

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**DOUTORADO EM QUÍMICA**

**Adriana Ferreira Faria**

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS POR  
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS UTILIZADOS NO  
TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

**Juiz de Fora**

**2010**

**Adriana Ferreira Faria**

**DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS POR  
ELETROFORESE CAPILAR PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS UTILIZADOS NO  
TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Química, área de  
concentração: Química Analítica, da  
Universidade Federal de Juiz de Fora,  
como requisito parcial para obtenção do  
grau de Doutor.**

**Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira**

**Co-orientador: Dr. Marcus Vinícius Nora de Souza**

**Juiz de Fora**

**2010**

Faria, Adriana Ferreira.

Desenvolvimento, otimização e validação de metodologias por eletroforese capilar para análise de fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. – 2010.

195 f. : il.

Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Tuberculose. 2. Eletroforese Capilar. 3. Isoniazida. I. Título.

CDU 616.24-002.5

*Ao meu pai que sempre será um exemplo de vida para mim e à minha família que esteve ao meu lado, em todos os momentos, me apoiando, para tornar possível essa conquista. A vocês o meu eterno agradecimento.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigada pelo fim de mais essa etapa, que não seria cumprida sem o Seu auxílio.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Marcone*, que sempre acreditou em meu potencial, confiou, incentivou e proporcionou novos aprendizados.

Ao meu co-orientador *Dr. Marcus Vinícius*, que também acreditou em mim, apoiou e propôs desafios que permitiram o meu crescimento profissional.

Aos colegas do *Grupo de Química Analítica e Quimiometria* pelo aprendizado, convivência e amizade. Em especial a *Juliana* e a *Luiza*, pelo trabalho realizado em parceria.

Aos *colegas do laboratório e da pós-graduação* pela colaboração, conversas e amizade. Em especial a *Vandinha* pela grande amizade.

Aos colaboradores *Prof. Dr. Roy E. Bruns*, *Prof. Dr. Wendel A. Alves*, *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana M. da Costa Ferreira*, *Prof. Dr. José Alberto F. da Silva* e *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Diniz* pelo auxílio e parceria.

A enfermeira *Mércia Guadalupe Ramos*, do Departamento de Epidemiologia da Prefeitura Municipal de Juiz de Fora, pelas amostras doadas.

A coordenação da pós-graduação.

A *Simone*, secretária da pós-graduação, que sempre esteve pronta a ajudar com eficiência e disposição.

A minha mãe *Cleonice* pelo amor, dedicação, apoio, orações e que mesmo distante, esteve sempre presente.

A minha irmã *Luciana* pelo carinho, incentivo e companheirismo.

A minha *princesinha Ester* pelo seu carinho e alegria.

Ao meu esposo *Alessandro* pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, incentivo e por estar ao meu lado em todos os momentos.

A Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Química.

A CAPES pela bolsa concedida.

*"O homem faz seus planos, mas o Senhor determina os seus passos".*

(Provérbios 16:9)

## RESUMO

O objetivo principal da tese em questão foi o desenvolvimento, otimização e validação de metodologias analíticas para análise de formulações farmacêuticas utilizadas no tratamento da tuberculose, as quais contêm como princípio ativo etambutol (ETB), isoniazida (ISO), rifampicina (RIF) e pirazinamida (PIR), isolados ou em associação. Inicialmente, duas metodologias analíticas para análise de ETB em comprimidos foram desenvolvidas: a primeira permitiu a análise simultânea de ETB e da impureza 2-amino-1-butanol por eletroforese capilar de zona (CZE) utilizando um eletrólito de corrida contendo 60,0 mmol L<sup>-1</sup> de tampão ácido acético/acetato de sódio e 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup>, polaridade normal (+25 kV) e detecção UV em 262 nm. A segunda foi realizada por espectrofotometria com diluição dos padrões e amostras em 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de tampão ácido acético/acetato de sódio e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> e detecção UV em 262 nm. A formação do complexo CuETB foi necessária em ambas as metodologias desenvolvidas, uma vez que ETB apresenta baixa absorvidade molar. Algumas figuras de mérito, tais como, linearidade, repetitividade, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação foram avaliadas para as duas metodologias. Os dois métodos foram comparados e não apresentaram diferenças significativas no intervalo de 95% usando o teste t não pareado com variância agrupada. Em um segundo momento, um novo método para análise simultânea de dose fixa combinada (DFC), contendo ETB, ISO, RIF e PIR por CZE com detecção UV foi desenvolvido, otimizado e validado. A condição experimental consistiu em um eletrólito contendo 50,0 mmol L<sup>-1</sup> de tampão ácido acético/acetato de sódio e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> e polaridade normal (+22 kV). Essa metodologia foi aplicada com sucesso na análise de 2-DFC (ISO e PIR) em comprimidos e 4-DFC (ETB, ISO, RIF e PIR) em sachê. Finalmente, uma metodologia por CZE utilizando detecção UV para a análise simultânea de ISO, suas impurezas e produtos de degradação, como o ácido isonicotínico, isonicotinato de etila, 4-cianopiridina e isonicotinamida foi otimizada. A condição experimental consistiu em um eletrólito contendo 50,0 mmol L<sup>-1</sup> de tampão ácido acético/acetato de sódio e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup>, polaridade normal (+20 kV) e detecção UV em 270 nm. É importante ressaltar que planejamentos de experimentos, tais como,

planejamento fatorial completo  $3^2$  e Box-Behnken  $3^3$  foram utilizados como ferramenta auxiliar no desenvolvimento e otimização das metodologias analíticas (CZE e espectrofotométrica) e na avaliação da robustez para a análise de 4-DFC.

Palavras-chave: Tuberculose. Etambutol. Isoniazida. Rifampicina. Pirazinamida. Eletforese capilar de zona. Detecção UV.



## ABSTRACT

The main focus of this thesis was the development, optimization and validation of analytical methodologies for analysis of pharmaceutical preparations used for tuberculosis treatment, which contain as active ingredients, ethambutol (ETB), isoniazid (ISO), rifampicin (RIF) and pyrazinamide (PYR) isolated or in association. Two analytical methodologies for ETB analysis in tablets were developed initially: the first one took into account the capillary zone electrophoresis (CZE) approach for simultaneous analysis of ETB and its impurity 2-amino-1-butanol using an electrolyte consisting of 60.0 mmol L<sup>-1</sup> of acetic acid/acetate buffer, 5.0 mmol L<sup>-1</sup> of Cu<sup>2+</sup>, under normal polarity (+25 kV) and UV detection at 262 nm. The second one was performed by spectrophotometry using 5.0 mmol L<sup>-1</sup> of acetic acid/acetate buffer and 0.5 mmol L<sup>-1</sup> of Cu<sup>2+</sup> for standards and sample dilutions under UV detection at 262 nm. The CuETB complex was necessary for the two methodologies, since ETB presents low molar absorptivity. Some merit figures such as linearity, repeatability, accuracy, limit of detection and limit of quantification were evaluated for both methodologies. These methodologies were compared and they did not present significant differences at the 95% confidence level using the parametric independent sample t test. In a second phase a novel method for the simultaneous analysis of fixed dose combination (FDC) containing ETB, ISO, RIF and PYR by CZE under UV detection was developed, optimized and validated. The experimental condition optimized consisted of an electrolyte containing 50.0 mmol L<sup>-1</sup> of acetic acid/acetate buffer and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> of Cu<sup>2+</sup> under normal polarity (+22 kV). This methodology was successfully applied to the analysis of 2-FDC (ISO and PYR) in tablet samples and 4-FDC (ETB, ISO, RIF and PYR) in a sachet sample. Finally, a CZE methodology using UV detection for simultaneous analysis of ISO, its impurities and degradation products such as isonicotinic acid, ethyl isonicotinate, 4-cyanopyridine and isonicotinamide was optimized. The optimized experimental condition consisted of an electrolyte containing 50.0 mmol L<sup>-1</sup> of acetic acid/acetate buffer and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> of Cu<sup>2+</sup> under normal polarity (+20 kV) and UV detection at 270 nm. It is important to stress that design of experiment such as 3<sup>2</sup> full factorial design and 3<sup>3</sup> Box-Behnken design were used as auxiliary tools in the development and

optimization of the analytical methodologies (CZE and spectrophotometric) and robustness evaluation for 4-FDC analysis.

Keywords: Tuberculosis. Ethambutol. Isoniazid. Rifampicin. Pyrazinamide. Capillary zone electrophoresis. UV detection.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura química da ISO .....	5
Figura 1.2	Estrutura química da RIF .....	6
Figura 1.3	Estrutura química da PIR .....	8
Figura 1.4	Estrutura química do ETB .....	9
Figura 1.5	Representação esquemática de um sistema básico de CE .....	19
Figura 1.6	Modelo para a interface capilar/solução e para o EOF .....	20
Figura 1.7	Esquema da migração eletroforética de um cátion .....	24
Figura 1.8	Representação esquemática de um sistema básico de CE e seu funcionamento. E: eletrodo .....	26
Figura 1.9	Representação esquemática da migração de moléculas neutras e íons de diferentes cargas e tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva .....	26
Figura 1.10	Diagrama de distribuição e curva de mobilidade efetiva para a SPFLX .....	28
Figura 1.11	Esquema de injeção hidrodinâmica: (A) pressurização positiva; (B) vácuo (pressurização negativa); (C) sifonagem .....	30
Figura 1.12	Esquema de injeção eletrocínética .....	31
Figura 1.13	Esquema de separação por CZE, sob EOF normal, de diferentes cátions .....	32
Figura 4.1	Estrutura química do 2 <sup>a</sup> 1B, produto de degradação do ETB .....	72
Figura 4.2	Espectros UV-vis de $2,5 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> de CuSO <sub>4</sub> , ETB e 2 <sup>a</sup> 1B, e das misturas CuETB e Cu2A1B na proporção 1:1. Todas as	

	soluções foram diluídas em 60 mmol L <sup>-1</sup> de solução tampão Hac/NaAc .....	73
Figura 4.3	Eletoferogramas dos experimentos: 2 (A); 3 (B), com perfil semelhante ao 6; 4 (C), com perfil semelhante aos experimentos 1, 5, 7, 8 e 9. Picos: (1) Na <sup>+</sup> ; (2) Cu <sub>2</sub> A1B; (3) Cu <sup>2+</sup> ; (4) CuETB. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +25 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; eletrólito descrito na Tabela 4.1 .....	75
Figura 4.4	Eletoferogramas: (A) padrão de 2A1B; (B) amostra fortificada com 2 <sup>a</sup> 1B; (C) amostra concentrada; (D) amostra diluída. Picos: (1) Na <sup>+</sup> ; (2) Cu <sub>2</sub> A1B; (3) Cu <sup>2+</sup> ; (4) CuETB; (*) efeito de matriz. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +25 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; eletrólito: 60 mmol L <sup>-1</sup> de tampão de Hac/NaAc (pH 4,6) e 5 mmol L <sup>-1</sup> de CuSO <sub>4</sub> .....	79
Figura 4.5	Espectros eletrônico do complexo CuETB para o planejamento fatorial 3 <sup>2</sup> .....	82
Figura 4.6	Superfície de resposta para o modelo ajustado .....	86
Figura 4.7	Curva de calibração externa para a quantificação espectrofotométrica .....	87
Figura 4.8	Estrutura cristalina do complexo CuETB .....	89
Figura 4.9	Curva de mobilidade efetiva para ETB, ISO, RIF e RIR .....	91
Figura 4.10	Espectros UV-vis de 10 mg L <sup>-1</sup> de ETB, CuETB (com adição de 2,5 x 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> de Cu <sup>2+</sup> ), ISO, RIF e PIR. Todas as soluções foram diluídas em 60,0 mmol L <sup>-1</sup> de solução tampão Hac/NaAc ....	91
Figura 4.11	Gráfico de número de pratos da RIF (N <sub>RIF</sub> ), valor arbitrário de 4000 para ausência e 1000 para presença de decomposição no pico da RIF e R <sub>PIR,pico do sistema</sub> <i>versus</i> experimento realizado para	

	planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	93
Figura 4.12	<p>Separação de mistura de padrões: (1) ETB, (2) ISO, (3) RIF e (4) PIR, diluída em solução aquosa CuSO<sub>4</sub> e Brij 35 nas concentrações descrita na Tabela 3.7; solução estoque de RIF foi preparada em Brij 35 na concentração descrita na Tabela 4.7. Eletroferograma: (A) experimento 3; (B) experimento 1; (C) experimento 10 com perfil semelhante aos experimentos 4, 5, 12 e 13; (D) experimento 9 com perfil semelhante aos experimentos 2, 6, 7, 8 e 11. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +25 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; capilar: 75 μm x 48,5 cm; eletrólito conforme descrito na Tabela 4.7 .....</p>	95
Figura 4.13	<p>Separação de mistura de padrões (1) ETB, (2) ISO, (3) RIF, (4) PIR; (*) produto de degradação da RIF. Eletroferogramas: (A) nas condições otimizadas descritas na Figura 4.12, (B) nas mesmas condições experimentais, exceto adição de Cu<sup>2+</sup> no eletrólito e na diluição dos padrões.....</p>	96
Figura 4.14	Gráfico de R <sub>ETB, PI</sub> e T <sub>PI</sub> <i>versus</i> voltagem aplicada .....	97
Figura 4.15	<p>Separação de mistura de padrões (1) ETB, (2) SPFLX – PI, (3) ISO, (4) RIF, (5) PIR. Eletroferogramas: (A) 1<sup>a</sup> corrida, (B) 33<sup>a</sup> corrida, (C) 1<sup>a</sup> corrida após substituição do eletrólito. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +22 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; capilar: 75 μm x 48,5 cm; eletrólito: 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão Hac/NaAc e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> .....</p>	98
Figura 4.16	<p>Superfície de resposta obtida para: (A) R<sub>ETB, PI</sub>, (B) R<sub>PIR, pico do sistema</sub> e (C) N<sub>RIF</sub>, mantendo constante no nível (0) os fatores Cu<sup>2+</sup>, Brij 35 e voltagem, respectivamente .....</p>	108
Figura 4.17	Eletroferogramas das amostras analisadas: (A) 4-DFC, (B) ETB,	

	(C) 2-DFC, (D) PIR, onde (1) ETB, (2) PI, (3) ISO, (4) RIF, (5) PIR. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +22 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; capilar: 75 µm x 48,5 cm; eletrólito: 50 mmol L <sup>-1</sup> de tampão Hac/NaAc e 12,5 mmol L <sup>-1</sup> de CuSO <sub>4</sub> .....	110
Figura 4.18	Eletoferograma da amostra 2-DFC: (1) ISO, (2) RIF e (3) produto de degradação, diluída em 2 mmol L <sup>-1</sup> de Brij 35 e 12,5 mmol L <sup>-1</sup> de CuSO <sub>4</sub> . Condições experimentais: eletrólito: 50 mmol L <sup>-1</sup> de tampão Hac/NaAc e 12,5 mmol L <sup>-1</sup> de CuSO <sub>4</sub> ; voltagem: +22 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; capilar: 75 µm x 48,5 cm; injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; para a amostra (IV) injeção hidrodinâmica: 30 mbar.10 s.....	112
Figura 4.19	Espectros de EPR dos complexos dos analitos com Cu(II) e do íon [Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup> .....	113
Figura 4.20	Esquema 1: Esquema reacional da fabricação industrial da ISO a partir do AIN; Esquema 2: Esquema reacional de fabricação industrial da ISO a partir da CPD.....	116
Figura 4.21	Estrutura química da ISO, suas principais impurezas e produtos de degradação .....	117
Figura 4.22	Espectros UV de solução aquosa 10 mg L <sup>-1</sup> de ISO, INE, IND, CPD e AIN .....	118
Figura 4.23	Curva de mobilidade efetiva para ISO, IND, AIN, INE e CPD .....	119
Figura 4.24	Separação de mistura de padrões (1) ISO, (2) INE, (3) IND, (4) CPD e (5) AIN, diluída em solução aquosa contendo CuSO <sub>4</sub> e Brij 35 nas concentrações descritas na Tabela 4.15. Eletoferogramas: (A) experimento 2, com perfil semelhante aos experimentos 1, 9 e 11; (B) experimento 4; (C) experimento 6, com perfil semelhante aos experimentos 3, 5, 7, 8, 12 e 13; (D) experimento 10. Condições experimentais: eletrólito: 50 mmol L <sup>-1</sup>	

	de tampão Hac/NaAc e CuSO <sub>4</sub> na concentração descrita na Tabela 4.15; injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5 s; detecção direta em 270 nm; capilar: 75 μm x 48,5 cm; voltagem: descrita na Tabela 4.15 .....	123
Figura 4.25	Superfícies de resposta obtidas para R <sub>INE,IND</sub> e R <sub>CPD,pico</sub> do sistema, nas três combinações possíveis, com um fator constante no nível (0): (A) voltagem; (B) Cu <sup>2+</sup> ; (C) Brij 35 .....	129
Figura 4.26	Eletoferogramas: (A) amostra; (B) amostra com adição de padrão. (1) ETB – PI, (2) ISO, (3) INE, (4) IND, (5) CPD, (6) AIN e (*) impureza ou produto de degradação; as soluções foram diluídas em 12,5 mmol L <sup>-1</sup> de CuSO <sub>4</sub> e 1 mmol L <sup>-1</sup> de Brij 35. Condições experimentais: eletrólito: 50 mmol L <sup>-1</sup> de tampão Hac/NaAc e 12,5 mmol L <sup>-1</sup> de CuSO <sub>4</sub> ; injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5 s; detecção direta em 270 nm; capilar: 75 μm x 48,5 cm; voltagem: +20 kV .....	134

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Esquema básico para tratamento da TB em adultos e adolescentes.....	12
Tabela 1.2	Matriz de planejamento $2^2$ .....	37
Tabela 1.3	Matriz de planejamento para um Box-Behnken $3^3$ .....	42
Tabela 1.4	Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados .....	45
Tabela 4.1	Matriz de planejamento $3^2$ e as resoluções monitoradas .....	74
Tabela 4.2	Resultados estatísticos para linearidade, seletividade, repetitividade, recuperação, LD e LQ .....	77
Tabela 4.3	Matriz de planejamento $3^2$ e as absorbâncias medidas .....	82
Tabela 4.4	Estimadores do modelo para absorvância .....	85
Tabela 4.5	Resultados da ANOVA para o ajuste do modelo linear nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados .....	85
Tabela 4.6	Análise estatística dos teores de ETB.2HCl determinados por CZE e por espectrofotometria .....	88
Tabela 4.7	Matriz de planejamento para um Box-Behnken $3^3$ .....	93
Tabela 4.8	Resultados do estudo de conformidade do sistema .....	99
Tabela 4.9	Resultados estatísticos para linearidade, seletividade, repetitividade, recuperação, LD e LQ .....	101
Tabela 4.10	Matriz de planejamento para o Box-Behnken $3^3$ e resultados para avaliação da robustez .....	102
Tabela 4.11	Estimadores dos modelos para $R_{ETB,PI}$ , $R_{PIR,pico}$ do sistema e $N_{RIF}$ ....	105



Tabela 4.12	Resultados da ANOVA para o ajuste dos modelos lineares nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados .....	106
Tabela 4.13	Resultados da determinação dos teores dos princípios ativos ETB, ISO, RIF e PIR, em diferentes formulações farmacêuticas ...	109
Tabela 4.14	Resultados de EPR para os complexos de Cu(II) com os fármacos .....	114
Tabela 4.15	Matriz de planejamento para o 3 <sup>3</sup> Box-Behnken e as resoluções monitoradas .....	121
Tabela 4.16	Estimadores do modelo para $R_{INE,IND}$ e $R_{CPD,pico}$ do sistema .....	126
Tabela 4.17	Resultados da ANOVA para o ajuste dos modelos lineares nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados .....	127
Tabela 4.18	Análise estatística dos experimentos 4 e 10 .....	130
Tabela 4.19	Resultados estatísticos para linearidade, repetitividade, recuperação, LD, LQ e quantificação da amostra .....	133

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2 <sup>a</sup> 1B	2-amino-1-butanol
4-DFC	4 fármacos em dose fixa combinada
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, do inglês: <i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
AIN	Ácido isonicotínico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Brij 35	Éter laurílico de polioxietileno 23
CE	Eletroforese capilar, do inglês: <i>capillary electrophoresis</i>
CFA	Composição fixa de aditivos
CPD	4-cianopiridina
CV	Coeficiente de variação
CZE	Eletroforese capilar de zona, do inglês: <i>capillary zone electrophoresis</i>
d.e.	Diâmetro externo do capilar
d.i.	Diâmetro interno do capilar
DAD	Arranjo de diodos, do inglês: <i>diode array</i>
DFC	Dose fixa combinada
DNA	Ácido desoxirribonucléico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DPP	Derivado Purificado da Proteína do bacilo da tuberculose
EOF	Fluxo eletrosmótico, do inglês: <i>electroosmotic flow</i>
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica, do inglês: <i>electron paramagnetic resonance</i>
ETB	Etambutol
ETB.2HCl	Dicloridrato de etambutol

Hac/NaAc	Tampão ácido acético/acetato de sódio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês: <i>human immunodeficiency virus</i>
HLA/SX	Análise linear híbrida, do inglês: <i>hybrid linear analysis</i>
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês: <i>high-performance liquid chromatography</i>
HT-UPLC	Cromatografia a líquido de ultra eficiência com alta temperatura, do inglês <i>ultra performance liquid chromatography with high temperature</i>
ICH	International Conference on Harmonisation
IND	Isonicotinamida
INE	Isonicotinato de etila
ISO	Isoniazida
LC/MS/MS	Cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa, do inglês: <i>liquid chromatography/ tandem mass spectrometry</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MDR-TB	Tuberculose multirresistente às drogas, do inglês: <i>multi-drug resistant tuberculosis</i>
MEKC	Cromatografia eletrocinética capilar micelar, do inglês: <i>micellar electrokinetic capillary chromatography</i>
MeOH	Metanol
MIC	Concentração inibitória mínima, do inglês: <i>minimum inhibitory concentration</i>
MQ <sub>ep</sub>	Média quadrática devido ao erro puro
MQ <sub>faj</sub>	Média quadrática devido à falta de ajuste
MQ <sub>R</sub>	Média quadrática devido à regressão
MQ <sub>r</sub>	Média quadrática residual

