

Determinação simultânea de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol em comprimidos com doses fixas combinadas

Method for simultaneously determining the Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide and Ethambutol in the combined fixed-dose tablets

RIALA6/1653

Patrícia Condé de LIMA*, André Luiz Mazzei ALBERT, Kátia Christina LEANDRO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Contaminantes Inorgânicos, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel: 21 3865-5180. E-mail: patricia.lima@incqs.fiocruz.br

Recebido: 14.07.2015 - Aceito para publicação: 11.09.2015

RESUMO

Os comprimidos utilizados no tratamento da tuberculose possuem quatro fármacos associados, isoniazida, pirazinamida, etambutol e rifampicina, e são distribuídos gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde. Os métodos analíticos oficiais para analisar este medicamento estão especificados na Farmacopeia Americana 36a edição e na Farmacopeia Internacional 4a edição. Porém, estes compêndios oficiais não possuem monografias para análise simultânea dos quatro fármacos. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia para determinar simultaneamente os princípios ativos em comprimidos dose fixa combinada, utilizando-se cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível, pois é de grande importância para o controle da qualidade do medicamento. O método desenvolvido utilizou coluna cromatográfica C18 (250 x 4,6) mm e 5 µm, fase móvel constituída de fase aquosa (85 % tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15 % metanol e 0,005 mol/L de Cu²⁺ ou 250 mg/L de CuSO₄.5H₂O) e fase orgânica (metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico). O fluxo foi de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 265 nm para isoniazida, pirazinamida e o etambutol e de 335 nm para rifampicina. Este método apresentou desvio padrão relativo inferior a 2,0 % na precisão e linearidade para os quatro fármacos estudados.

Palavras-chave. isoniazida, pirazinamida, etambutol, rifampicina, CLAE-UV, tuberculose.

ABSTRACT

Tablets containing isoniazid, pyrazinamide, ethambutol and rifampicin are used for tuberculosis treatment, and they are freely distributed by the Brazilian National Health System. The official analytical methods for testing those substances in fixed-dose combined tablet are described in the United States Pharmacopeia and the International Pharmacopoeia. None of these official compendiums refers to the methodologies for conducting the simultaneous analysis of these four drugs. This study aimed at developing an analytical methodology to determine simultaneously all of four drugs in tablets for tuberculosis treatment, by means of high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detector. The developed method used a chromatographic column with octadecylsilane stationary phase (250 mm x 4.6 mm x 5 µm particle size). The mobile phase was aqueous (85 % ammonium formate buffer pH 5, 15 % methanol and 250 mg CuSO₄.5H₂O), and organic phase (methanol, 0.1 % triethylamine and 0.2 % formic acid). The flow was 1.0 mL/min, at a wavelength of 265 nm or, when the equipment allowed, a wavelength of 335 nm for isoniazid, pyrazinamide and ethambutol and 335 nm for rifampicin. The developed methodology showed satisfactory results regarding the precision parameter, with relative standard deviation lower than 2.0 % for the studied drugs.

Keywords. isoniazid, pyrazinamide, ethambutol, rifampicin, HPLC-UV, tuberculosis.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta principalmente os pulmões. É causada por uma bactéria em forma de pequenos bastões cujo nome científico é *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK)¹⁻³.

Com a evolução do estudo da doença, os países desenvolvidos acreditavam que no final do século XX a TB estaria erradicada ou confinada aos países pobres. Entretanto, com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em 1981, ocorreu um aumento no número de casos notificados de TB em pessoas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Além disso, os intensos movimentos migratórios populacionais, a desestabilização dos sistemas de saúde pública, a crise social/financeira mundial, o empobrecimento da população, a urbanização caótica e a ausência de controle social vêm dificultando o controle da doença^{4,5}.

A TB continua sendo um importante problema de saúde mundial, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle, considerando os aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública, merecendo atenção dos profissionais de saúde e da sociedade como um todo⁶.

