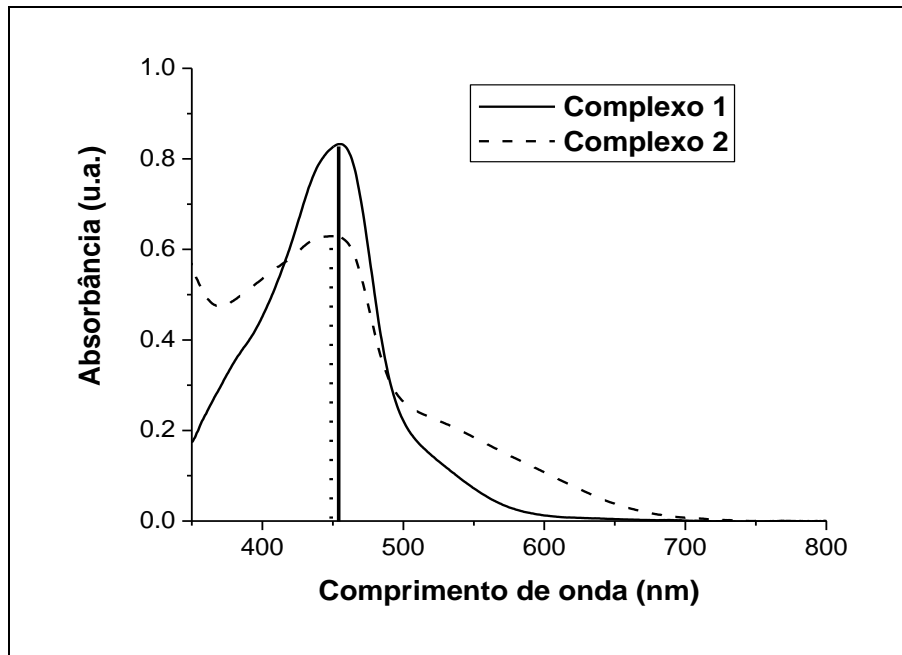


Figura 15: Comportamento espectral dos complexos envolvidos na determinação de INH (Complexo 1: $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$) e RIF (Complexo 2))

Uma das formas que permite contornar parte do problema de interferência espectral é a metodologia derivativa. Assim, os espectros de cada um dos fármacos complexados foram processados em primeira derivada com 9 pontos de alisamento. Nestas condições, o espectro da RIF apresenta um ponto de anulação de melhor definição em 450 nm, ponto este onde a derivada do sinal de absorbância é zero para qualquer valor de concentração deste analito. Em função desta característica, uma curva analítica com valores de $\partial A/\partial \lambda$, neste ponto de anulação, pode ser elaborada para INH (Figura 16).

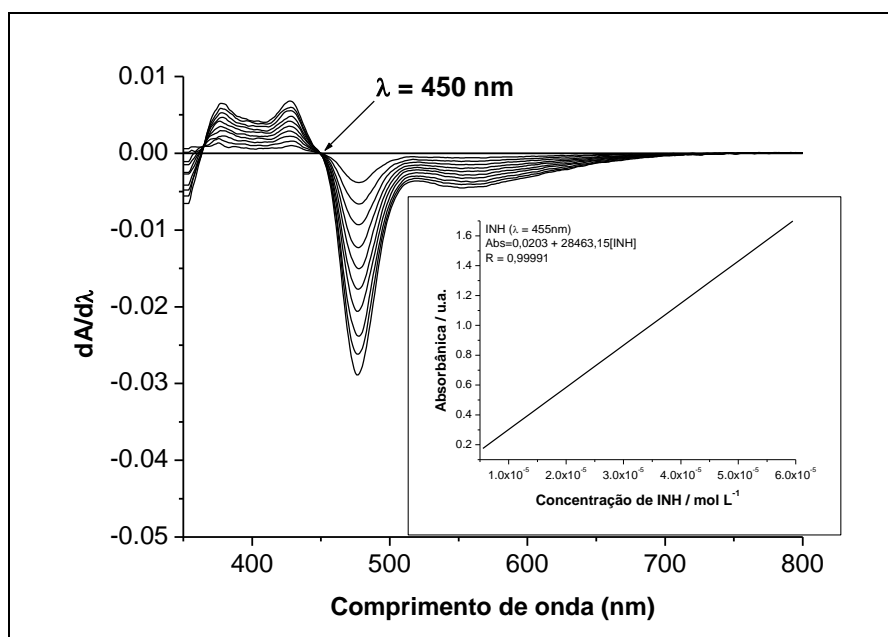


Figura 16: Primeira derivada dos dados espectrais (RIF) e curva analítica (INH)

De maneira análoga, a INH apresenta também um ponto de anulação onde a derivada do sinal é zero, em 455 nm. Neste ponto uma curva analítica com valores de $\partial A/\partial \lambda$ pode ser elaborada para determinação da RIF (Figura 17).

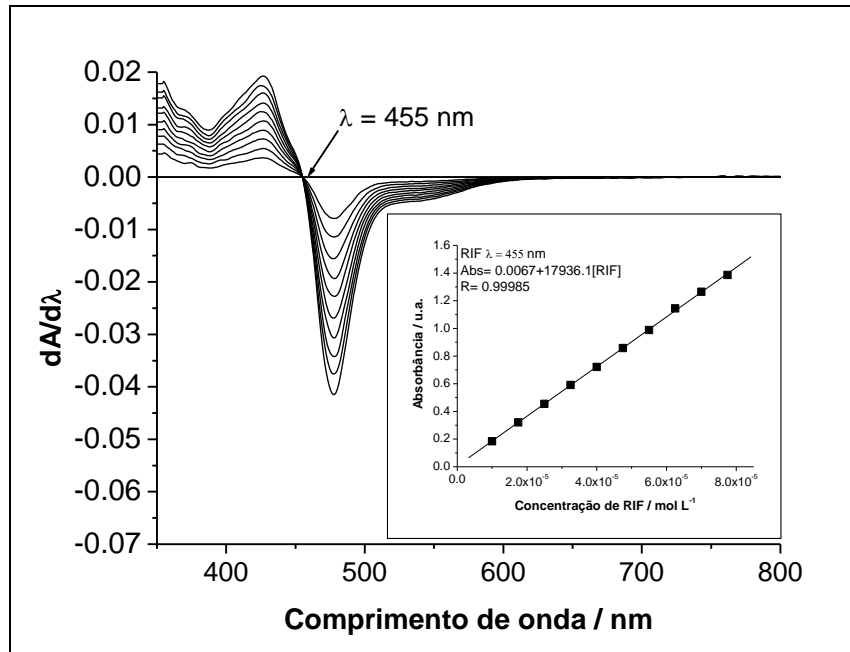


Figura 17: Primeira derivada dos dados espectrais (INH) e curva analítica (RIF).

Utilizando-se treze misturas sintéticas para avaliar a capacidade de previsão deste sistema de calibração, foi possível observar a baixa capacidade do método derivativo em realizar a determinação quantitativa dos fármacos. Em todas as amostras a concentração determinada foi negativa, ou seja, não determinável. Esta incapacidade de previsão, provavelmente foi uma consequência da perda de sensibilidade do método que é gerada pela derivatização dos dados espectrais, além do aumento do ruído. Para a RIF, a curva analítica foi construída no comprimento de onda de 455 nm (muito próximo do seu próprio ponto de inflexão, 450 nm). Neste comprimento de onda a derivada do sinal de absorção da RIF apresenta valores muito próximos de zero, dificultando o emprego da metodologia derivativa para a determinação deste fármaco. Além disso, a proximidade dos pontos de inflexão (450 e 455 nm) faz com que os valores dos sinais utilizados para a construção das curvas analíticas sejam muito pequenos e, portanto os ruídos nos espectros derivados apresentam grande influência, explicando a impossibilidade de determinação.

Para o método de Vierordt, o sistema de equações foi resolvido prevendo-se os valores de concentração para RIF e INH, com seus respectivos erros relativos médios (Tabela 09).

Tabela 09: Resposta prevista e erro obtidos pelo método de Vierordt para RIF e INH.

Amostra	Concentração real (mol L ⁻¹)		Concentração prevista (mol L ⁻¹) (s*)		Erro Relativo (%)	
	RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH
1 a 3	1,50 x 10 ⁻⁵	4,50 x 10 ⁻⁵	5,48 x 10 ⁻⁹ (7,48 x 10 ⁻⁹)*	6,47 x 10 ⁻⁵ (1,78 x 10 ⁻⁵)*	100	43,7
4 a 6	1,10 x 10 ⁻⁵	4,40 x 10 ⁻⁵	1,22 x 10 ⁻⁸ (4,23 x 10 ⁻⁸)*	5,14 x 10 ⁻⁵ (3,51 x 10 ⁻⁷)*	99,9	16,9
7 a 9	3,50 x 10 ⁻⁵	2,80 x 10 ⁻⁵	2,28 x 10 ⁻⁷ (1,81 x 10 ⁻⁸)*	4,86 x 10 ⁻⁵ (1,46 x 10 ⁻⁶)*	99,3	73,4
10	5,00 x 10 ⁻⁵	4,30 x 10 ⁻⁵	3,54 x 10 ⁻⁷	7,16 x 10 ⁻⁵	99,3	66,5
11	6,50 x 10 ⁻⁵	1,15 x 10 ⁻⁵	5,39 x 10 ⁻⁷	5,04 x 10 ⁻⁵	99,2	338,0
12	4,20 x 10 ⁻⁵	3,55 x 10 ⁻⁵	0,00	6,43 x 10 ⁻⁵	100	81,1
13	3,00 x 10 ⁻⁵	1,80 x 10 ⁻⁵	1,96 x 10 ⁻⁷	3,66 x 10 ⁻⁵	99,3	103,0
ERRO RELATIVO MÉDIO (%)					99,7	76,2

s* = Estimativa do desvio para as análises realizadas em triplicata.

Como esperado, o princípio da aditividade espectrofotométrica, assim como o método derivativo anteriormente avaliado, também apresentou baixa capacidade de previsão e altos valores de erro relativo médio (76,2% para INH e 99,7% para RIF). Nesse método obtém-se maior exatidão quando os máximos de absorção dos dois analitos não se sobrepõem consideravelmente, fato que não acontece para estas análises.

Os resultados apresentados indicam que os sistemas univariados de calibração, fundamentados em curvas analíticas convencionais e no uso de sistemas derivativos, se apresentam inadequados para o processamento de sinais espectrais com intensa sobreposição. Como comentado anteriormente, trata-se do principal inconveniente associado ao uso de espectroscopia eletrônica, inconveniente este que normalmente limita consideravelmente a sua aplicabilidade. Deste ponto de vista, o uso de alternativas multivariadas se justifica plenamente.

5.2.3 Método Multivariado (Cu (II) e NC para derivatização química)

Os espectros na região do visível do conjunto de calibração, composto por 25 misturas sintéticas, dentro da faixa de concentração de 1,00 x 10⁻⁵ a 5,00 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ para a INH e 1,00 x 10⁻⁵ a 7,00 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ para a RIF foram adquiridos (Figura 18) e processados através da metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e procedimento de validação cruzada. Nesta etapa, além da utilização dos dados originais, foram testados diversos tipos de tratamentos (primeira derivada, segunda

derivada, alisamento, normalização) aliados a procedimentos de pré-processamento (dados centrados na média, autoescalamento), avaliando sempre a capacidade de previsão dos modelos utilizando um conjunto de validação externa.

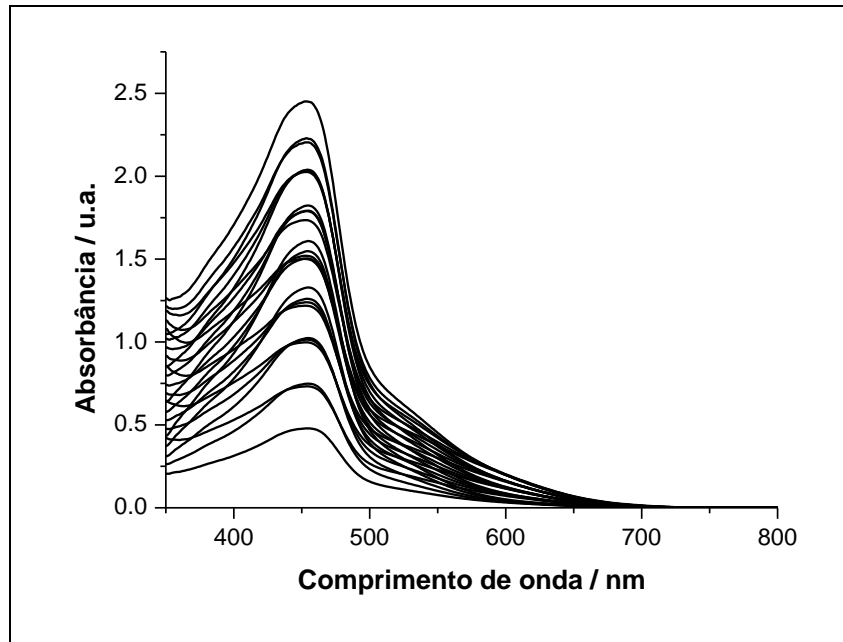


Figura 18: Comportamento espectral das 25 misturas sintéticas do conjunto de calibração utilizados na construção do modelo multivariado para a determinação de RIF e INH.

O modelo otimizado para determinação de RIF e INH com melhor capacidade de previsão apresentou as seguintes características: faixa espectral de 350 a 800 nm, com dados alisados em 5 pontos, o que permite uma minimização dos ruídos instrumentais. Para definir o melhor número de variáveis latentes (VLs) para construção do modelo multivariado, utilizou-se o método de validação cruzada, "*Leave one out*".

Neste procedimento, um espectro é retirado do conjunto de calibração, sendo utilizado como elemento de previsão. Esta operação é repetida tantas vezes quanto necessário, de maneira a garantir que todos os elementos do conjunto participem como elemento de previsão. Os erros que surgem desta previsão são apresentados como a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (RMSECV) em função do número de VLs (Figura 19).

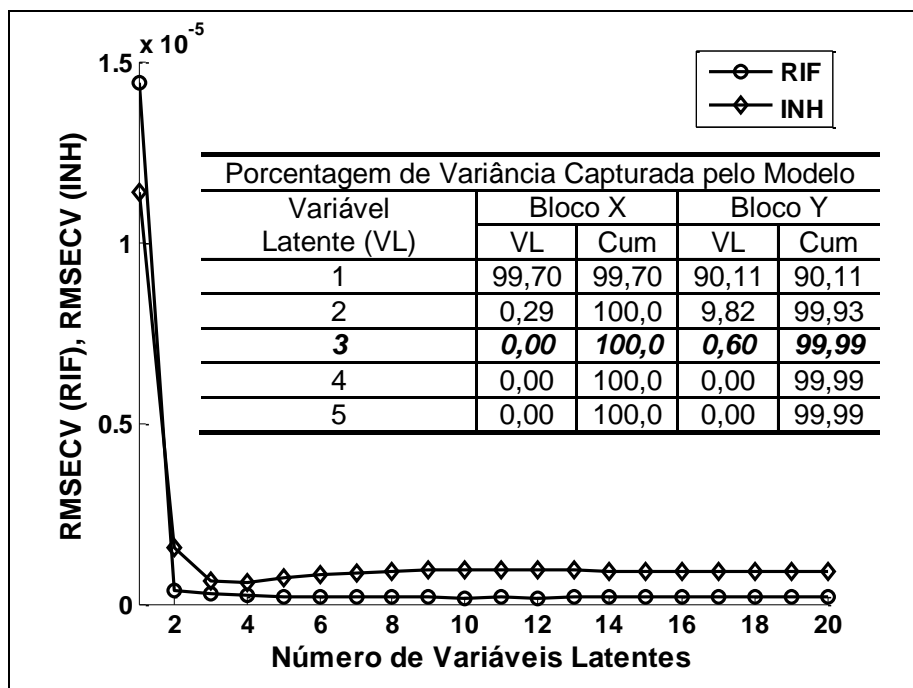


Figura 19: Evolução dos valores de RMSECV pelo número de variáveis latentes, no detalhe: porcentagem de variância capturada pelo modelo em cada variável latente.

A minimização dos erros de previsão para o modelo construído com 3 VLs, gera valores de RMSECV de $3,05 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para RIF e $6,28 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para INH. Sendo que a variância capturada para a matriz X é de 100% e da matriz Y de 99,99%. Embora fosse esperado que o sistema a ser calibrado apresentasse apenas 2 VLs (uma para cada fármaco), modelos com esta característica apresentaram uma menor capacidade de previsão para INH, indicando que a inclusão desta terceira VL é importante para explicar parte da informação espectral referente ao complexo $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$.

A Figura 20 mostra o vetor de regressão obtido para este modelo construído utilizando os dados alisados em 5 pontos e 03 VLs.

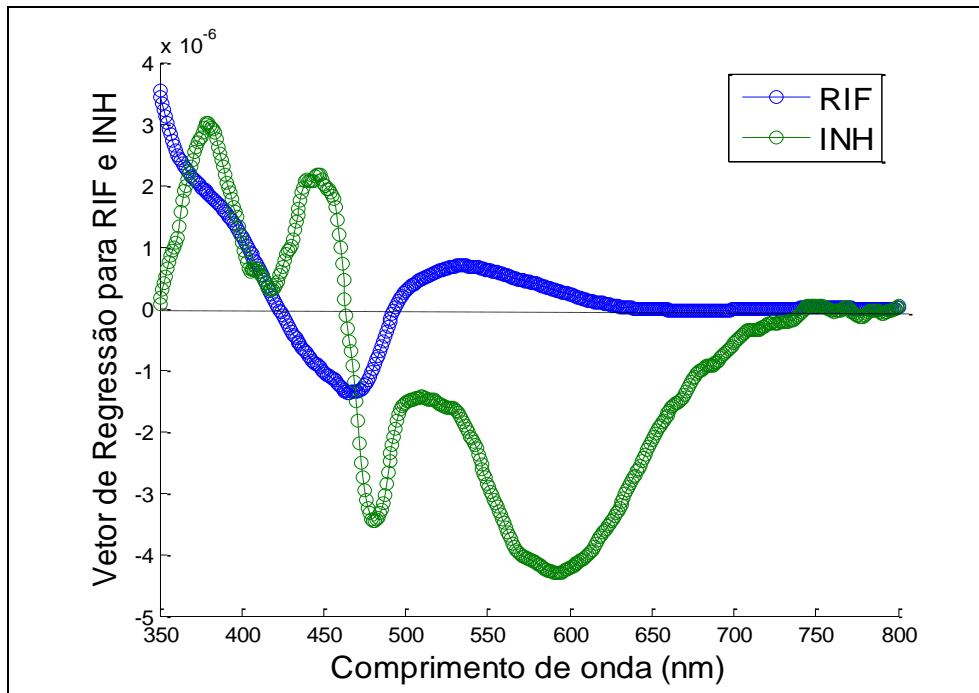


Figura 20: Gráfico do vetor de coeficiente de regressão para RIF e INH do modelo PLSR construído.