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Regressão por componentes principais, do inglês: <i>principal component regression</i>
PI	Padrão interno
PIR	Pirazinamida
PLS1	Regressão por mínimos quadrados parciais, do inglês: <i>classical partial least squares</i>
PNCT	Programa Nacional de Controle da Tuberculose
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês ribonucleic acid
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês: relative standard derivation
SDS	Dodecil sulfato do sódio, do inglês: sodium dodecyl sulfate
SPFLX	Sparfloxacina
SQ <sub>ep</sub>	Soma quadrática devido ao erro puro
SQ <sub>faj</sub>	Soma quadrática devido à falta de ajuste
SQ <sub>R</sub>	Soma quadrática devida à regressão
SQ <sub>r</sub>	Soma quadrática residual
SQ <sub>T</sub>	Soma quadrática total
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
UPLC	Cromatografia a líquido de ultra eficiência, do inglês: <i>ultra performance liquid chromatography</i>
US-FDA	United States Food and Drug Administration
USP	Farmacopéia Americana, do inglês: <i>United States Pharmacopeia</i>
USP/NF	United States Pharmacopeia/National Formulary
UV	Ultravioleta

UV-vis Ultravioleta-visível

XDR-TB Tuberculose super-resistente aos medicamentos, do inglês: *extensively drug-resistant tuberculosis*

## LISTA DE SÍMBOLOS

$h$	Altura de elevação do reservatório de amostra
$H_{\text{máx}}$	Altura máxima do pico do analito
$H_{\text{mín}}$	Altura mínima do pico do analito
$\text{p}K_a$	Antilogaritmo da constante de dissociação de um ácido
$A_x$	Área do analito na amostra
$A_{x+p}$	Área do analito na amostra com adição de padrão
$E$	Campo elétrico
$Z$	Carga do íon
$q$	Carga do soluto
$e$	Carga elementar de um elétron
$e_a$	Carga por unidade de área da superfície interna do capilar
$S$	Coefficiente angular da curva analítica
$r$	Coefficiente de correlação
$R^2$	Coefficiente de determinação
$L_{\text{ef}}$	Comprimento efetivo do capilar
$L_{\text{tot}}$	Comprimento total do capilar
$C_a$	Concentração da amostra
$C_i$	Concentração dos íons do eletrólito
$K_a$	Constante de dissociação do ácido
$\epsilon_0$	Constante de permissividade elétrica do vácuo
$s$	Desvio padrão
$s_y$	Desvio padrão dos valores $y_{ij}$ em relação a suas médias
$s_{y,x}$	Desvio padrão residual
$d_i$	Diâmetro interno do capilar

$\Delta P$	Diferença de pressão aplicada
$t_v$	Distribuição de Student
$F_{v1,v2}$	Distribuição F
e.p.média	Erro padrão da média
e.p.efeitos	Erro padrão dos efeitos
e.p.b	Erro puro dos estimadores
$\delta$	Espessura da dupla camada
b	Estimador do parâmetro populacional do modelo
$F_{\text{atrito}}$	Força de atrito
$F_{\text{elétrica}}$	Força elétrica
FI	Força iônica
$\alpha$	Grau de dissociação
v	Grau de liberdade
w	Largura do pico de um soluto medida na base
$\bar{x}$	Média
$\bar{y}$	Média das respostas experimentais das observações
D	Média dos coeficientes de difusão de dois solutos
AV	Metade da amplitude de variação
$\mu_{\text{ef}}$	Mobilidade efetiva
$\mu_{\text{ep}}$	Mobilidade eletroforética
$\mu_{\text{eo}}$	Mobilidade eletroosmótica
$\mu_{\text{média}}$	Mobilidade média dos solutos
$\mu_{\text{obs}}$	Mobilidade observada
$m_i$	Número de medição
m	Número de níveis distintos da variável independente

$p$	Número de parâmetros do modelo
$N$	Número de pratos
$n_i$	Número de repetições no nível $i$
$n_{PC}$	Número de réplicas no ponto central
$n_T$	Número total de ensaios
$n$	Número total de observações
$n_-$	Número total de sinais negativos na coluna de um fator
$n_+$	Número total de sinais positivos na coluna de um fator
$\epsilon_r$	Permitividade relativa da solução
$2^k$	Planejamento fatorial de dois níveis e $k$ fatores
$PC_i$	Ponto central da variável $i$
$\%R$	Porcentagem de recuperação
$\zeta$	Potencial zeta
$Q_{inj}$	Quantidade de amostra injetada
$r$	Raio iônico efetivo
$R$	Resolução entre dois pares de picos adjacentes
$y_i$	Resposta experimental das observações
$\hat{y}_i$	Resposta prevista utilizando um modelo de previsão
$S_a$	Sinal analítico da amostra
$S_{a+p}$	Sinal analítico da amostra com adição de padrão
$S_p$	Sinal analítico do padrão
$t_m$	Tempo de migração
$g_{//}$	Tensor do desdobramento espectroscópico paralelo
$g_{\perp}$	Tensor do desdobramento espectroscópico perpendicular
$A_{//}$	Tensor do desdobramento hiperfino paralelo



$A_{\perp}$	Tensor do desdobramento hiperfino perpendicular
$\mu_0$	Valor declarado
$s^2$	Variância
$s_{ag}^2$	Variância agrupada
$\hat{V}_{m\acute{e}d\acute{i}a}$	Variância da média
$\hat{V}_{efeitos}$	Variância dos efeitos
$\hat{V}_b$	Variância dos estimadores
$v_{ep}$	Velocidade eletroforética
$v_{eo}$	Velocidade eletroosmótica
$\eta$	Viscosidade
$V$	Voltagem
$v_x$	Volume de amostra
$v_{inj}$	Volume de amostra injetado
$v_p$	Volume de padrão adicionado

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	TUBERCULOSE .....	1
1.1.1	Números da Tuberculose .....	3
1.1.2	Tuberculostáticos de Primeira Escolha .....	5
1.1.2.1	Isoniazida .....	5
1.1.2.2	Rifampicina .....	6
1.1.2.3	Pirazinamida .....	8
1.1.2.4	Etambutol .....	9
1.1.3	Dose Fixa Combinada .....	10
1.1.4	O Tratamento da Tuberculose .....	11
1.2	METODOLOGIAS DE ANÁLISE .....	14
1.3	ELETROFORESE CAPILAR .....	18
1.3.1	Instrumentação .....	18
1.3.2	Fundamentos Teóricos .....	19
1.3.2.1	Fluxo Eletroosmótico .....	19
1.3.2.2	Mobilidade Eletroosmótica .....	21
1.3.2.3	Mobilidade Eletroforética .....	23
1.3.2.4	Mobilidade Observada .....	25
1.3.2.5	Mobilidade Efetiva .....	27
1.3.3	Introdução da Amostra .....	29
1.3.4	Modos de Separação .....	31
1.3.4.1	Eletroforese Capilar de Zona .....	31
1.3.4.1.1	Solução Tampão .....	34

1.3.4.1.2	Aditivos .....	35
1.4	PLANEJAMENTO FATORIAL .....	36
1.4.1	Planejamento Fatorial $2^k$ .....	36
1.4.2	Planejamento Box-Behnken .....	41
1.4.3	Análise de Variância .....	42
1.5	VALIDAÇÃO .....	46
1.5.1	Seletividade .....	47
1.5.2	Linearidade e Faixa de Aplicação .....	48
1.5.3	Precisão .....	49
1.5.4	Exatidão .....	50
1.5.5	Limite de Detecção .....	51
1.5.6	Limite de Quantificação .....	52
1.5.7	Robustez .....	53
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>55</b>
3.1	REAGENTES .....	55
3.2	INSTRUMENTAÇÃO .....	56
3.3	ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ETB E 2-AMINO-1-BUTANOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR CZE UTILIZANDO COMPLEXAÇÃO COM COBRE(II) .....	57
3.3.1	Soluções Estoque .....	57
3.3.2	Amostra .....	57
3.3.3	Procedimentos para Avaliação de Figuras de Mérito .....	57
3.3.4	Formação do Complexo CuETB .....	58
3.4	METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA ALTERNATIVA PARA ANÁLISE DE ETAMBUTOL EM FORMULAÇÃO	

	FARMACÊUTICA .....	60
3.4.1	Soluções Estoque .....	60
3.4.2	Amostra .....	60
3.4.3	Procedimentos para Avaliação de Figuras de Mérito .....	61
3.5	ANÁLISE SIMULTÂNEA DOS TUBERCULOSTÁTICOS DE PRIMEIRA ESCOLHA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CZE SOB DETECÇÃO UV .....	62
3.5.1	Soluções estoque .....	62
3.5.2	Amostras .....	62
3.5.3	Procedimentos para Validação da Metodologia .....	63
3.5.4	Amostra para Teste de Degradação .....	65
3.5.5	Caracterização dos Complexos .....	66
3.6	ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ISO, SUAS IMPUREZAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CZE .....	67
3.6.1	Soluções estoque .....	67
3.6.2	Síntese do INE .....	67
3.6.3	Síntese da IND .....	68
3.6.4	Amostra .....	68
3.6.5	Procedimentos para Avaliação de Figuras de Mérito .....	69
3.7	PROCEDIMENTO ANALÍTICO .....	70
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	71
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
4.1	ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ETB E 2-AMINO-1-BUTANOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR CZE UTILIZANDO COMPLEXAÇÃO COM COBRE(II) .....	72
4.1.1	Estudo de Formação do Complexo CuETB .....	72
4.1.2	Otimização do Sistema de Eletrólito .....	74

4.1.3	Figuras de Mérito .....	75
4.1.4	Análise de Formulação Farmacêutica .....	78
4.1.5	Considerações .....	79
4.2	METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA ALTERNATIVA PARA ANÁLISE DE ETAMBUTOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA .....	81
4.2.1	Otimização do Sinal de Absorbância .....	81
4.2.2	Análise de Formulação Farmacêutica .....	86
4.2.3	Considerações .....	88
4.3	ANÁLISE SIMULTÂNEA DOS TUBERCULOSTÁTICOS DE PRIMEIRA ESCOLHA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CZE SOB DETECÇÃO UV .....	90
4.3.1	Otimização do Sistema de Eletrólito .....	90
4.3.2	Seleção do Padrão Interno .....	96
4.3.3	Estudo da Estabilidade do Eletrólito e da Solução de RIF .....	97
4.3.4	Validação .....	98
4.3.4.1	Conformidade do Sistema .....	98
4.3.4.2	Parâmetros de Validação .....	99
4.3.5	Quantificação .....	109
4.3.6	Detecção de Produtos de Degradação .....	111
4.3.7	Estudo de Caracterização dos Complexos .....	112
4.3.8	Considerações .....	115
4.4	ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ISO, SUAS IMPUREZAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR CZE .....	116
4.4.1	Seleção do Comprimento de Onda .....	117
4.4.2	Otimização do Sistema de Eletrólito .....	118
4.4.3	Análise por Superfície de Resposta .....	123

4.4.4	Seleção da Condição Experimental Ótima .....	130
4.4.5	Figuras de Mérito e Análise de Formulação Farmacêutica .....	131
4.5	Considerações .....	134
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>135</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>137</b>
	<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>148</b>
	<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>153</b>
	<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>158</b>
	<b>ANEXO A – DISTRIBUIÇÃO t .....</b>	<b>165</b>
	<b>ANEXO B – DISTRIBUIÇÃO F .....</b>	<b>166</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa grave, negligenciável, transmitida pelo ar, sendo o agente etiológico responsável a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, isolada e descoberta pelo cientista alemão Robert Koch em 1882 (DE SOUZA, 2008).

A TB se desenvolve rapidamente em áreas do corpo com muito oxigênio, sendo o pulmão o principal órgão atingido pela doença. Após um período de 15 dias, os bacilos passam a se multiplicar facilmente nos pulmões, pois ainda não há proteção natural do organismo contra a doença. Se o sistema de defesa não conseguir destruir o bacilo, instala-se a TB primária, caracterizada por pequenas lesões (nódulos) nos pulmões. Com o tempo e sem o devido tratamento, o avanço da doença começa a provocar sintomas mais graves. De pequenas lesões, os bacilos cavam as chamadas cavernas tuberculosas, que costumam inflamar com frequência e sangrar. A tosse, nesse caso, não é seca, mas com pus e sangue, é chamada hemoptise (DE SOUZA, 2008).

Os sintomas de uma pessoa que foi infectada pelo bacilo geralmente são: tosse crônica, febre, suor noturno, dor no tórax, anorexia e adinamia (falta de disposição) (DE SOUZA, 2006).

As formas extra-pulmonares mais freqüentes da doença são a pleural (que ocorre por ruptura de pequenos focos pulmonares subpleurais) - 45%, a linfática - 15%, a gênito-urinária - 16%, a miliar (disseminação por ruptura de lesão dentro de um vaso sanguíneo com disseminação dos bacilos por todo organismo) - 10% e a osteo-articular - 7%. A forma extra-pulmonar representa cerca de 18% do total de casos notificados (DE SOUZA, 2006).

São mais susceptíveis à doença, idosos, as crianças, profissionais de saúde, mineiros portadores de silicose, pessoas com problemas de alcoolismo e nutrição, usuários de medicamentos como corticóides e portadores de outras doenças como o diabetes, neoplasias e a sarcoidose (DE SOUZA, 2006).

A TB esteve presente desde os primórdios da civilização humana e inclusive evidenciada em múmias do antigo Egito, além de estar mencionada em registros

antigos de diferentes povos, como por exemplo, assírios, hebreus, chineses, indianos, gregos e romanos possuindo diferentes nomes, sendo o nome tuberculose somente adotado em 1839, por Johann Lucas Schonlein (1793-1864) (DE SOUZA et al., 2008). A cura e a causa da TB foram objetos de inúmeros estudos e teorias durante séculos e envolta de dúvidas e mistérios, com a população humana totalmente indefesa a esta doença durante milênios, sendo responsável pela morte de bilhões de pessoas. Para se ter uma idéia do panorama trágico da TB, alguns acreditavam que a sociedade européia iria desaparecer até o final do século dezenove vítima desta doença. Devido ao desenvolvimento científico dos séculos dezenove e vinte, e após a descoberta de Koch em 1892 sobre a causa da TB, inúmeras importantes descobertas foram responsáveis pelo controle e cura desta doença, dentre elas, podemos mencionar a descoberta do raio X em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Roentgen (1845-1923) (Prêmio Nobel em 1901); um eficiente e simples teste para identificar pessoas infectadas foi desenvolvido pelos pesquisadores alemão Felix Mendel (1862-1925) e o francês Charles Mantoux (1877-1947) e ainda hoje utilizado e mais conhecido como DPP (Derivado Purificado da Proteína do bacilo da TB); a vacina BCG (bacillus Calmette-Guérin) foi desenvolvida e aplicada em 1921 em humanos, e até hoje é utilizada em crianças de 0 a 4 anos, sendo seu nome uma homenagem a seus inventores, os franceses Albert Calmette e Camille Guérin e finalmente, a descoberta em 1943 do antibiótico estreptomicina pelo americano Selman Waksman (Prêmio Nobel em medicina em 1952), que foi um importante marco no combate à TB e o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento desta doença, abrindo assim, novas perspectivas para a busca de novos fármacos (DE SOUZA et al., 2008).

Após a descoberta de Waksman, vários compostos foram sintetizados e testados, identificando-se assim, os compostos que até hoje são utilizados como fármacos de primeira escolha no tratamento da TB, a saber: a isoniazida (ISO) em 1952, a rifampicina (RIF) em 1965, o etambutol (ETB) em 1968 e a pirazinamida (PIR) em 1970 (DE SOUZA, 2006; DE SOUZA, 2008).

Devido ao sucesso desses fármacos, acreditava-se que entre as décadas de 70 e 80 a TB seria erradicada. No entanto, o que se observou foi o seu reaparecimento no início da década de 80 como um sério problema de saúde mundial. Vários foram os fatores responsáveis pelo ressurgimento da TB no mundo, dentre eles podemos destacar a não adesão dos pacientes ao tratamento, que



contribuiu para o aparecimento de bactérias resistentes aos fármacos utilizados, aumento da pobreza, envelhecimento da população, a falta de informação, os movimentos migratórios, ausência de investimentos e o surgimento, na mesma década, da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS, do inglês: *Acquired Immuno Deficiency Syndrome*) (DE SOUZA, 2009; CARVALHO et al., 2008).

Os casos de TB multirresistente às drogas (MDR-TB, do inglês: *multi-drug resistant tuberculosis*), que ocorre quando o bacilo torna-se resistente a pelo menos RIF e ISO, têm aumentado a cada ano (WHO, 2009). Estima-se que pelo menos 4% de pacientes com TB têm cepas que são resistentes, a pelo menos um, dos atuais medicamentos de primeira escolha e mais de 400.000 novos casos de MDR-TB são detectados todos os anos. O aumento nos casos de MDR-TB é devido a vários fatores, tais como controle inadequado da TB básica, baixo investimento, a falta de novos fármacos e estratégias, co-infecção com o vírus HIV e a transmissão de cepas resistentes de doenças infectocontagiosas de uma pessoa para outra. Neste caso, medicamentos de segunda escolha são utilizados.

Outro enorme problema recentemente descoberto é uma classe de bactérias super-resistentes aos medicamentos (XDR-TB, do inglês: *extensively drug-resistant tuberculosis*), que são cepas resistentes aos fármacos de primeira e segunda escolha. O surgimento da MDR-TB e da XDR-TB tem causado graves problemas no tratamento da TB (WHO, 2009; DE SOUZA, 2009).

Devido às proporções assustadoras da TB no cenário mundial, essa doença foi declarada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1993, um problema de proporções mundiais (LOURENÇO et al., 2008; CARDOSO et al., 2009).

### 1.1.1 Números da Tuberculose

Os indicativos da TB no mundo são alarmantes, estima-se que cerca de um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo de Koch, ocorrendo anualmente cerca de 2 a 3 milhões de mortes. Segundo a OMS, uma imensa tragédia poderá ocorrer nas próximas duas décadas, com quase 1 bilhão de pessoas infectadas e mais de 35 milhões de mortes. Esta doença se concentra principalmente nos países em desenvolvimento, nos quais ocorrem 95% dos casos

e, estima-se que, aproximadamente 70% da população esteja infectada. Por exemplo, na Índia, um importante país em desenvolvimento, estima-se que existem cerca de 14 milhões de casos, dos quais são adicionados a cada ano 2 milhões de novos casos com cerca de 500.000 óbitos. Já nos países ricos, este número é menor que 10%, com uma estatística anual de mais de 400.000 novos casos e cerca de 40.000 mortes (DE SOUZA, 2008).

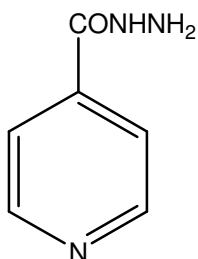
No Brasil, a TB é a sétima doença infecciosa em internação no Sistema Único de Saúde (SUS) e a quarta que mais mata. Estima-se que cerca de 85 mil brasileiros estão infectados pela TB e que ocorra 5 mil óbitos por ano. A incidência é de 39 casos por 100 mil habitantes e 70% estão concentrados em 315 dos 5.565 municípios brasileiros. Entre os estados, aqueles que apresentam maior incidência são: Rio de Janeiro, Amazonas, Pernambuco, Pará e Ceará (VILLELA, 2009).

Embora os casos de TB tenham caído 24,4% no Brasil em sete anos, o país é o 18º numa lista das 22 nações com maior número de pessoas infectadas pela doença. A meta da OMS é reduzir pela metade até 2015 o número de casos e mortes, com ações que estimulem e intensifiquem a execução de políticas nacionais de controle e tratamento da moléstia (VILLELA, 2009).

A TB é também a principal co-infecção em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês: *human immunodeficiency virus*) e a causa mais comum da morte de pacientes com AIDS, responsável por cerca de 32% de todas as mortes ocorridas por esta doença, e em nossos dias, estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo estejam co-infectadas por estas duas doenças. Isto se deve ao comprometimento de seu sistema imunológico, fazendo com que o bacilo de Koch que se encontra em estado de latência, possa ser ativado (CARVALHO et al., 2008).

## 1.1.2 Tuberculostáticos de Primeira Escolha

### 1.1.2.1 Isoniazida



$pK_a$ : 3,79 e 11,27

**Figura 1.1** Estrutura química da ISO.

ISO ou hidrazida do ácido isonicotínico (Figura 1.1) é um agente potente contra a *Mycobacterium tuberculosis*, que surgiu em 1952. A concentração inibitória mínima (MIC, do inglês: *minimum inhibitory concentration*) é muito baixa, o que contribui para sua eficácia ( $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Portanto, a ISO deve ser incluída em qualquer regime terapêutico da TB, a não ser que existam contra-indicações específicas (ROSSETI et al., 2002). A ISO exerce uma ação bacteriostática nos bacilos em repouso e bactericida nos que estão em fase de divisão rápida, como nos bacilos intracelulares (IZONIAZIDA, 2010).

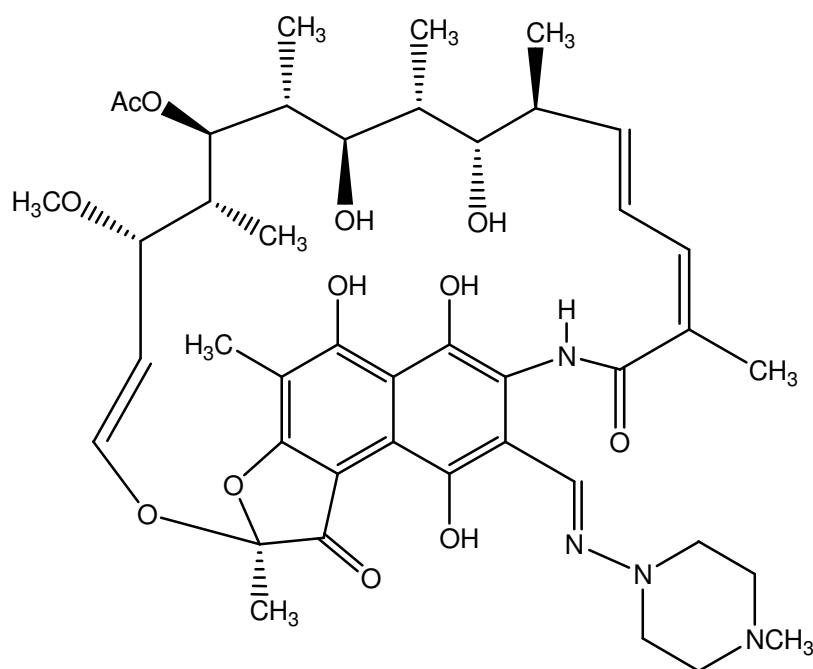
#### *Mecanismo de ação*

Inibe a síntese do ácido micólico, componente essencial da parede celular das micobactérias. Outros mecanismos de ação têm sido aventados, como a quelatação de íons metálicos necessários ao metabolismo da micobactéria e a interferência no metabolismo da glicose e na respiração celular destes microorganismos (IZONIAZIDA, 2009).