Segundo o Boletim Epidemiológico⁷, em 2013 foram notificados 71.123 novos casos da doença no Brasil, a taxa de incidência foi de 35,4/100 mil habitantes. Em 2012, o coeficiente de morte foi de 2,3/100 mil habitantes. Houve uma redução global do número de casos e de óbitos por TB, nas duas últimas décadas. De 2003 a 2013, a queda do coeficiente de incidência foi de 20,4 % e o de mortalidade caiu 41 % desde 1990, mesmo tendo ocorrido uma queda nos indicadores de mortalidade e de incidência no ano de 2012. A OMS recomenda uma meta cura de pelo menos 85,0 % dos casos e o Brasil não conseguiu alcançar esta meta, tendo 70,6 % de cura. Esses indicadores colocam o Brasil em 16º lugar num ranking de 22 nações consideradas de grande circulação da doença.

O controle da TB é baseado na busca de casos, no diagnóstico precoce e adequado e seu tratamento até a cura, com o objetivo de interromper a cadeia de transmissão e evitar possíveis adoecimentos. Uma vez iniciado o tratamento, ele não deve ser interrompido, salvo após uma rigorosa revisão clínica e laboratorial que determine mudanças de diagnóstico^{6,8}.

O tratamento da TB é feito através do uso de antibióticos, sendo 100 % eficaz, se realizado por um período mínimo de seis meses sem interrupção². A melhor forma de assegurar a cura do paciente é a utilização dos princípios básicos para o tratamento, que são: associação medicamentosa adequada, doses corretas e uso por tempo suficiente, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos⁶. A utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos simultaneamente é uma forma de se evitar a seleção de bacilos resistentes, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro⁹.

O esquema básico com comprimidos em doses fixas combinando os quatro fármacos (4 em 1) é indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e mundialmente utilizado, apresentando excelentes resultados quanto à efetividade, em particular pela maior adesão ao tratamento. Os comprimidos de doses fixas combinadas (DFC) apresentam as seguintes dosagens: Rifampicina (RMP) 150 mg, Isoniazida (INH) 75 mg, Pirazinamida (PYA) 400 mg e Etambutol (EMB) 275 mg. Os DFC possuem diversas vantagens sobre os fármacos utilizados isoladamente (monoterapia), dentre elas, destaca-se a diminuição dos erros de prescrição porque as doses recomendadas são padronizadas pela OMS; a quantidade de comprimidos ingeridos é menor, dando maior conforto e favorecendo a adesão do paciente ao tratamento¹⁰. O medicamento para o tratamento da TB é disponibilizado pelo Ministério da Saúde e distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

As farmacopeias que apresentam metodologias de análise para dosagem dos quatro fármacos presentes no comprimido de DFC são a Farmacopeia Americana (USP) 36ª edição¹¹ e a Farmacopeia Internacional (Ph. Int.) 4ª edição¹². A USP recomenda o uso de uma metodologia para a dosagem dos fármacos nos comprimidos 4 em 1 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), onde a determinação do teor de RMP, INH, PYA é realizada separadamente da determinação do EMB. Na Ph. Int. a metodologia para a determinação do teor de INH, PYA e EMB é realizada separadamente da determinação da RMP. Os diluentes para a análise de RMP só diferem nas proporções, onde a USP usa o diluente 96:4 e a Ph. Int. usa 60:40 da mistura tampão fosfato (pH ~ 7) e metanol, respectivamente. As diferentes características instrumentais entre estas metodologias estão descritas para melhor entendimento no Quadro 1. A Farmacopeia Brasileira (FB) 5ª edição¹³ possui uma metodologia para análise dos fármacos individualmente. Portanto, nenhum destes compêndios possui metodologias para análise simultânea dos quatro fármacos.

Este artigo trata do desenvolvimento de um método analítico para a determinação simultânea de INH, PYA, RMP e EMB em comprimidos de doses fixas combinadas por CLAE-UV. É um método original e relevante na área de controle de qualidade de produtos farmacêuticos, uma vez que não existem monografias para a determinação simultânea dos quatro fármacos em comprimidos nos compêndios oficiais e nem na literatura científica, sem uma etapa de derivatização prévia das amostras. A apresentação deste novo método é de grande importância no campo da Vigilância Sanitária, pois é de interesse do Ministério da Saúde monitorar a qualidade destes medicamentos distribuídos pelo SUS, principalmente levando-se em conta o grande número de casos de tuberculose no Brasil, nos dias atuais. A utilização deste método simultâneo reduzirá o tempo de análise e o consumo de solventes, gerando economia aos laboratórios.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamento

O método foi desenvolvido pela técnica de análise por CLAE. Foi utilizado um cromatógrafo do fabricante Gilson com detector ultravioleta-visível 152, forno Shimadzu modelo CTO-6A, bomba binária 321 e injetor automático com sistema de resfriamento 235p. O software usado para aquisição de dados foi o Unipoint®. A coluna utilizada foi uma C18 Luna (250 x 4,6) mm, 5 µm. Fabricante: Phenomenex®. Lote: 5291-82.

Reagentes

Foram utilizados padrões USP de cloridrato de etambutol, lote H CAT.NO. 25700, isoniazida, lote H CAT.NO. 34970, pirazinamida, lote G CAT.NO. 58500 e rifampicina, lote J CAT.NO. 60400. As amostras foram feitas um pool de 20 comprimidos. Os reagentes tetracloreto de carbono, trietilamina e ácido fórmico utilizados foram grau P.A da marca Merck e, os solventes metanol e acetonitrila, grau CLAE da marca Tédia. A água utilizada foi obtida através do sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Milipore modelo Direct-Q.

Otimização do diluente da rifampicina

Com o objetivo de solubilizar e minimizar a degradação da RMP foram testados alguns solventes: apolar (tetracloreto de carbono), polar prótico (metanol) e polar aprótico (acetonitrila) e o diluente preconizado pela USP (solução 96 % tampão fosfato pH 6,8 com 4 % metanol).

Foram feitas soluções na proporção 10 % de água e 90 % de solvente orgânico (acetonitrila ou metanol), suficiente para promover a dissolução do EMB, sem provocar alterações estruturais na RMP, pois o EMB presente no comprimido 4 em 1 está sob a forma de cloridrato, insolúvel em solventes orgânicos. Após avaliar os resultados, foram testados estes diluentes aumentando-se a proporção de água e adicionando-se à solução tampão citrato de 0,03 a 0,15 mg.mL⁻¹ (pH 7,0), como antioxidante.

Quadro 1. Métodos de análise para RMP, INH, PYA e EMB apresentados nas Farmacopeias Americana e Internacional

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

Estes diluentes foram testados em soluções de RMP de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto no padrão quanto na amostra (comprimido). Foram realizados testes com a solução contendo a menor concentração de tampão citrato resfriada a 5 °C, utilizando-se o recurso de resfriamento dos autoinjetores.

Formação do complexo metal-etambutol e sua absorção no UV

O EMB não absorve na região do UV e por isso foram realizados experimentos visando a formação de complexos metal-EMB, variando-se os valores de pH e de vários íons metálicos, como: Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} . A solução padrão de EMB 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi testada com soluções de mesma concentração desses íons metálicos, diluídos em tampão acetato e tampão fosfato variando-se o pH de 4,0 a 7,0. Essas soluções foram analisadas por espectrofotometria para verificar a complexação desses íons metálicos com EMB e sua absorção na faixa do UV-visível.

Análises por espectrofotometria UV-visível em 265 nm foram realizadas para verificar a estequiometria do complexo EMB-metal, variando-se a concentração do EMB de 16 a 96 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em relação a uma concentração fixa de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da solução de íon metálico que apresentou melhor resultado no estudo de complexação.

Desenvolvimento do método analítico

Para verificar a melhor resolução cromatográfica entre INH, PYA, EMB e RMP foi preparada uma solução padrão de aproximadamente 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ desses analitos, no comprimido, pesou-se aproximadamente 1,0000 g da amostra. Essa solução foi analisada em duas fases móveis: (i) tampão acetato de amônio de 0,1 a 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH entre 6 e 7), metanol e solução de Cu^{2+} e (ii) tampão formiato de amônio de 0,1 a 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH entre 4 e 5), metanol e solução de Cu^{2+} . Através da avaliação dos resultados cromatográficos obtidos foi definida a fase móvel aquosa a ser utilizada.