Esta figura evidencia que praticamente todas as regiões espectrais foram consideradas relevantes para a correlação desejada, sendo que apenas a região após os 700 nm não apresenta informação analítica relevante (coeficientes de regressão muito próximos de zero).

A Figura 21 mostra o gráfico de “loadings” vs comprimento de onda e sua semelhança ao comportamento espectral dos compostos característicos empregados para a determinação espectrofotométrica na região do visível de RIF e INH.

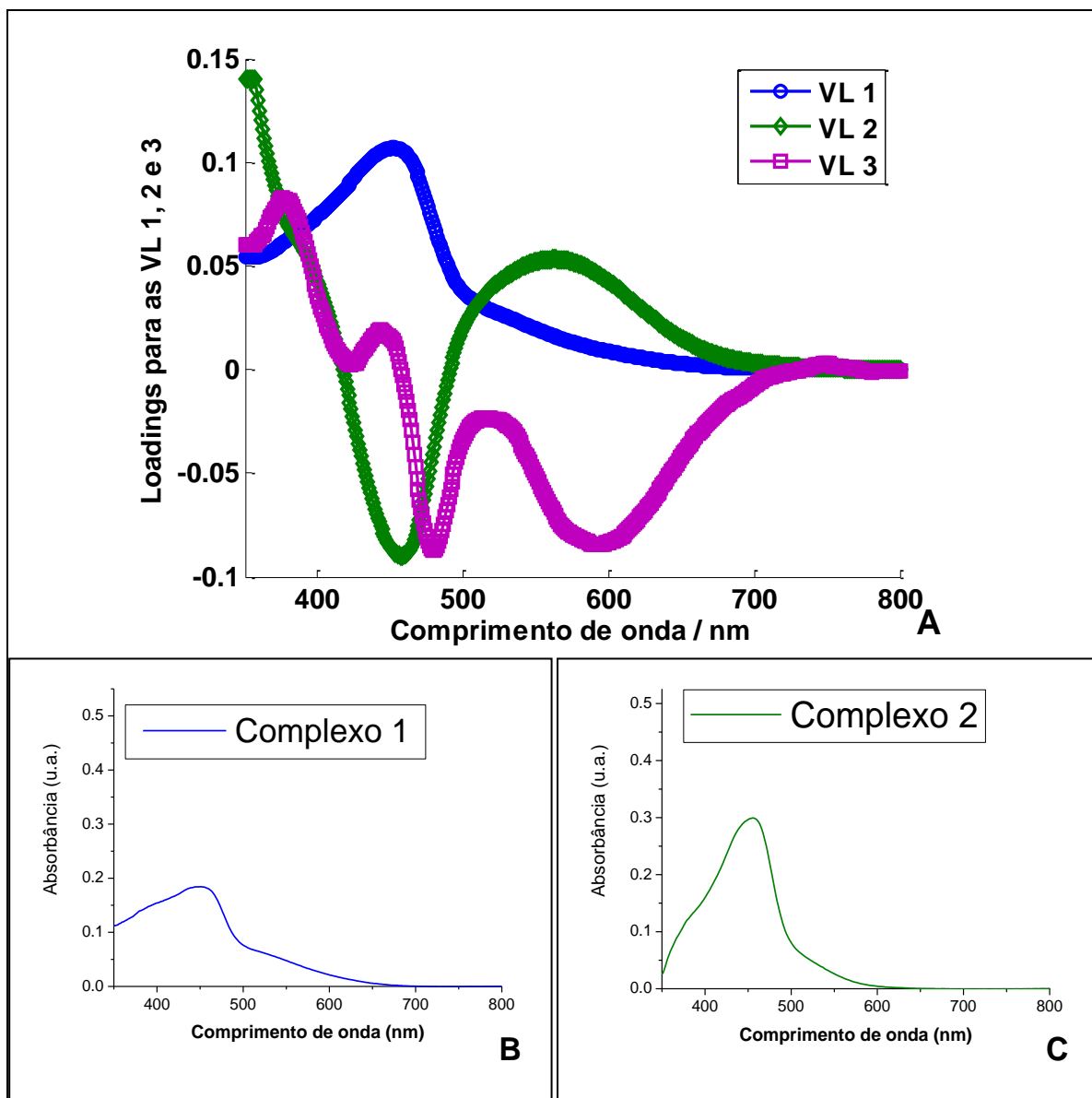


Figura 21:(A) Loadings das 3 primeiras VLs e no detalhe: comportamento espectral individual de (B) RIF e (C) INH na presença dos reagentes colorimétricos Cu (II) e NC.

No gráfico de “loadings” é possível observar a contribuição de cada variável original para a construção das 03 primeiras VLs, sendo que nenhuma delas evidencia a inserção de ruídos ao modelo. Além disso, observa-se que o comportamento dos “loadings” referentes à primeira VL, assemelha-se muito ao comportamento espectral do complexo formado com a RIF indicando que esta VL explica grande parte da informação analítica referente a este complexo e, portanto é fundamental na construção do modelo multivariado para determinação de RIF. De modo análogo, o comportamento dos “loadings” referentes à segunda VL é similar ao inverso do comportamento espectral do complexo $[\text{Cu}(\text{NC})_2]^+$, ou seja, essa VL explica grande parte da informação espectral deste complexo, sendo fundamental na construção do modelo para quantificação de INH.

A terceira e última VL explica as demais informações espectrais relevantes na construção do modelo.

A Figura 22 apresenta o gráfico de resíduos de Student vs Leverage para a verificação de anomalias no conjunto de calibração.

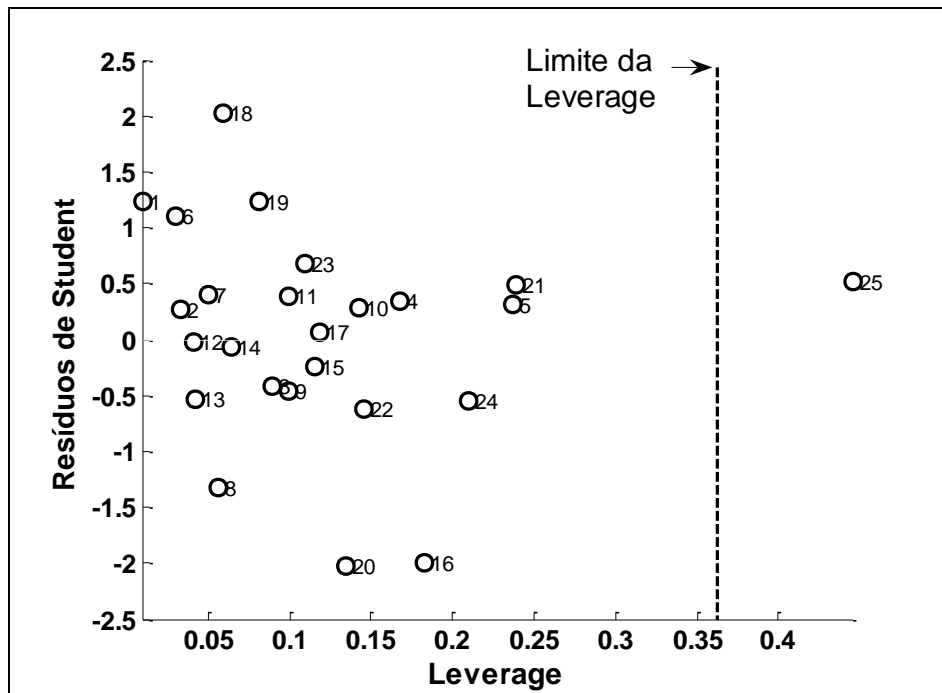


Figura 22: Resíduos de Students vs leverage para o modelo multivariado construído.

Os resíduos de Student 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. Por definição, os valores máximos permitidos para estes parâmetros são $\pm 2,5$ para os Resíduos de Student e 0,36 para o Leverage (considerando-se $3 \text{ VL}/N$, onde VL representa o número de VLs utilizadas na construção do modelo, e N é o número de amostras do conjunto de calibração). Embora a amostra 25 encontre-se fora do limite de leverage (0,36), uma tentativa de retirada desta amostra do conjunto de calibração foi realizada. No entanto, isso não contribuiu para a minimização de erros de calibração e validação. Tal fato pode ser explicado já que as amostras de maior e menor concentração dos analitos geralmente possuem um comportamento espectral diferente do comportamento médio das demais amostras do conjunto.

A Figura 23 ilustra os valores reais vs os valores previstos pelo modelo de regressão durante a validação cruzada para ambos os analitos.

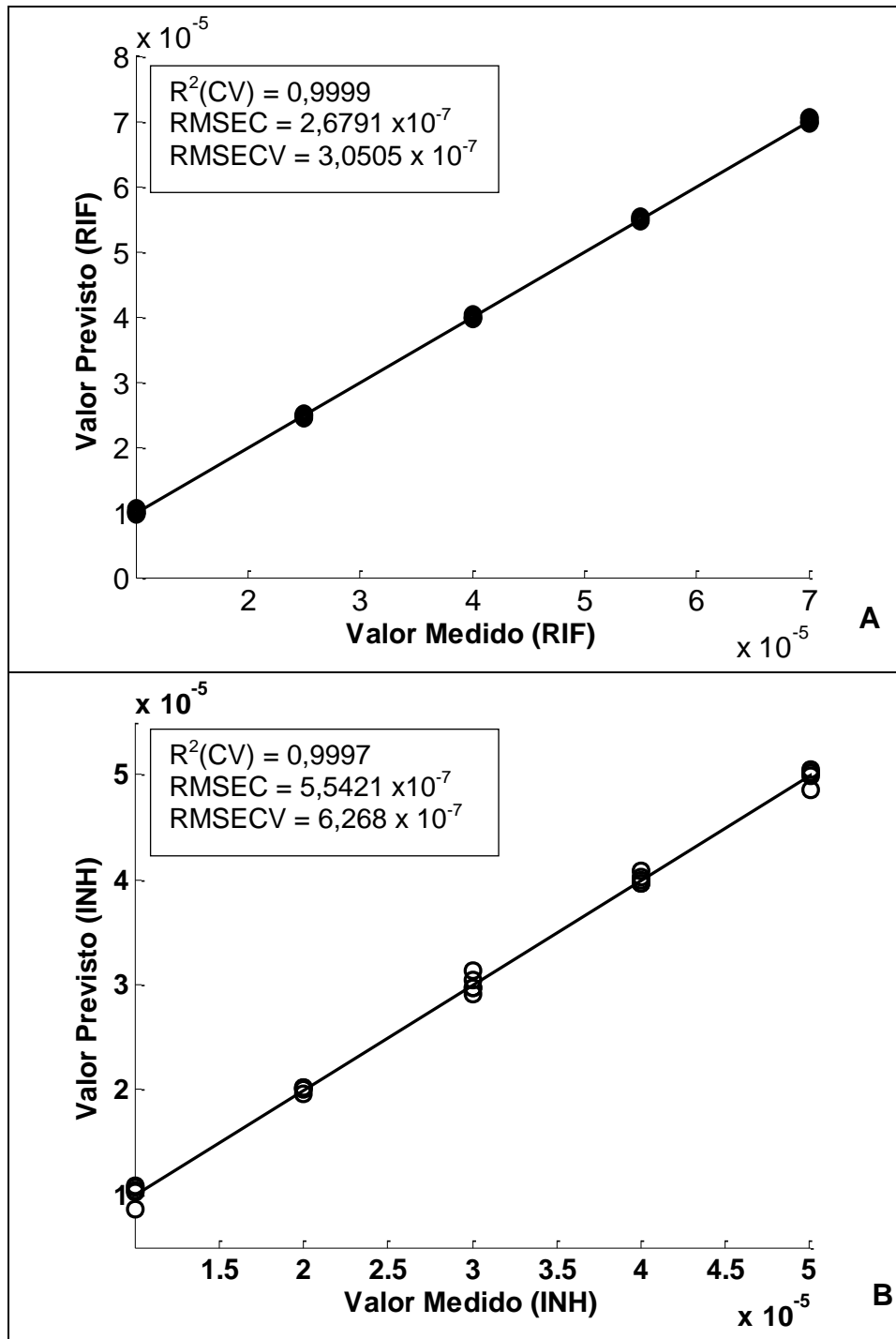


Figura 23: Valores previstos (CV) vs. valores reais de (A) RIF; (B) INH

Como é possível observar, o modelo apresentou boa capacidade preditiva, demonstrada pelos altos coeficientes de correlação obtidos ($R_{CV} = 0,9999$ para RIF e $R_{CV} = 0,9997$ para INH).

A capacidade de previsão foi confirmada frente ao conjunto de validação externa (conjunto de misturas sintéticas que não foram utilizadas na etapa de calibração) obtendo-se os valores apresentados na Tabela 10. É possível observar que os erros relativos foram baixos, inferiores a 3,83% para a RIF e 6,11% para INH, com boa

repetibilidade (baixos valores de estimativa do desvio padrão) A utilização da espectrofotometria na região do visível acoplada ao PLS mostrou-se satisfatória por se tratar de uma técnica simples, de baixo custo, alta sensibilidade e baixos valores de erro para a determinação destes tuberculostáticos.

Tabela 10: Resposta prevista e erro obtidos pelo modelo multivariado PLSR para a previsão de RIF e INH.

Amostra	Concentração real (mol L ⁻¹)		Concentração prevista (mol L ⁻¹) (s*)		Erro Relativo (%)	
	RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH
	1 a 3	1,50 x 10 ⁻⁵	4,50 x 10 ⁻⁵	1,52 x 10 ⁻⁵ (2,65 x 10 ⁻⁷)*	4,44 x 10 ⁻⁵ (4,04 x 10 ⁻⁷)*	1,92
4 a 6	1,10 x 10 ⁻⁵	4,40 x 10 ⁻⁵	1,14 x 10 ⁻⁵ (5,77 x 10 ⁻⁸)*	4,39 x 10 ⁻⁵ (3,0 x 10 ⁻⁷)*	3,50	0,70
7 a 9	3,50 x 10 ⁻⁵	2,80 x 10 ⁻⁵	3,50 x 10 ⁻⁵ (1,53 x 10 ⁻⁷)*	2,83 x 10 ⁻⁵ (2,52 x 10 ⁻⁷)*	0,28	1,36
10	5,00 x 10 ⁻⁵	4,30 x 10 ⁻⁵	4,98 x 10 ⁻⁵	4,42 x 10 ⁻⁵	0,22	2,90
11	6,50 x 10 ⁻⁵	1,15 x 10 ⁻⁵	6,42 x 10 ⁻⁵	1,09 x 10 ⁻⁵	1,15	4,60
12	4,20 x 10 ⁻⁵	3,55 x 10 ⁻⁵	4,18 x 10 ⁻⁵	3,33 x 10 ⁻⁵	0,30	6,11
13	3,00 x 10 ⁻⁵	1,80 x 10 ⁻⁵	2,99 x 10 ⁻⁵	1,77 x 10 ⁻⁵	0,24	1,47
ERRO RELATIVO MÉDIO (%)					1,63	1,82

s* - estimativa do desvio padrão para triplicata

Para fins de comparação, a Tabela 11 apresenta os erros relativos médio para o conjunto de validação externa empregando-se todas as metodologias de análise simultânea de INH e RIF utilizando-se o procedimento de derivatização empregando-se como reagentes soluções de Cu(II) e NC.

Tabela 11: Capacidade de previsão dos modelos construídos para a determinação de INH e RIF.

MODELO	Erro relativo médio (%)	
	RIF	INH
Princípio da aditividade espectrofotométrica	99,7	76,2
Primeira derivada dos dados espectrais	100	100
Modelo multivariado (PLSR)	1,63	1,82

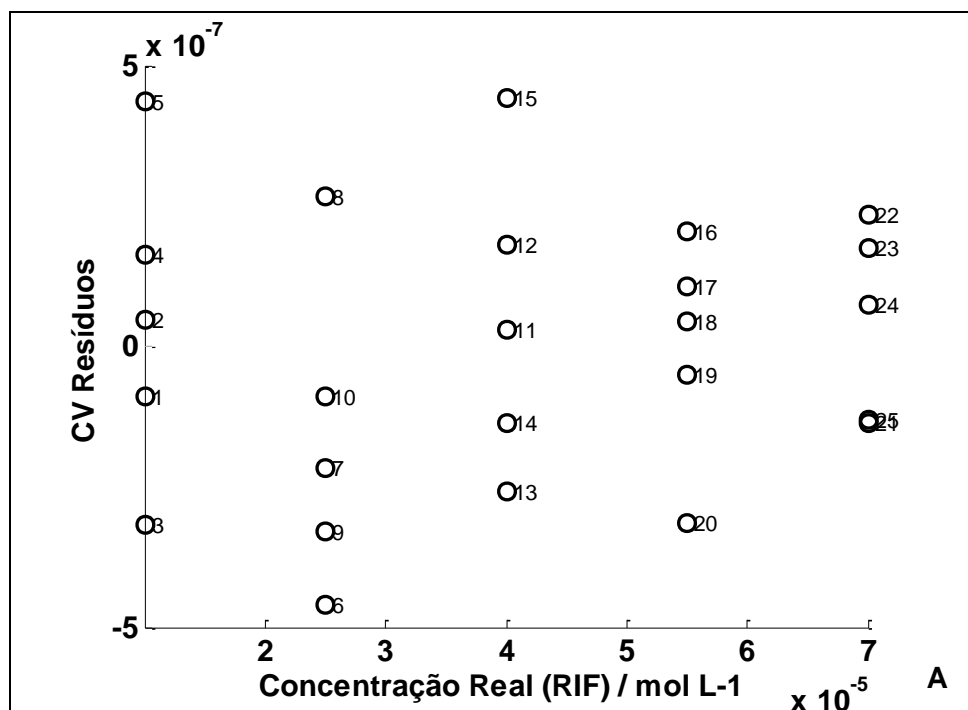
Através destes dados, é possível confirmar a superioridade da capacidade de previsão da metodologia de calibração multivariada para a análise requerida.

5.2.4. Validação do método empregando íons Cu (II) e NC na derivatização química

Os valores de RMSEP e erro relativo médio do conjunto de validação externa através do modelo PLSR foram respectivamente $3,30 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e 1,63% para RIF e $8,11 \times 10^{-7}$ e 1,82% para a INH, indicando uma boa exatidão do método.