### Farmacocinética

Rapidamente absorvida após administração oral (92%), atingindo rapidamente todos os fluidos e células. Apresenta pico plasmático em 1 ou 2 horas e as concentrações no sistema nervoso e no líquido cefalorraquidiano variam de 20 a 100% em relação às do plasma. O tempo de meia-vida varia de 0,8 a 1,8 horas nos indivíduos com acetilação lenta e 2 a 4,5 horas em outros. É excretada primariamente na urina, inalterada ou como derivado acetil ou como ácido isonicotínico (IZONIAZIDA, 2009; IZONIAZIDA, 2010).

#### 1.1.2.2 Rifampicina



$pK_a$ : 4,96 e 7,30

**Figura 1.2** Estrutura química da RIF.

A RIF (Figura 1.2) é um derivado semi-sintético da rifampicina B que é um complexo macrocíclico produzido pelo *Streptomyces mediterranei* que surgiu em

1965 e possui uma MIC de  $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  (RIFAMPICINA, 2010; ROSSETI et al., 2002). A resistência a RIF é pouco comum, porém tem aumentado ultimamente, alertando para o desenvolvimento de linhagens de microorganismos MDR. Dificilmente a resistência a RIF ocorre isolada. Na maioria dos casos, está associada a outros fármacos, principalmente a ISO. Neste contexto, a resistência a RIF pode ser assumida como um marcador para a MDR-TB (VARELDZIS et al., 1994).

### *Mecanismo de ação*

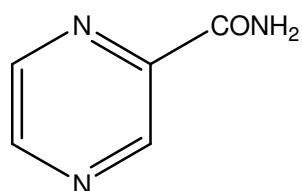
Exerce ação antibacteriana através da inibição da polimerase do ácido ribonucleico (RNA, do inglês: ribonucleic acid) dependente do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês: deoxyribonucleic acid) o que leva a supressão da formação da cadeia na síntese do RNA. Atua na subunidade b da enzima, sendo bactericida tanto para microorganismos extracelulares como intracelulares (RIFAMPICINA, 2010).

### *Farmacocinética*

É bem absorvida por via oral exceto pelos doentes com AIDS, diabetes e problemas gastrointestinais. Existe um agrupamento em 2 tipos consoante a absorção: os doentes que absorvem lentamente e os que absorvem rapidamente, influenciando o efeito terapêutico (RIFAMPICINA, 2010). Apresenta boa distribuição, atingindo inclusive o sistema nervoso. Sua metabolização se faz no fígado, com meia-vida de 3 horas (600 mg), diminuindo um pouco com doses repetidas o que é recompensado porque apresenta ação antibacteriana com níveis mínimos de concentração sanguínea (LAFEPE, 2009). Liga-se de modo extenso às proteínas plasmáticas. O fármaco é desacetilado no fígado e seu metabólito (25-desacetilrifampicina) mantém atividade antibacteriana. É eliminado por via biliar,

entrando em circulação entero-hepático, sendo 30% excretado pela urina e 70% pelas fezes (RIFAMPICINA, 2010).

### 1.1.2.3 Pirazinamida



$pK_a$ : -0,88 e 13,91

**Figura 1.3** Estrutura química da PIR.

PIR (Figura 1.3) é um análogo heterocíclico da nicotinamida, que surgiu em 1970. Possui uma MIC de  $100,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo inativa em pH neutro e ativa contra *Mycobacterium tuberculosis* em pH 5,5. O seu uso foi inicialmente contestado devido à sua toxicidade hepática relacionada com a posologia excessivamente elevada, mas atualmente é muito usada devido à sua capacidade de “esterilizar a lesão” atuando nos bacilos em multiplicação lenta ou “bacilos persistentes” (PIRAZINAMIDA, 2009; PIRAZINAMIDA, 2010).

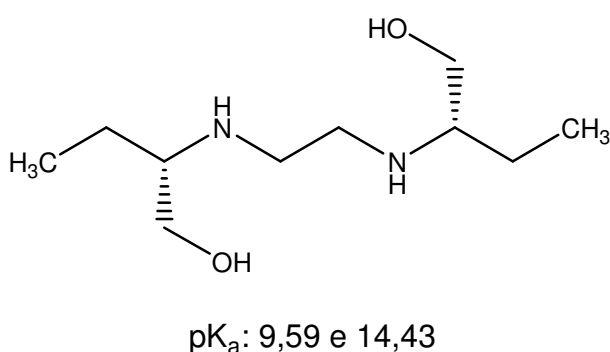
#### *Mecanismo de ação*

É um pró-fármaco bioativado, provavelmente, por amidase em ácido pirazinóico que tem ação bactericida inibindo a síntese dos ácidos micólicos. A sua ação só ocorre no ambiente ácido ( $\text{pH} \leq 5,6$ ) da lesão caseosa ou nos fagolisossomas dos macrófagos (PIRAZINAMIDA, 2010).

### Farmacocinética

É bem absorvido por via oral. Uma dose oral de 1 g produz pico plasmático de  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 2 horas e  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  em 15 horas, apresenta meia-vida de 9 a 10 horas. Metabolizada principalmente no fígado, sofre hidrólise formando ácido pirazinóico, que é o metabólito ativo, seguido de hidroxilação. É excretada rapidamente, principalmente pela urina, parcialmente inalterada e parcialmente como metabólitos (PIRAZINAMIDA, 2009; PIRAZINAMIDA, 2010).

#### 1.1.2.4 Etambutol



**Figura 1.4** Estrutura química do ETB.

ETB (Figura 1.4) é um tuberculostático sintético e micobacteriostático, que surgiu em 1968 e possui uma MIC de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As micobactérias captam rapidamente o ETB quando adicionado as culturas que se encontram em fase exponencial de crescimento. Todavia, a inibição do crescimento não é significativamente antes de 24 horas, aproximadamente. Tem capacidade de atuar nas estirpes resistentes à ISO e à estreptomicina (ETAMBUTOL, 2010; IQUEGO, 2009).

### *Mecanismo de ação*

Afeta a síntese de componentes parietais inibindo a transferase de arabinose envolvida na síntese da parede celular. O seu efeito tuberculostático não é significativamente evidenciado antes de 24 h (ETAMBUTOL, 2010).

### *Farmacocinética*

Administrado por via oral é, rapidamente, absorvido no trato gastrointestinal (75 a 80%). As concentrações máximas no plasma são obtidas dentro de 2 a 4 horas após administração da droga e são proporcionais à dose. A meia-vida da droga é de 3 a 4 horas. Dentro de 24 horas, dois terços de uma dose ingerida são excretados de modo inalterado na urina; até 15% são excretados na forma de dois metabólitos, um aldeído e um derivado do ácido dicarboxílico (IQUEGO, 2009).

#### 1.1.3 Dose Fixa Combinada

Dose fixa combinada (DFC) é a denominação para associação de dois ou mais tuberculostáticos de primeira escolha em proporções fixas e em única forma farmacêutica; possui como principais vantagens: redução do risco de resistência microbiana; menor risco de erros de medicação; melhor adesão do paciente ao tratamento; redução de custos de tratamento; simplificação do manuseio e da distribuição dos fármacos (WHO, 2001). A OMS recomenda o uso de DFC como rotina no tratamento de TB e os coloca na lista de medicamentos essenciais (PANCHAGNULA et al., 2004).

A associação dos fármacos traz vantagens terapêuticas, mas gera novos desafios para a indústria farmacêutica, tais como a estabilidade dos fármacos na associação e a dificuldade analítica para quantificação simultânea. Os problemas associados à qualidade das DFC tais como, a baixa biodisponibilidade da RIF e a



instabilidade da formulação, são conhecidos (BHUTANI et al., 2005). Existem várias justificativas para estes problemas: alteração da forma cristalina da RIF, adsorção do fármaco pelos excipientes, ordem de adição dos fármacos no preparo da formulação, decomposição da formulação e decomposição no estômago (SINGH et al., 2001).

A decomposição na formulação também já é bem conhecida: a RIF em meio ácido hidrolisa a 3-formilrifampicina, esta hidrólise é duas vezes mais rápida na presença de ISO (SHISHOO et al., 1999). A 3- formilrifampicina também reage com a ISO para formar isonicotinil hidrazona, mesmo na forma sólida (SINGH et al., 2001). A PIR e ETB atuam como catalisadores desta reação, mediante a transferência intramolecular de um próton (BHUTANI et al., 2005).

#### 1.1.4 O Tratamento da Tuberculose

No que diz respeito à prevenção da TB, a única vacina disponível é a BCG, que previne o desenvolvimento de formas severas e fatais da doença em crianças, mas não tem sido efetiva em reduzir os casos em adultos. Atualmente, tem sido dada maior atenção ao desenvolvimento de uma nova vacina efetiva, mas este esforço deve levar 25 anos ou mais para ser concluído (DE SOUZA, 2008).

O tratamento corrente utiliza uma combinação de ISO, RIF, PIR e ETB, este foi recentemente reformulado para adolescentes e adultos pelo Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), com o intuito de torná-lo mais eficaz. O ETB foi introduzido na fase intensiva de tratamento do esquema básico, devido à constatação do aumento da resistência primária à ISO (de 4,4 para 6,0%) e a resistência primária à associação ISO-RIF (de 1,1 para 1,4%), observado no II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos Anti-TB conduzido em 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997. Também para a fase intensiva de tratamento, foi adotada a apresentação em comprimidos dos 4 fármacos em dose fixa combinada (4-DFC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). A Tabela 1.1 mostra o novo esquema básico adotado no Brasil para adultos e adolescentes.

O novo esquema básico utilizando o 4-DFC, que ainda não está sendo fabricado no Brasil, trás mais uma vantagem, o menor custo se comparado com o esquema dos fármacos não associados. O tratamento para seis meses com os fármacos não associados custa R\$ 84,55 e com o novo medicamento vale cerca de US\$ 30,00, aproximadamente R\$ 55,00 (TARGINO, 2009).

O esquema básico com 4-DFC é mundialmente utilizado, com excelentes resultados quanto à efetividade, em particular pela maior adesão ao tratamento. Espera-se, portanto, com a introdução do 4-DFC aumentar o sucesso terapêutico devido ao maior conforto do paciente, pela redução do número de comprimidos a serem ingeridos e a impossibilidade de administração isolada dos fármacos, evitando assim o aumento da multirresistência. O 4-DFC também simplifica a gestão farmacêutica em todos os níveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

**Tabela 1.1** Esquema básico para tratamento da TB em adultos e adolescentes

Fase do tratamento	Fármacos	Faixa de peso (kg)	Unidade/dose	Meses
Intensiva	4-DFC*	20 a 35	2 comprimidos	2
		36 a 50	3 comprimidos	
		> 50	4 comprimidos	
Manutenção	2-DFC (RIF-ISO)	20 a 35	1 cápsula (300/200 mg)	4
		36 a 50	1 cápsula (300/200 mg)	
			1 cápsula (150/100 mg)	
		> 50	2 cápsulas (300/200 mg)	

\*150 mg RIF, 75 mg ISO, 400 mg PIR e 275 mg ETB.

A adesão ao tratamento, que é frequentemente baixa, devido à duração do mesmo, à falta de informação e acompanhamento e aos diversos efeitos colaterais tais como náuseas, vômitos, asma, alterações visuais, cegueira, entre outros, tem provocado o desenvolvimento de bactérias multirresistentes aos fármacos de primeira escolha, tornando assim o tratamento ineficaz. Neste caso, uma segunda linha de medicamentos (amicacina, capreomicina, cirpofloxacina, cicloserina, etionamida, canamicina, ofloxacina, ácido *p*-aminosalicílico e protionamida) é

utilizada. No entanto, a utilização destes fármacos apresenta também desvantagens, como maiores efeitos colaterais, uma maior duração no tratamento, entre 18 e 24 meses, custo até 100 vezes maiores e taxas de cura cerca de 60% menores (DE SOUZA, 2006).

O progresso no desenvolvimento de novos fármacos tem sido impedido pela crença de que não é necessário e também pelo alto custo do investimento associado à percepção de que o potencial do mercado global é insuficiente para garantir retorno ao investimento. De acordo com as indústrias farmacêuticas, o custo para desenvolver um fármaco, desde o laboratório até o mercado gira em torno de US\$ 300 a US\$ 500 milhões, tendo os maiores custos com a fase clínica. Neste contexto, estima-se que o mercado potencial retornaria cerca de US\$ 150 milhões por ano, insuficiente para muitas empresas. Para se ter uma idéia da falta de novos fármacos no combate à TB, desde 1966 não foi desenvolvido nenhum novo fármaco para o tratamento desta doença, ao passo que, para o tratamento da AIDS, de 1980 até os dias de hoje foram desenvolvidos 21 novos fármacos. No entanto, devido a TB ser atualmente um grave problema de saúde mundial, diversas iniciativas tem influenciado cada vez mais a pesquisa de novos fármacos nos últimos quinze anos (PALOMINO et al., 2009).

## 1.2 METODOLOGIAS DE ANÁLISE

Diferentes metodologias analíticas foram desenvolvidas com o intuito de determinar ETB, ISO, RIF e PIR em formulações farmacêuticas e em amostras biológicas. Dentre as metodologias mais utilizadas destacam-se técnicas de separação e espectrofotometria UV associada a métodos de regressão multivariada.

A determinação direta de ETB por detecção UV é difícil devido a sua baixa absorvidade molar. Portanto, procedimentos auxiliares, tais como derivatização e complexação são necessários. HASSAN & SHALABY, 1992, propuseram a análise de ETB por absorção atômica, espectrofotometria e potenciometria baseando-se na reação de complexação de ETB com fosfato de cobre em meio de tampão borato pH 9.2. O procedimento envolve passos de aquecimento, resfriamento e filtração. Em 1996, BREDA et al. determinaram ETB em plasma e urina humana por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, do inglês: high-performance liquid chromatography) com detecção por fluorescência através de derivatização com 4-fluor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol. Em 1998, CHENEVIER et al. propuseram um método por HPLC utilizando derivatização química com feniletilisocianato, detecção UV em 200 nm e tempo de análise de 15 min. Uma metodologia por cromatografia a líquido de fase reversa com pareamento iônico a fim de propiciar a formação de complexo catiônico ( $[\text{Cu}_2\text{ETB}](\text{SO}_4^{2-})_2$ ) em solução foi desenvolvida por JIANG et al., 2002. A complexação foi realizada na coluna após adição de  $\text{CuSO}_4$  na fase móvel e ajuste de pH em 4,5 com HCl diluído. Esta metodologia foi sugerida com potencial aplicação no monitoramento de matéria-prima e no controle da qualidade de formulações farmacêuticas. Em 2004, NAKANO et al. desenvolveram uma metodologia por cromatografia a líquido (LC, do inglês: *liquid chromatography*) e detecção por fluorescência utilizando procedimento de derivatização para monitoramento do fármaco em soro de coelho. RAGONESE et al., 2002, utilizaram a eletroforese capilar (CE, do inglês: *capillary electrophoresis*) e planejamento fatorial Box-Behnken para otimização do sistema de eletrólito que propiciou a separação de ETB e 2-amino-1-butanol (2A1B), sua impureza, através de detecção UV em 200 nm e tempo de análise de 4 min. No entanto, apesar da sua importância, este método apresentou baixa sensibilidade sendo necessário a utilização de altas concentrações de ETB na ordem de grandeza de  $10^3 \text{ mg L}^{-1}$  para obter sinal analítico satisfatório.

HSIEH et al., 2006, otimizaram uma metodologia para análise simultânea de ETB e metoxifenamina usando CE com detecção por eletroquimioluminescência em 8 min.

Para a determinação das DFC, diferentes abordagens multivariadas foram utilizadas. Em 1998, BENETTON et al. desenvolveram métodos para a determinação de RIF e ISO, respectivamente, em cápsulas comerciais, utilizando a espectrofotometria visível e a primeira derivada da espectrofotometria UV. Os métodos foram comparados com o recomendado pela Farmacopéia Americana XXIII (USP, do inglês: *United States Pharmacopeia*) apresentando boa concordância entre os resultados, baixo custo e curto tempo de análise. Em 1999, GOICOECHEA & OLIVIERI desenvolveram uma metodologia bem sucedida para determinação simultânea de ISO, RIF e PIR em comprimidos por espectrofotometria no UV-vis através de modelagem da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS1, do inglês: *classical partial least squares*) com alta precisão e exatidão. Em 2001, ESPINOSA-MANSILLA et al. realizaram um estudo comparativo entre a análise linear híbrida (HLA/SX, do inglês: *hybrid linear analysis*) e o PLS1 para determinação simultânea de ISO, RIF e PIR em formulações farmacêuticas. A metodologia por HLA/SX apresentou resultados similares ao PLS1 para análise de RIF e PIR e ligeiramente piores para ISO. Em 2005, MADAN et al. realizaram com sucesso a determinação simultânea de ISO, RIF e PIR por espectrofotometria UV em formulações farmacêuticas através do uso da regressão por componentes principais (PCR, do inglês: *principal component regression*) e PLS1. Em 2008, YOUSSEF et al. propuseram um novo método por calibração multivariada para a análise de misturas ternárias contendo ISO, RIF e PIR.

Por outro lado, a HPLC tem sido bastante utilizada para a quantificação desses três fármacos. Em 1999, PANCHAGNULA et al. propuseram uma metodologia por HPLC com eluição isocrática e fase reversa para determinação de RIF e seus derivados metabólitos em plasma e urina na presença de ISO e PIR em 17 min. Em 2002, ESPINOSA-MANSILA et al. implementaram um método utilizando eluição por gradiente segmentado e detecção fotométrica programada com arranjo de diodo em 254 e 475 nm para determinação simultânea de ISO, RIF, PIR e do metabólito acetilisoniazida. Também em 2002, CALLERI et al. desenvolveram e validaram um método por HPLC utilizando eluição por gradiente e detecção fotométrica com arranjo de diodo para determinação de DFC contendo ISO, RIF e PIR, em 35 min. Ainda em 2002, KHUHAWAR et al. propuseram uma metodologia

por HPLC, utilizando derivatização com 2-fluoreno-carboxaldeído, coluna YMC-ODS, eluição isocrática e detecção UV em 337 nm, para determinação de ISO, RIF e PIR em preparações farmacêuticas e em amostras de sangue de pacientes em tratamento contra TB. Em 2005, UNSALAN et al. propuseram uma metodologia para monitoramento terapêutico de pacientes com TB através de análise de ISO, RIF e PIR em plasma. O método por HPLC consistiu em fase reversa, eluição por gradiente, detecção fotométrica com arranjo de diodo e tempo de análise de 20 min. Em 2008, NGUYEN et al. desenvolveram e validaram um método por cromatografia a líquido de ultra eficiência (UPLC, do inglês: *ultra performance liquid chromatography*) com detecção UV para determinação de ISO, RIF e PIR em DFC. Melhorias na separação foram alcançadas com a combinação da UPLC com alta temperatura (HT-UPLC, do inglês: *ultra performance liquid chromatography with high temperature*), pois permitiu o uso de fluxo da fase móvel mais elevado. A validação de ambos os métodos UPLC e HT-UPLC demonstrou que estes podem ser aplicados à análise de rotina desses fármacos em curto tempo (1 min). Em 2009, JU-YING et al. propuseram uma metodologia para determinação simultânea de ISO, RIF e PIR em fármacos e em urina humana utilizando extração por Cloud Point acoplada a HPLC. Os analitos foram eluídos por gradiente e detectados em 310 nm com tempo de retenção de 14,5 (PIR), 34,4 (ISO) e 38,1 (RIF) min. Neste mesmo ano, GONG et al. desenvolveram um método por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massa (LC/MS/MS, do inglês: *liquid chromatography/ tandem mass spectrometry*) para análise simultânea de ETB e PIR em plasma humano. Normalmente, estes fármacos são combinados para o tratamento da TB, mas devido às polaridades muito diferentes torna-se complicada a determinação por LC/MS/MS. Entretanto, um método robusto e rápido (2,5 min) foi otimizado (GONG et al., 2009).

Em 2002, ACEDO-VALENZUELA et al. investigaram a eletroforese capilar (CE, do inglês: *capillary electrophoresis*) como proposta de separação alternativa para a determinação desses fármacos. Uma metodologia por cromatografia eletrocínética capilar micelar (MEKC, do inglês: *micellar electrokinetic capillary chromatography*) com detecção UV, em 8 min foi desenvolvida. O eletrólito consistiu na mistura de 40,0 mmol L<sup>-1</sup> de tampão borato e 100 mmol L<sup>-1</sup> de dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês: sodium dodecyl sulfate), com pH ajustado em 8,5. A metodologia foi aplicada à análise de formulações farmacêuticas com bons resultados quando comparado com o método de referência por HPLC.

O grande desafio está no desenvolvimento de metodologias capazes de analisar simultaneamente estes quatro fármacos, minimizando os problemas tais como a decomposição da RIF, a hidrólise da ISO e a baixa absorvidade molar do ETB. Este objetivo só foi alcançado, até o momento, por SONG et al. que desenvolveram uma metodologia por LC/MS para determinação de ETB, ISO, RIF, PIR e dois metabólitos, acetilisoniazida e 25-desacetilrifampicina, em amostras de sangue de pacientes com TB (SONG et al., 2007).

### 1.3 ELETROFORESE CAPILAR

A CE é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico. Historicamente, foi desenvolvida por Arne Tiselius, no início da década de 30, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo. Por este trabalho, Tiselius recebeu o prêmio Nobel de Química de 1948 (SKOOG et al., 2002; TAVARES, 1996).

Por ser ecologicamente mais correta e de menor custo operacional, a CE tem sido a técnica de separação de mais rápida expansão em análises farmacêuticas, e tem gradualmente se estabelecido como técnica alternativa e de suporte para HPLC (ALTRIA, 1999; VEUTHEY, 2005; WATSON, 1999). A importância da CE tornou-se evidente com o projeto genoma humano e o sequenciamento de proteínas. A partir de então, tem sido utilizada em análises de rotinas farmacêuticas, forenses, clínicas e ambientais (ALTRIA & ELDER, 2004).