Para melhorar o perfil cromatográfico da análise dentro dos parâmetros de simetria,

após 12 minutos de análise cromatográfica, foi alterada a fase móvel aquosa para a fase móvel orgânica, constituída de metanol, trietilamina e ácido fórmico, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Rampa de programação do modo gradiente para análise da INH, PYA, EMB e RMP com trietilamina e ácido fórmico na fase orgânica

Tempo	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0 - 12	100	0
12-20	0	100
20-35	100	0

Após definir as condições analíticas a serem utilizadas, o teste de verificação da adequação do sistema foi realizado para assegurar a performance do sistema cromatográfico no início e durante a realização das análises, provendo assim dados de qualidade aceitáveis. Foram avaliados os parâmetros fator de cauda, resolução e fator de capacidade, enquanto que a eficiência cromatográfica foi avaliada pelo número de pratos teóricos.

O método desenvolvido para a determinação simultânea do teor de INH, PYA, EMB e RMP foi submetido aos parâmetros de avaliação de linearidade e precisão. Estes parâmetros de avaliação são baseados no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, da Anvisa, e Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, do Inmetro^{14, 15}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a USP, existe uma diferença no tempo de preparo e análise da RMP das soluções padrão e amostra. A solução padrão de RMP deveria ser analisada em até 10 minutos, enquanto que a solução amostra poderia ser analisada em até 2 horas. Inicialmente, um dos objetivos deste trabalho foi apresentar alguma alternativa viável para impedir a degradação da RMP durante a análise quantitativa.

O estudo da estabilidade da RMP foi realizado através de injeções sucessivas de uma solução de amostra de RMP (comprimido),

utilizando-se o diluente indicado na técnica de análise de teor de RMP, PYA e INH da USP, por 2 horas, em temperatura ambiente. A avaliação estatística para verificar a significância da regressão das concentrações durante o intervalo de tempo estudado foi observada pela aplicação do valor p da inclinação da regressão. Se o valor de p fosse maior que 0,05 (ao nível de confiança de 95 %), a inclinação da regressão linear deverá ser considerada insignificante¹⁶.

Foram observadas degradações significativas (valores de p menores que 0,05) em todos os testes realizados, utilizando-se os seguintes diluentes: USP (96 % tampão fosfato pH ~ 7 e 4 % de MeOH), MeOH, MeCN e 90 % de MeOH e 10 % de H₂O e 90 % de MeCN e 10 % de H₂O, ambos com tampão citrato nas concentrações de 0,03 a 0,15 mg.mL⁻¹ (pH 7,0). Porém, quando os diluentes utilizados foram 90 % de MeCN e 10 % de água ou 90 % de MeOH e 10 % de água com tampão citrato 0,03 mg.mL⁻¹ (pH 7,0) e resfriados a 5 °C, o tempo de análise aumentou para 18 horas,

com valores de p de aproximadamente 0,66, observando-se que a degradação da RMP foi insignificante, como podemos observar na Figura 1.

De acordo com Farias¹⁷, os cátions formam complexos estáveis com o amoníaco e com a maioria das aminas, exceto as aminas pouco nucleofílicas. No caso do EMB, foi observada a formação de complexo com Ni²⁺ e Cu²⁺, sendo que o complexo com o Cu²⁺ foi mais estável e com maior absorvidade molar. Outro fato observado foi que o aumento do pH gerou um deslocamento batocrômico no espectro UV-visível do complexo formado.

A estequiometria do complexo Cu-EMB foi determinada por espectrofotometria UV-visível em 265 nm, variando-se a concentração de EMB e mantendo-se fixa a concentração de Cu²⁺ (10 µg.mL⁻¹)¹⁸. Através deste estudo, foi possível concluir que a estequiometria consiste de 2 mols de complexante para 1 átomo-grama de íon cúprico em tampão acetato (pH 6,0).