O método apresentou linearidade em uma faixa de concentração para RIF de $1,00 \times 10^{-5}$ a $7,00 \times 10^{-5}$ e de $1,00 \times 10^{-5}$ a $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para INH. Apesar de obter coeficientes de correlação (0,9999 para a RIF e 0,9997 para a INH) maiores que os preconizados pela ANVISA (coeficiente de correlação $\geq 0,99$), o intervalo de concentração modelado não compreende a faixa de 80 a 120% do valor nominal de concentração dos analitos em amostras farmacêuticas, e, portanto não obedece a esta especificação da ANVISA. Ou seja, a proporção 1:4 da quantidade em mol de RIF:INH está dentro dos limites lineares estabelecidos pelo modelo (representada pelas amostras que se localizam no canto esquerdo superior da Figura 7), mas sem a possibilidade de aumentar a concentração de INH ou diminuir a de RIF. Esta impossibilidade de obter um modelo no intervalo recomendado se deve ao fato de que a diminuição da concentração de RIF acarretaria em prejuízo de previsão devido a baixa sensibilidade para esta determinação. Por outro lado, aumentar a concentração de INH também não é uma solução viável, já que o comportamento espectral das misturas teria valores de absorbância superiores a 3,0 u.a., região que não garante a obediência da lei de Lambert - Beer.

A Figura 24 apresenta a aleatoriedade dos resíduos para RIF e INH no modelo desenvolvido.



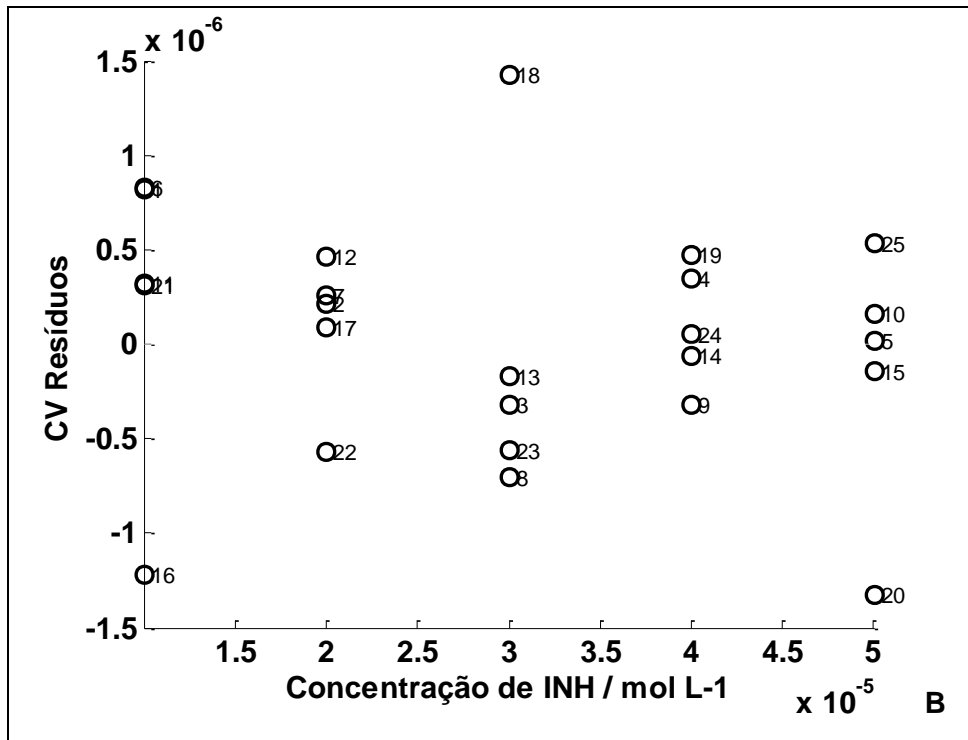


Figura 24: Gráfico dos resíduos (CV) vs concentração real para RIF e INH.

Os dados de coeficientes de correlação já mencionados, juntamente com a aleatoriedade dos resíduos, indicam um bom ajuste do modelo multivariado, sendo este linear na faixa de concentração estudada.

As análises de precisão envolveram estudos de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída). Neste trabalho, esta figura de mérito analítico foi obtida através dos cálculos de coeficiente de variação (CV, Equação 02) e estes, foram comparados aos valores referenciados pela ANVISA.

$$CV(\%) = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Eq. 02

Onde: DP é a estimativa do desvio padrão e CMD a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável de CV (%) deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% de DPR. Os resultados para estes parâmetros estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados do ensaio de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída) para o modelo multivariado.

		Amostra 01		Amostra 02		Amostra 03	
Concentração (mol L ⁻¹)		RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH
		1,50x10 ⁻⁵	4,50x10 ⁻⁵	1,10x10 ⁻⁵	4,40x10 ⁻⁵	3,50x10 ⁻⁵	2,80x10 ⁻⁵
Precisão intra- corrída	CMD	1,52x10 ⁻⁵	4,48x10 ⁻⁵	1,14x10 ⁻⁵	4,40x10 ⁻⁵	3,51x10 ⁻⁵	2,84x10 ⁻⁵
	DP	2,81x10 ⁻⁷	8,50x10 ⁻⁷	4,67x10 ⁻⁸	3,08x10 ⁻⁷	1,23x10 ⁻⁷	2,17x10 ⁻⁷
	CV	1,84 %	1,89 %	0,41 %	0,70 %	0,35 %	0,77 %
Precisão inter- corrída	CMD	1,55x10 ⁻⁵	4,55x10 ⁻⁵	1,14x10 ⁻⁵	4,43x10 ⁻⁵	3,54x10 ⁻⁵	2,82x10 ⁻⁵
	DP	3,27x10 ⁻⁷	1,31x10 ⁻⁶	1,72x10 ⁻⁷	1,14x10 ⁻⁶	3,67x10 ⁻⁷	7,06x10 ⁻⁷
	CV	2,11 %	2,87 %	1,51 %	2,58 %	1,04 %	2,51 %

A Tabela evidencia que a metodologia proposta apresenta boa repetibilidade (precisão intra-corrída) e boa precisão intermediária (precisão inter-corrída) com valores de DPR dentro dos critérios aceitáveis (DPR < 5%). Em ambos os casos, a determinação de RIF mostrou maior precisão que a determinação de INH.

O método também foi considerado robusto (Tabela 13) por apresentar estabilidade das soluções analíticas por até 2 h após a sua preparação (DPR máximo observado de 3,29%) e resultados precisos até a temperatura de 25° C para análises feitas em um sistema variando-se a temperatura (5° a 55° C).

Tabela 13: Avaliação da capacidade de previsão do modelo construído para uma mistura contendo $3,50 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de RIF e INH em diferentes temperaturas, erro relativo médio destas determinações e estimativa do desvio padrão para previsão desta mesma solução em diferentes tempos de reação.

Temperatura (°C)	Concentração Predita (mol L^{-1})		Erro Relativo Médio (%)		Tempo de reação (min)	DPR (%)	
	RIF ($3,50 \times 10^{-5}$)	INH ($3,50 \times 10^{-5}$)	RIF	INH		RIF	INH
5	$3,51 \times 10^{-5}$	$3,47 \times 10^{-5}$	0,33	-1,15	5	0,29	0,17
10	$3,64 \times 10^{-5}$	$3,37 \times 10^{-5}$	2,93	-3,59	10	0,36	0,87
15	$3,69 \times 10^{-5}$	$3,28 \times 10^{-5}$	5,45	-6,28	20	1,24	0,90
20	$3,76 \times 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-5}$	7,48	-8,85	30	1,49	0,99
25	$3,96 \times 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-5}$	7,73	-8,85	45	1,43	1,21
30	$4,02 \times 10^{-5}$	$3,14 \times 10^{-5}$	14,8	-10,1	60	1,97	1,22
35	$4,09 \times 10^{-5}$	$3,10 \times 10^{-5}$	17,0	-11,5	90	2,08	1,43
40	$4,19 \times 10^{-6}$	$3,10 \times 10^{-5}$	-88,0	-11,4	120	2,97	3,29
45	$4,27 \times 10^{-5}$	$3,09 \times 10^{-5}$	22,1	-11,7	180	5,42	5,89
50	$4,36 \times 10^{-5}$	$3,10 \times 10^{-5}$	24,7	-11,5	240	8,37	6,78
55	$3,52 \times 10^{-5}$	$3,45 \times 10^{-5}$	63,7	-1,30	300	9,12	8,01

Finalmente, de acordo com os estudos de linearidade, precisão e exatidão, foi determinada a faixa de aplicação do método analítico multivariado dentro dos intervalos compreendidos entre $1,00 \times 10^{-5}$ a $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a INH e $1,00 \times 10^{-5}$ a $7,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para a RIF.

5.2.5 - Análise de amostras reais

A exatidão do método multivariado proposto também foi avaliada em relação aos resultados obtidos por aplicação do método cromatográfico padrão, na análise de medicamentos. Para tal, os cromatogramas dos padrões de calibração e as curvas analíticas obtidas estão representados na Figura 25.

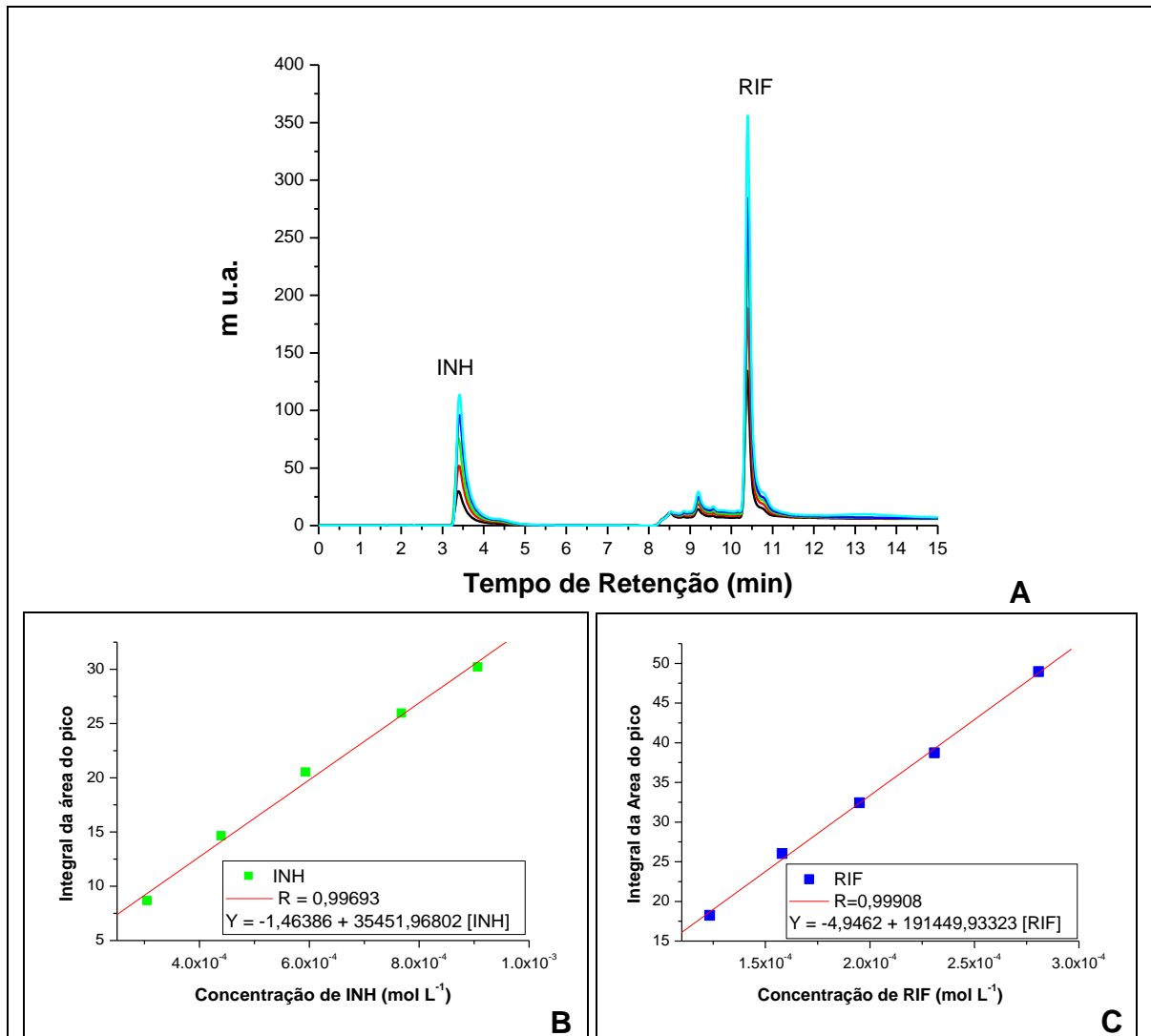


Figura 25: (A) Cromatogramas dos Padrões farmacêuticos obtidos pelo método padrão farmacopeico. Curva analítica construída a partir do método padrão para (B) INH; (C) RIF.

Pode-se observar uma excelente linearidade tanto para a RIF ($Y = -4,9462 + 191450 C_{RIF}$, $R = 0,9908$) quanto para a INH ($Y = -1,4639 + 35451 C_{INH}$, $R = 0,9969$). Os cromatogramas obtidos pela análise dos medicamentos estão apresentados na Figura 26.

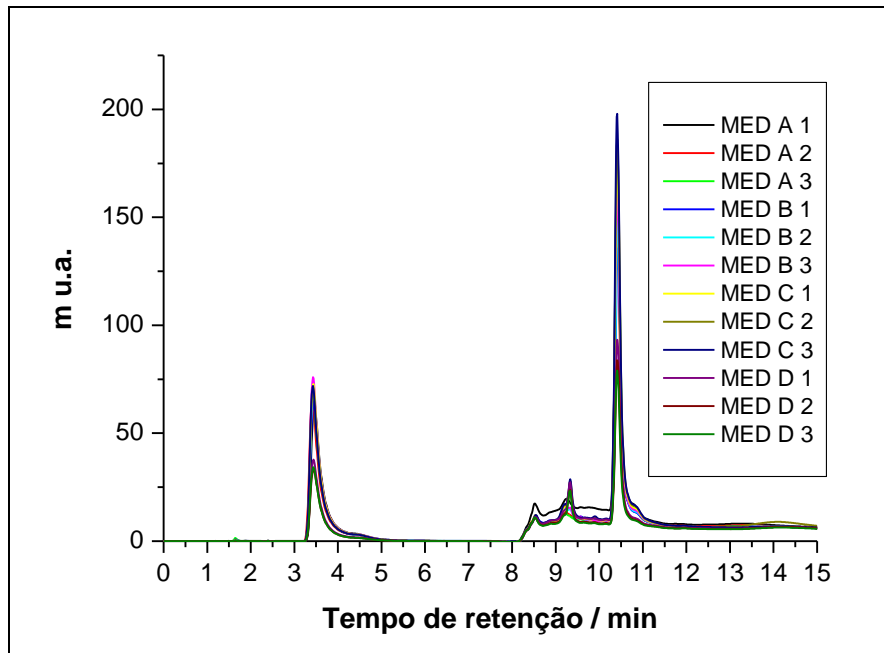


Figura 26: Cromatogramas obtidos na análise dos medicamentos pelo método padrão farmacopeico.

Empregando a curva analítica construída, estimou-se a quantidade dos analitos em cada formulação farmacêutica. Estes dados foram comparados com os obtidos pelo método espectroscópico multivariado (Tabela 14), evidenciando uma excelente coerência entre o método da farmacopéia e a proposta neste trabalho.

Tabela 14. Análise de medicamentos pela metodologia farmacopeica e pelo método UV-Vis proposto acompanhado dos erros relativos.

Medicamento	Método Padrão		Método Proposto		Erro Relativo (%)	
	RIF / mg	INH / mg	RIF / mg	INH / mg	RIF	INH
MED A	299,0	205,0	304,9	212,4	2,0	3,6
MED B	153,2	101,2	154,0	106,2	0,5	4,9
MED C	325,0	199,1	318,3	208,7	-2,1	4,8
MED D	169,7	108,7	165,5	109,2	-2,5	0,5

Assim, a utilização da reação de derivatização utilizando Cu (II) e NC na análise por espectroscopia na região do visível acoplada a PLSR mostrou-se adequada na determinação de ambos os analitos em medicamentos associados.

De modo geral, o método proposto apresenta capacidade de previsão semelhante ao método padrão, enquadrando-se na maioria das especificações recomendadas pela ANVISA. Além disso, apresenta vantagens como diminuição no tempo de análise e

principalmente no custo como pode ser observado na Tabela 15 que compara ambos os métodos utilizados para a análise de cada amostra.

Tabela 15. Comparação entre o método padrão e método proposto na análise de uma amostra contendo a associação estudada.

	Método Padrão	Método proposto
Tempo de preparo de uma amostra	30 minutos	10 minutos
Tempo de leitura para uma amostra	20 minutos	50 segundos
Custo estimado dos reagentes	R\$ 30,00	R\$ 7,00
Custo estimado dos equipamentos	R\$ 120.000,00	R\$ 30.000,00

Há de se ressaltar ainda que no método desenvolvido não houve interferência dos excipientes, nem a necessidade de separação dos mesmos através de filtração.

5.2.6 Aplicação do método desenvolvido em amostras biológicas

5.2.6.1 Análise de urina humana fortificada com RIF e INH

Como pode ser observado nos resultados da seção anterior, o método analítico desenvolvido mostrou-se rápido, de baixo custo, sensível e preciso para a análise de rotina de RIF e INH em cápsulas e comprimidos. Como as faixas lineares do método multivariado proposto para RIF e INH são compatíveis com a concentração destes medicamentos na urina excretada por pacientes em tratamento [BARSOU *et al*, 2008], um estudo para diagnosticar a viabilidade de aplicação direta deste método em amostras de urina humana sem efetuar uma etapa de separação na amostra foi realizada. Apesar deste método apresentar boa sensibilidade, a seletividade é um parâmetro extremamente importante nesta matriz, uma vez que devem ser considerados os efeitos da matéria orgânica presente na amostra, assim como, sua coloração característica.

A Figura 27 compara o comportamento espectral de uma mistura sintética e uma amostra de urina fortificada com concentrações apropriadas dos analitos e diluídas na proporção 3:10 (faixa linear do modelo multivariado construído) analisada pelo método proposto.