#### 1.3.1 Instrumentação

O sistema básico de CE (Figura 1.5) consiste de uma fonte de alta tensão, capilares de teflon ou de sílica fundida, revestidos externamente com polimida, teflon ou poliacrilato, eletrodos (geralmente de platina), reservatórios para soluções e um detector apropriado. Os comandos para controle do equipamento, aquisição e tratamento de dados são realizados mediante interface com um computador. A fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, através da conexão com os eletrodos, que são imersos em reservatórios contendo eletrólito. O sistema é termostatizado por circulação de um líquido ou de ar forçado através do cartucho contendo o capilar (TAVARES, 1996).



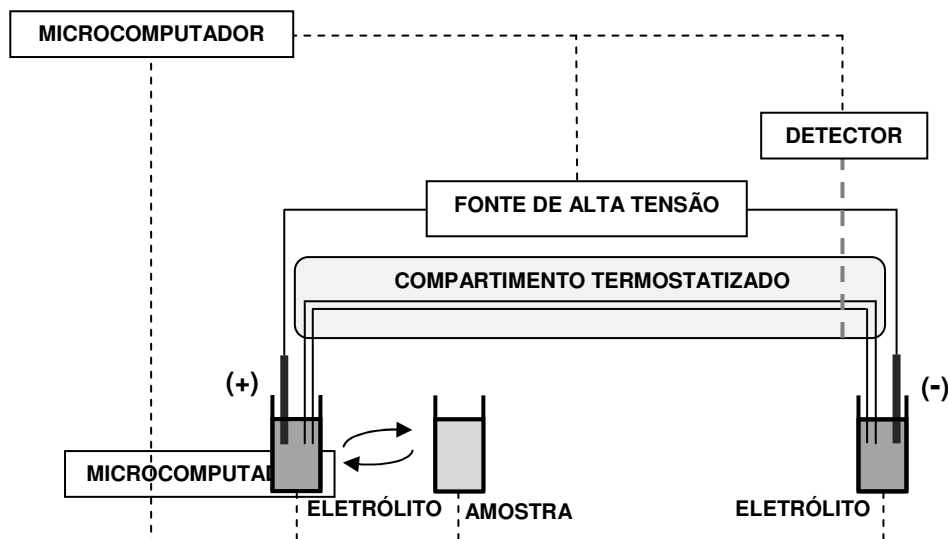


Figura 1.5 Representação esquemática de um sistema básico de CE.

### 1.3.2 Fundamentos Teóricos

#### 1.3.2.1 Fluxo Eletrosmótico (BAKER, 1995; TAVARES, 1996)

Em CE, além dos solutos, a solução tampão se move através do capilar sob a influência de um campo elétrico; este fenômeno é denominado fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês: electroosmotic flow). Sob a aplicação de voltagem positiva na injeção, utilizando capilar de sílica fundida, o EOF ocorre em direção ao cátodo, o que significa que a solução tampão flui do reservatório de entrada através do capilar e é descartada no reservatório de saída.

Em contato com uma solução tampão a superfície interna do capilar adquire carga, isto ocorre devido a dois fenômenos: ionização ou adsorção.

Em capilares de teflon, o EOF ocorre em função da absorção dos íons eletricamente carregados do tampão na parede interna do capilar.

Capilares de sílica fundida funcionalizada possuem vários grupos silanóis (Si-OH) de caráter ácido ( $pK_a$  5,9). Em contato com o meio aquoso alguns desses grupos são ionizados e a superfície interna do capilar torna-se negativamente carregada. Quando uma diferença de potencial é aplicada nas extremidades do capilar preenchido com eletrólito apropriado, um campo elétrico é estabelecido tangencialmente ao longo deste eletrólito. Sob este campo elétrico, os íons em

solução são distribuídos, de forma não homogênea, nas proximidades da parede interna do capilar devido à ação das forças elétrica e de atrito formando a dupla camada elétrica, que é composta pelas camadas compacta e difusa.

A camada compacta é formada na região imediatamente adjacente à superfície devido à adsorção específica, por forças eletrostáticas e/ou de coesão, de moléculas de água e alguns íons, provavelmente desidratados, e através da adsorção não-específica de íons hidratados que se ligam fracamente a superfície.

A camada difusa é a região na qual a concentração de íons de carga oposta à superfície do capilar diminui aproximando-se da concentração dos íons em solução. Sob a ação de um campo elétrico, os cátions solvatados migram em direção ao cátodo transportando moléculas de água, o que induz o fluxo de solução como um todo, conhecido com EOF (Figura 1.6).

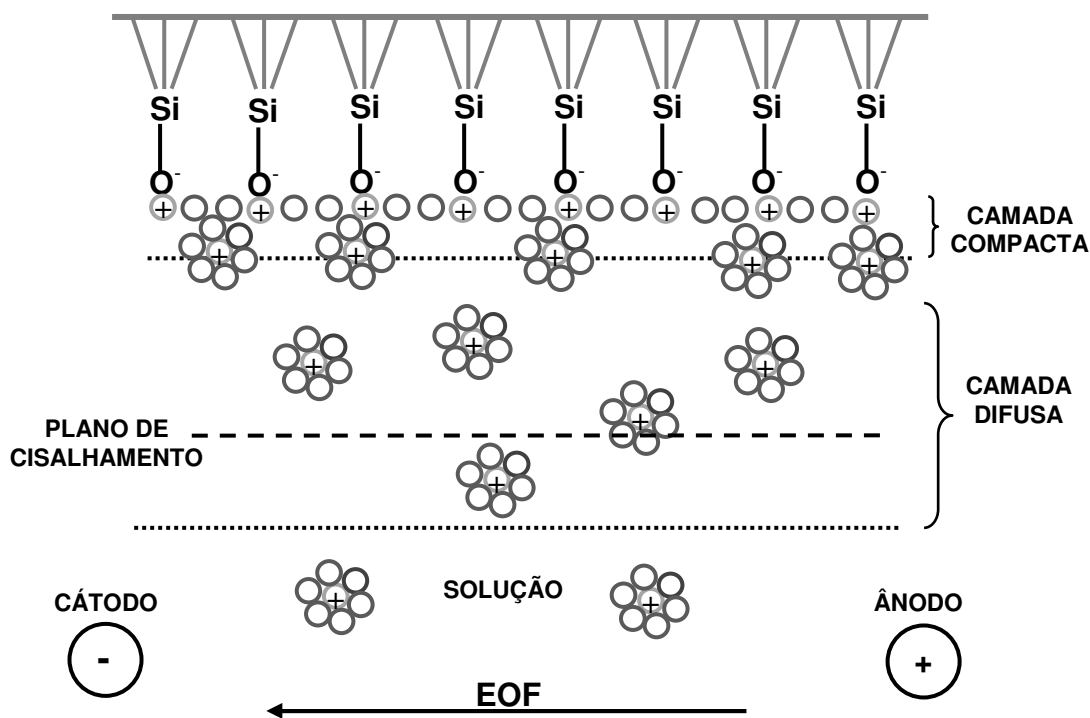


Figura 1.6 Modelo para a interface capilar/solução e para o EOF.

O EOF é caracterizado por um perfil radial constante da velocidade, não contribui, portanto, para o alargamento de bandas. Esta peculiaridade distingue a CE dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresenta uma variação parabólica para o perfil da velocidade dentro da coluna, característico do fluxo

induzido por pressão. Além disto, o EOF, geralmente de grande magnitude, contribui significativamente pela condução dos solutos, independente da carga, em direção ao detector. Portanto, permite, hipoteticamente, a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, aniônicos, neutros e ionizáveis.

O controle adequado do EOF é de grande importância para a eficiência da separação, por isso as propriedades físico-químicas da solução têm sido controladas. Entre estas propriedades destacam-se: pH, concentração e força iônica da solução tampão, tipo e concentração de um eletrólito inerte ou aditivo orgânico, viscosidade, constante dielétrica e temperatura.

### 1.3.2.2 Mobilidade Eletrosmótica (BAKER, 1995; TAVARES, 1996)

A distribuição não homogênea dos íons na camada difusa produz um gradiente de velocidade, conhecido como velocidade eletrosmótica ( $v_{eo}$ ). A  $v_{eo}$  pode ser calculada de modo simplificado pela equação de Helmholtz-Smoluchowski (Equação 1.4). Esta equação prevê a dependência entre a velocidade máxima linear dos íons em solução ( $v_{eo}$ ), em  $\text{cm s}^{-1}$ , e o campo elétrico ( $E$ ).

$$v_{eo} = -\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad (1.1)$$

onde:  $\epsilon_r$  é a permitividade relativa da solução (usualmente tomada como a permitividade do solvente puro);

$\epsilon_0$  é a constante de permitividade do vácuo ( $\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$ );

$\zeta$  é o potencial desenvolvido no plano de cisalhamento, denominado potencial zeta, em V;

$E$  é o campo elétrico aplicado em  $\text{V cm}^{-1}$ ;

$\eta$  é a viscosidade da solução tampão em  $\text{N s m}^{-2}$ .

A constante de proporcionalidade, que representa a mobilidade eletroosmótica ( $\mu_{eo}$ ), em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ , é dada por:

$$\mu_{eo} = -\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (1.2) \quad \text{ou} \quad \mu_{eo} = \frac{V_{eo}}{E} \quad (1.3)$$

Experimentalmente, pode-se determinar o valor da  $\mu_{eo}$  através da injeção de um analito neutro, conhecendo as dimensões do capilar e a voltagem aplicada (Equação 1.4):

$$\mu_{eo} = \frac{L_{ef} L_{tot}}{t_{eo} V} \quad (1.4)$$

onde:  $L_{ef}$  é o comprimento efetivo do capilar em cm;

$L_{tot}$  é o comprimento total do capilar em cm;

$t_{eo}$  é o tempo de migração do soluto neutro em s;

$V$  é a voltagem aplicada em V.

A  $\mu_{eo}$  pode ser otimizada a partir do controle, por exemplo, da força iônica (FI) e do pH da solução de eletrólito. A FI depende da concentração e da carga dos íons em solução (Equação 1.5):

$$FI = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2 \quad (1.5)$$

onde:  $C_i$  é a concentração dos íons do eletrólito em  $\text{mol L}^{-1}$ ;

$Z_i$  é o número de cargas elementares do íon do eletrólito.

A espessura da dupla camada ( $\delta$ ) é inversamente proporcional a concentração dos íons do eletrólito. O  $\zeta$ , definido pela Equação 1.6, é proporcional a  $\delta$ . Logo, quanto maior a concentração de íons, maior a FI, menor a  $\delta$ , menor o  $\zeta$  e, conseqüentemente, menor a  $\mu_{eo}$ .

A influência do pH na  $\mu_{eo}$  ocorre, principalmente, em função da carga ( $e_a$ ) dos grupos silanóis da superfície interna do capilar. Portanto, em um pH mais elevado, maior número de grupos silanóis desprotonados, aumentando assim o valor do  $\zeta$  e da  $\mu_{eo}$ .

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e_a}{\epsilon_r} \quad (1.6)$$

onde:  $\delta$  é a espessura da dupla camada;

$e_a$  é a carga por unidade de área da superfície interna do capilar;

$\epsilon_r$  é a permissividade relativa da solução tampão.

### 1.3.2.3 Mobilidade Eletroforética (BAKER, 1995; TAVARES, 1996)

A mobilidade eletroforética ( $\mu_{ep}$ ), fenômeno exclusivo de um soluto, corresponde a sua velocidade ( $v_{ep}$ ) em um campo elétrico unitário (Equação 1.7):

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad (1.7)$$

onde:  $v_{ep}$  é a velocidade eletroforética em  $\text{cm s}^{-1}$ ;

$E$  é o campo elétrico aplicado em  $\text{V cm}^{-1}$ .

Quando uma diferença de potencial é aplicada nas extremidades do capilar preenchido com eletrólito apropriado, no qual foi injetada uma alíquota de uma amostra iônica, o campo elétrico tangencial estabelecido influencia na migração do íon. O íon é acelerado até que a força de atrito ( $F_{\text{atrito}}$ ) (Equação 1.8) alcance o valor da força elétrica ( $F_{\text{elétrica}}$ ) (Equação 1.9), e este migra com velocidade constante (Equação 1.10) (Figura 1.7).

$$F_{atrito} = 6\pi r\eta v_{ep} \quad (1.8)$$

$$F_{elétrica} = |Z|eE \quad (1.9)$$

$$v_{ep} = \frac{|Z|eE}{6\pi r\eta} \quad (1.10)$$

onde:  $\eta$  é a viscosidade do meio em  $\text{N s m}^{-2}$ ;

$r$  é o raio iônico efetivo em  $\mu\text{m}$ ;

$Z$  é o número de cargas elementares do íon;

$e$  é a carga elementar de um elétron ( $e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$ );

$E$  é o campo elétrico em  $\text{V cm}^{-1}$ .

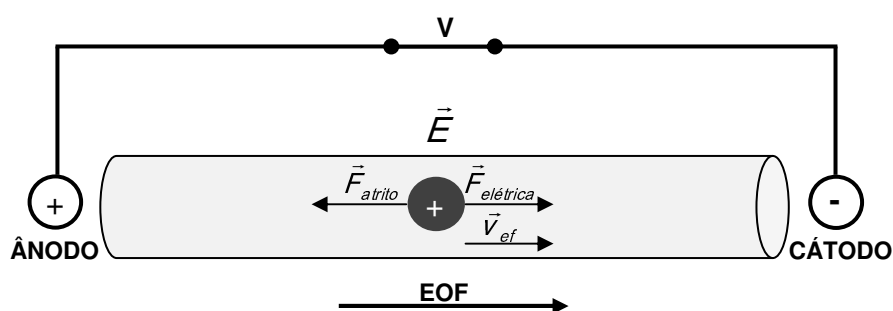


Figura 1.7 Esquema da migração eletroforética de um cátion.

A  $\mu_{ep}$  (Equação 1.11) pode ser obtida pela substituição da Equação 1.10 na Equação 1.7:

$$\mu_{ep} = \frac{|Z|e}{6\pi\eta r} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1.11)$$

onde:  $\eta$  é a viscosidade do meio em  $\text{N s m}^{-2}$ ;

$r$  é o raio iônico efetivo em  $\mu\text{m}$ ;

$Z$  é o número de cargas elementares do íon;

$e$  é a carga elementar de um elétron ( $e = 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$ );

$q$  é a carga do analito em  $\text{C}$ .

## 1.3.2.4 Mobilidade Observada (BAKER, 1995; TAVARES, 1996)

A mobilidade observada ( $\mu_{obs}$ ) de um soluto depende da sua  $\mu_{ep}$  e da  $\mu_{eo}$  (Equação 1.12).

$$\vec{\mu}_{obs} = \vec{\mu}_{ep} + \vec{\mu}_{eo} \quad (1.12)$$

Experimentalmente, pode-se determinar o valor da  $\mu_{obs}$  através da injeção de uma solução contendo o analito de interesse, conhecendo as dimensões do capilar, a voltagem aplicada e a  $\mu_{eo}$  (Equação 1.13):

$$\mu_{obs} = \left( \frac{L_{ef} L_{tot}}{t_m V} \right) \quad (1.13)$$

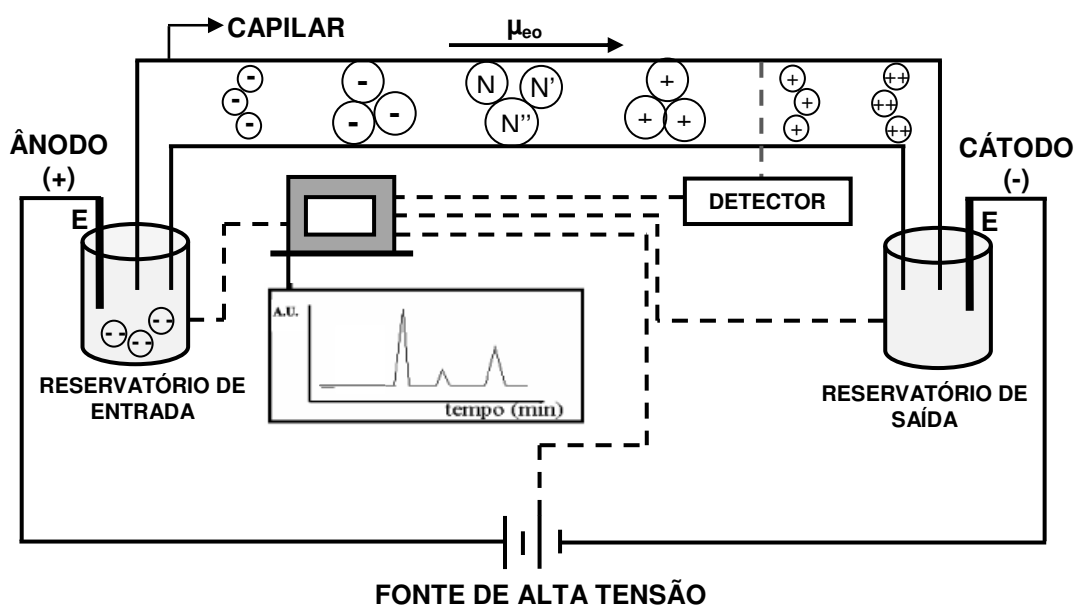
onde:  $L_{ef}$  é o comprimento efetivo do capilar em cm;

$L_{tot}$  é o comprimento total do capilar em cm;

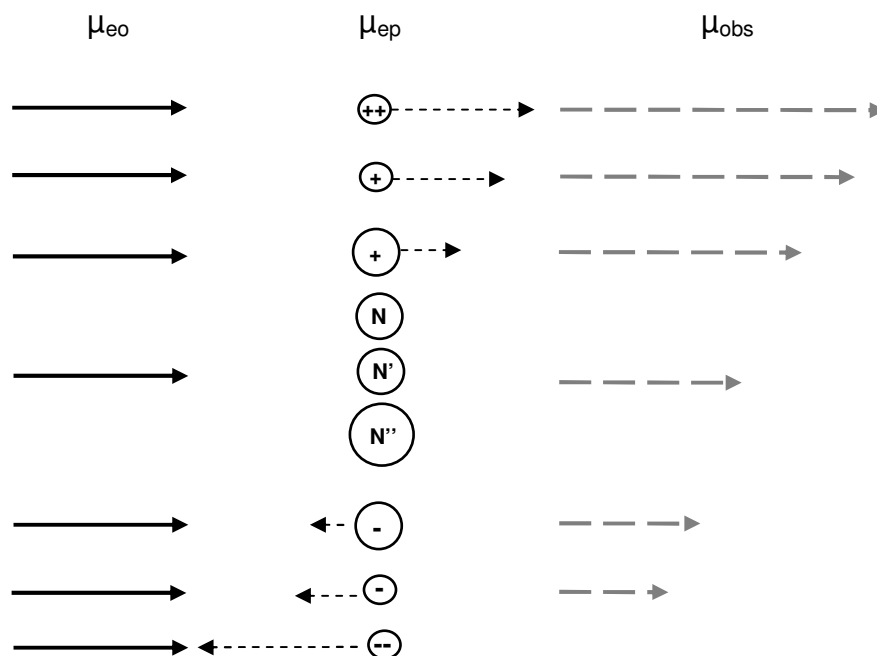
$t_m$  é o tempo de migração do analito de interesse em s;

$V$  é a voltagem aplicada em V.

A Figura 1.8 ilustra a separação de uma amostra contendo moléculas neutras e íons de diferentes cargas e tamanhos sob EOF normal, direcionado ao cátodo, e polaridade positiva na extremidade do capilar onde é feita a injeção. A velocidade e o sentido da migração dependem do raio iônico e da magnitude e dos sinais de suas cargas, conforme exemplificado na Figura 1.9. Portanto, os cátions de maior carga e menor tamanho movem-se mais rápido; os compostos neutros migram com a velocidade do EOF; e os ânions, em função da magnitude das  $\mu_{eo}$  e  $\mu_{ep}$ , podem ser arrastados em direção ao detector pelo EOF.



**Figura 1.8** Representação esquemática de um sistema básico de CE e seu funcionamento. E: eletrodo.



**Figura 1.9** Representação esquemática da migração de moléculas neutras e íons de diferentes cargas e tamanhos sob EOF normal e polaridade positiva.



### 1.3.2.5 Mobilidade Efetiva

O conceito de mobilidade efetiva ( $\mu_{ef}$ ) é utilizado para descrever a migração de compostos existentes pelo menos sob duas formas químicas, ionizada e não-ionizada, em equilíbrio, que migram como um soluto único (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

A  $\mu_{ef}$  pode ser calculada experimentalmente através da realização de uma análise, sob condições experimentais determinadas, para cada analito. Desta análise serão utilizados os dados de tempo de migração do analito e do EOF, voltagem aplicada e dimensões do capilar, para cálculo da  $\mu_{eo}$  (Equação 1.4), da  $\mu_{obs}$  (Equação 1.13) e posteriormente, da  $\mu_{ep}$  (Equação 1.12) do analito.

Em seguida, é necessário calcular o grau de dissociação ( $\alpha$ ) para cada analito. Considerando-o como um ácido fraco  $H_nA$ , o denominador (D) em todas as expressões de valores de  $\alpha$  toma a forma de (SKOOG et al., 2006):

$$D = [H_3O^+]^n + K_{a1}[H_3O^+]^{(n-1)} + K_{a1}K_{a2}[H_3O^+]^{(n-2)} + \dots + K_{a1}K_{a2}\dots K_{an} \quad (1.14)$$

onde:  $[H_3O^+]$  é a concentração de  $H_3O^+$  liberada pelo analito em mol L<sup>-1</sup>;

$K_{a1}$  é a primeira constante de dissociação do analito;

$K_{a2}$  é a segunda constante de dissociação do analito;

$K_{an}$  é a n-ésima constante de dissociação do analito.