Os testes seguintes foram realizados

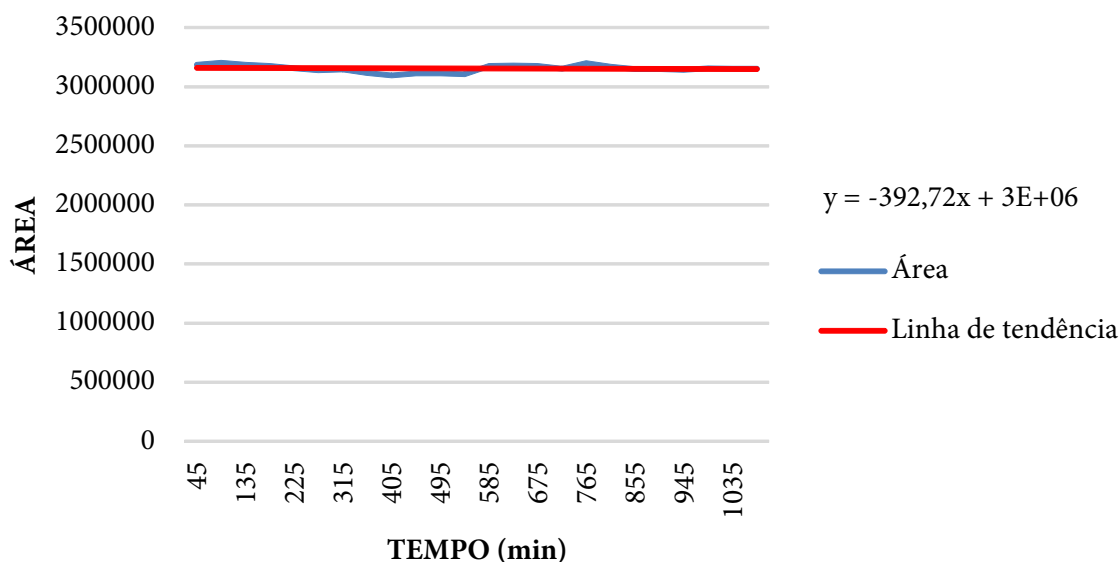


Figura 1. Gráfico da estabilidade da RMP (200 µg.mL⁻¹) no comprimido com diluente 10 % de água e 90 % de metanol a 5 °C

para a obtenção de um cromatograma contemplando os quatro fármacos, dentro dos critérios de aceitabilidade dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico. Como esses fármacos contêm um ou mais grupos ácidos e/ou básicos e suas retenções em fase reversa são muito sensíveis à variação do pH, utilizou-se tampão na fase móvel. Foram testados o uso do acetato de amônio em pH na faixa de 6 a 7 ($pK_{a_{HAC}} = 4,8$; 20 °C) e formiato de amônio em pH levemente ácido, na faixa de 4 a 5 ($pK_{a_{HFO}} = 3,8$; 20 °C), mesmo estando no limite ou extrapolando a capacidade tamponadora máxima. O formiato de amônio demonstrou ser o tampão mais adequado pois proporcionou uma melhor simetria dos sinais e os valores de pKa dos fármacos (INH $pK_a = 2,0$ e $3,5$; PYA $pK_a = 0,5$; EMB $pK_a = 6,35$ e $9,35$ e RMP $pK_a = 1,7$ e $7,9$) estão afastados da faixa de pH do tampão formiato.

Devido à presença de grupamentos básicos, principalmente na INH e RMP, haveria uma forte interação com o grupo silanol da fase estacionária ($pK_a \sim 3,5$), o que comprometeria a simetria dos picos. Para prevenir tal problema, foi utilizada uma coluna cuja fase estacionária era desativada (*endcapped*), bem como, foi feita a adição de uma base orgânica (trietilamina) à fase móvel.

A fase móvel aquosa foi otimizada

para a eluição dos três princípios ativos (INH, PYA e EMB) e a composição estabelecida foi: $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de formiato de amônio com pH dentro da faixa de 4,5 a 5,0, 15 % de metanol e $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ de Cu^{2+} . O volume de fase móvel orgânica (MeOH) foi gradualmente aumentado segundo uma programação de gradiente linear até a eluição da RMP. Nestas condições cromatográficas o sinal da RMP não foi considerado apropriado. Para a adequação desta condição foi adicionado à fase móvel orgânica trietilamina e ácido fórmico, ajustando o sinal da RMP dentro dos parâmetros de simetria.