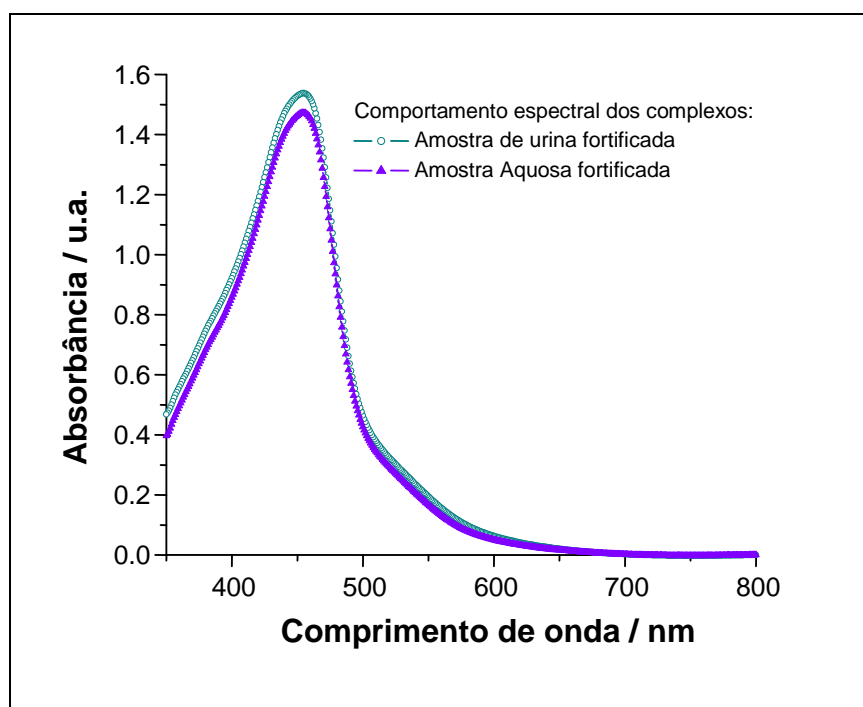


Figura 27: Comportamento espectral da solução aquosa e amostra de urina fortificadas com quantidades apropriadas de RIF e INH após as reações colorimétricas.

É possível observar que o comportamento espectral da urina fortificada é muito similar ao comportamento espectral da mistura em solução aquosa.

A Tabela 16 mostra os resultados obtidos na análise de duas amostras de urina.

Tabela 16. Resultados obtidos na determinação de RIF e INH por espectrofotometria UV-Vis em amostra de urina humana fortificada.

Adição / mol L ⁻¹		Concentração Encontrada / mol L ⁻¹ *		Recuperação / %	
RIF	INH	RIF*	INH*	RIF	INH
5,00x 10 ⁻⁵	5,00 x 10 ⁻⁵	4,83 x 10 ⁻⁵ ± 3,07x10 ⁻⁷	5,20 x 10 ⁻⁵ ± 2,81x10 ⁻⁷	96,7	104,0
5,00 x 10 ⁻⁵	5,00 x 10 ⁻⁵	4,87 x 10 ⁻⁵ ± 9,57x10 ⁻⁷	5,09 x 10 ⁻⁵ ± 9,50x10 ⁻⁷	97,5	101,9

* Valores médios e estimativa do desvio padrão para cinco determinações.

Dessa forma pode-se inferir que estes resultados são extremamente satisfatórios. Vale a pena ressaltar que a viabilidade desta determinação só foi possível pelo uso de reações de derivatização química que tornaram o método mais seletivo comparado àqueles que utilizam a região UV (190-350 nm) para a construção de modelos multivariados. Assim, este método pode ser aplicado à análise direta de RIF e INH em amostras de urina sem a interferência dos componentes da matriz biológica.

5.2.6.2 Análise de soro sintético fortificado com RIF e INH

O fato de não termos dados de literatura que mencionem a quantidade de RIF e INH encontrada em soro sanguíneo faz com que esta etapa do trabalho seja voltada para diagnosticar a interferência dos constituintes do soro humano sintético na determinação dos fármacos através do método desenvolvido. A quantidade média ($n = 5$) de RIF e INH recuperada foi igual a 99,8 e 99,1 % para RIF e INH, respectivamente. A precisão da metodologia, aplicada em amostra de soro humano sintético, foi avaliada por meio de 5 replicatas, sendo o DPR obtido igual a $4,88 \times 10^{-7}$ para a RIF e $5,21 \times 10^{-7}$ para a INH.

Esses resultados indicam que os componentes do soro humano sintético não interferem no método desenvolvido, sendo que os resultados de recuperação encontrados foram melhores em comparação com a análise de urina, o que pode ser atribuído a ausência de cor na matriz de soro sintético.

5.3 Método empregando Fe (III) e o-FEN para a derivatização química

Nesta segunda proposta de derivatização química, a determinação indireta de INH foi bem descrita por [EL-BRASHY *et al*, 1991], e novamente os reagentes utilizados para esta derivatização complexam com a RIF (Figura 28). Um fator agravante nesta proposta está representado pela maior quantidade de possíveis reações secundárias, fato que dificulta muito o desenvolvimento de uma metodologia de calibração. É possível observar pelo comportamento espectral dos possíveis complexos formados, que em alguns casos, são formados compostos que deixam de absorver na região visível (mistura de RIF + Fe (III) ou mistura de RIF + Fe (II)).

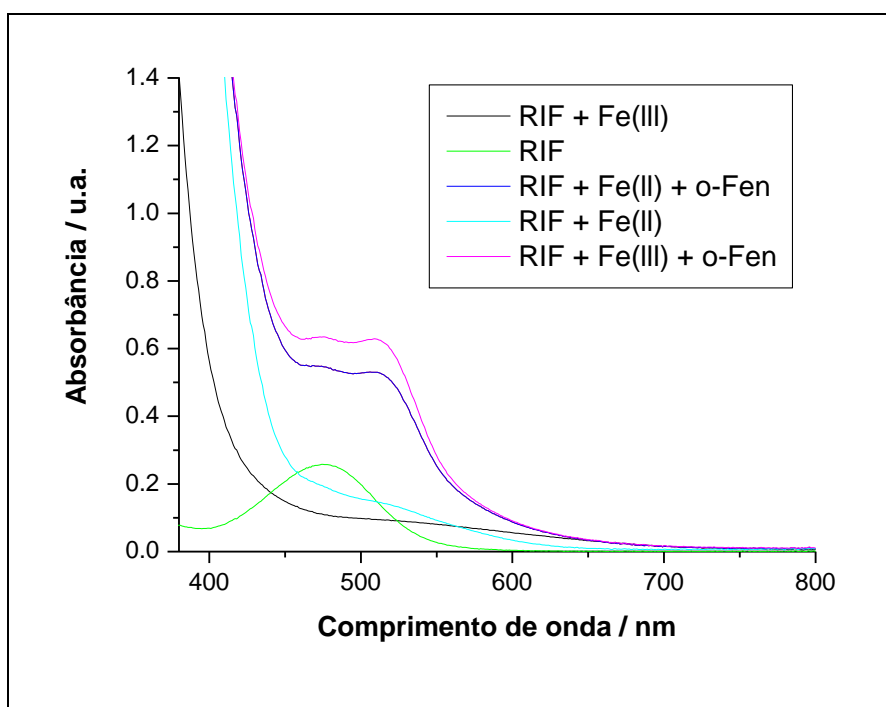


Figura 28: Comportamento espectral de vários compostos formados com a RIF a partir das reações de derivatização empregando-se Fe (III) e o-Fen.

Diversas tentativas foram realizadas para minimizar o problema e possibilitar a aplicação da metodologia multivariada para esta proposta. No entanto, como será possível observar nos resultados a seguir, nenhum modelo satisfatório foi encontrado.

5.3.1 Modelo Multivariado (Fe (III) e o-Fen para derivatização química)

Os espectros na região do visível do conjunto de calibração, composto por 25 misturas sintéticas, dentro da faixa de concentração de $1,50 \times 10^{-5}$ a $9,50 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para a INH e $2,00 \times 10^{-5}$ a $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ para a RIF foram adquiridos e processados através da metodologia de Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) e procedimento de validação cruzada. Nesta etapa, além da utilização dos dados originais, foram testados diversos tipos de tratamentos (primeira derivada, segunda derivada, alisamento, normalização) concomitantemente a procedimentos de pré-processamento (dados centrados na média, autoescalamento), avaliando sempre a capacidade de previsão dos modelos, através de um conjunto de validação externa composto por 13 misturas sintéticas, sendo 3 delas em triplicata.

O melhor modelo empregou dados originais na região espectral compreendida entre 380 e 800 nm com resolução de 1 nm. A região entre 350 e 380 nm foi eliminada do conjunto de dados espectrais por apresentar ruído intenso (Figura 29).

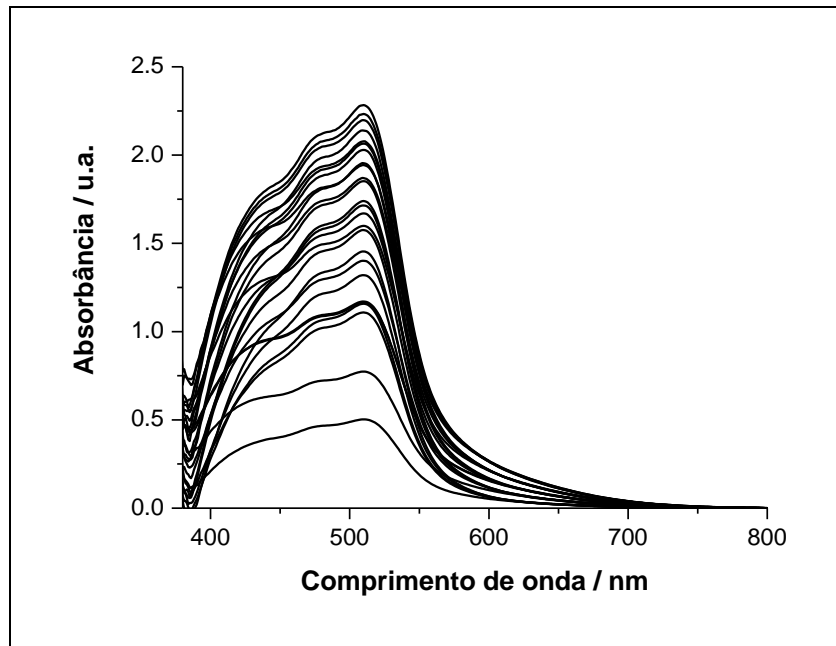


Figura 29: Espectros do conjunto de calibração utilizado na construção do modelo multivariado.

Para definir o melhor número de variáveis latentes (VLs) para construção do modelo multivariado, utilizou-se o método de validação cruzada, "Leave one out". Os erros que surgem desta previsão são apresentados como RMSECV em função do número de variáveis latentes (Figura 30).

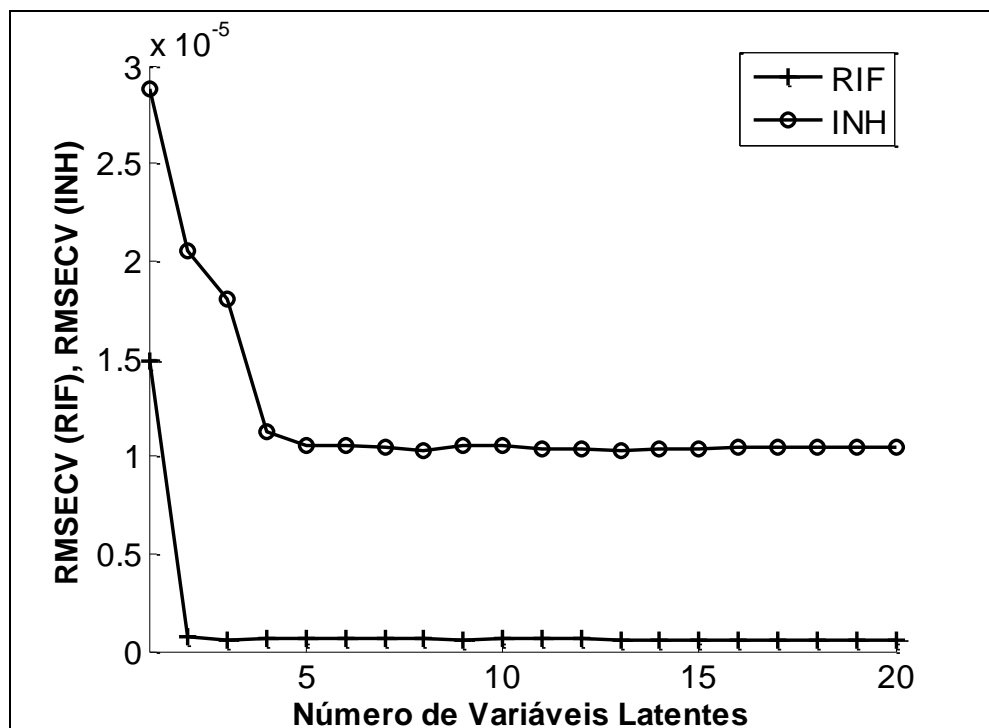


Figura 30: Evolução do RMSECV em função do número de variáveis latentes para o modelo utilizando dados originais e região espectral compreendida entre 380 e 800 nm.

Através desse gráfico foi possível observar que a partir de 2 VLs os erros para o RIF são praticamente constantes, enquanto que para a INH a minimização do erro ocorre somente após a quarta VL. Adicionalmente, observa-se que estas quatro VLs explicam 100,0 % da variância dos dados espectrais (matriz X), e 99,92% da variância dos dados de concentração (matriz Y).

Por esta razão 4 VLs foram selecionadas para a elaboração do modelo de determinação simultânea de RIF e INH. Entretanto, para fins comparativos, modelos envolvendo um maior ou menor número de VLs também foram elaborados, no entanto, a capacidade de previsão do modelo não foi melhorada.

A Figura 31 mostra o gráfico dos coeficientes de regressão para o melhor modelo para esta proposta vs os comprimentos de onda.

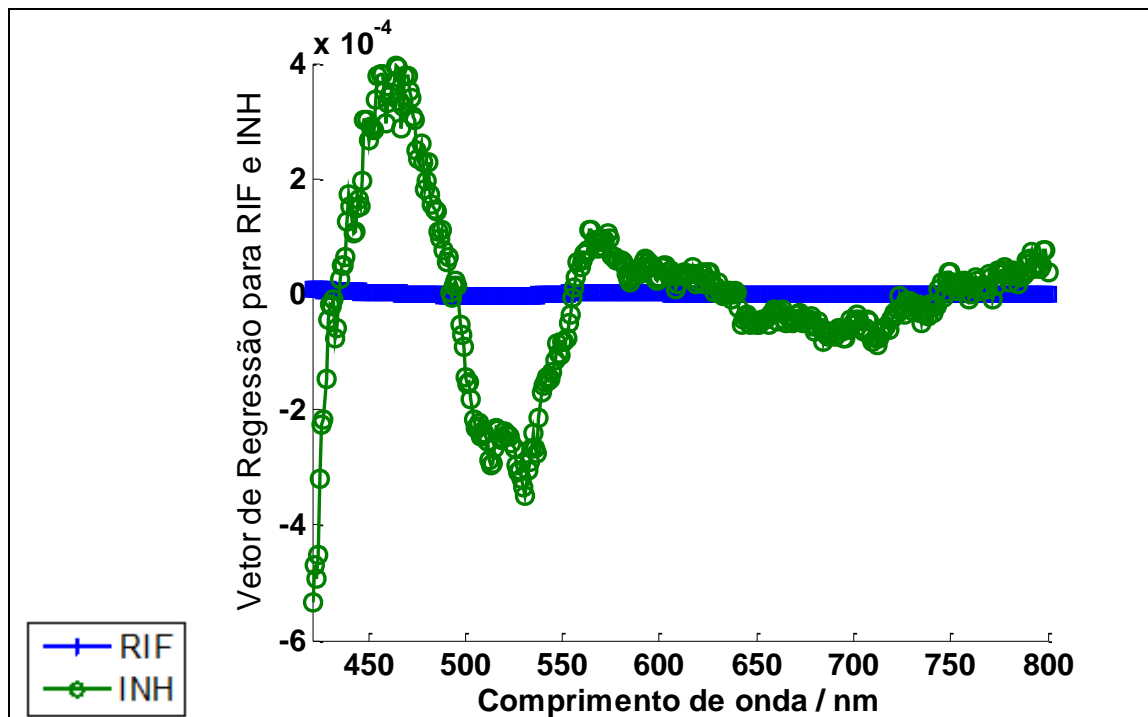


Figura 31: Gráfico dos coeficientes de regressão na faixa espectral estudada para RIF e INH utilizando dados originais e 4 VL.

Analisando-se os dados de coeficiente de regressão para o melhor modelo é possível observar que para a determinação de INH, os coeficientes de regressão indicam que nenhuma região espectral é importante na construção do modelo de determinação para este fármaco (valores muito próximos de zero). Esta tendência gera indícios de uma baixa capacidade de previsão para a INH por esta metodologia.

A análise do gráfico de resíduos Studentizados vs Leverage indica que todas as amostras apresentam baixos valores de resíduo, e leverage dentro dos limites aceitáveis. Assim, para ambos os parâmetros avaliados nenhuma amostra pode ser considerada anômala.

Embora a Figura 32 apresente um bom coeficiente de correlação entre o valor real e o previsto para RIF ($R_{CV} = 0,9999$), o mesmo não pode ser dito para a correlação encontrada para a INH ($R_{CV} = 0,9200$). Este é um outro indício da dificuldade de obtenção de um modelo com boa capacidade de previsão para a INH.