O numerador para  $\alpha_0$  é o primeiro termo; para  $\alpha_1$  é o segundo termo, e assim por diante. Logo:

$$\alpha_0 = \frac{[H_3O^+]^n}{D} \quad (1.15)$$

$$\alpha_1 = \frac{K_{a1}[H_3O^+]^{(n-1)}}{D} \quad (1.16)$$

Após a determinação dos valores de  $\mu_{ep}$  e  $\alpha$ , a  $\mu_{ef}$  de um analito pode ser obtida pela Equação 1.17, que é a definição clássica de Tiselius:

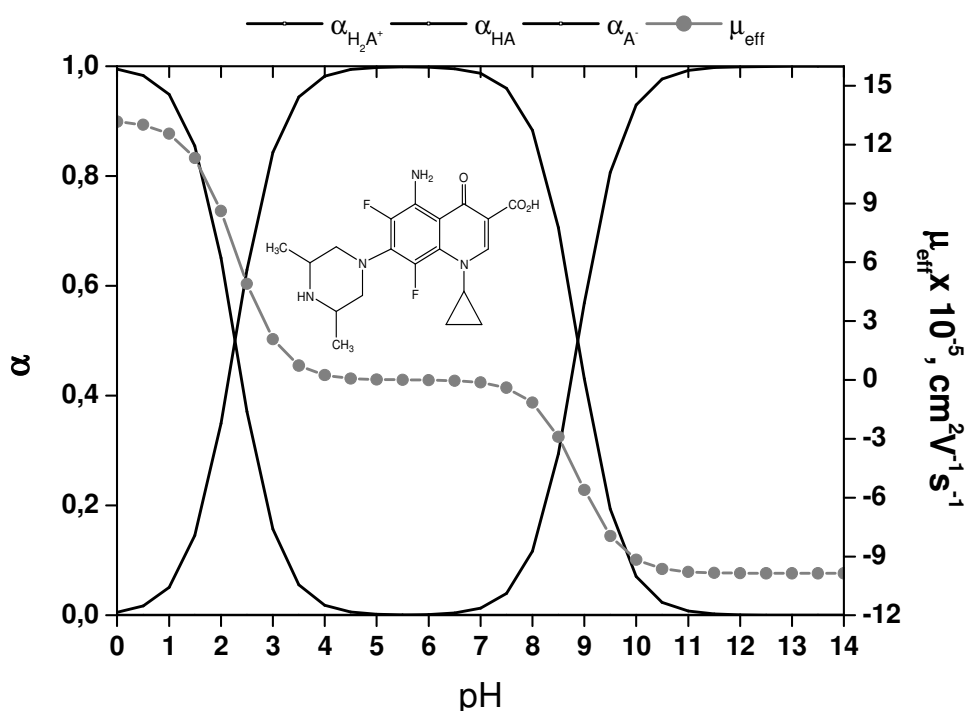
$$\mu_{ef} = \sum (\mu_{ep} \alpha_j) \quad (1.17)$$

onde:  $\mu_{ep}$  é a mobilidade eletroforética do analito em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

$\alpha_j$  é a fração molar do analito sob cada forma química.

Com os valores de  $\mu_{ef}$  calculados pode-se construir um gráfico de  $\mu_{ef}$  *versus* pH, denominado curva de mobilidade efetiva. Estas curvas são excelentes indicadores da condição de pH mais propícia para a separação ocorrer, ou seja, o pH em que as diferenças entre  $\mu_{ef}$  dos solutos são maximizados (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Para exemplificar a construção da curva de mobilidade efetiva, foi utilizada a sparfloxacina (SPFLX), fármaco bactericida, cujos  $\text{pK}_{as}$  são iguais a 2,27 e 8,88. A Figura 1.10 mostra o diagrama de distribuição e a curva de mobilidade efetiva para este fármaco (FARIA et al., 2006). Analisando o gráfico, verifica-se que a SPFLX apresenta carga positiva em pH menor ou igual a 3,0, no intervalo de pH entre 4,0 e 7,5 está neutra e em pH maior ou igual a 8,0 possui carga negativa.



**Figura 1.10** Diagrama de distribuição e curva de mobilidade efetiva para a SPFLX.

### 1.3.3 Introdução da Amostra (BAKER, 1995; TAVARES, 1996)

As amostras e/ou padrões podem ser introduzidas no capilar por métodos hidrodinâmicos, aplicando um gradiente de pressão, e eletrocinéticos, através de um gradiente de potencial.

Na injeção hidrodinâmica o gradiente de pressão pode ser estabelecido por pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução ou por gravidade (Figura 1.11). O volume introduzido no capilar é uma alíquota representativa da composição da amostra, e depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. O volume de amostra injetado ( $v_{inj}$ ), em nL, por pressurização ou vácuo pode ser calculado através da Equação 1.18 e por gravidade pela Equação 1.19.

$$v_{inj} = \frac{\Delta P d_i^4 \pi t}{8 \eta L_{tot}} \quad (1.18)$$

onde:  $\Delta P$  é a diferença de pressão aplicada em mbar;

$d_i$  é o diâmetro interno do capilar em  $\mu\text{m}$ ;

$t$  é o tempo de pressão aplicada em s;

$\eta$  é a viscosidade da solução de amostra em  $\text{N.s.m}^{-2}$ ;

$L_{tot}$  é o comprimento total do capilar em cm.

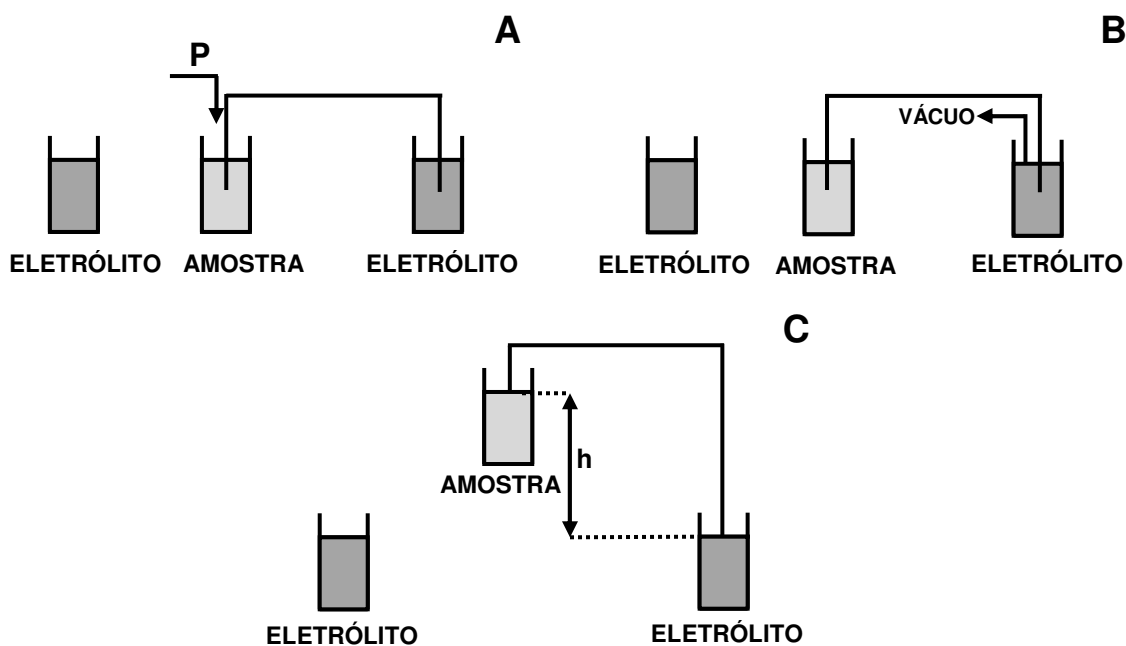
$$v_{inj} = \frac{2,84 \times 10^{-8} h t d_i^4}{L_{tot}} \quad (1.19)$$

onde:  $h$  é a altura que o reservatório de amostra é elevado em mm;

$t$  é o tempo em que o reservatório de amostra permanece elevado em s;

$d_i$  é o diâmetro interno do capilar em  $\mu\text{m}$ ;

$L_{tot}$  é o comprimento total do capilar em cm.



**Figura 1.11** Esquema de injeção hidrodinâmica: (A) pressurização positiva; (B) vácuo (pressurização negativa); (C) sifonagem.

Na injeção eletrocinética, a amostra é introduzida no capilar como resultado da combinação entre as  $v_{ep}$  e  $v_{eo}$  (Figura 1.12). A quantidade de amostra injetada depende da  $\mu_{ep}$  do soluto, das condutividades da amostra e do eletrólito, assim como da magnitude do EOF. Como consequência, a amostragem discrimina os componentes da amostra em função de suas  $\mu_{ep}$ . A quantidade de amostra injetada ( $Q_{inj}$ ) pode ser determinada pela Equação 1.20:

$$Q_{inj} = \frac{V \pi r^2 C_a t (\mu_{ep} + \mu_{eo})}{L_{tot}} \quad (1.20)$$

onde:  $V$  é a voltagem aplicada em V;

$C_a$  é a concentração do analito em mol L<sup>-1</sup>;

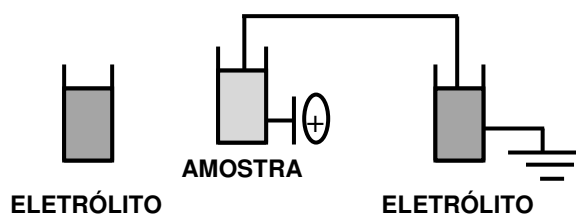
$t$  é o tempo em que a voltagem foi aplicada em s;

$r$  é o raio interno do capilar em  $\mu\text{m}$ ;

$\mu_{ep}$  é a mobilidade eletroforética do soluto em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

$\mu_{eo}$  é a mobilidade do EOF em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

$L_{tot}$  é o comprimento total do capilar em cm.



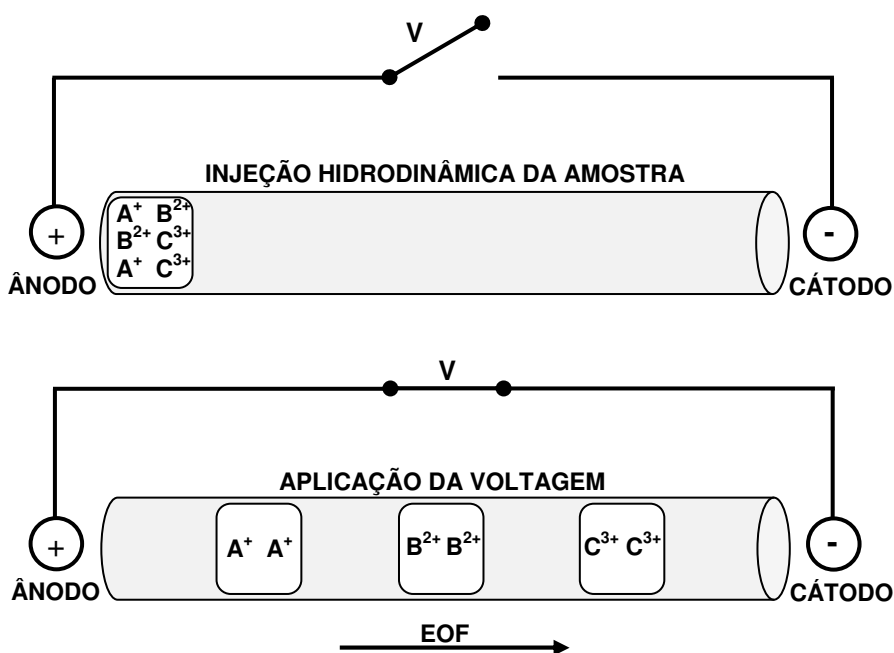
**Figura 1.12** Esquema de injeção eletrocinética.

### 1.3.4 Modos de Separação

As separações em CE podem ser realizadas por vários modos, com mecanismos singulares e seletividade característica, como: fronteira móvel, zona, isotacoforese, focalização isoeletrica e em gel (BAKER, 1995; SKOOG, 2002, TAVARES, 1996). Nesta tese será discutida apenas a eletroforese capilar de zona, uma vez que foi este o modo utilizado.

#### 1.3.4.1 Eletroforese Capilar de Zona (BAKER, 1995; SKOOG, 2002, TAVARES, 1997)

A eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês capillary zone electrophoresis) é um dos modos de separação eletroforética mais utilizados. Na CZE, o capilar é preenchido com uma solução tampão de composição constante e a amostra é introduzida neste meio tamponado, como uma banda de pequena espessura. Quando o potencial é aplicado os diferentes compostos iônicos da mistura migram de acordo com a sua própria mobilidade e se separam em zonas, como pode ser observado na Figura 1.13. A separação, em CZE, ocorre como resultado de duas estratégias: maximizar as diferenças entre as  $\mu_{ep}$  dos solutos e minimizar as causas de alargamento de zona.



**Figura 1.13** Esquema de separação por CZE, sob EOF normal, de diferentes cátions.

A eficiência da separação por CE pode ser determinada pela resolução ( $R$ ), que verifica o quanto as substâncias de uma mistura estão separadas, pelo número de pratos ( $N$ ), que estima a dispersão que o analito sofre em função do tempo necessário para que ocorra a separação, e pelo tempo de migração ( $t_m$ ) dos analitos. Em CZE,  $R$ ,  $N$  e  $t_m$  podem ser descritos pelas Equações 1.21, 1.22 e 1.23, que consideram a difusão como a única causa de alargamento das zonas.

$$R_{i,j+1} = \frac{1}{4\sqrt{2}} (\mu_i - \mu_{i+1}) \left( \frac{V}{D(\mu_{\text{média}} + \mu_{eo})} \right)^{1/2} \quad (1.21)$$

$$N = \frac{L_{\text{det}} (\mu_{ep} + \mu_{eo}) V}{2D L_{\text{tot}}} \quad (1.22)$$

$$t_m = \frac{L_{ef} L_{tot}}{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) V} \quad (1.23)$$

onde:  $\mu_i$  e  $\mu_{i+1}$  são as mobilidades observadas de dois solutos migrando em posições adjacentes em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

$D$  é a média dos coeficientes de difusão dos dois solutos.

$V$  é a voltagem aplicada em  $V$ ;

$\mu_{\text{média}}$  é a mobilidade média dos solutos em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

$\mu_{eo}$  é a mobilidade do EOF em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

$\mu_{ep}$  é a mobilidade eletroforética do soluto  $i$  em  $\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ;

$L_{ef}$  é o comprimento efetivo do capilar em  $\text{cm}$ ;

$L_{tot}$  é o comprimento total do capilar em  $\text{cm}$ .

As Equações 1.21 a 1.23 indicam que o uso de voltagens elevadas implica em um ganho de resolução e eficiência, e na diminuição do tempo de análise. A Equação 1.21 também indica que um ganho de resolução em separações difíceis pode ser alcançado com o ajuste da magnitude do EOF, fazendo com que a  $\mu_{eo}$  se aproxime da mobilidade dos solutos, mas com sinal oposto. Entretanto, como consequência, há perda de eficiência (Equação 1.22) e aumento no tempo de análise (Equação 1.23).

Apesar das Equações 1.21 a 1.23 serem tradicionais para descreverem  $R$  e  $N$  por GZE, a aplicação dessas equações torna-se difícil em função da necessidade de se conhecer o coeficiente de difusão do analito. Uma boa aproximação pode ser obtida utilizando as equações clássicas para cromatografia (Equações 1.24 e 1.25).

$$N = 16 \left( \frac{t_m}{w} \right)^2 \quad (1.24)$$

onde:  $t_m$  é o tempo de migração do analito em  $s$ ;

$w$  é a largura do pico, medida na base do pico em  $s$ .

$$R = \frac{2(t_{m_i} - t_{m_{i+1}})}{(w_i + w_{i+1})} \quad (1.25)$$

onde:  $t_{m_i}$  e  $t_{m_{i+1}}$  são os tempos de migração de dois solutos adjacentes em s;

$w_i$  e  $w_{i+1}$  são as larguras dos picos de dois solutos adjacentes, medida na base do pico em s.

#### 1.3.4.1.1 Solução Tampão

Em separações de solutos com caráter ácido-base, a  $\mu_{ep}$  do soluto depende do pH do eletrólito. Neste caso, o termo mobilidade efetiva,  $\mu_{ef}$ , o qual incorpora o produto das  $\mu_{ep}$  das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado, é empregado (TAVARES, 1997). Portanto, o controle do pH é aconselhável e a escolha de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação.

O EOF é suscetível a variações de pH, portanto, um tampão deve possuir alta capacidade tamponante. Em geral, um tampão é eficiente em um intervalo de pH correspondente ao valor do seu  $pK_a$  mais ou menos uma unidade. Além disto, o tampão deve possuir baixa influência no sinal do analito e conter íons com mobilidade semelhante à do soluto para evitar distorções no perfil da banda e minimizar o seu alargamento (BAKER, 1995).

Em capilares de sílica fundida, o intervalo de pH adequado para trabalho varia entre 1 e 13, mas em geral esse intervalo é limitado pela estabilidade do soluto. A concentração das soluções tampão usadas em CE varia entre 5 e 200 mmol L<sup>-1</sup>. A escolha da concentração deve ser feita considerando vários efeitos. Altas concentrações podem comprometer a separação, pelo excesso de calor decorrente do efeito Joule. Baixas concentrações podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar causando alargamento e distorção das bandas tornando o EOF errático, o que dificulta a reprodutibilidade dos tempos de migração, prejudicando a identificação dos solutos (TAVARES, 1997).



#### 1.3.4.1.2 Aditivos

Em CZE é bastante comum o uso de eletrólitos aditivados. O uso de aditivos é indicado para alterar a mobilidade do soluto, modificar o EOF, solubilizar solutos e reduzir a interação de certos analitos com a parede interna do capilar, minimizando efeitos de adsorção (TAVARES, 1997). Entre os aditivos mais comumente utilizados destacam-se: agentes complexantes, compostos de inserção, tensoativos e solventes orgânicos.

#### 1.4 PLANEJAMENTO FATORIAL (NETO, 2007)

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que vem sendo muito utilizada na otimização de sistemas contendo duas ou mais variáveis e que se deseja saber se ocorre interação entre essas variáveis. Os resultados obtidos por planejamentos fatoriais, muitas vezes, não seria possível de serem alcançados por métodos univariados ou, provavelmente, seria necessário um número maior de ensaios o que resultaria num tempo maior para a otimização do sistema.

Além disso, o planejamento fatorial é um recurso elegante capaz de auxiliar no planejamento dos experimentos para a obtenção dos dados de forma organizada e sistemática. Entretanto, o sucesso de um planejamento fatorial dependerá do conhecimento claro de seus objetivos e da maneira em que será estruturado e realizado.

Para executar um planejamento fatorial é necessário definir quais são os fatores relevantes para o sistema e especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores que serão empregados em cada ensaio.

##### 1.4.1 Planejamento Fatorial $2^k$ (NETO, 2007)

Planejamentos de dois níveis são os mais simples, fáceis de executar e úteis para uma investigação preliminar, quando se deseja selecionar os fatores mais relevantes.

Para  $k$  fatores, isto é,  $k$  variáveis controladas pelo analista, um planejamento completo em dois níveis exige a realização de  $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$  ensaios diferentes, sendo denominado planejamento fatorial  $2^k$ .

Portanto, para um planejamento fatorial  $2^2$ , serão realizados 4 experimentos em todas as combinações possíveis. A lista dessas combinações é chamada matriz de planejamento (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** Matriz de planejamento  $2^2$ 

Ensaio	$X_1$	$X_2$	Resposta
1	$n_{1inf}$	$n_{2inf}$	$Y_1$
2	$n_{1sup}$	$n_{2sup}$	$Y_2$
3	$n_{1inf}$	$n_{2inf}$	$Y_3$
4	$n_{1sup}$	$n_{2sup}$	$Y_4$

Os níveis inferiores de cada fator,  $n_{1inf}$  e  $n_{2inf}$ , podem ser codificados por -1, e os níveis superiores,  $n_{1sup}$  e  $n_{2sup}$ , podem ser codificados por +1. Esta codificação se baseia no princípio descrito pelas Equações 1.26 e 1.27:

$$X_i^{(-)} = \frac{n_{inf} - PC_i}{AV} = -1 \quad (1.26)$$

$$X_i^{(+)} = \frac{n_{sup} - PC_i}{AV} = +1 \quad (1.27)$$

onde:  $PC_i$  é o ponto central da variável  $i$ :  $PC_i = \frac{n_{inf} + n_{sup}}{2}$

$AV$  é metade da amplitude de variação:  $AV = \frac{n_{sup} - n_{inf}}{2}$

Para calcular os efeitos e os estimadores dos parâmetros populacionais do modelo, por operações matriciais, é necessário escrever a matriz de coeficiente de contraste,  $\mathbf{X}$ . A primeira coluna desta matriz é de +1 correspondente a média, a segunda e a terceira coluna correspondem às colunas  $X_1$  e  $X_2$  da matriz de planejamento, escrita na forma codificada, e a quarta coluna é o produto entre  $X_1$  e  $X_2$ . E o vetor  $\mathbf{y}$ , correspondente as respostas dos ensaios.

$$\mathbf{X} = \begin{matrix} & M & X_1 & X_2 & X_{12} \\ \begin{matrix} +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \end{matrix} & \begin{bmatrix} -1 & -1 & +1 \\ -1 & -1 & -1 \\ -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 \end{bmatrix} \end{matrix}$$

$$\mathbf{y} = \begin{matrix} R \\ \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \end{bmatrix} \end{matrix}$$

A média ( $\mathbf{m}$ ) pode ser calculada por:

$$\mathbf{m} = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{y}}{2^k \cdot r} \quad \text{ou} \quad \mathbf{m} = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{y}}{2^k + r_{PC}} \quad (1.28)$$

onde:  $K$  é o número de fatores;

$r$  é o número de réplicas experimentais;

$r_{PC}$  é o número de réplicas no ponto central.

E os efeitos por:

$$\text{efeitos} = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{y}}{2^{k-1} \cdot r} \quad (1.29)$$

Para calcular o erro experimental é necessário que o planejamento seja realizado aleatoriamente com réplicas autênticas de todos os experimentos ou dos experimentos no ponto central. A extensão desse erro é importante para avaliar a significância dos efeitos.

Para determinar o erro padrão (e.p.) da média e dos efeitos é necessário, inicialmente, calcular a variância agrupada ( $s_{ag}^2$ ) ponderada pelos graus de liberdade (Equação 1.30) ou a variância no ponto central ( $s_{PC}^2$ ). A variância agrupada é utilizada para um planejamento com réplicas experimentais em cada nível e a variância no ponto central quando o planejamento possui réplicas apenas no ponto central. Posteriormente, a variância da média ( $\hat{v}_{média}$ ) e dos efeitos ( $\hat{v}_{efeitos}$ ) é calculada de acordo com as Equações 1.31, 1.32, 1.33 e 1.34. Nas Equações 1.31 e 1.32,  $s^2$  pode ser a  $s_{ag}^2$  ou a  $s_{PC}^2$ .

$$s_{ag}^2 = \frac{\sum_i^n v_i s_i^2}{\sum_i^n v_i} \quad (1.30)$$

$$\hat{v}_{média} = \frac{s^2}{n_T} \quad (1.31)$$

$$\hat{v}_{efeitos} = \frac{s^2}{n_+} + \frac{s^2}{n_-} \quad (1.32)$$

$$e.p._{média} = \sqrt{\hat{v}_{média}} \quad (1.33)$$

$$e.p._{efeitos} = \sqrt{\hat{v}_{efeitos}} \quad (1.34)$$

onde:  $v_i = n_i - 1$  é o número de graus de liberdade de  $s_i^2$ ;

$s_i^2$  é a estimativa da variância do  $i$ -ésimo ensaio;

$n_T$  é o número total de ensaios;

$n_+$  é o número total de sinais positivos na coluna de um fator;

$n_-$  é o número total de sinais negativos na coluna de um fator.