As condições finais para análise do comprimido 4 em 1 por CLAE/UV desenvolvidas no presente estudo foram: fase móvel aquosa - 85 % tampão formiato de amônio $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 5), 15 % metanol e $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ de Cu^{2+} e fase móvel orgânica - metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico em modo gradiente segundo a Tabela 1. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ em um fluxo de 1 mL.min^{-1} , nos comprimentos de onda de 265 e 335 nm. As amostras foram mantidas no sistema cromatográfico a 5 °C durante toda a análise.

O software do equipamento utilizado (Unipoint®) permitiu a troca para um novo comprimento de onda na mesma

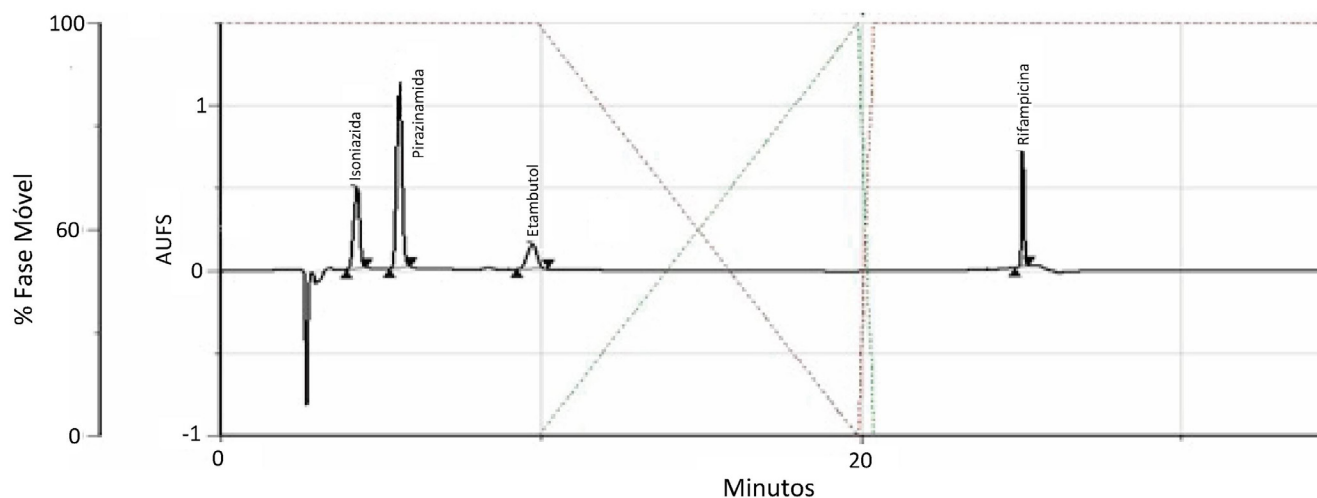


Figura 2. Cromatograma obtido da análise do comprimido 4 em 1 nos comprimentos de onda de 265 (INH, PYA e EMB) e 335 nm (RMP)