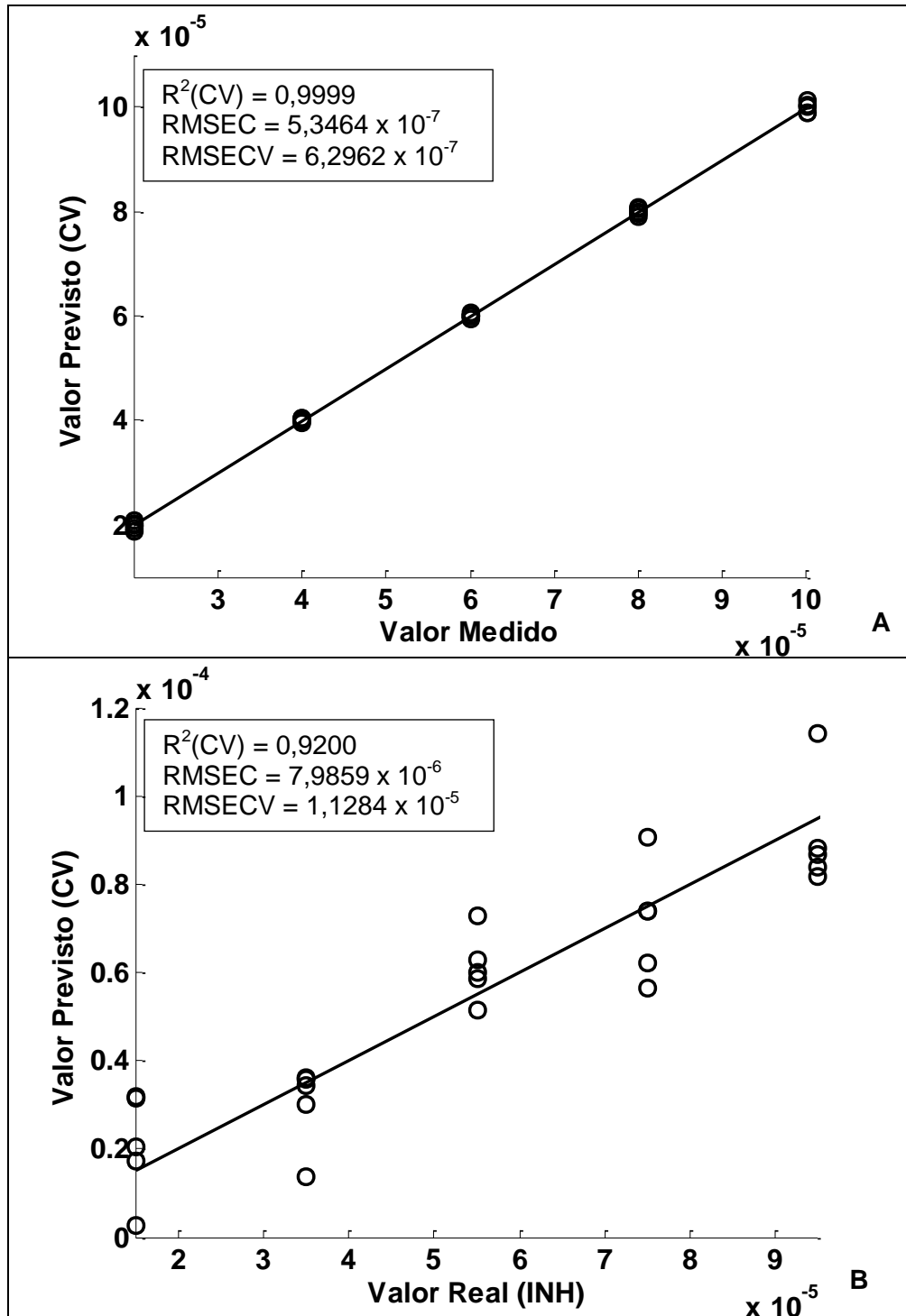


Figura 32: Gráfico de valores reais vs valores previstos para a validação cruzada, valores de coeficientes de regressão ($R^2(CV)$), RMSEC e RMSECV obtidos pelo modelo multivariado para: (A) RIF; (B) INH

Para uma melhor avaliação do modelo construído, uma etapa de validação externa foi realizada. Os valores das concentrações de RIF e INH previstos por esse modelo, bem como os erros relativos e os valores de RMSEP estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados da previsão das concentrações das misturas sintéticas de RIF e INH, reservadas para validação, utilizando o melhor modelo multivariado encontrado para previsão. (concentrações expressas em mol L⁻¹ e erro relativo em %).

Amostra	Concentração real		Concentração prevista		Erro Relativo (%)	
	(mol L ⁻¹)		(mol L ⁻¹) (s*)		RIF	INH
	RIF	INH	RIF	INH		
1 a 3	6,50 x 10 ⁻⁵	5,00 x 10 ⁻⁵	6,62 x 10 ⁻⁵ (2,65 x 10 ⁻⁷)*	6,08 x 10 ⁻⁵ (4,04 x 10 ⁻⁷)*	1,94	21,7
4 a 6	2,25 x 10 ⁻⁵	9,00 x 10 ⁻⁵	2,25 x 10 ⁻⁵ (5,77 x 10 ⁻⁸)*	9,84 x 10 ⁻⁵ (3,0 x 10 ⁻⁷)*	0,04	9,38
7 a 9	2,50 x 10 ⁻⁵	7,50 x 10 ⁻⁵	2,49 x 10 ⁻⁵ (1,53 x 10 ⁻⁷)*	5,08 x 10 ⁻⁵ (2,52 x 10 ⁻⁷)*	-0,47	-32,3
10	4,50 x 10 ⁻⁵	9,00 x 10 ⁻⁵	4,45 x 10 ⁻⁵	9,71 x 10 ⁻⁵	-1,04	7,91
11	3,50 x 10 ⁻⁵	2,00 x 10 ⁻⁵	3,57 x 10 ⁻⁵	2,97 x 10 ⁻⁵	1,93	48,5
12	8,50 x 10 ⁻⁵	3,00 x 10 ⁻⁵	8,76 x 10 ⁻⁵	4,74 x 10 ⁻⁵	3,09	58,1
13	9,50 x 10 ⁻⁵	8,00 x 10 ⁻⁵	1,01 x 10 ⁻⁴	9,20 x 10 ⁻⁵	7,28	15,0
ERRO RELATIVO MÉDIO (%)					2,26	27,5

s* - estimativa do desvio padrão para triplicata

O modelo multivariado construído apresenta baixo erro relativo médio para a determinação de RIF (2,26%), no entanto, para a determinação de INH, os altos erros relativos (erro médio de 27,5%) na sua determinação acompanhado da interpretação do vetor de coeficientes de regressão mostram a baixa capacidade de previsão para quantificação deste fármaco.

5.4 Método Voltamétrico

Em virtude de problemas de adsorção da RIF quando dissolvida em metanol na superfície do eletrodo, optou-se por seguir os estudos dissolvendo este fármaco em água. Como a solubilidade deste fármaco é baixa neste solvente, fez-se necessária a utilização de uma técnica voltamétrica mais sensível para a determinação dos analitos.

A proposta voltamétrica para determinação de RIF e INH foi baseada na utilização de eletrodos de pasta de carbono. Estes sensores eletroquímicos têm sido aplicados com frequência em análises farmacêuticas e biomédicas [FARGHALY *et al*, 2005; FIORUCCI

e CAVALHEIRO, 2002; RADY, 2003], sendo muito atrativos, uma vez que oferecem versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, facilidade de renovação da superfície, além da possibilidade de miniaturização.

5.4.1 Estudo do comportamento eletroquímico de RIF e INH em eletrodo de pasta de carbono

A técnica de voltametria cíclica (VC) foi utilizada para estudar o comportamento eletroquímico dos fármacos de interesse na superfície de um eletrodo de pasta de carbono. No entanto, devido a menor sensibilidade desta técnica, houve a necessidade de utilizar soluções com concentrações maiores de INH e RIF, sendo que neste último caso, isso só é possível empregando-se uma quantidade de metanol. Este tipo de solubilização é incompatível com o uso do eletrodo de pasta de carbono, pois na composição da pasta, utiliza-se óleo mineral como aglutinante, que na presença de solventes orgânicos pode ser parcialmente solubilizado e assim comprometer a compactação do eletrodo de trabalho.

Mantendo-se a concentração de RIF constante ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), a análise por VC deste fármaco em diferentes pH's apresentou um processo redox quase reversível e melhor definido em pH = 4,00, conforme mostrado na Figura 33.

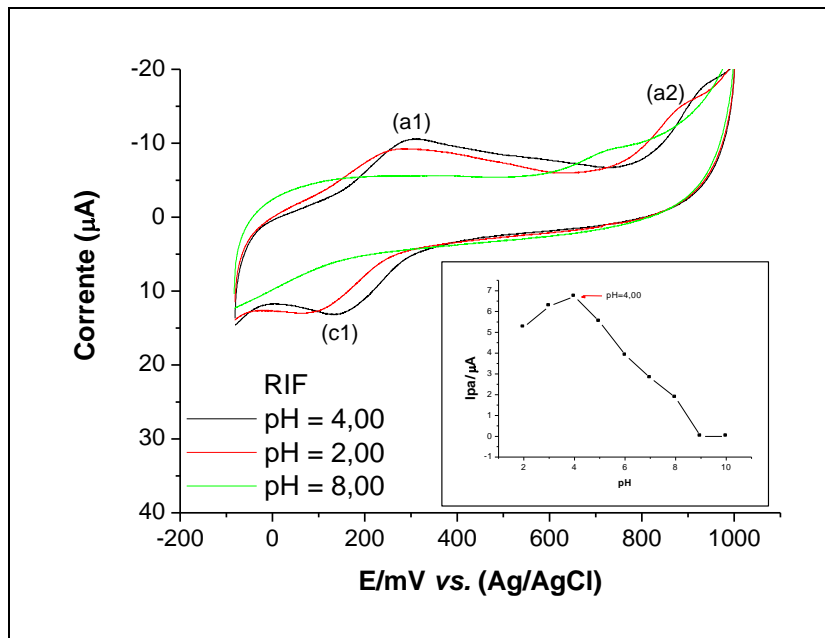


Figura 33: Influência do pH no comportamento voltamétrico da RIF ($5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), no detalhe: influência do pH no I_{pa} para o pico (1a) em 0,305V.

O primeiro pico anódico (a1) ($E_{pa} = 0,305 \text{ V}$) juntamente com o respectivo pico catódico (c1) ($E_{pc} = 0,121 \text{ V}$), pode ser atribuído ao mecanismo que envolve a

transferência de dois prótons e dois elétrons, típico das hidroquinonas [HAMMAM *et al*, 2004] (Figura 34).

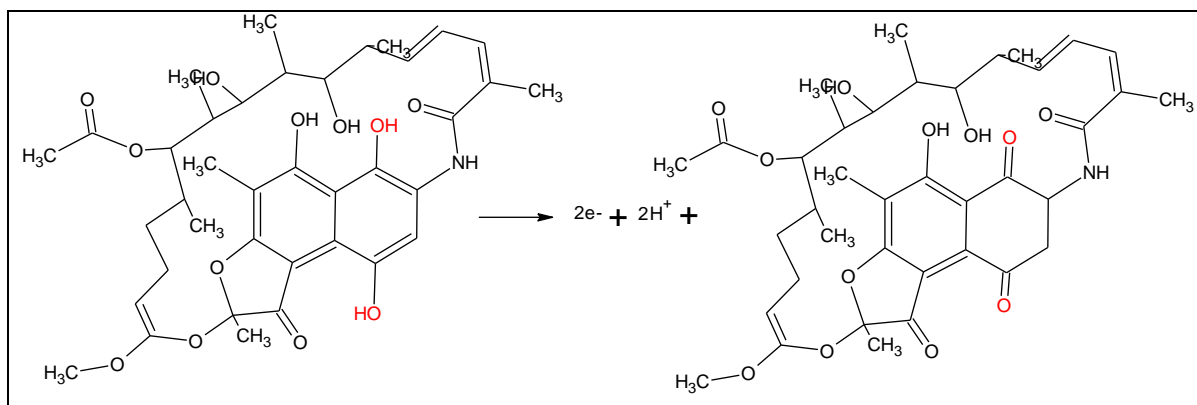


Figura 34: Esquema do primeiro processo de oxidação da RIF (em destaque vermelho) em eletrodo de pasta de carbono (pH = 4,00)

Já o segundo pico anódico (a2), é irreversível e de menor intensidade, o que pode ser decorrente da oxidação do grupo hidroxila fenólico (Figura 35) [HAMMAM *et al*, 2004].

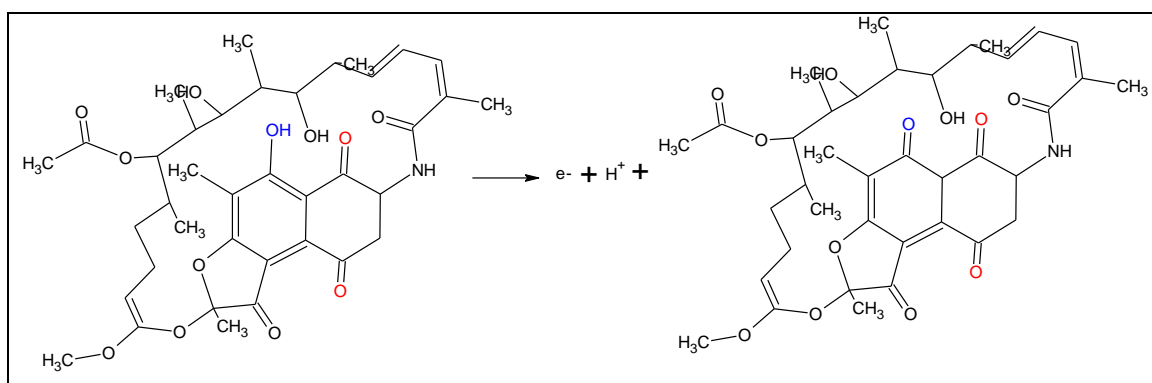


Figura 35: Esquema do segundo processo de oxidação da RIF (em destaque azul) em eletrodo de pasta de carbono (pH = 4,00)

Adicionalmente, na caracterização do processo redox envolvido, este estudo mostrou que além de obter uma maior sensibilidade em pH 4,00, há uma maior reversibilidade do sistema ($\Delta E = 184$ mV), quando comparado com os resultados obtidos para o pH 5,00 e 8,00.

Este mesmo estudo foi realizado para a INH, mantendo-se a concentração do fármaco constante (5×10^{-4} mol L⁻¹) (Figura 36).

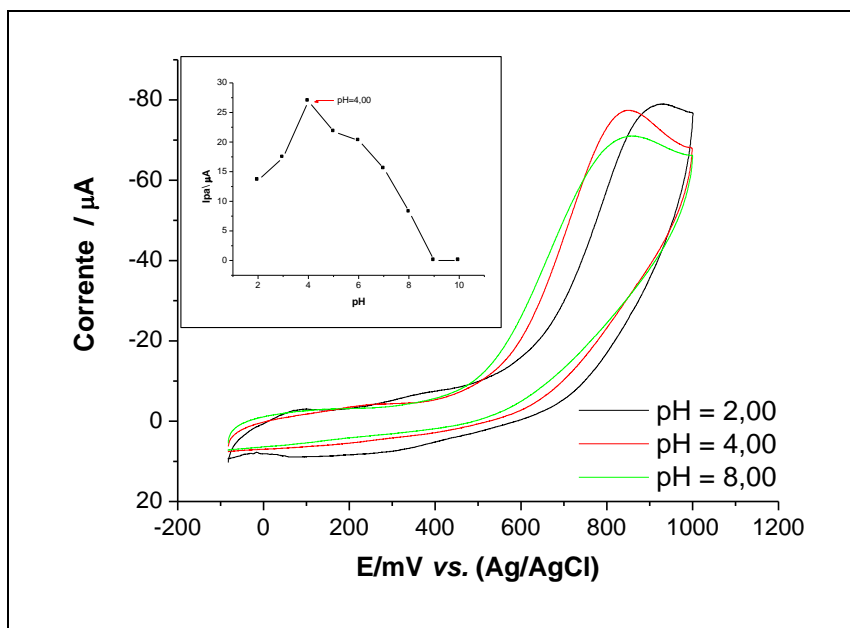


Figura 36: Influência do pH na corrente de pico anódica (I_{pa}) para a INH ($5,00 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) em eletrodo de pasta de carbono.

A análise por VC mostrou um único processo totalmente irreversível ($E_{pa} = 0,903$ V) envolvendo dois elétrons que pode ser atribuído a oxidação da amida da molécula de INH [MAJIDI *et al*, 2006] (Figura 37). Coincidentemente, os maiores valores de I_{pa} foram obtidos também em pH 4,0 decrescendo com o aumento do pH.

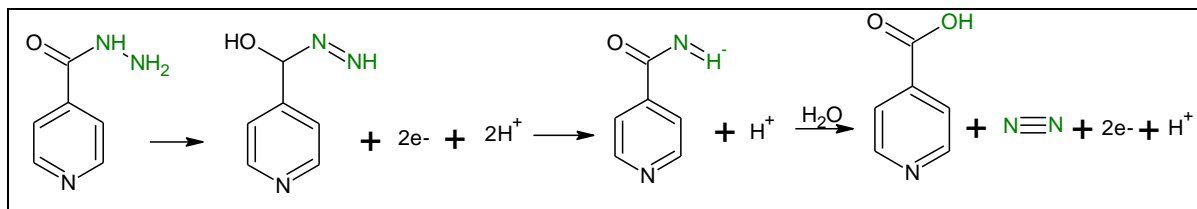


Figura 37: Esquema do processo de oxidação da INH (em destaque verde) em eletrodo de pasta de carbono (pH = 4,00) [MAJIDI *et al*, 2006]

Para caracterizar o processo envolvido na interface eletrodo-solução para RIF e INH conforme mostra a Figura 38, um estudo da influência da velocidade de varredura na corrente de pico anódico foi realizado.

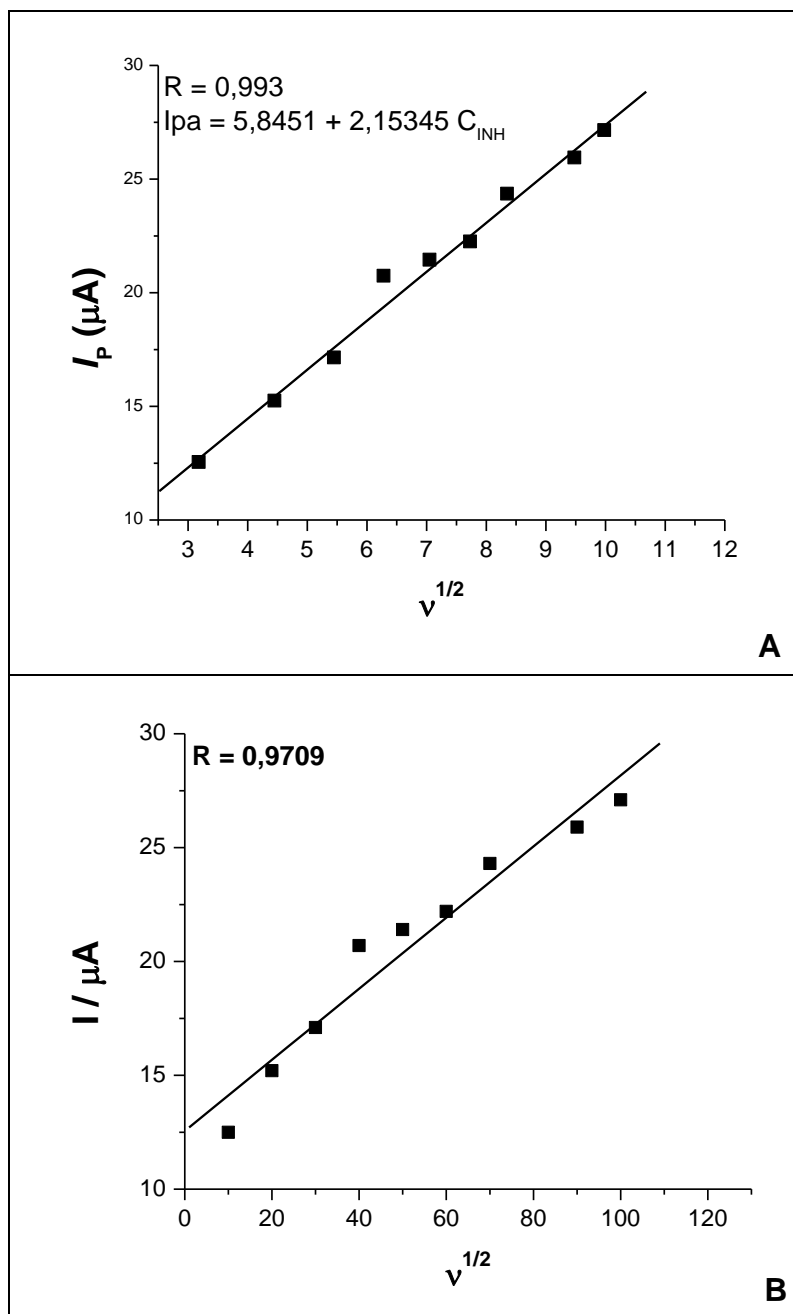


Figura 38: Estudo da I_p vs a raiz quadrada da velocidade de varredura; (A) INH; (B) RIF.