Com o erro padrão pode-se construir intervalos de confiança (Equação 1.35) para os valores dos efeitos, usando a distribuição de Student. Se o zero estiver contido no intervalo os efeitos não são considerados significativos, caso contrário, são significativos.

$$\text{intervalo de confiança} = \text{efeito} \pm t_v \times \text{e.p.}_{\text{efeito}} \quad (1.35)$$

onde:  $v_i = n_i - 1$  é o número de graus de liberdade de  $S_i^2$ ;

$\text{e.p.}_{\text{efeito}}$  é o erro puro do efeito.

O modelo estatístico é usado para descrever as respostas de um planejamento fatorial. Os estimadores dos parâmetros populacionais ( $b$ ) do modelo linear nos parâmetros podem ser obtidos pelo método dos mínimos quadrados através da Equação 1.36:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{y} \quad (1.36)$$

Para um planejamento  $2^2$ , o modelo pode ser representado pela Equação 1.37:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_i \sum_{\substack{j \\ i < j}} \hat{\beta}_{ij} x_i x_j + e_i \quad (1.37)$$

A variância e o erro padrão dos estimadores podem ser calculados através das Equações 1.38 e 1.39, onde se utiliza apenas a diagonal principal da matriz  $(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1}$ , nestas equações,  $s^2$  pode ser a  $S_{\text{ag}}^2$  ou a  $S_{\text{PC}}^2$ .

$$\hat{V}_b = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} s^2 \quad (1.38)$$

$$e.p.b = \sqrt{(X^T X)^{-1} s^2} \quad (1.39)$$

#### 1.4.2 Planejamento Box-Behnken (FERREIRA et al., 2007)

O planejamento Box-Behnken é um planejamento fatorial incompleto de três níveis,  $3^k$ . É utilizado quando se deseja obter uma descrição mais detalhada sobre o sistema, realizando menos experimentos que seriam requeridos por um planejamento completo. O planejamento Box-Behnken permite ainda a modelagem de superfícies de resposta.

O número de ensaios,  $n$ , é definido de acordo com a Equação 1.40:

$$n = 2k(k - 1) + n_{PC} \quad (1.40)$$

onde:  $K$  é o número de fatores;

$n_{PC}$  é o número de réplicas no ponto central.

Para um planejamento Box-Behnken  $3^3$  com triplicata no ponto central, a matriz de planejamento é mostrada na Tabela 1.3 e modelo quadrático completo pode ser calculado através da Equação 1.41:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_{\substack{i \\ i < j}} \sum_j \hat{\beta}_{ij} x_i x_j + e_i \quad (1.41)$$

**Tabela 1.3** Matriz de planejamento para um Box-Behnken  $3^3$ 

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Resposta
1	-1	-1	0	$Y_1$
2	+1	-1	0	$Y_2$
3	-1	+1	0	$Y_3$
4	+1	+1	0	$Y_4$
5	-1	0	-1	$Y_5$
6	+1	0	-1	$Y_6$
7	-1	0	+1	$Y_7$
8	+1	0	+1	$Y_8$
9	0	-1	-1	$Y_9$
10	0	+1	-1	$Y_{10}$
11	0	-1	+1	$Y_{11}$
12	0	+1	+1	$Y_{12}$
13	0	0	0	$Y_{13}$
14	0	0	0	$Y_{14}$
15	0	0	0	$Y_{15}$

#### 1.4.3 Análise de Variância (NETO, 2007)

Após a construção de um modelo é necessário verificar se este está ajustado adequadamente, para isso, é fundamental fazer a análise dos resíduos. O método mais utilizado para realizar a avaliação do ajuste de um modelo é a *Análise de Variância*.

Para fazer a análise de variância de um modelo é necessário, inicialmente, decompor os desvios das respostas observadas em relação à média. As somas dos



quadrados destes desvios são chamadas de somas quadráticas (SQ) (Equação 1.42).

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (1.42)$$

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r$$

onde:  $SQ_T$  é a soma quadrática em torno da média;

$SQ_R$  é a soma quadrática devida à regressão;

$SQ_r$  é a soma quadrática residual.

Isso significa que uma parte da variação total das observações de  $Y_i$  em torno da média é descrita pela equação da regressão, e o restante fica por conta dos resíduos. Quanto maior for a fração descrita pela regressão, melhor será o ajuste do modelo, o que pode ser quantificado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Equação 1.43). Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de  $R^2$ , melhor terá sido o ajuste do modelo as respostas, pois menos resíduo foi observado. Entretanto, o valor de  $R^2$  não deve ser utilizado para validação do modelo.

$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (1.43)$$

Dividindo as SQ pelos seus respectivos números de graus de liberdade obtêm as chamadas médias quadráticas (MQs). As equações para o cálculo das SQs e das MQs estão apresentadas na Tabela 1.4.

Admitindo que os erros seguem uma distribuição normal, a significância da regressão pode ser estatisticamente testada utilizando um teste F da razão  $MQ_R/MQ_r$ . Se  $F_{\text{calc}(vR,vr)} > F_{\text{tab}}$ , há evidência de uma relação linear entre as variáveis  $y$  e  $x$ . Entretanto, nem sempre, uma regressão dada como significativa pelo teste F é útil para realizar previsões. Pode acontecer que a faixa de variação coberta pelos fatores estudados seja pequena demais, fazendo com que o efeito sobre a resposta fique mascarado pela extensão do erro experimental. O teste F da significância só

pode ser utilizado se não houver evidência de desvio da normalidade na distribuição dos resíduos.

A soma quadrática residual deixada pelo modelo pode ser decomposta em duas partes: uma causada pelos erros aleatórios denominada soma quadrática devido ao erro puro ( $SQ_{ep}$ ), e a outra devida à falta de ajuste chamada de soma quadrática devido a falta de ajuste do modelo ( $SQ_{faj}$ ) (Equação 1.44). A  $SQ_{faj}$  pode ser reduzida aperfeiçoando-se o modelo, mas a  $SQ_{ep}$  não pode ser controlada.

$$\sum_i^m (SQ_r)_i = \sum_i^m \sum_j^{n_j} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_j} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_j} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \quad (1.44)$$

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj}$$

A razão entre essas somas quadráticas pelos seus respectivos números de graus de liberdade fornecerá as respectivas médias quadráticas (Tabela 1.4). Um teste F da razão da  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  será utilizado para avaliar o ajuste do modelo. Se  $F_{calc}(vfaj, vep) < F_{tab}$ , não há evidência de falta de ajuste do modelo.

**Tabela 1.4** Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de Variação	Soma Quadrática	v	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p - 1	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p - 1}$
Resíduo	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	n - p	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n - p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m - p	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m - p}$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n - m	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n - m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	n - 1	
% de variação explicada		$\frac{SQ_R}{SQ_T}$	
% máxima de variação explicável		$\frac{SQ_T - SQ_{ep}}{SQ_T}$	

$n_i$ : número de repetições no nível  $i$ ;  $m$ : número de níveis distintos da variável independente;  $n = \sum n_i$ : número total de observações;  $p$ : número de parâmetros do modelo.

## 1.5 VALIDAÇÃO

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

Existem várias definições de validação e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladora. Como exemplo, as definições da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), International Conference on Harmonisation (ICH) e United States Pharmacopeia/National Formulary (USP/NF) seguem abaixo:

- ANVISA: “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003).
- ICH: “A validação deve demonstrar que o procedimento analítico é adequado para a sua finalidade” (ICH, 2005).
- USP/NF: “A validação é o processo que estabelece, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método analítico satisfazem os requisitos para as aplicações analíticas previstas” (USP/NF, 2006).

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos: no laboratório e completa (HILL & REYNOLDS, 1999; RIBANI et al., 2004; THOMPSON et al., 2002; VAN DER VOET et al., 1999).

O primeiro tipo de validação é realizado em um único laboratório, onde se avaliam todas as características de desempenho, exceto a reprodutibilidade. Este procedimento é realizado para validar novo método que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar a adaptação de método adotado de outras fontes. A validação completa envolve todas as características de desempenho, inclusive a reprodutibilidade, sendo necessária realização de estudo interlaboratorial. Este segundo tipo de validação é realizado quando se deseja tornar a metodologia desenvolvida como método oficial para uma determinada aplicação (RIBANI et al., 2004; THOMPSON et al., 2002).

As características de desempenho analítico típicas que devem ser considerados na validação são: especificidade, linearidade, faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (USP/NF, 2006).

Entretanto, antes de iniciar os experimentos de validação deve-se avaliar o sistema utilizado para verificar se está capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Esta avaliação é alcançada com experimentos de conformidade do sistema, que pode ser definido como um conjunto de testes para garantir que o sistema integral, constituído de equipamento, componentes eletrônicos, operações analíticas e amostras a serem analisadas, está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI et al., 2004; USP/NF, 2006). Parâmetros do teste de conformidade do sistema a serem medidos dependem do tipo de método que está sendo avaliado. Normalmente, no mínimo dois parâmetros são requeridos para garantir a conformidade do sistema. Alguns parâmetros recomendados pela United States Food and Drug Administration (US-FDA) são: repetitividade, resolução e número de pratos da coluna (US-FDA, 2000).

### 1.5.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar os analitos na presença de outros componentes da matriz que podem interferir na determinação. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro princípio ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação (ICH, 2005; USP/NF, 2006).

A seletividade pode ser avaliada por várias maneiras: comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com padrão desta substância; comparação do espectro do pico do padrão com o espectro do pico desta substância na amostra, obtidos utilizando detecção por arranjo de diodos ou espectrômetro de massas; comparação da inclinação da curva analítica com adição de padrão da substância de interesse na amostra com a inclinação da curva analítica sem a presença da matriz, este método é utilizado quando não é possível

obter a amostra isenta da substância de interesse (JENKE, 1998; RIBANI et al., 2004).

### 1.5.2 Linearidade e Faixa de Aplicação

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de obter resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcional à concentração do analito dentro de uma faixa de aplicação (USP/NF, 2006). Para o estabelecimento da linearidade é recomendado um mínimo de cinco níveis de concentração (ICH, 2005).

Um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados é evidenciado pela obtenção de um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual ou maior que 0,999 (JENKE, 1998; SHABIR, 2003), a ANVISA recomenda um  $r$  igual ou maior que 0,990 (ANVISA, 2003).

A linearidade pode também ser verificada através da aplicação do teste de hipótese de linearidade *a priori*, que compara o desvio padrão residual,  $s_{y,x}$ , com o desvio padrão dos valores  $y_{ij}$  em relação a suas médias, que é dado por  $s_y$  (Equação 1.45). O teste é realizado pela comparação entre  $F_{calc}$  e  $F_{\alpha; f1=p-2; f2=m-p}$  ( $F_{tab}$ ), se  $F_{calc} \leq F_{tab}$  o modelo linear pode ser utilizado (DANZER & CURRIE, 1998).

$$F_{calc} = \frac{s_{y,x}^2}{s_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad (1.45)$$

onde:  $m_i$  é o número de medição;

$p$  é o número de pontos da curva analítica;

$m$  é o produto entre  $p$  e  $m_i$ .

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o nível superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade do método (USP/NF, 2006). É recomendado que o intervalo considerado seja de 80% a 120% do teor declarado para doseamento de uma substância ativa em produto acabado e de 50% a 120% do limite especificado para a determinação de impureza (ICH, 2005; USP/NF, 2006).

### 1.5.3 Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados de testes individuais, quando o método é aplicado a sucessivas determinações de uma amostra homogênea. É geralmente expresso através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês relative standard deviation), também conhecido como coeficiente de variação (CV) (Equação 1.46) (ICH, 2005; USP/NF, 2006).

$$RSD(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.46)$$

onde:  $s$  é o desvio padrão dos resultados;

$\bar{x}$  é a média dos resultados.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método realizadas em um curto intervalo de tempo e sob as mesmas condições: mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo procedimento (ICH, 2005; USP/NF, 2006). A ICH e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações em triplicata ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores (ICH, 2005; USP/NF, 2006). Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003).

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados de uma mesma amostra analisada por laboratórios diferentes, é um estudo colaborativo (ICH, 2005; USP/NF, 2006).

#### 1.5.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos por este método ao valor de referência aceito como verdadeiro (USP/NF, 2006).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição de padrão (RIBANI et al., 2004).

A exatidão é calculada através da porcentagem de recuperação (%R), em que quantidades conhecidas de padrão da substância são adicionadas em diferentes níveis à matriz isenta da substância de interesse ou à amostra (Equação 1.47), ou através da diferença entre a média e o valor verdadeiro aceito, juntamente com intervalo de confiança (USP/NF, 2006). A ICH recomenda que exatidão seja avaliada em, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações em triplicata (ICH, 2005).

$$\%R = \frac{S_{a+p} - S_a}{S_p} \times 100 \quad (1.47)$$

onde:  $S_{a+p}$  é o sinal da amostra com adição de padrão;

$S_a$  é o sinal da amostra;

$S_p$  é o sinal do padrão.



### 1.5.5 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 2005; USP/NF, 2006).

O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

Método visual: o LD é determinado pela análise de amostras em concentrações conhecidas do analito, tal que possa estabelecer o nível mínimo em que este pode ser detectado com segurança. Este método pode ser aplicado para métodos não-instrumentais e instrumentais (ICH, 2005).

Método relação sinal-ruído: esta abordagem só pode ser aplicada em procedimentos analíticos que exibem ruído da linha de base. A determinação da relação sinal-ruído é realizada comparando os sinais medidos a partir de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito com um branco para estabelecer a concentração mínima em que o analito pode ser detectado com segurança. A relação sinal-ruído entre 3 ou 2:1 é geralmente considerada aceitável para a estimativa do limite de detecção (ICH, 2005). O LD pode ser calculado pela Equação 1.48:

$$LD = 3 \times \frac{s_{ruído} \times C_a}{H_{máx} - H_{mín}} \quad (1.48)$$

onde:  $s_{ruído}$  é a estimativa do desvio padrão da linha base (ruído);

$C_a$  é a concentração do analito;

$H_{máx}$  é a altura máxima do pico do analito;

$H_{mín}$  é a altura mínima do pico do analito.

Método baseado em parâmetros da curva analítica: o LD pode ser expresso pela Equação 1.49 (ICH, 2005):

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1.49)$$

onde:  $s$  é a estimativa do desvio padrão do branco ou da linha de regressão ou do coeficiente linear da curva analítica;

$S$  é o coeficiente angular da curva analítica.

Para utilizar esse método é necessário construir uma curva analítica utilizando a matriz contendo composto de interesse na faixa de concentração próxima ao LD (RIBANI et al. 2004).

#### 1.5.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando um determinado procedimento (ICH, 2005; USP/NF, 2006).

Os mesmos critérios de LD são adotados para o LQ utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando o método visual, a relação sinal ruído (Equação 1.50) e os parâmetros da curva analítica (1.51) (ICH, 2005).

$$LQ = 10 \times \frac{s_{ruído} \times C_a}{H_{máx} - H_{mín}} \quad (1.50)$$

onde:  $s_{ruído}$  é a estimativa do desvio padrão da linha base (ruído);

$C_a$  é a concentração do analito;

$H_{máx}$  é a altura máxima do pico do analito;

$H_{mín}$  é a altura mínima do pico do analito.

$$LQ=10 \times \frac{s}{S} \quad (1.51)$$

onde:  $s$  é a estimativa do desvio padrão do branco ou da linha de regressão ou do coeficiente linear da curva analítica;

$S$  é o coeficiente angular da curva analítica.

### 1.5.7 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações no sistema e fornece uma indicação da sua confiabilidade (RIBANI et al., 2004, USP/NF, 2006).

Alguns parâmetros recomendados para avaliar a robustez em CE são: dimensões do capilar; material do capilar; composição do eletrólito; injeção; voltagem; temperatura; comprimento de onda (US-FDA, 2000).

Se pequenas variações nesses parâmetros não provocarem alterações nos resultados que excedam os limites aceitáveis de linearidade, exatidão e precisão, o método é robusto (RIBANI et al., 2004).

## 2 OBJETIVOS

Devido ao fato da TB ser ainda um importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, é de grande relevância o desenvolvimento e otimização de novas metodologias para a análise dos fármacos utilizados no seu tratamento. Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento, otimização e validação de uma metodologia por CZE/UV para determinação dos tuberculostáticos de primeira escolha (ETB, ISO, RIF e PIR). O segundo objetivo foi o desenvolvimento e otimização de metodologias alternativas para determinação de ETB em formulação farmacêutica, fazendo uso de detecção UV. Finalmente, o terceiro objetivo foi o desenvolvimento e otimização de uma metodologia alternativa para análise simultânea de ISO, suas impurezas de síntese e seus principais produtos de degradação por CZE/UV.

### 3 EXPERIMENTAL

#### 3.1 REAGENTES

Todos os reagentes foram de grau analítico. Ácido acético (HAc), hidróxido de sódio (NaOH), sulfato cúprico pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), dodecil sulfato de sódio (SDS) e metanol (MeOH) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); éter laurílico de polioxietileno 23 (Brij 35) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); sparfloxacin (SPFLX) foi adquirida da Xiamen Mchem Pharma Group (Xiamen, China); 2-amino-1-butanol (2A1B) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); dicloridrato de etambutol (ETB.2HCl) foi adquirido da Genix Indústria Farmacêutica (Goiás, Brazil); isoniazida (ISO) foi adquirida Taizhou Jiangbei Chemical Factory (Taizhou, China); rifampicina (RIF) foi adquirida da Xiamem Mchem Laboratories Ltd (Xiangyang, China); pirazinamida (PIR) foi adquirida da AB Farmo Química Ltda (Goiás, Brazil); 4-cianopiridina foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); ácido isonicotínico foi adquirido da Acros Organics (New Jersey, USA).

### 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos envolvendo separação foram conduzidos através de um equipamento comercial de CE (modelo HP3d CE, Agilent Technologies Palo Alto, USA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês diode array), controle de temperatura no interior do cartucho por circulação com ar forçado (25°C), e software para aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01). A injeção e o condicionamento do capilar foram realizados hidrodinamicamente e o sistema de eletrólito foi operado sob polaridade normal e voltagem constante. Todos os experimentos foram realizados em capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) com 48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm de comprimento efetivo e 75 µm d.i. x 375 µm d.e.

Espectros eletrônicos UV-vis foram realizados em espectrofotômetro de varredura com duplo feixe resolvido no tempo (modelo UV-1601 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) usando celas regulares de quartzo de caminho óptico igual a 1,0 cm.

Os experimentos para caracterização do complexo CuETB foram realizados através de equipamento comercial de cromatografia líquida equipado com espectrômetro de massas modelo Waters ZQ-LC/MS 2000.

Espectros EPR foram registrados em equipamento Bruker modelo EMX, operando em banda X (9.49 GHz), com 20,12 mW de potência e frequência de modulação de 100 kHz. As condições-padrão de registro destes espectros foram:  $2,52 \times 10^3$  ganho no registrador e amplitude de modulação 15G.

### 3.3 ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ETB E 2-AMINO-1-BUTANOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR CZE UTILIZANDO COMPLEXAÇÃO COM COBRE(II)

#### 3.3.1 Soluções Estoque

Solução aquosa contendo  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão ácido acético/acetato de sódio (HAc/NaAc) (pH 4,6) e solução aquosa contendo  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  foram utilizadas no preparo dos eletrólitos e nas diluições dos padrões e das amostras.

Solução aquosa contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de ETB e solução aquosa contendo  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  de 2A1B foram usadas nos procedimentos de otimização do método e quantificação da amostra.

#### 3.3.2 Amostra

Seis comprimidos de ETB.2HCl foram pesados e macerados. Massa correspondente a 125,0 mg de ETB foi transferida para balão volumétrico de 25,00 mL e dissolvida em água deionizada (procedimento realizado seis vezes). Após 10 min de sonicação, as amostras em suspensão foram filtradas através de filtro Millipore 0,45  $\mu\text{m}$  para obter soluções límpidas.

#### 3.3.3 Procedimentos para Avaliação de Figuras de Mérito

Foram construídas curvas de calibração externa para ETB e 2A1B em triplicata: 0, 25, 50, 75, 100 e 125  $\text{mg L}^{-1}$ . As soluções foram preparadas em balão volumétrico de 5,00 mL, a partir da adição de alíquotas apropriadas: (1) soluções estoque dos padrões; (2) solução tampão HAc/NaAc, para uma concentração final de  $60 \text{ mmol L}^{-1}$ ; (3) solução de  $\text{CuSO}_4$ , tal que, a concentração final fosse igual a  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . O volume foi ajustado com água deionizada.

Foi construída curva de adição de padrão para 2A1B adicionando 1,0 mL de solução de amostra em cada balão volumétrico de 5,00 mL. Em seguida, foi adicionada alíquota de solução estoque de 2A1B, tal que, a concentração final de padrão fosse igual a 0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg L<sup>-1</sup>. Finalmente, foram adicionadas alíquotas de tampão HAc/NaAc e CuSO<sub>4</sub>, tal que, as concentrações fossem iguais a 60 e 5 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O volume foi ajustado com água deionizada. Este procedimento foi realizado seis vezes.

Para a construção da curva de adição de padrão para ETB, a amostra preparada foi diluída cinco vezes. Uma alíquota de 250 µL da amostra diluída foi transferida para seis balões volumétricos de 5,00 mL, as quais foram adicionadas alíquotas de solução estoque de padrão de ETB, para que a concentração do padrão fosse igual a 0, 25, 50, 75, 100 e 125 mg L<sup>-1</sup>. Posteriormente, o procedimento foi o mesmo descrito para 2A1B.

As curvas de calibração externa foram utilizadas para cálculo da linearidade, repetitividade em área e tempo de migração para os padrões. As curvas de adição de padrão foram usadas para avaliar a repetitividade em área e tempo de migração para a amostra. E através da comparação entre as curvas de calibração externa e de adição de padrão foi obtida a seletividade. Estas curvas também foram utilizadas para determinar a recuperação da metodologia.