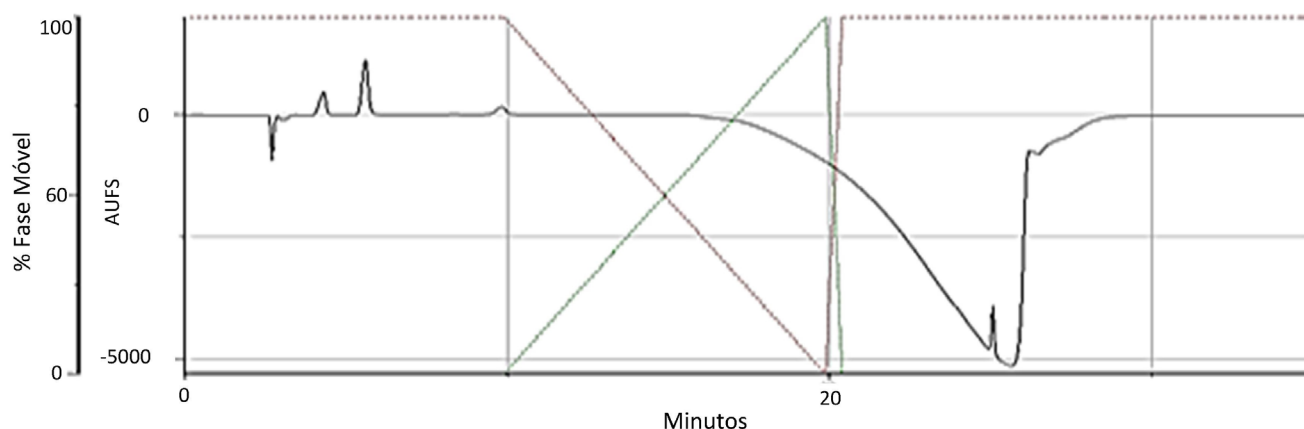


Figura 3. Cromatograma do comprimido 4 em 1 somente no comprimento de onda em 265 nm

análise cromatográfica, zerando a linha de base e ajustando a sensibilidade da célula fotomultiplicadora em três comandos de tempo. O monitoramento da INH, PYA e complexo (Cu-EMB) foi realizado no comprimento de onda de 265 nm. A partir de 12 minutos, a RMP foi monitorada no comprimento de onda de 335nm. O cromatograma da análise realizada pode ser observado na Figura 2.

Condições experimentais: cromatógrafo Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm com fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 265 e 335 nm, fase aquosa - 85 % tampão formiato de amônio 0,3 mol.L⁻¹ pH 5, 15 % metanol e 0,005 mol.L⁻¹ de Cu²⁺ e fase orgânica - metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico em modo gradiente segundo a Tabela 1.

Se o cromatógrafo utilizado não possuir um software que possibilite a mudança do comprimento de onda durante a análise cromatográfica, todas as substâncias podem ser visualizadas em 265 nm, porém haverá um declínio natural da linha de base à medida que a composição da fase orgânica aumentar durante a programação do gradiente, conforme pode ser observado na Figura 3. Isto ocorre porque a fase aquosa absorve muito mais que a fase orgânica nesse comprimento de onda.

Condições experimentais: cromatógrafo

Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm com fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 265 nm, fase aquosa - 85 % tampão formiato de amônio 0,3 mol.L⁻¹ pH 5, 15 % metanol e 0,005 mol.L⁻¹ de Cu²⁺ e fase orgânica - metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico em modo gradiente segundo a Tabela 1.

A aquisição dos dados experimentais (cromatogramas) foi realizada uma inspeção visual dos dados no gráfico x-y referente às respostas das áreas *versus* as concentrações do analito. Reportou-se o gráfico e os seguintes parâmetros de linearidade: Coeficiente de correlação (r), y-intercepto, o coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear, o limite de detecção obtido. As curvas analíticas foram preparadas a partir de 7 níveis de concentrações dos padrões de INH, PYA, EMB e RPM, respectivamente. A linearidade da curva de calibração para a INH na faixa de concentração de 0,05 a 0,10 mg.mL⁻¹ foi observada na equação $y = 11692009x + 125632$, com $r = 0,9995$ e $R^2 = 0,9989$. Para a PYA a faixa de concentração foi de 0,27 a 0,52 mg.mL⁻¹ e a curva apresentou a equação $y = 31810254x + 4148064$, com $r = 0,9978$ e $R^2 = 0,9956$. Já o EMB a faixa de concentração foi de 0,19 a 0,36 mg.mL⁻¹

e foi observada a equação $y = 9427203x + 34120$, com $r = 0,9995$ e $R^2 = 0,9989$. A RMP a faixa de concentração foi de 0,05 a 0,1 mg.mL⁻¹ e foi observada a equação $y = 53169601x + 97065$, com $r = 0,9999$ e $R^2 = 0,9997$. O Coeficiente de correlação (r) deve ser maior ou igual a 0,99¹⁴, para os quatro fármacos o método apresentou uma resposta linear satisfatória.

A repetibilidade foi analisada contemplando a faixa linear do método em três níveis de concentração: baixa (80 %), média (100 %) e alta (120 %) da concentração teórica do fármaco no comprimido. Os resultados das repetibilidades das análises efetuadas dos quatro fármacos foram calculados através do DPR, que atestam a repetibilidade do método, e não podem ultrapassar 2,0 %¹⁴. Todo o estudo foi realizado utilizando amostras de dois fabricantes diferentes (produto 1 e produto 2). O método foi considerado preciso para os quatro fármacos com o DPR inferior a 2,0 %.