Em ambos os casos, a relação linear obtida ($R = 0,996$ para a RIF e $R = 0,993$ para a INH) indica um processo difusional das espécies eletroativas na interface eletrodo-solução.

De acordo com esses resultados, foi possível observar o comportamento voltamétrico reversível da RIF e irreversível da INH, caracterizados por um processo difusional das espécies eletroativas na interface eletrodo-solução. Ambos os fármacos apresentam sinais voltamétricos melhores em pH 4 (tanto em termos de sensibilidade, quanto de reversibilidade dos sistema para RIF) e uma ampla faixa de separação entre

os picos anódicos (aproximadamente 0,600 V) o que deve possibilitar a determinação de RIF e INH através de métodos convencionais de calibração.

5.4.2 Estudos utilizando voltametria de onda quadrada (SWV)

Tendo em vista o problema de solubilidade da RIF e a certa incompatibilidade do metanol com o eletrodo de trabalho, optou-se pela utilização de uma das técnicas voltamétricas mais sensíveis, ou seja, a voltametria de onda quadrada. Assim, ambos os fármacos foram dissolvidos somente em água destilada e analisados via SWV (Figura 39).

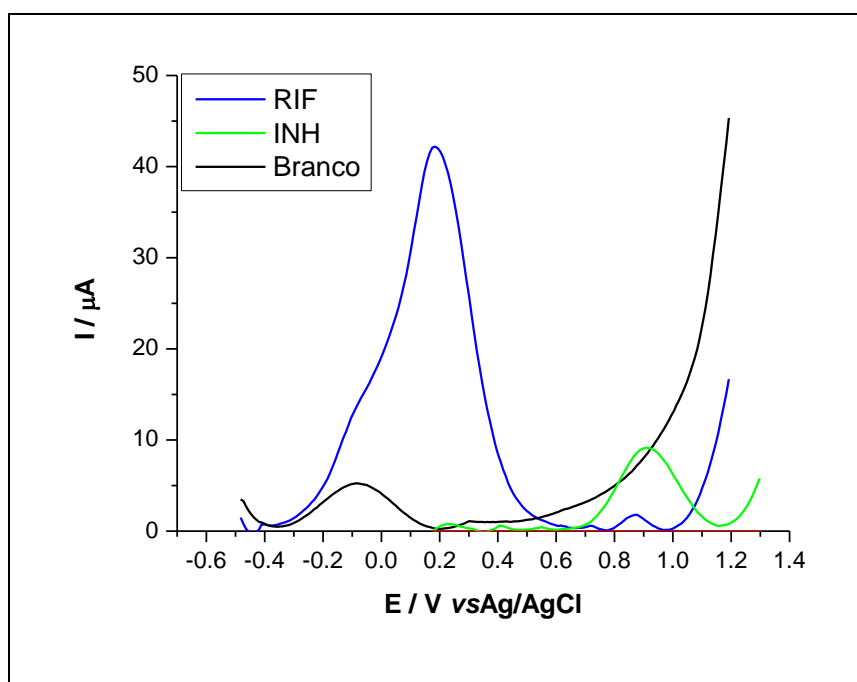


Figura 39: Comportamento voltamétrico (SWV) da RIF e INH em eletrodo de pasta de carbono.

Embora tenha sido adotada uma modificação no solvente utilizado para solubilização da RIF, é possível observar que não ocorreram grandes modificações no comportamento voltamétrico deste fármaco. Em pH 4,00 a RIF mostra duas correntes de pico ($E_{p1} = 0,180$ V e $E_{p2} = 0,871$ V), enquanto que a INH apresenta apenas uma corrente de pico em 0,910 V. Apesar da segunda corrente de pico da RIF (em E_2) ser muito próximo ao pico da INH, ele apresenta pequena intensidade, indicando que o mesmo não terá tanta influência na determinação univariada da INH. Os picos de maior intensidade para ambos os fármacos apresentam potencial de oxidação distantes ($\Delta E_{pa} = 0,730$ V), fato que gera indícios da possibilidade de determinação dos dois fármacos em mistura.

Com a finalidade de maximizar o sinal analítico dos fármacos utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV), a resposta do eletrodo de pasta de carbono foi avaliada em relação ao pH e condições instrumentais da técnica. Essas medidas foram realizadas em solução $1,67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do fármaco e o efeito do pH sobre o potencial de pico (E_p) e da corrente de pico (I_p) da RIF foi examinado em eletrólito suporte Britton-Robinson, com o pH ajustado entre 2,00 a 8,00. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 40.

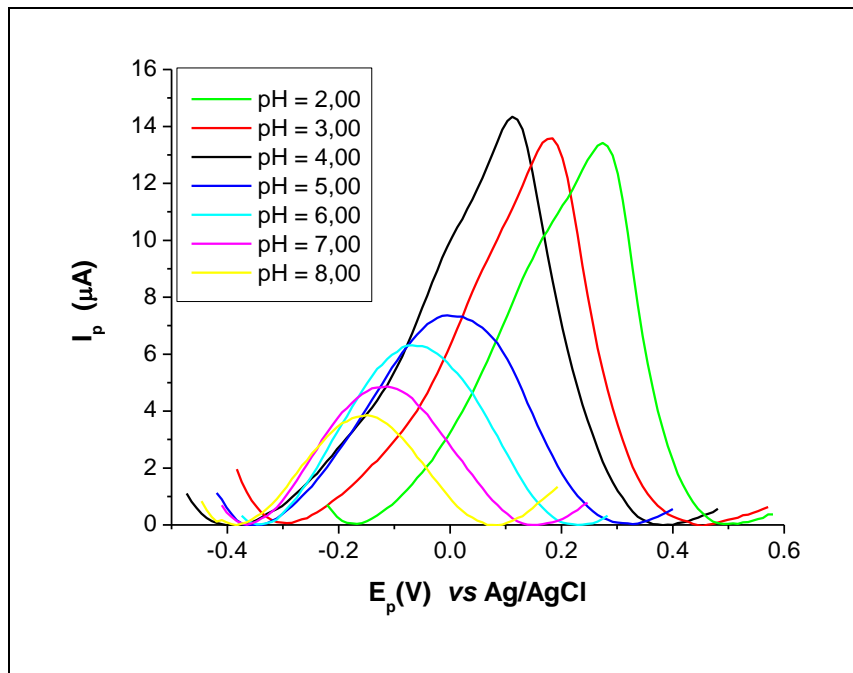


Figura 40: Comportamento Voltamétrico (SWV) da RIF em diversos pHs em eletrodo de pasta de carbono.

A Figura 41 representa a influência do pH nos dados de potencial (E) e corrente de pico (I) para o processo redox da RIF.

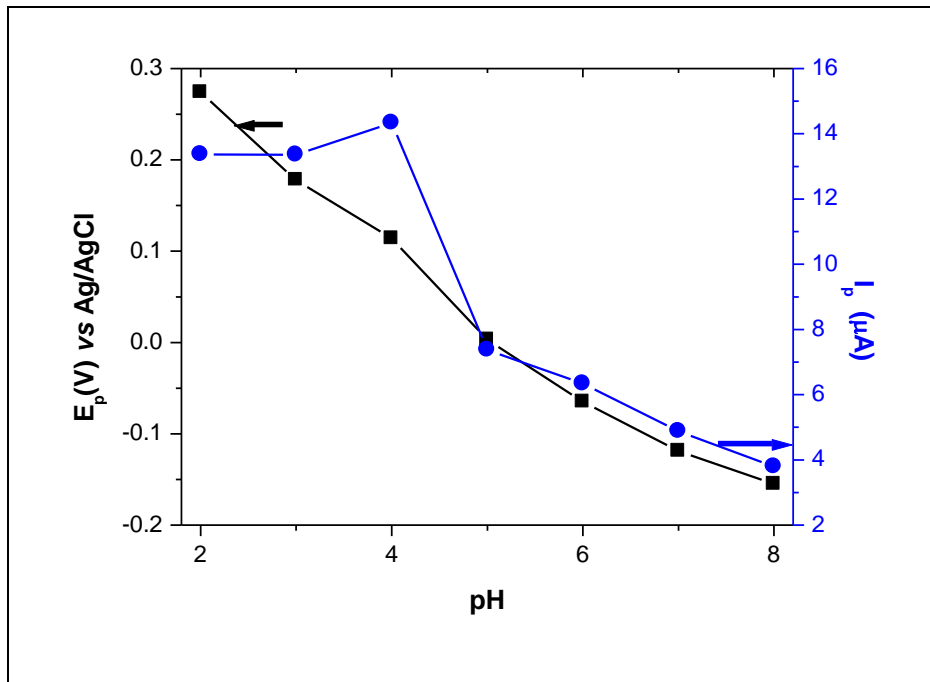


Figura 41: Evolução do I_p (em azul) e do E_p (em preto) em função do pH para a resposta voltamétrica da RIF em eletrodo de pasta de carbono.

É possível observar que o aumento do pH promoveu uma mudança no E_p para valores menos positivos em uma relação linear. Esse resultado mostra que o processo é dependente da concentração hidrogeniônica do meio e a etapa de transferência de elétrons é precedida por uma protonação.

Por outro lado, a dependência de pH vs I_p revelou que o pico de corrente tem um valor máximo de pH 4,00 (Figura 41) diminuindo em ambas as direções, tanto para pHs maiores quanto para menores. Por este motivo todos os experimentos posteriores utilizando o eletrodo de pasta de carbono foram realizados em pH 4,00.

O mesmo estudo foi realizado para a INH ($4,50 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), sendo que a Figura 42 apresenta o comportamento voltamétrico da INH em função do pH.

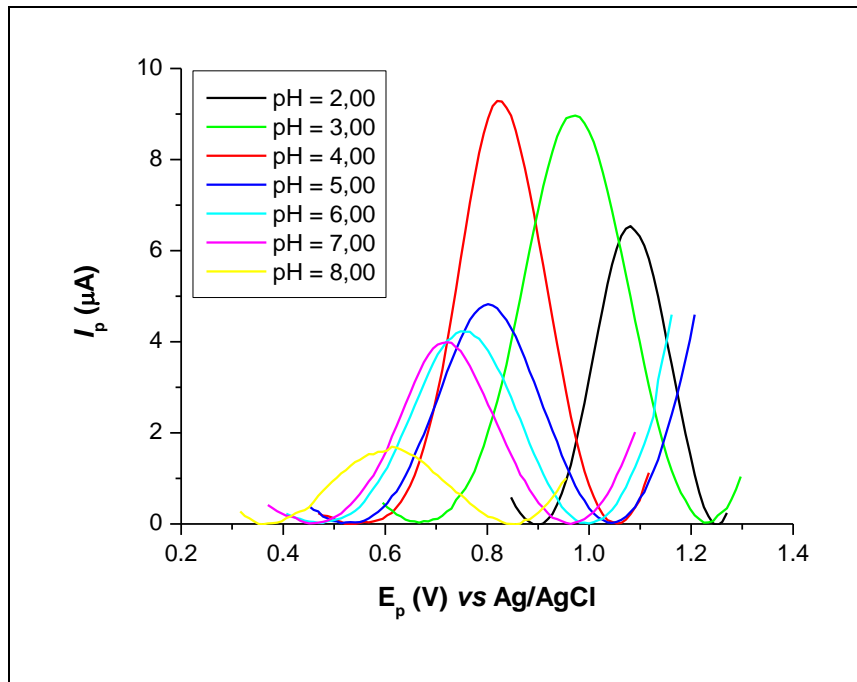


Figura 42: Comportamento Voltamétrico (SWV) da RIF em diversos pHs em eletrodo de pasta de carbono.

A Figura 43 representa a influência do pH no E e I para a determinação de INH em eletrodo de pasta de carbono.

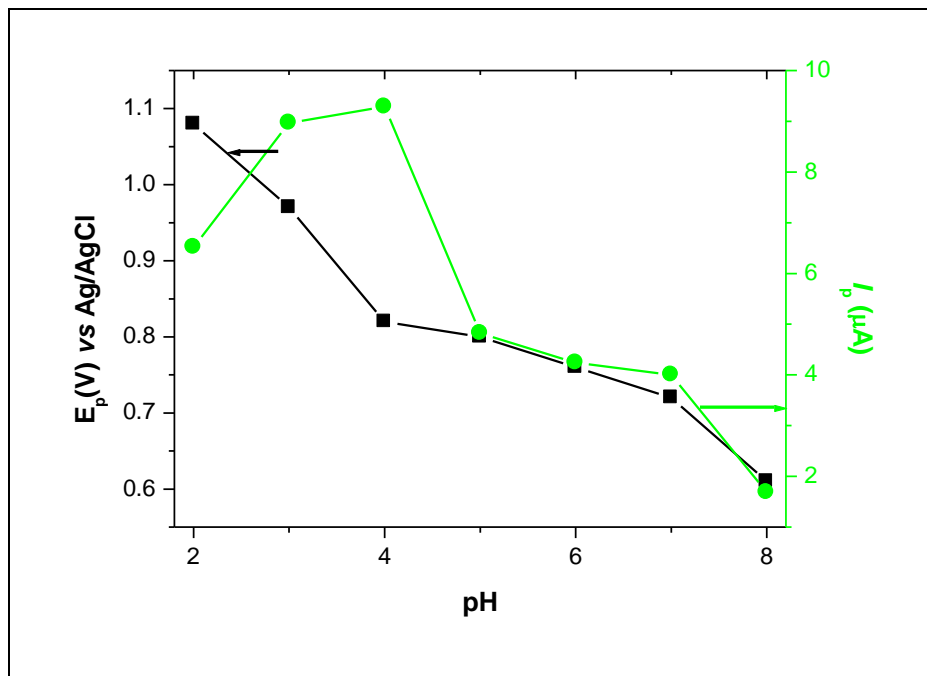


Figura 43: Evolução do I_p (em verde) e do E_p (em preto) em função do pH para a resposta voltamétrica da INH.

De acordo com a Figura 42, observa-se que o comportamento da INH assemelha-se ao comportamento da RIF onde, o aumento da pH promoveu uma mudança no E_p para valores menos positivos em uma relação linear. Sendo assim, a mesma interpretação do mecanismo redox da RIF pode ser utilizada para a INH. Outro fator coincidente foi a dependência de pH vs I, que revelou um valor máximo de corrente em pH 4,00, conforme mostrado na Figura 43. Assim, a partir deste estudo todos os ensaios foram realizados em tampão Britton-Robinson (pH = 4,00).

5.4.2.1 Otimização dos parâmetros operacionais da voltametria de onda quadrada

Para obter as melhores correntes de pico para a determinação de RIF e INH, dois planejamentos fatoriais foram realizados. No caso da RIF empregou-se uma concentração fixa de $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto para INH a concentração utilizada foi de $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em decorrência das menores intensidades de pico, em ambos os planejamentos, o pH 4,00 das soluções aquosas foi mantido pela utilização de uma solução tampão Britton-Robinson, e as respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18: Planejamento Fatorial para a otimização dos parâmetros instrumentais para a determinação de RIF e INH por Voltametria de onda Quadrada em eletrodo de pasta de carbono.

Ensaio	Parâmetro	Frequência	$E_{\text{Amplitude}}$ (V)	E_{step} (V)	$I_p / \mu\text{A}$	$I_p / \mu\text{A}$
		(Hz)			RIF	INH
01		-1	-1	-1	12,32	7,07
02		+1	-1	-1	12,35	7,14
03		-1	+1	-1	13,33	8,08
04		+1	+1	-1	13,95	8,66
05		-1	-1	+1	13,72	8,25
06		+1	-1	+1	14,32	8,30
07		-1	+1	+1	14,08	8,21
08		+1	+1	+1	14,47	9,22
09		0	0	0	14,02	8,91
10		0	0	0	14,02	8,75
11		0	0	0	14,05	8,61

Os efeitos dos fatores obtidos neste planejamento estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Efeitos dos fatores: Frequência, amplitude de pulso e potencial de step para a determinação voltamétrica de RIF e INH em eletrodo de pasta de carbono utilizando Voltametria de onda quadrada e estimativa do desvio padrão para os ensaios realizados em triplicata.

Fatores	INH	RIF
Frequência	0,4281	0,4115
$E_{\text{amplitude}}$	0,8545	0,7802
E_{step}	0,3674	-0,0939
Frequência vs $E_{\text{amplitude}}$	0,7552	1,1634
Frequência vs E_{step}	- 0,0978	- 0,0829
$E_{\text{amplitude}}$ vs E_{step}	0,4116	0,5229
$E_{\text{amplitude}}$ vs Frequência vs E_{step}	- 0,1130	- 0,1979
$S = x t_{95\%, \sigma=2}$	0,5133	0,0610

Para o planejamento realizado para a otimização das condições experimentais para a INH e pelos cálculos dos efeitos e considerando-se a estimativa do desvio de 0,5133 ($\delta \times t_{95\%, \sigma=2}$), pode-se constatar que somente o efeito principal da $E_{\text{amplitude}}$ e o efeito de interação que envolve a frequência e $E_{\text{amplitude}}$ são significativos.