O LD e o LQ foram determinados pelo método relação sinal-ruído, através dos eletroferogramas da amostra para ETB e da amostra com adição de padrão para 2A1B.

#### 3.3.4 Formação do Complexo CuETB

86,9 mg de ETB.2HCl foi pesada e dissolvida em 2,0 mL de solução tampão HAc/NaAc 60 mol L<sup>-1</sup>; 159 mg de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O foi pesada e dissolvida em 3,0 mL de solução tampão HAc/NaAc 60 mmol L<sup>-1</sup>. Em seguida, a solução contendo ETB foi gotejada lentamente na solução de CuSO<sub>4</sub>, sob constante agitação. A solução foi mantida em repouso à temperatura ambiente até ocorrer à formação de precipitados. Os precipitados formados foram dissolvidos em metanol. Esta solução também foi mantida em repouso à temperatura ambiente. Após alguns dias verificou-se a



formação de novos precipitados. Estes precipitados foram dissolvidos em 1 metanol: 1 água (v/v), e a solução foi analisada por LC/MS.

### 3.4 METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA ALTERNATIVA PARA ANÁLISE DE ETAMBUTOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

#### 3.4.1 Soluções Estoque

Solução aquosa de tampão HAc/NaAc (pH 4,6) na concentração de 50 mmol L<sup>-1</sup> e solução aquosa de CuSO<sub>4</sub> na concentração de 5 mmol L<sup>-1</sup> foram utilizadas nas diluições de padrão e amostras.

Solução aquosa de ETB.2HCl na concentração de 2,5 mmol L<sup>-1</sup> foi utilizada nos procedimentos de otimização da metodologia e quantificação da amostra, após diluição adequada em concentração apropriada de tampão HAc/NaAc e CuSO<sub>4</sub>.

#### 3.4.2 Amostra

Vinte comprimidos de ETB.2HCl foram pesados e macerados. Massa correspondente a 8,0 mg do princípio ativo foi pesada e dissolvida em água deionizada em um balão volumétrico de 10,00 mL (procedimento realizado cinco vezes). Após 10 min de sonicação, as amostras foram filtradas através de filtro Millipore 0,45 µm para obter soluções límpidas que foram utilizadas nas etapas posteriores:

- a) Solução de amostra: 615 µL de solução da amostra foram transferidos para um balão volumétrico de 10,00 mL, ao qual foram adicionadas alíquotas de tampão HAc/NaAc e CuSO<sub>4</sub>, tal que, a concentração final fosse igual a 5,0 e 0,5 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente.
- b) Solução de amostra com adição de padrão: 615 µL da solução de amostra foram transferidos para um balão volumétrico de 10,00 mL, ao qual foram adicionadas alíquotas de soluções estoque, tal que, a concentração final fosse igual a 0,16 mmol L<sup>-1</sup> de ETB, 5 mmol L<sup>-1</sup> de tampão HAc/NaAc e 0,5 mol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.

### 3.4.3 Procedimentos para Avaliação de Figuras de Mérito

Foi construída uma curva de calibração externa para ETB em triplicata: 0,08; 0,12; 0,16; 0,20; 0,24; 0,28; 0,32 e 0,36 mmol L<sup>-1</sup>. As soluções foram preparadas em um balão volumétrico de 10,0 mL, a partir da adição de alíquotas apropriadas: (1) solução estoque de ETB 2,5 mmol L<sup>-1</sup>; (2) solução tampão HAc/NaAc, para uma concentração final de 5 mmol L<sup>-1</sup>; (3) solução de CuSO<sub>4</sub>, tal que, a concentração final fosse igual a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. O volume foi ajustado com água deionizada. Esta curva foi utilizada para cálculo do ajuste do modelo e quantificação das amostras.

A solução (a), descrita no item 3.4.2, foi usada para avaliar a repetitividade da determinação da amostra.

As soluções (a e b), descritas no item 3.4.2, foram utilizadas para determinar a recuperação da metodologia espectrofotométrica.

O LD e o LQ foram determinados pelo método relação sinal-ruído, através do espectro da amostra farmacêutica contendo ETB.

### 3.5 ANÁLISE SIMULTÂNEA DOS TUBERCULOSTÁTICOS DE PRIMEIRA ESCOLHA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CZE SOB DETECÇÃO UV

#### 3.5.1 Soluções estoque

Solução aquosa contendo  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc (pH 4,6) foi utilizada no preparo dos eletrólitos.

Solução aquosa contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  foi usada no preparo dos eletrólitos e na diluição de padrões e amostras.

Solução aquosa contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de Brij 35 foi utilizada no preparo de solução estoque de RIF e de amostras contendo RIF, e na diluição de padrões e amostras.

Solução de SPFLX (padrão interno - PI) contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foi preparada em MeOH.

Soluções aquosas contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de ETB e ISO, e  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  de PIR foram preparadas independentemente.

Solução aquosa contendo  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de RIF e  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de Brij 35 foi preparada diariamente, utilizando banho de ultra-som para propiciar a completa dissolução da RIF.

#### 3.5.2 Amostras

**2-DFC:** Para a associação  $150 \text{ mg RIF}$  e  $100 \text{ mg ISO}$ , quatro cápsulas foram abertas e pesadas. Massa correspondente a  $20,0 \text{ mg}$  de RIF foi transferida para um balão volumétrico de  $100,0 \text{ mL}$  ao qual foram adicionadas alíquotas de Brij 35,  $\text{CuSO}_4$  e SPFLX tal que a concentração final fosse  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (composição fixa de aditivos - CFA), respectivamente. Após sonicação até completa dissolução da RIF, o volume foi ajustado com água deionizada e as

amostras em suspensão foram filtradas através de filtro Millipore 0,45 µm para obter soluções límpidas.

**PIR**: Para a formulação contendo 500 mg de PIR quatro comprimidos foram pesados e macerados. Massa correspondente a 500 mg de PIR foi transferida para balão volumétrico de 25,00 mL e dissolvida em água deionizada. Após 10 min de sonicação, as amostras em suspensão foram filtradas através de filtro Millipore 0,45 µm para obter soluções límpidas. Alíquota de 800 µL da solução de amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10,00 mL juntamente com CFA e o volume final ajustado com água deionizada.

**ETB**: Para a formulação contendo 400 mg de ETB.2HCl quatro comprimidos foram pesados e macerados. Massa correspondente a 400 mg de ETB foi transferida para um balão volumétrico de 25,00 mL e dissolvida em água deionizada. Após 10 min de sonicação, as amostras em suspensão foram filtradas através de filtro Millipore 0,45 µm para obter soluções límpidas. Alíquota de 750 µL da solução de amostra foi transferida para um balão volumétrico de 10,00 mL, juntamente com CFA e o volume final ajustado com água deionizada.

A quantificação para as amostras 2-DFC, PIR e ETB foi realizada por calibração externa, em quadruplicata.

**4-DFC**: O preparo da amostra 4-DFC está descrito nos procedimentos para validação da metodologia.

### 3.5.3 Procedimentos para Validação da Metodologia

Para o estudo de conformidade do sistema foi preparada mistura de padrões contendo 50 mg L<sup>-1</sup> de ETB, ISO, RIF e PIR, juntamente com a CFA.

Para construção da curva de calibração externa foi preparada uma solução correspondente ao nível máximo de concentração (nível 6). Foi pesada 3,0 mg de padrão de RIF, essa massa foi transferida para um balão volumétrico de 50,00 mL, ao qual foi adicionada a CFA. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de solução estoque de ETB, ISO e PIR, tal que a concentração final fosse 96, 48, e 144 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (procedimento realizado em triplicata). Estas soluções foram mantidas no banho de ultra-som até a completa dissolução da RIF e o volume final foi ajustado com água deionizada.

Para obtenção dos demais níveis da curva de calibração foram realizadas diluições da solução preparada para o nível 6: nível 1: 1,7 mL; nível 2: 3,3 mL; nível 3: 5,0 mL; nível 4: 6,7 mL e nível 5: 8,3 mL, a cada balão foram adicionadas alíquotas de Brij 35, CuSO<sub>4</sub> e SPFLX, de modo que a CFA fosse mantida. O volume final foi ajustado com água deionizada.

Para a construção da curva de adição de padrão foi utilizada a amostra 4-DFC. O conteúdo do sachê de 4-DFC foi pesado e, em seguida, dois procedimentos foram realizados:

- a) Nível mínimo da curva de adição de padrão (solução 1): 13,8 mg da amostra 4-DFC, correspondente a 2,0 mg de RIF, foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL juntamente com a CFA.
- b) Nível máximo da curva por adição de padrão (solução 6): 13,8 mg de amostra 4-DFC, correspondente a 2,0 mg de RIF, e 2,0 mg de padrão de RIF foram transferidas para um balão volumétrico de 100,00 mL juntamente com CFA. A este balão foram adicionadas alíquotas de ETB, ISO e PIR, tal que, a concentração final fosse 64, 32 e 96 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

As amostras em suspensão 1 e 6 foram mantidas no banho de ultra-som até a completa dissolução da RIF (por aproximadamente 60 min) e o volume final foi ajustado com água deionizada. Em seguida, foram filtradas através de filtro Millipore 0,45 µm para obter soluções límpidas.

Para obtenção dos níveis intermediários da curva de adição de padrão, as seguintes misturas foram realizadas para um volume final de 10,0 mL: nível 2: 8,7 e 1,3 mL; nível 3: 7,5 e 2,5 mL; nível 4: 5,0 e 5,0 mL e nível 5: 2,5 e 7,5 mL, da solução 1 e 6, respectivamente. Cada procedimento descrito acima foi realizado seis vezes.

As curvas de calibração externa foram utilizadas para cálculo da linearidade, repetitividade em área e tempo de migração para os padrões. As curvas de adição de padrão foram usadas para avaliar a repetitividade em área e tempo de migração para a amostra. E através da comparação entre as curvas de calibração externa e de adição de padrão foi obtida a seletividade. Estas curvas também foram utilizadas para determinar a recuperação da metodologia.

O LD e o LQ foram determinados pelo método relação sinal-ruído, através do eletroferograma das amostras de 2-DFC, ETB e PIR.

Para avaliar a robustez foi realizado um planejamento Box-Behnken 3<sup>3</sup>, utilizando como fatores concentração de CuSO<sub>4</sub> e Brij 35, e voltagem. As soluções de eletrólito e padrões foram preparadas a partir de diluições apropriadas das soluções estoque.

#### 3.5.4 Amostra para Teste de Degradação

Uma cápsula da associação 150 mg RIF e 100 mg ISO foi aberta e pesada. Massas correspondentes a 10,0 mg de RIF foram transferidas para 4 béqueres. Cada amostra foi submetida a um procedimento distinto (SHISHOO et al., 1999):

- (I) Exposição à luz visível por 43 h;
- (II) Exposição à luz UV por 1 h;
- (III) Aquecimento até 45 °C;
- (IV) Aquecimento até 95 °C.

Em seguida, cada amostra foi transferida para um balão volumétrico de 25,0 mL, sendo realizado o mesmo procedimento de dissolução descrito para a amostra 2-DFC.

### 3.5.5 Caracterização dos Complexos

Para a análise por ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do inglês: *electron paramagnetic resonance*) foram preparadas soluções de ETB, ISO, RIF e PIR na concentração de 1,8, 3,6, 3,6 e 4,0 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, diluídas separadamente em balões volumétricos de 10,00 mL contendo 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão HAc/NaAc, 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> e 2 mmol L<sup>-1</sup> de Brij 35. As soluções dos analitos foram diluídas na proporção 2:1 v/v em etanol, congeladas em nitrogênio a 77K e, em seguida, analisadas por EPR.



### 3.6 ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ISO, SUAS IMPUREZAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CZE

#### 3.6.1 Soluções estoque

Solução aquosa contendo  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc (pH 4,6) foi utilizada no preparo dos eletrólitos.

Solução aquosa contendo  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  e solução aquosa contendo  $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de Brij 35 foram usadas no preparo dos eletrólitos e na diluição de padrões e amostra.

Soluções aquosas contendo  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de ETB, utilizado como PI,  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de ISO,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de isonicotinato de etila (INE),  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de isonicotinamida (IND),  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de 4-cianopiridina (CPD) e  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido isonicotínico (AIN) foram preparadas independentemente.

OBS: INE e IND foram sintetizadas e devidamente caracterizadas pelo grupo de pesquisa “Síntese de substâncias no combate a doenças tropicais”, coordenado pelo Dr. Marcus V.N. de Souza.

#### 3.6.2 Síntese do INE (BRENNER & HUBER, 1953)

INE foi sintetizado a partir da reação entre o AIN ( $8,1 \text{ mmol}$ ) e cloreto de tionila ( $32,5 \text{ mmol}$ ) em etanol. Adicionou-se o cloreto de tionila em  $5,00 \text{ mL}$  de etanol e manteve-se sob agitação à temperatura ambiente por  $5 \text{ min}$ . Após este período, o ácido foi adicionado ao meio reacional. A reação foi mantida a temperatura ambiente por  $5 \text{ h}$ . A mistura resultante foi concentrada sob pressão reduzida, e o sólido obtido foi lavado com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  e extraído com acetato de etila ( $3 \times 10,00 \text{ mL}$ ). A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$  e evaporada sob pressão reduzida. O produto foi devidamente caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , infravermelho e espectrometria de massas.

### 3.6.3 Síntese da IND

IND foi sintetizada a partir da reação do isonicotinato de metila (3,6 mmol) com amônia em metanol (10,00 mL). Solubilizou-se o éster no metanol e então borbulhou-se amônia até a saturação do meio. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 1 h. A mistura resultante foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel. O produto foi devidamente caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , infravermelho e espectrometria de massas.

### 3.6.4 Amostra

Comprimido contendo 100 mg de ISO foi pesado, macerado e transferido para balão volumétrico de 50,00 mL, ao qual foi adicionado água deionizada, este procedimento foi realizado em triplicata. Após 10 min de sonicação, as amostras em suspensão foram centrifugadas 4000 rpm por 15 min, e o sobrenadante foi utilizado nas etapas posteriores:

- a) Solução de amostra para determinação das impurezas e produtos de degradação: 2,0 mL do sobrenadante foram transferidos para balão volumétrico de 5,00 mL, ao qual foram adicionadas alíquotas de PI, Brij 35 e  $\text{CuSO}_4$ , tal que, a concentração final fosse igual a  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $12,5 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.
- b) Solução de amostra com adição de padrão para determinação das impurezas e produtos de degradação: 2,0 mL do sobrenadante foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, ao qual foram adicionadas alíquotas de solução estoque, tal que, a concentração final fosse igual a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de PI,  $30 \text{ mg L}^{-1}$  de INE, IND e CPD e  $16 \text{ mg L}^{-1}$  de AIN e alíquotas de Brij 35 e  $\text{CuSO}_4$  para uma concentração final igual a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $12,5 \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.

- c) Solução de amostra para determinação da ISO: 125  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para um balão volumétrico de 5,00 mL, ao qual foram adicionadas alíquotas de PI, Brij 35 e  $\text{CuSO}_4$ , tal que, a concentração final fosse igual a 20  $\text{mg L}^{-1}$ , 1  $\text{mmol L}^{-1}$  e 12,5  $\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.
- d) Solução de amostra com adição de padrão para determinação da ISO: 125  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para balão volumétrico de 5,00 mL, ao qual foram adicionadas alíquotas de solução estoque, tal que, a concentração final fosse igual a 20  $\text{mg L}^{-1}$  de PI, 20  $\text{mg L}^{-1}$  de ISO, 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de Brij 35 e 12,5  $\text{mol L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ .

### 3.6.5 Procedimentos para Avaliação de Figuras de Mérito

Foram construídas curvas de calibração externa para ISO (10, 32,5, 55, 77,5 e 100  $\text{mg L}^{-1}$ ), AIN (2, 10, 18, 26 e 34  $\text{mg L}^{-1}$ ), INE, IND e CPD (10, 20, 30, 40 e 50  $\text{mg L}^{-1}$ ), em triplicata. As soluções foram preparadas em um balão volumétrico de 5,00 mL, a partir da adição de alíquotas apropriadas: (1) soluções estoque dos padrões; (2) solução estoque de PI, tal que, a concentração final fosse igual a 20  $\text{mg L}^{-1}$ ; (3) solução de Brij 35, para uma concentração final de 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ; (4) solução de  $\text{CuSO}_4$ , tal que, a concentração final fosse igual a 12,5  $\text{mmol L}^{-1}$ . O volume foi ajustado com água deionizada.

As curvas de calibração externa foram utilizadas para cálculo da linearidade, repetitividade em área e tempo de migração para os padrões. As soluções (a e c), descritas no item 3.5.4, foram usadas para avaliar a repetitividade para a amostra. As soluções (a e b; c e d), descritas no item 3.5.4, foram utilizadas para determinar a porcentagem de recuperação da metodologia.

O LD e o LQ foram determinados pelo método relação sinal-ruído, através dos eletroferogramas da amostra a para AIN, c para ISO e b para INE, IND e CPD.

### 3.7 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

CE: Quando um capilar novo foi utilizado, este foi condicionado, por aplicação de 940 mbar de pressão, com solução aquosa de NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (30 min), água deionizada (5 min) e solução de eletrólito (10 min). Entre corridas, o capilar foi condicionado com solução aquosa de NaOH  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ , água deionizada (2 min) e solução de eletrólito (3 min).

Espectrofotômetro: As análises utilizaram como referência solução aquosa de tampão HAc/NaAc e  $\text{CuSO}_4$  nas mesmas concentrações utilizadas nas diluições dos padrões e amostras. Entre as leituras, a cubeta foi lavada com água destilada e rinsada com a solução a ser analisada.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

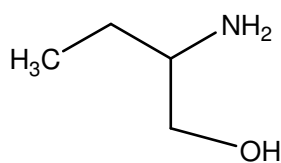
As análises estatísticas paramétrica dos dados, incluindo: cálculo dos estimadores dos modelos, ANOVA, superfícies de resposta, testes de normalidade, independência, homocedasticidade, intervalo de confiança, %CV e %R, entre outros, foram realizados mediante o uso de softwares como o Excel, o SPSS for Windows 8.0 e o Statistic 6.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ETB E 2-AMINO-1-BUTANOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA POR CZE UTILIZANDO COMPLEXAÇÃO COM COBRE(II)

O ETB, tuberculostático de primeira escolha, degrada a 2-amino-1-butanol (2A1B) (Figura 4.1) e a quantidade deste produto em formulação farmacêutica não deve ser maior que 1% do teor de ETB.2HCl (RAGONESE et al., 2002). Portanto, metodologias analíticas simples, rápidas e eficientes, capaz de determinar simultaneamente ETB e 2A1B, são ferramentas que facilitam o processo de controle de qualidade da formulação.

Dentro deste contexto, uma metodologia alternativa para análise simultânea de ETB e 2A1B por CZE foi proposta.



$pK_a$  : 9,27 e 12, 90

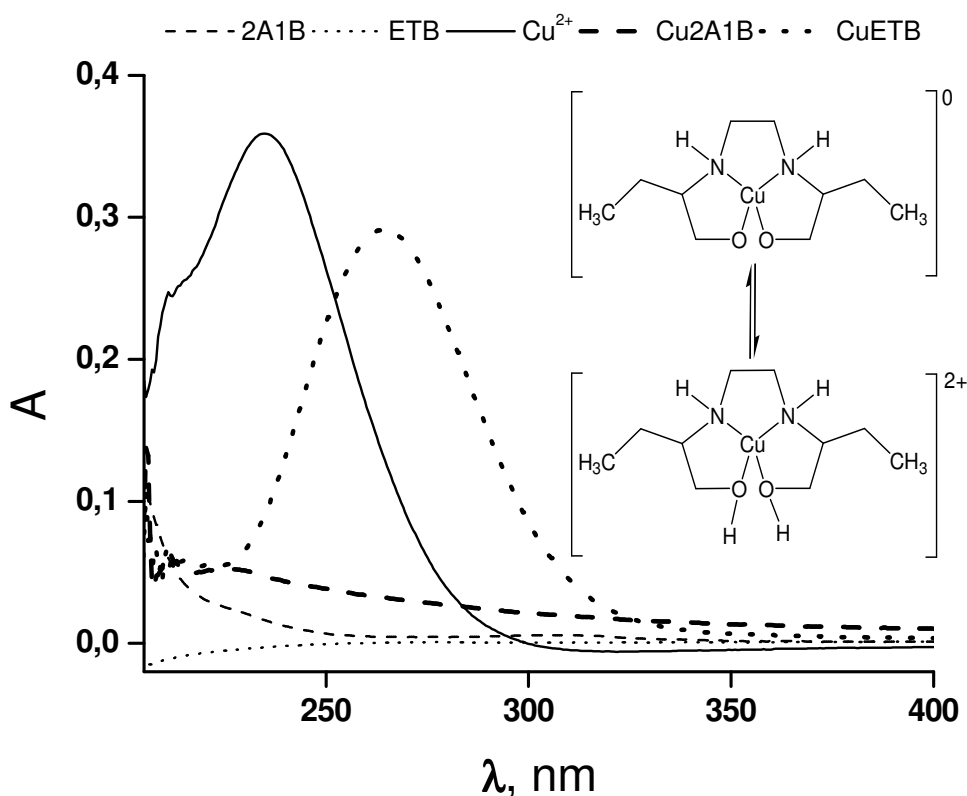
**Figura 4.1** Estrutura química do 2A1B, produto de degradação do ETB.

#### 4.1.1 Estudo de Formação do Complexo CuETB

Baseado no estudo de complexação de ETB com Cu(II) realizada por JIANG et al., 2002, solução tampão HAc/NaAc (pH 4,6) foi utilizada a fim de manter o pH no intervalo de 4,0-5,0, pois, de acordo com a literatura a recuperação e a sensibilidade eram pobres em pH abaixo de 4,0 e em pH acima de 5,0 ocorre a precipitação de hidróxido cúprico. Figura 3.2 mostra os espectros eletrônicos UV-vis das soluções de CuSO<sub>4</sub>, ETB, 2A1B, CuETB e Cu2A1B. Analisando os espectros, é possível observar um deslocamento batocrômico (ou deslocamento para o vermelho) comparando as bandas de absorção do Cu<sup>2+</sup> livre (250 nm) com a da mistura CuETB (262 nm), o que sugere ocorrência de complexação. É também possível observar

uma pequena variação da banda de absorção Cu2A1B em comparação com 2A1B. Com base na análise do espectro eletrônico, o comprimento de onda de 262 nm foi selecionado para o estudo de otimização por CE.