O limite de detecção foi estimado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Construiu-se três curvas de calibração onde calculou-se a média dos resultados do coeficiente angular (a) e o desvio Padrão (DP) do coeficiente linear. Os resultados obtidos foram: 2,98E+00 para INH, 2,06E+01 para PYA, 1,17E+01 para EMB e 2,05E+00 para RMP.

O limite de quantificação foi estimado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base. Construiu-se três curvas de calibração onde calculou-se a média dos resultados do coeficiente angular (a) e o DP do coeficiente linear. Os resultados obtidos foram: 8,81E+00 para INH, 6,06E+01 para PYA, 3,47E+01 para EMB e 6,12E+00 para RMP.

CONCLUSÃO

O método proposto se mostrou eficiente para a análise simultânea de INH, PYA, EMB e RMP em comprimidos 4 em 1 utilizados no tratamento da TB. A metodologia desenvolvida apresenta vantagens em relação aos métodos oficiais citados neste estudo, principalmente, em relação à análise simultânea e ao controle da estabilidade da RMP. Os sinais relativos aos quatro fármacos na análise cromatográfica podem ser visualizados a 265 nm. Caso o software utilizado permita a troca para um novo comprimento de onda na mesma análise cromatográfica, a INH, PYA e EMB podem ser visualizados em 265 nm e a RMP em 335 nm, aumentando a seletividade e a sensibilidade da RMP e correlatos. O método avaliado apresentou uma resposta linear satisfatória dentro da faixa de concentração compreendida entre 0,05 a 0,10 mg.mL⁻¹ para INH, 0,27 a 0,52 mg.mL⁻¹ para PYA, 0,19 a 0,36 mg.mL⁻¹ para EMB e 0,05 a 0,1 mg.mL⁻¹ para RMP. O método foi considerado preciso para os quatro fármacos, pois o DPR foi inferior a 2,0 %.

REFERÊNCIAS

1. Bastos D. A estrutura do *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase e os mecanismos de ação da isoniazida: um estudo para novos ligantes [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2006.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, 2002 [acesso 2011 Dez 07]. Disponível em: [<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ProgramaTB.pdf>].

3. Rede TB. Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose: Sobre a Tuberculose. 2012 [acesso 2012 Fev 13]. Disponível em: [<http://redetb.org/sobre-a-tuberculose>].
4. Conde MB, Souza GM, Kritski AL. Tuberculose sem medo. 1ª ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2002.
5. Secretaria da Saúde. Divisão de Controle da Tuberculose CVE-SES/SP. Perguntas e respostas. 2010 [acesso 2012 Fev 13]. Disponível em: [<http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose>].
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, 2011 [acesso 2012 Jan 29]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_tb.pdf].
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: O controle da Tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. Brasília, 2014 [acesso 2014 Set 13]. Disponível em: [<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/29/BE-2014-45--2--tb.pdf>].
8. Lopes A C. Tratado de clínica médica. 2ª ed. São Paulo (SP): Roca; 2006.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Tratamentodiretamenteobservado(TDO)datuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem. Brasília, 2011 [acesso 2012 Jan 29]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tdo_tb.pdf].
10. World Health Organization – WHO. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO Press; 2009.
11. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 36. National Formulary 31. Rockville: US Pharmacopeial Convention, 2013.
12. The International Pharmacopoeia. 4. ed. 4st suppl. Geneva: WHO, 2011.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5a ed. Volume 2. Brasília: ANVISA, 2010.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro. Orientações sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro: Inmetro, 2011.
16. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ISO Guia 35:2012. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012.
17. Farias RF. Química de coordenação: fundamentos e atualidades. Campinas (SP): Editora Átomo; 2005.
18. Likussar W, Boltz DF. Theory of continuous variations plots and a new method for spectrophotometric determination of extraction and formation constants. *Anal Chem*. 1971; 43(10):1265-72. [DOI:10.1021/ac60304a006].