Já para o planejamento realizado para a otimização das condições experimentais para a RIF, todos os efeitos principais, bem como os efeitos de interação são significativos no nível de 95% de confiança. Assim, considerando-se o efeito de interação de terceira ordem, observa-se que uma melhor sensibilidade é obtida nos níveis máximos dos fatores estudados. Como para a INH a resposta otimizada ocorre nos maiores valores de $E_{\text{amplitude}}$ e frequência, sem efeito do E_{step} , considerou-se para os demais ensaios o nível +1 de todos os fatores para a determinação desejada.

Para ambos os fármacos, a melhor resposta foi obtida nos níveis positivos para todos os fatores. Um deslocamento deste planejamento para avaliar valores superiores dos parâmetros analisados, não pôde ser realizado devido ao aumento da intensidade dos ruídos no sinal voltamétrico. Todos os experimentos posteriores foram realizados nas condições otimizadas, ou seja: pH = 4,00; amplitude de pulso = 0,09 V; frequência = 30 Hz; potencial de step = 0,009 V.

5.4.3 Aplicação analítica

5.4.3.1 Curva Analítica individual

A linearidade da corrente de pico para a RIF foi avaliada na faixa de concentração de $4,00 \times 10^{-7}$ a $5,40 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (Figura 44).

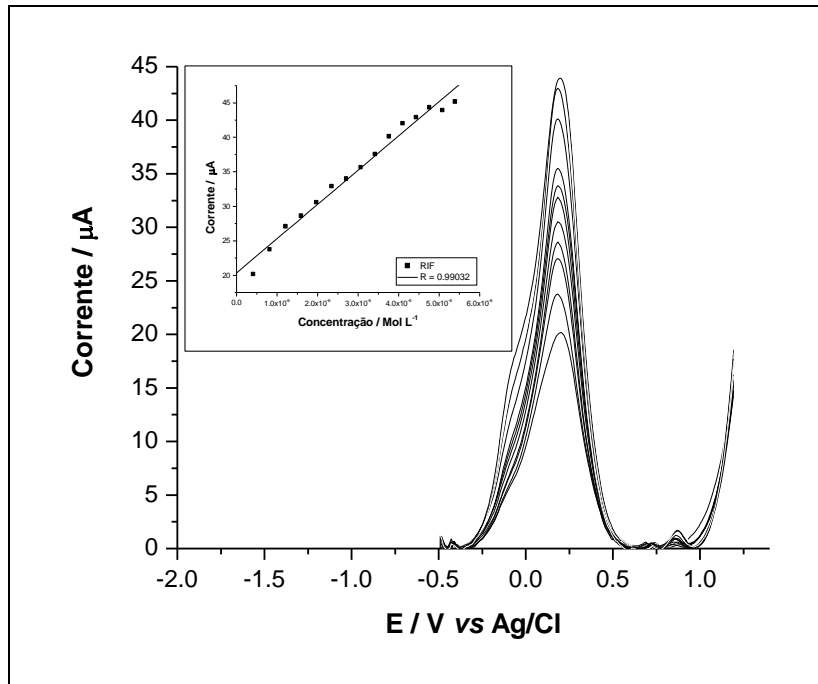


Figura 44: Comportamento voltamétrico e curva analítica para a determinação individual de RIF em eletrodo de pasta de carbono nas condições: pH = 4,00; amplitude de pulso = 0,09 V; frequência = 30 Hz; potencial de step = 0,009 V.

Observa-se uma excelente linearidade ($R = 0,99032$; $I_p = 20,3912 + 4,9642 \times 10^6 C_{RIF}$) em uma ampla faixa de concentração. O mesmo estudo foi realizado para a INH (Figura 45) na faixa de concentração de $2,00 \times 10^{-4}$ a $5,80 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Para este analito, a faixa de concentração estudada foi mais estreita, uma vez que nas maiores concentrações de INH em solução é possível perceber a saturação do eletrodo.

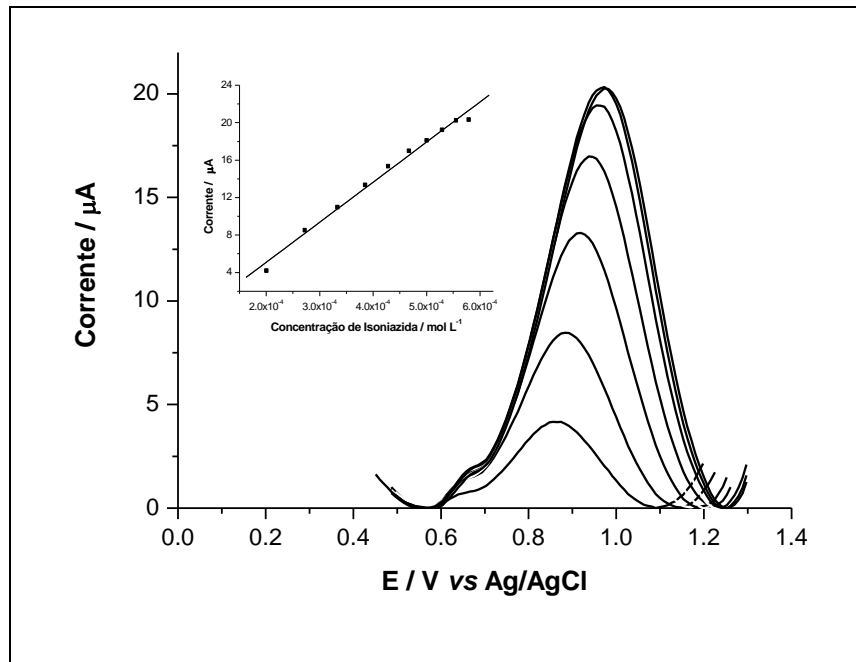


Figura 45: Comportamento voltamétrico e curva analítica para a determinação individual de INH em eletrodo de pasta de carbono nas condições: pH = 4,00; amplitude de pulso = 0,09 V; frequência = 30 Hz; potencial de step = 0,009 V

Obeve-se uma excelente linearidade na faixa de concentração estudada ($R=0,9951$; $I_p = 3,4386 + 42781,95 C_{INH}$). No entanto, observou-se uma maior sensibilidade para a determinação de RIF visto que o coeficiente angular da equação da reta é mais de 100 vezes superior que o mesmo parâmetro da equação da INH.

Para ambas as curvas analíticas construídas, foram obtidas coeficientes de correlação superiores a 0,99. Utilizando-se as curvas analíticas, construiu-se o método de adição de padrão para ambos os fármacos. Esse método desenvolvido foi aplicado para a determinação de RIF e INH em associação farmacêutica, sem a necessidade de pré-tratamento ou extração antes das análises.

A Figura 46 mostra os voltamogramas obtidos e a curva de adição de padrão em triplicata (no detalhe) para a determinação individual de RIF na formulação farmacêutica em forma de cápsulas para o medicamento A (MED A).

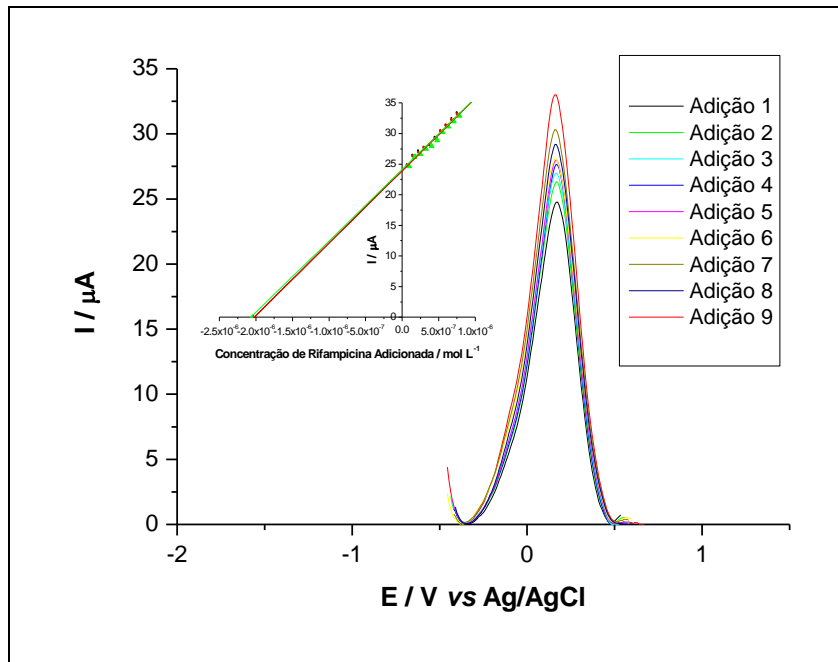


Figura 46: Comportamento voltamétrico da RIF e curva de adição de padrão em triplicata (no detalhe) para o medicamento MED A.

A Figura 47 mostra o comportamento voltamétrico e a curva de adição de padrão em triplicata (no detalhe) para a determinação de INH. Neste caso, está representado apenas a determinação da formulação farmacêutica em cápsulas MED A.

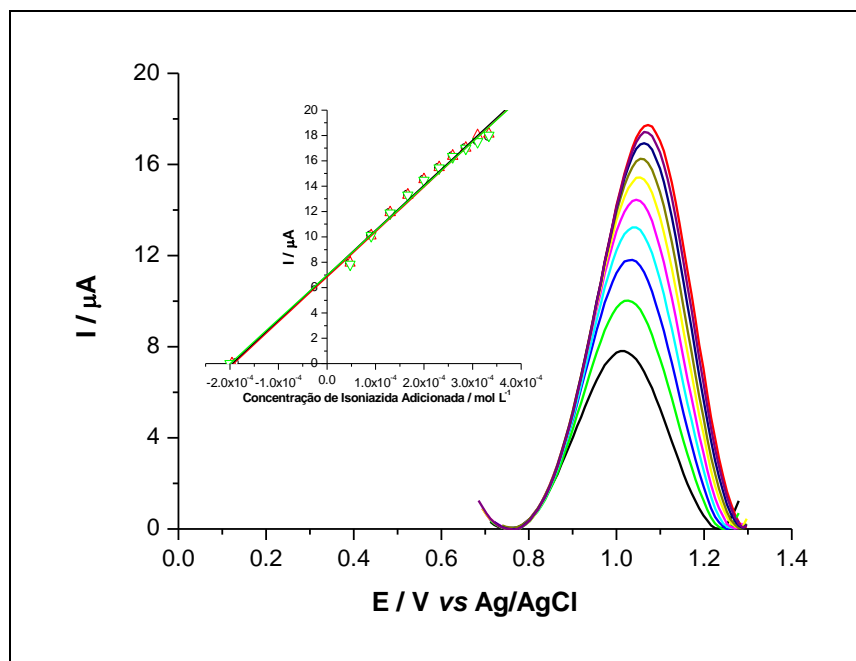


Figura 47: Comportamento voltamétrico da INH e curva de adição de padrão em triplicata (no detalhe) para o medicamento MED A.

Os resultados das determinações de RIF e INH através do método de adição de padrão foram comparados aos obtidos através do método farmacopeico (Tabela 20).

Tabela 20: Valores previstos pelo método voltamétrico desenvolvido e erro relativo médio em relação ao valor determinado pelo método padrão farmacopeico.

VALOR HPLC		VALOR PREVISTO (SWV)*		ERRO RELATIVO (%)	
RIF	INH	RIF	INH	RIF	INH
299,04	205,02	305,79 ± 2	233,10 ± 6	2,26	13,69
153,17	101,22	157,49 ± 2	115,15 ± 7	2,82	13,76
325,05	199,15	312,42 ± 6	217,24 ± 1	-3,89	9,08
169,71	108,75	154,87 ± 5	128,01 ± 6	-8,74	17,71

* Valores médios obtidos para triplicata e estimativa do desvio padrão

Estes resultados indicam que a determinação de RIF pelo método de adição de padrão via SWV, apresenta melhor exatidão que a determinação de INH. Este fato pode estar correlacionado com o deslocamento do potencial de pico observado com o aumento da concentração de INH (Figura 45), e principalmente decorrente da menor sensibilidade (coeficiente angular da curva analítica) e precisão (maiores valores de estimativa do desvio padrão) do método voltamétrico para a determinação deste fármaco.

Além disso, comparando-se os resultados do método voltamétrico utilizado (erro relativo médio de 4,43% para RIF e 13,6% para INH) e o melhor método espectrofotométrico multivariado na região do visível (erro relativo médio de 1,78% para RIF e 3,45% para INH), é possível observar uma menor exatidão do método de SWV.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Três propostas foram avaliadas como alternativas para o controle de qualidade de medicamentos contendo a associação Rifampicina e Isoniazida:

Proposta 1: Utilização de Cu (II) e Neocuproina para a determinação espectrofotométrica simultânea na região do visível

1. A determinação indireta de INH foi otimizada em relação ao pH e a concentração de um dos agentes complexantes. Resultados de maior sensibilidade foram obtidos em condição de maior pH (6,0) e maior concentração de Cu (II). Mesmo após a derivatização química, problemas de sobreposição espectral são observados e, portanto várias metodologias de calibração (convencional e multivariada) foram empregadas.

2. Os problemas de interferência espectral observados entre RIF e INH inviabilizam a determinação de suas misturas, utilizando-se modelos de calibração univariados convencionais, métodos derivativos ou princípio da aditividade espectrofotométrica, propiciaram erros relativos médios muito elevados (acima de 76,2 %) para a determinação dos fármacos de interesse.
3. O modelo de calibração elaborado via PLSR apresenta uma melhor capacidade de previsão ($E_r = 1,63\%$ para RIF e $1,82\%$ para INH) quando comparados com os métodos de calibração convencionais.
4. Na fase de validação segundo os critérios da ANVISA este modelo apresentou boa exatidão, especificidade em relação à matriz, repetibilidade e precisão adequadas. A leitura espectrofotométrica das soluções contendo a associação RIF e INH em temperaturas superiores a $30\text{ }^\circ\text{C}$ e/ou 2 horas de preparo aumenta a margem de erro para a determinação de ambos os fármacos influenciando diretamente a capacidade de previsão do modelo.
5. De modo geral, pode-se considerar que este método atende aos requisitos necessários, apresentando boa capacidade de previsão em amostras reais e possui como principal vantagem uma maior especificidade, rapidez, baixo custo, fácil implementação.
6. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de RIF e INH em matrizes biológicas (urina e soro humano sintético) obtendo-se recuperações próximas a 100% em todas as análises, sem a necessidade de tratamento prévio da amostra, e, portanto, pode ser empregado como um método auxiliar nas análises de urina de pacientes em tratamento, podendo contribuir no monitoramento e na aplicação de medidas terapêuticas de combate a doença.

Proposta 2: Utilização de Fe (III) e o-fenantrolina para a determinação espectrofotométrica simultânea na região do visível:

1. O modelo de calibração PLSR apresentou boa capacidade preditiva para a RIF (erro relativo médio $2,30\%$), porém apresenta altos erros relativos para a determinação de INH ($27,82\%$). Para este último fármaco, há indícios de que o modelo não considerou a informação analítica do complexo Fe (II) - o-Fen, provavelmente em decorrência da formação de diversos complexos de grande absorvidade molar, principalmente com a RIF. Assim, o complexo que

caracteriza indiretamente a INH sofre uma reação secundária que dificulta a construção de um modelo robusto e confiável para INH, o que inviabiliza a determinação simultânea dos fármacos em associação.

Proposta 3: Determinação voltamétrica

1. Utilizando-se eletrodo de pasta de carbono e a técnica de voltametria cíclica observou-se o comportamento voltamétrico quase reversível da RIF e irreversível da INH, caracterizados por um processo difusional das espécies eletroativas na interface eletrodo-solução.
2. Ambos os fármacos apresentam uma corrente de pico anódica mais intensa (RIF e INH) e reversível (RIF) em pH 4,00, com uma ampla faixa de separação entre os picos anódicos tanto utilizando a voltametria cíclica quanto a voltametria de onda quadrada.
3. A incompatibilidade do uso de eletrodo de pasta de carbono e metanol (solvente utilizado para solubilizar uma maior quantidade de RIF) gerou a necessidade do uso da voltametria de onda quadrada, como método para a determinação desejada. Além disso, a sensibilidade da técnica voltametria de onda quadrada é superior à sensibilidade da voltametria de pulso diferencial.
4. A melhor resposta para ambos os analitos é obtida em pH 4,00 utilizando os parâmetros instrumentais fixos em 30 Hz para a frequência, 0,09 V para potencial de amplitude de pulso e 0,009 V para potencial de step. Nestas condições a corrente de pico cresce linearmente com as seguintes faixas de concentração: $4,00 \times 10^{-7}$ a $5,40 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (RIF) e de $2,00 \times 10^{-4}$ a $5,80 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (INH).
5. Pelo uso do método de adição de padrão foi possível determinar voltametricamente a concentração dos analitos em formulações farmacêuticas. No entanto, em comparação com o método padrão farmacopeico, os resultados não foram satisfatórios para a determinação de INH (erros de determinação superiores a 10%).

Concluindo, a proposta 1 mostrou-se mais adequada para a quantificação dos tuberculostáticos rifampicina e isoniazida em amostras farmacêuticas e em urina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-MOMANI, I. F. Flow Injection Spectrophotometric Determination of the Antibacterial Levofloxacin in Tablets and Human Urine. *Analytical Letters*, vol. 39, **2006**, pgs. 741-750.
- ANVISA - Resolução RE nº 475, de 19 de marco de 2002. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, **2003**.
- ARAÚJO, M. G.; Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 36, **2003**, pgs. 373-382.
- 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. 1645-1650.
- BARSOUM, B. N.; KAMEL M. S.; Diab, M. M.A. Spectrophotometric Determination of Isoniazid and Rifampicin from Pharmaceutical Preparations and Biological Fluids. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, vol. 4, **2008**, pgs.471-484.
- BENAMOR, M.; AGUERSSIF, N. Simultaneous determination of calcium and magnesium by derivative spectrophotometry in pharmaceutical products. *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 69, **2008**, pgs. 676-681.
- BERGAMINI, M. F.; SANTOS, D. P.; ZANONI, M.B. Determination of isoniazid in human urine using screen-printed carbon electrode modified with poly-L-histidine. *Bioelectrochemistry*, vol. 77, **2010**, pgs. 133–138.
- BLANCHARD, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 65, **1996**, pgs. 215-239.
- BORDBAR, M.; YEGANEH-FAAL, A.; GHASEMI, J.; AHARI-MOSTAFAVI, M. M.; SARLAK,N.; BAHARIFARD, M. N. Simultaneous spectrophotometric determination of minoxidil and tretinoin by the H-point standard addition method and partial least squares. *Chemical Papers*, vol. 63, **2009**, pgs. 336–344.
- BRAININA, K. H. Advances in Voltammetry. *Talanta*, vol. 34, **1987**, pgs. 41- 50.
- BRO, R. Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist? *Analytica Chimica Acta*, vol. 500; **2003**, pgs.185-194.

- BRUNS, R. E., SCARMINIO I.S. BARROS NETO, B., Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria; 2ª Ed; Campinas; SP: Editora da UNICAMP; 2003.
- CALLERI, E.; LORENZI, E.; FURLANETTO, S.; MASSOLINI, B. G.; CACCIALANZA, G. Validation of a RP-LC method for the simultaneous determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in a pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 29, **2002**, pgs. 1089–1096.
- CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M.V.; TEIXEIRA, R.M.; Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos antitoxoplasma gondii e diagnóstico. *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 46, **2000**; pgs. 335-41.
- CARVALHO, L. M.; Voltammetric behavior of amfepramone (diethylpropion) at the hanging mercury drop electrode and its analytical determination in pharmaceutical formulations. *Journal of Brazilian Chemical Society*, vol. 18, **2007**, pgs. 789-796.
- CARVALHO, R.M.; MELO, C.; KUBOTA, L.T. Simultaneous determination of phenol isomers in binary mixtures by differential pulse voltammetry using a carbon fibre electrode and neural network with pruning as a multivariate calibration tool. *Analytica Chimica Acta*, vol. 420, **2000**, pgs. 109-121.
- DU, L.; WU, L.; LU, J.; GUO, W.; MENG, Q.; JIANG, C.; SHEN, S.; TENG, L. 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, **2007**, pgs. 518-523.
- DUCATTI, R. G.; RUFFINO-NETO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The resumption of consumption - A review on Tuberculosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, **2006**, pgs. 697-714.
- DURÁN MERÁS I.; GALEANO DÍAZ T.; ALEXANDRE FRANCO M.; Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta*, **2005**, vol. 65(1), pgs. 7-14.
- EIRAS S.P., COSCIONE A.R., ANDRADE J.C., CUSTODIO R., Métodos de otimização em química. Criado em 1999. Disponível em: [HTTP://www.chemkeys.com/artigo/9/89/#](http://www.chemkeys.com/artigo/9/89/#); acesso em 29 de dezembro de 2010.

- EL-BRASHY, A. M.; IBRAHIM, F. A.; EL-ASHRY, S. M. Colorimetric determination of some important hydrazine derivatives. *Microchimica Acta*, vol. 105, **1991**, pgs. 105–110.
- EL-HEFNAWAY, G. B. Voltammetric behavior and qualification of the sedative-hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.34, **2004**, pgs 75-86.
- 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, **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, **2001**, pgs. 129-136.
- FANG, P.; DELI, H.; HUAZHU, R.; YOUTAN, Q.; XU, W. P.; PINGLIU, Y.; YUANZHANG, W.; CHANGCHEN, Y.; ZHANG, F. Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, levofloxacin in mouse tissues and plasma by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, vol. 878, **2010**, pgs. 2286–2291.
- FARGHALY, O. A.; TAHER, M. A.; NAGGAR, A. H.; EL-SAYED, A. Y. Square wave anodic stripping voltammetric determination of metoclopramide in tablet and urine at carbon paste electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol 38, **2005**, pgs. 14-20
- 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. 669-677.

- FIGUEIRÓ, R.; GIL-AZEVEDO, L. H.; The role of neotropical blackflies (diptera: simuliidae) as vectors Of the onchocerciasis: a short overview of the ecology behind the Disease. *Oecologia Australis*, vol. 14, **2010**, pgs. 745-755.
- FIORUCCI, A. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of carbon paste electrode in the direct voltammetric determination of tryptophan in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 28, **2002**, pgs. 909-915.
- GAITONDE, C. D.; PATHAK, A. C. Rapid and sensitive estimation of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in combined dosage form by reversed phase liquid chromatography. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 17, **1991**, pgs. 1201-1214.
- GARCIA, M. G.; GARCIA, A.; GONZALEZ, I. Extration and electrochemical quantification of the active ingredient (diazepam) in pharmaceutical products. *Talanta*, vol. 40, **1993**, pgs. 1775-1779.
- GARRIDO FRENICH, F. J.; ARREBOLA LIÉBANAS, M.; MATEU-SÁNCHEZ, MARTINEZ VIDAL, J. L. Multicomponent determination of pesticides in vegetables by gas chromatography with mass spectrometric detection and multivariate calibration. *Talanta*, vol. 60, **2003**, pgs. 765-774.
- GHASEMI, J.; NIAZI, A. Two- and three-way chemometrics methods applied for spectrophotometric determination of lorazepam in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, vol. 533, **2005**, pgs. 169-177.
- GIKAS, E.; BAZOTI, F. N.; NOURGIAKIS, P.; PERIVOLIOTI, E.; ROUSSIDIS, A.; SKOUTELIS, A.; TSARBOPOULOS, A. Simultaneous quantification of daptomycin and rifampicin in plasma by ultra performance liquid chromatography: Application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 51, **2010**, pgs. 901–906.
- 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.
- GOYAL, R. N.; OYAMA, M.; SINGH, S. P. Fast determination of salbutamol, abused by athletes for doping, in pharmaceutical and human biological fluids by square wave voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 611, **2007**, pgs. 140-148.

- GUARRIGUES, S.; ANDRADE, J. M.; LA GUARDIA; M.; PRADA, D. Multivariate calibrations in Fourier transform infrared spectrometry for prediction of kerosene properties. *Analytica Chimica Acta*, vol. 317, **1995**, pgs. 95-105.
- 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.
- HOLTEZ, F. B.; PESSINI, G. L. SANCHES. W. R.; CORTEZ D. A. G. NAKAMURA C. V. DIAS B. P.; Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **2002**, Vol 97(7), pgs. 1027-1031.
- KATZ, N.; ALMEIDA, K.; Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, vol. 55, **2003**, pgs. 38-41.
- KHUHAWAR, M. Y.; RIND, F. M. A. Liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood. *Journal of Chromatography B*, vol. 766, **2002**, pgs. 357-363.
- KLOPMAN, G.; FERCU, D.; JACOB, J. Computer-aided study of the relationship between structure and antituberculosis activity of a series of isoniazid derivatives. *Chemical Physics*, vol. 204, **1996**, pgs. 181-193.
- LAVORANTE, A. F.; PIRES, C. K.; REIS, B. F. Multicommuted flow system employing pinch solenoid valves and micro-pumps. Spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 42, **2006**, pgs. 423–429.
- LEE M. J.; SEO D.Y.; LEE H.E.; WANG I.C.; KIM W.S.; JEONG M.Y.; CHOI G. J.; In line NIR quantification of film thickness on pharmaceutical pellets during a fluid bed coating process. *International Journal of Pharmaceutics*, **2011**. Vol. 403(2), pgs. 66-72.
- LEVIN, M. E.; HATFULL, G.F. Mycobacterium smegmatis RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Molecular Microbiology*, vol. 8, **2006**, pgs. 277 – 285.

- LI L.; CHENG Y. B.; USTIN S.; HU X. T.; RIAÑO D.; Retrieval of vegetation equivalent water thickness from reflectance using genetic algorithm (GA)-partial least squares (PLS) regression. *Advances in Space Research*, **2008**, vol. 41(11), pgs. 1755-1763.
- 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*, vol. 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.
- MAJIDI M. R.; JOUYBAN A.; ASADPOUR-ZEYNALI K.; Voltammetric behavior and determination of isoniazid in pharmaceuticals by using overoxidized polypyrrole glassy carbon modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2006**, vol. 589:1, pgs. 32-37.
- MANDELL, G L.; PETRI JUNIOR, W. A. Fármacos Antimicrobianos. In: HARDMAN, J. G., et.al.. As bases farmacológicas da terapêutica. 9 ed. México DF: Mc. Graw- Hill Interamericana S.A., **1996**.
- MARTINDALE. The complete drug reference. 33 ed. London: Pharmaceutical Press, **2002**.
- MARTINS, J. D.; NERY, C. G. C.; PIANETTI, G. A.; VIANA-JÚNIOR, N. S.; VIANNA-SOARES, C. D. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, **2007**, pgs. 63-70.
- MAZUREK, S.; SZOSTAK, R.; Quantification of aspartame in commercial sweeteners by FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, **2011**, vol. 125(3), pgs. 1051-1057.
- MEDEIROS, Z.; OLIVEIRA, C.; QUARESMA, J.; BARBOSA, E.; AGUIAR-SANTOS, A. M.; BONFIM, C.; ALMEIDA, J.; LESSA, F. A filariose bancroftiana no município de Moreno – Pernambuco, *Brasil. Revista Brasileira de Epidemiologia*, vol. 7, **2004**, pgs. 73-79.
- MEDINA, A. R.; CÓRDOVA, M. L. F.; MOLINA-DIAZ, A. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls

multioptosensing device. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 21, **1999**, pgs. 983-992.

MERCK: The Merck Index. MERCK & CO INC. 12 ed. N.J: Whitehouse station. **2000**.

MILCZAREKA, R. R.; SALTVEIT B, M. E.; GARVEYC, T. C.; MCCARTHIA, M. J. Assessment of tomato pericarp mechanical damage using multivariate analysis of magnetic resonance images. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 52, **2009**, pgs. 189–195.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas são foco de investimento científico, Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/reportagensEspeciais/default.cfm?pg=dspDetalhes&id_area=124&CO_NOTICIA=10052 dia 10 de janeiro de 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de saúde: Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica elaborado pelo Comitê Técnico/científico de assessoramento à tuberculose e assessor para Co-infecção HIV-TB- Brasília: Fundação Nacional de saúde, ministério da saúde, **2002** pgs. 100.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ações transversais da vigilância em saúde : promoção, integração e análise: gestão 2007-2008 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, **2009**. pgs 200 (Série C. Projetos, Programas e Relatórios)

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília; 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Texto de difusão técnico-científica do Ministério de Saúde; Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Revista Saúde Pública*, vol. 44, **2010**, pgs. 200-202.

MOREL, M. C. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. *Cadernos de Saúde Pública*, vol. 22, **2006**, pgs. 1522-1523.

MORITA, T. e ASSUMPÇÃO, R. M. V.; Manual de soluções, Reagentes e Solventes; 2ª Ed; São Paulo: Editora Edgard Blucher; **1972**, p. 272.

- MOURA, J. R. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicável ao desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos de olanzapina. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná – Paraná, Brasil. **2009**
- NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por Fluorescência de Raios-x. *Química Nova*, vol. 24, **2001**, pgs. 531–539.
- NI, Y.; LI, S.; KOKOT, S.; Simultaneous voltammetric analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Food Chemistry*, **2011**, vol.124(3), pgs.1157-63.
- NI, Y.; QI, Z.; KOKOT, S.; Simultaneous ultraviolet-spectrophotometric determination of sulfonamides by multivariate calibration approaches. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 82, **2006**, pgs. 241-247.
- NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S. Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. *Analytica Chimica Acta*, vol. 439, **2002**, pgs. 159-168.
- ÖZGÜR, M. Ü.; BOZDOGAN, A.; ERÇAG, A.; KOYUNCU, I. Simultaneous determination of anthocyanin and ponceau 4R in drink powders by derivative spectrophotometry and partial least-squares multivariate spectrophotometric calibration. *Monatshefte fur Chemie*, vol. 132; **2001**, pgs. 669-673.
- PANCHAGNULA, R.; AGRAWAL, S. Biopharmaceutical and pharmacokinetic aspects of variable bioavailability of rifampicin. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 271, **2004**, pgs. 1-4.
- 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.
- PARHAM, H.; ZARDAR, B. Determination of isosorbide dinitrate en arterial plasma, synthetic serum and pharmaceutical formulations by linear sweep voltammetry on a gold electrode. *Talanta*, v.55, **2001**, pgs. 255-262.

- PEINADO, A., HAMMOND, J.; SCOTT, A.; Development, validation and transfer of a Near Infrared method to determine in-line the end point of a fluidised drying process for commercial production batches of an approved oral solid dose pharmaceutical product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2011**, vol. 54(1), pgs. 13-20.
- PICON, P. D.; BASSANESI, S. L.; CARAMORI, M. L. A.; FERREIRA, R. L. T.; JARCZEWSKI, C. A.; BORBA VIEIRA, P. R. Fatores de risco para a recidiva da tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, vol. 33, **2007**, pgs. 572-578.
- PONTES, F. Doenças negligenciadas ainda matam 1 milhão por ano no mundo. *Inovação em Pauta*, **2010**, pgs 69-73.
- RADI, A. Anodic voltammetric assay of lamsoprazole and omeprazole on a carbon paste electrode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 31, **2003**, pgs. 1007-1012.
- RAMALEY, L.; KRAUSE, M. S. Theory of square wave voltammetry. *Analytical chemistry*, vol. 41, **1969**, pgs. 1362–1369.
- REGO, J. F. do; MOURA, J. I. de; MOITA, G. C. Determinação de olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação. *Química Nova*, vol. 33, **2010**, pgs. 471-477.
- ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. *Química Nova*, vol. 27, **2004**, pgs. 807-812.
- ROSSETTI, M. L. R.; VALIM, A. R. M.; SILVA, M. S. N.; RODRIGUES, V. S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista Saúde Pública*, vol 36, **2002**, pgs. 525–532.
- RUPP, E. B.; ZUMAN, P.; SESTAKOVA, I.; HORAK, V. Polarographic determination of some pesticides. Application to a study of their adsorption on lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol .40, **1992**, pgs.2016-2021.
- SABNIS, S. S., DHAVALE, N. D., JADHAV, V. Y., GANDHI, S. V. Spectrophotometric simultaneous determination of Rabeprazole Sodium and Itopride Hydrochloride in capsule dosage form. *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 69, **2008**, pgs. 849–852.

- SAFAVI, A.; KARIMI, M.A.; HORMOZI NEZHAD, M.R.; KAMALI, R.; SAGHIR N. Sensitive indirect spectrophotometric determination of isoniazid. *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 60, **2004**, pgs. 765–769.
- SAMADI-MAYBODI, A.; NEJAD-DARZI, S. K. H. Simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in pharmaceutical preparations using multivariate calibration. *Spectrochimica Acta Part A*, vol. 75, **2010**, pgs. 1270-1274.
- SARAOGI, G.K.; GUPTA, P, GUPTAB, U. D., JAIN, N.K.; AGRAWAL,G. P. Gelatin nanocarriers as potential vectors for effective management of tuberculosis. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 385, **2010**, pgs. 143–149.
- SAURINA, J.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; FÁBREGAS, E.; ALEGRET, S. Cyclic voltammetric simultaneous determination of oxidizable amino acids using multivariate calibration methods. *Analytica Chimica Acta*, vol. 405, **2000**, pgs. 153-160.
- SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER, L. JR.; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T. Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, vol. 409; **2000**, pgs. 159-170.
- SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P. T. J. Avaliação do uso de Métodos Quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, vol. 23, **2000**, pgs 239-247.
- SHAHROKHIAN, S.; AMIRI, M. Multi-walled carbon nanotube paste electrode for selective voltammetric detection of isoniazid. *Microchimica Acta*, vol. 157, **2007**, pgs. 149–158
- SHISHOO, C. J.; SHAH, S. A.; RATHOD, S. S.; SAVALE, J. S.; KOTECHA, J. S.; SHAH, P. B. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 190, **1999**, pgs. 109-123.
- SILVA, B. D.; Desenvolvimento de Metodologias Espectroscópicas Multivariadas para Quantificação de Isoniazida e Rifampicina em Medicamentos. Dissertação de mestrado, UFPR, Curitiba, **2008**.
- SILVA, B.B.; LOPES-COSTA, P.V.; PIRES, C.G.; PEREIRA-FILHO, J.D.; J.D. SANTOS A.R. Tuberculosis of the breast: analysis of 20 cases and a literature review.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, vol. 103, **2009**, pgs. 559—563.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. *Principles of Instrumental Analysis*, Saunders College Publishing: USA, 2002.

SOHRANI A. S.; AHMAD B.; KHALID, J. H. Acetylation percentage method for determination of acetylator status in human volunteers and tuberculous patients. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol 8, **1995**, pgs.11-16.

SOUZA DE, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, vol. 26, **2003**, pgs. 81-89.

STEPHEN, W. I.; ISLAM, M. A. 3,5,6-Trisubstituted 1,2,4-triazines as analytical reagents: Part II. Compounds containing the cuproine functional group. *Analytica Chimica Acta*, vol. 274, **1993**, pgs. 347-354.

TAN, H. S.I. Sensitive colorimetric determination of isoniazida. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, **2006**, pgs. 993—997.

TAUIL, P. L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, vol 18, **2002**, pgs. 867-871.

TOLEDO, R. A.; CASTILHO, M.; MAZO, L. H. Determination of dipyrindamole in pharmaceutical preparations using square wave voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 36, **2005**, pgs. 1113-1117.

USP - The United States Pharmacopoeia, U.S. Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, 2007.

VETUSCHI, C.; GIANNANDREA, A.; CARLUCCI, G.; MAZZEO, P. Determination of hydrochlorothiazide and irbesartan in pharmaceuticals by fourth-order UV derivative spectrophotometry. *Il Farmaco*, vol. 60, **2005**, pgs. 665-670.

WANG, W.; CHEN, J.; CHEN, Y.; LIN, L. Tuberculosis of the head and neck: a review of 20 cases. *Oral Surgery, Oral medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, vol. 197, **2009**, pgs. 381-386.

WHO – World Health Organization. Tuberculosis. Reportagem publicada em 13 de fevereiro de 2010. Acesso pelo site: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/> em março de 2010.

WHO, World Health Organization, Switzerland, Geneva, 2001, http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/TDR_TB_4FDC_02.1.pdf.

WU, D., NIE, P., CUELLO, J., HE, Y., WANG, Z. e WU, H.; Application of visible and near infrared spectroscopy for rapid and non-invasive quantification of common adulterants in Spirulina powder. *Journal of Food Engineering*, **2011**, vol. 102(3), pgs. 278-286.

YANG, G.; WANG, C.; ZHANG, R.; WANG, C.; QU, Q.; HU, X. Poly(amidosulfonic acid) modified glassy carbon electrode for determination of isoniazid in pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*, vol. 73, **2008**, pgs. 37–42.

ZEAITER, M., KNIGHT, W. e HOLLAND, S.; Multivariate regression modeling for monitoring quality of injection moulding components using cavity sensor technology: Application to the manufacturing of pharmaceutical device components. *Journal of Process Control*, vol. 21(1), **2011**, pgs.137-150.

ZHANG, H.; WU, L.; LI, Q.; DU, X. Determination of isoniazid among pharmaceutical samples and the patients saliva samples by using potassium ferricyanide as spectroscopic probe reagent. *Analytica Chimica Acta*, vol. 628, **2008**, pgs. 67–72.