Um estudo complementar por LC/MS foi realizado, a fim de avaliar o complexo CuETB formado. Os resultados obtidos indicam a presença de dois compostos principais: um com  $m/z$  266,2 e intensidade relativa de 100%, e o outro com  $m/z$  268,2 e intensidade relativa de 55%. O primeiro foi atribuído a um complexo neutro  $[\text{CuETB}]^0$  e o segundo a um catiônico  $[\text{CuETB}]^{2+}$  (Figura 4.2). Acredita-se que o complexo catiônico é dominante no meio de tampão HAc/NaAc, uma vez que, em meio ácido o equilíbrio químico deve favorecer a espécie carregada. Além disto, o complexo apresentou tempo de migração menor que o do EOF.



**Figura 4.2** Espectros UV-vis de  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ , ETB e 2A1B, e das misturas CuETB e Cu2A1B na proporção 1:1. Todas as soluções foram diluídas em  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução tampão HAc/NaAc.

#### 4.1.2 Otimização do Sistema de Eletrólito

Após a confirmação da formação do complexo CuETB, que permitiu a detecção do ETB na região do UV, um planejamento fatorial  $3^2$  (NETO et al., 2007) foi realizado afim de otimizar o sistema de eletrólito. Os fatores selecionados foram a concentração de tampão HAc/NaAc e  $\text{Cu}^{2+}$ . A Tabela 4.1 apresenta a matriz de planejamento e as respostas monitoradas. Outras condições experimentais, tais como, voltagem, volume de injeção, comprimento de onda, dimensões do capilar e temperatura no cartucho foram mantidas constante.

O parâmetro utilizado para a seleção do experimento ótimo baseou-se na resolução (R) dos pares de picos,  $R_{\text{Na}^+, \text{Cu}2\text{A}1\text{B}}$  e  $R_{\text{Cu}2\text{A}1\text{B}, \text{Cu}^{2+}}$ , uma vez que estes foram considerados críticos para a determinação do 2A1B. Uma resolução maior ou igual a 1,50 é desejável para se obter uma separação na linha base (HARRIS, 2008).

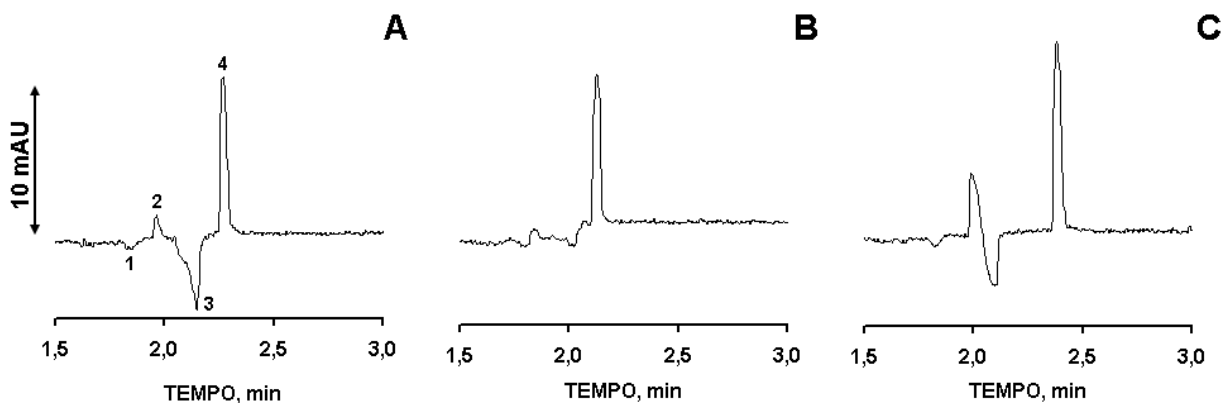
Analisando os resultados (Tabela 4.1) dos experimentos 1, 2 e 3 verifica-se que a concentração de tampão HAc/NaAc é determinante na otimização da separação do 2A1B dos picos de sistema; comparando os experimentos 2, 5 e 8, onde a concentração de tampão é mantida constante no nível (0), verifica-se que é necessário manter a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  no nível (-1) para que a separação ocorra. Portanto, apenas o experimento 2 apresentou resolução maior que 1,50 para ambos os pares de picos críticos, conseqüentemente, o eletrólito consistindo na mistura de  $60,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  foi o otimizado. A Figura 4.3 apresenta os eletroferogramas dos experimentos 2 (A), 3 (B), com perfil semelhante ao experimento 6, e 4 (C), com perfil semelhante aos experimentos 1, 5, 7, 8 e 9.

**Tabela 4.1** Matriz de planejamento  $3^2$  e as resoluções monitoradas

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HAc/NaAc	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1
$\text{Cu}^{2+}$	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1
$R_{\text{Na}^+, \text{Cu}2\text{A}1\text{B}}$	1,88	1,92	1,00	2,69	2,20	1,29	2,69	2,14	1,93
$R_{\text{Cu}2\text{A}1\text{B}, \text{Cu}^{2+}}$	1,00	1,67	3,40	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00	1,11

HAc/NaAc ( $\text{mmol L}^{-1}$ ): (-1) 50; (0) 60; (+1) 70;  
 $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ ): (-1) 5; (0) 7,5; (+1) 10;





**Figura 4.3** Eletroferogramas dos experimentos: 2 (A); 3 (B), com perfil semelhante ao 6; 4 (C), com perfil semelhante aos experimentos 1, 5, 7, 8 e 9. Picos: (1)  $\text{Na}^+$ ; (2)  $\text{Cu}_2\text{A1B}$ ; (3)  $\text{Cu}^{2+}$ ; (4)  $\text{CuETB}$ . Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +25 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; eletrólito descrito na Tabela 4.1.

#### 4.1.3 Figuras de Mérito

Após o desenvolvimento e otimização da metodologia, algumas figuras de mérito, tais como, linearidade, seletividade, repetitividade, exatidão, LD e LQ foram avaliados. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2.

A seletividade foi avaliada pelo método de adição de padrão. Os valores dos coeficientes angulares das curvas de calibração externa e de adição de padrão foram iguais para ETB e muito próximos para 2A1B, o que é um indicativo de que a seletividade é adequada.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Equação 1.43) e do teste de hipótese *a priori* (Equação 1.45). Todos os valores de  $R^2$  foram iguais ou superiores a 0,998, o que é um indicativo de um ajuste provavelmente adequado dos dados. Os valores de  $F_{\text{calc}}$ , obtidos a partir do teste de hipóteses *a priori*, foram iguais a 3,22 e 3,28 para ETB e 2A1B, respectivamente. Portanto, os valores de  $F_{\text{calc}}$  foram menores que o  $F_{\text{tab}(0,05;3;10)} = 3,71$ , não evidenciando falta de ajuste no intervalo de 95% de confiança. Com base nos resultados de  $R^2$  e  $F_{\text{calc}}$ , pode-se concluir que o método apresentou uma relação linear entre área e concentração, dentro da faixa de aplicação estudada (0 a 125  $\text{mg L}^{-1}$ ).

A repetitividade (Equação 1.46) foi avaliada em área e em tempo de migração no intervalo de 0 a 125 mg L<sup>-1</sup>, para as curvas de padronização externa e de adição de padrão. Os maiores valores de %CV estão apresentados na Tabela 4.2, sendo estes menores que 5% indicando boa precisão.

A exatidão foi determinada através da porcentagem de recuperação (%R) na faixa de 25 a 125 mg L<sup>-1</sup>. A %R média está mostrada na Tabela 4.2, e pode-se observar que os resultados ficaram dentro do intervalo de 95-105%, indicando uma exatidão adequada.

O LD (Equação 1.48) e o LQ (Equação 1.50) foram calculados pelo método relação sinal-ruído. Os valores determinados foram considerados adequados para análise de formulação farmacêutica. O LD igual a 5,9 mg L<sup>-1</sup> para 2A1B permitiu a detecção deste em concentrações até 0,45% em relação à concentração de ETB. 2HCl.

**Tabela 4.2** Resultados estatísticos para linearidade, seletividade, repetitividade, recuperação, LD e LQ

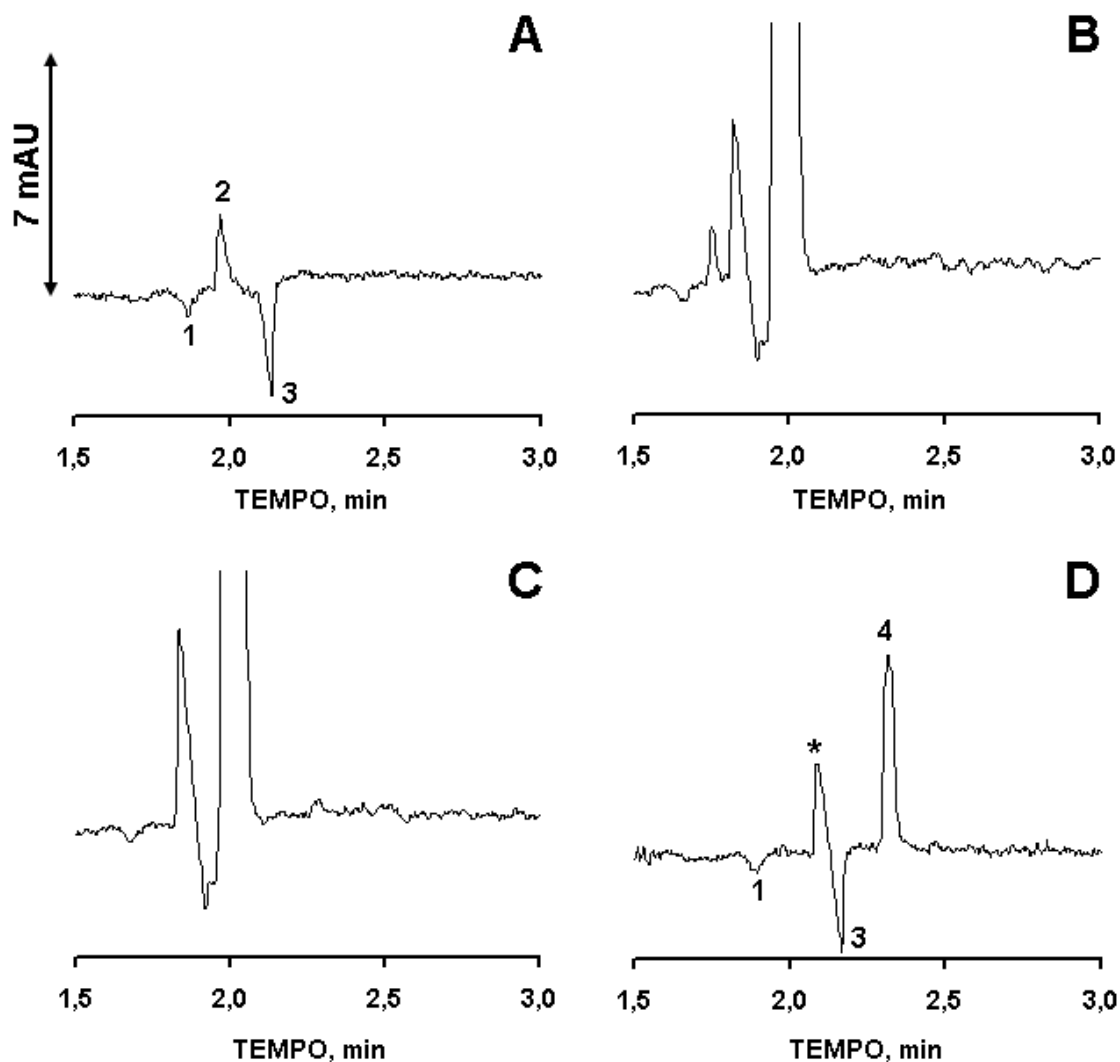
		Linearidade e Seletividade				Repetitividade (%CV)		%R	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
	Curva	Inclinação	Intercepto	R <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	Área	t <sub>m</sub>			
ETB	A	0,141 ± 0,002	- 0,197 ± 0,142	0,999	3,22	0,964	1,38	102	1,7	5,9
	B	0,141 ± 0,003	6,99 ± 0,24	0,998		2,13	3,67			
2A1B	A	0,0542 ± 0,0002	- 0,0348 ± 0,0187	0,999	3,28	0,366	1,55	99,9	5,9	19,6
	B	0,0543 ± 0,0008	- 0,0368 ± 0,0622	0,999		1,94	2,09			

A: curva de calibração externa (n=3); B: curva de adição de padrão (n=6); F<sub>0,05;3;10</sub> = 3,71.

#### 4.1.4 Análise de Formulação Farmacêutica

A quantificação foi realizada pelo método de adição de padrão para seis amostras genuínas. O teor de ETB.2HCl determinado foi  $390,8 \pm 1,2$  mg, para o valor declarado de 400 mg. No entanto, a presença de 2A1B em concentração igual ou superior a 0,45%, em relação à concentração de ETB. 2HCl, não foi detectada.

A Figura 4.4 mostra os eletroferogramas obtidos para padrão de 2A1B e para amostra farmacêutica contendo ETB.2HCl. Na amostra, é possível observar a presença de um pico devido ao efeito de matriz, que não interferiu na detecção dos analitos. Os picos 1 e 3 foram confirmados por simulação do eletrólito condutor utilizando o programa peakmaster 5.2 (STEDRY et al., 2003) e os picos 2 e 4 por adição padrão.



**Figura 4.4** Eletroferogramas: (A) padrão de 2A1B; (B) amostra fortificada com 2A1B; (C) amostra concentrada; (D) amostra diluída. Picos: (1)  $\text{Na}^+$ ; (2)  $\text{Cu2A1B}$ ; (3)  $\text{Cu}^{2+}$ ; (4)  $\text{CuETB}$ ; (\*) efeito de matriz. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +25 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; eletrólito: 60  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão de HAc/NaAc (pH 4,6) e 5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

#### 4.1.5 Considerações

O método otimizado apresentou como vantagens: eletrólito condutor simples e de baixo custo; curto tempo de análise (2,5 min); aumento significativo na sensibilidade em comparação com a metodologia por CE utilizando detecção UV (RAGONESE et al., 2002); e em comparação com HPLC, determinação simultânea

de ETB e sua impureza, utilização de coluna não-específica, ausência de solvente orgânico e reagente de pareamento iônico (JIANG et al., 2002). Este trabalho foi publicado em 2008: “FARIA, A.F.; DE SOUZA, M.V.N.; BRUNS, R.E.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; Optimization of an electrolyte system for analysis of ethambutol in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis using complexation with copper(II). **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 1202, n. 2, p. 224-228, aug. 2008.”

Em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. José Alberto Fracassi da Silva, da UNICAMP, foi desenvolvida uma nova metodologia para determinação de ETB e 2A1B por CE com detecção condutométrica. Este segundo trabalho foi publicado em 2010: “DA SILVA, J.A.F.; DE CASTRO, N.V.; DE JESUS, D.P.; FARIA, A.F.; DE SOUZA, M.V.N.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; Fast determination of ethambutol in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, Germany, v. 31, n. 3, p. 570-574, feb. 2010.”

## 4.2 METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA ALTERNATIVA PARA ANÁLISE DE ETAMBUTOL EM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Uma vez que, a espectrofotometria é uma das técnicas analíticas simples, versátil, robusta, de alta adesão e baixo custo, a implementação de um método alternativo para análise de ETB em matéria prima ou isoladamente em preparações farmacêuticas sinaliza positivamente. Dentro deste contexto, uma metodologia espectrofotométrica, alternativa aos métodos de separação, foi desenvolvida e otimizada para análise de ETB em formulação farmacêutica, através da complexação com Cu(II), conforme descrito no item 4.1.

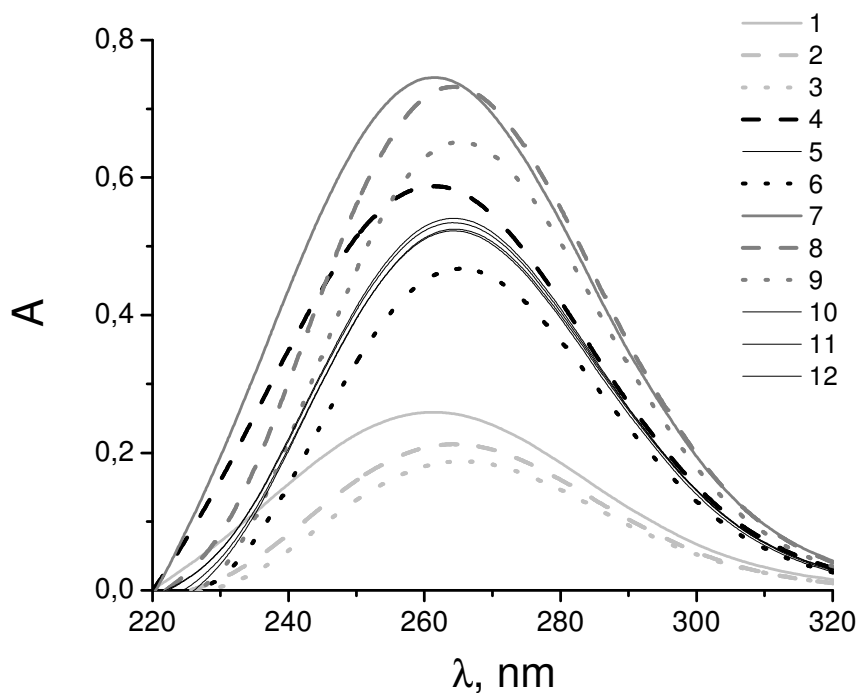
### 4.2.1 Otimização do Sinal de Absorbância

A fim de maximizar a sensibilidade do sinal analítico um planejamento fatorial  $3^2$  com quadruplicata no ponto central (NETO et al., 2007), utilizando como fatores concentração de tampão HAc/NaAc (pH 4,6) e concentração de  $\text{Cu}^{2+}$ , foi realizado. A Tabela 4.3 mostra a matriz de planejamento e as absorbâncias medidas. A Figura 4.5 apresenta os espectros eletrônicos para o planejamento fatorial  $3^2$ .

**Tabela 4.3** Matriz de planejamento  $3^2$  e as absorvâncias medidas

Experimento	$\text{Cu}^{2+}$	Tampão HAc/NaAc	Absorvância
1	-1	-1	0,259
2	-1	0	0,212
3	-1	+1	0,188
4	0	-1	0,588
5	0	0	0,523
6	0	+1	0,468
7	+1	-1	0,746
8	+1	0	0,732
9	+1	+1	0,652
10	0	0	0,541
11	0	0	0,535
12	0	0	0,525

$\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ ): (-1) 0,1; (0) 0,3; (+1) 0,5;  
 Tampão HAc/NaAc ( $\text{mmol L}^{-1}$ ): (-1) 5; (0) 32,5; (+1) 60.

**Figura 4.5** Espectros eletrônico do complexo CuETB para o planejamento fatorial  $3^2$ .



Analisando as absorvâncias dos 12 experimentos realizados (Tabela 4.3 e Figura 4.5) pode-se observar que o experimento 7, com tampão HAc/NaAc no nível (-1) e  $\text{Cu}^{2+}$  no nível (+1), foi o mais favorável para a formação do complexo CuETB. Portanto, a condição otimizada consistiu na diluição dos padrões em  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

Análise de regressão por superfície de resposta, para as absorvâncias obtidas do planejamento de fatorial  $3^2$ , foi realizada utilizando o modelo quadrático completo (Equação 1.41). Os estimadores dos parâmetros populacionais do modelo foram calculados pelo método dos mínimos quadrados através da Equação 1.36. As matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  usadas para determinação dos estimadores estão apresentadas a seguir:

$$\mathbf{X} = \begin{matrix} & \text{M} & X_1 & X_2 & X_1^2 & X_2^2 & X_{12} \\ \begin{matrix} + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \\ + \end{matrix} & \begin{matrix} -1 & -1 & +1 & +1 & -1 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & +1 & +1 & -1 \\ 0 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & +1 & 0 & 0 & 0 \\ +1 & +1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & 0 & +1 & 0 \\ +1 & +1 & +1 & +1 & +1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{matrix} & \begin{matrix} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \end{matrix} \end{matrix} \quad \mathbf{y} = \begin{matrix} A \\ 0,259 \\ 0,212 \\ 0,188 \\ 0,588 \\ 0,523 \\ 0,468 \\ 0,746 \\ 0,732 \\ 0,652 \\ 0,541 \\ 0,535 \\ 0,525 \end{matrix}$$

onde:  $X_1$  é o fator  $\text{Cu}^{2+}$ ;

$X_2$  é o fator Tampão HAc/NaAc;

$X_1^2$  é o parâmetro quadrático para o  $\text{Cu}^{2+}$ ;

$X_2^2$  é o parâmetro quadrático para o tampão HAc/NaAc;

$X_{12}$  é a interação  $\text{Cu}^{2+}$  com tampão HAc/NaAc.

Logo, os estimadores foram obtidos pelo produto das matrizes  $(\mathbf{X}^T\mathbf{X})^{-1}$  e  $\mathbf{X}^T\mathbf{y}$ :

$$(\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} = \begin{bmatrix} 0,208 & 0,000 & 0,000 & -0,125 & -0,125 & 0,000 \\ 0,000 & 0,167 & 0,000 & 0,000 & 0,000 & 0,000 \\ 0,000 & 0,000 & 0,167 & 0,000 & 0,000 & 0,000 \\ -0,125 & 0,000 & 0,000 & 0,375 & -0,125 & 0,000 \\ -0,125 & 0,000 & 0,000 & -0,125 & 0,375 & 0,000 \\ 0,000 & 0,000 & 0,000 & 0,000 & 0,000 & 0,250 \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{X}^T \mathbf{y} = \begin{bmatrix} 5,969 \\ 1,471 \\ -0,286 \\ 2,789 \\ 2,901 \\ -0,023 \end{bmatrix}$$

A Tabela 4.4 mostra os valores calculados para os coeficientes (estimadores dos parâmetros populacionais) e  $p$ -valores ( $p$ -valor é a probabilidade da hipótese nula). Usando um nível de significância de 5%, é considerado que um fator afeta a resposta se os coeficientes diferirem de zero e o  $p$ -valor for menor que 0,050 (RAGONESE et al., 2002).

**Tabela 4.4** Estimadores do modelo para absorvância

Termo	Coeficiente	Erro padrão	p-valor
Constante	0,532	± 0,004	0,000
[Cu <sup>2+</sup> ]	0,260	± 0,003	0,000
[HAc/NaAc]	-0,0475	± 0,003	0,001
[Cu <sup>2+</sup> ] x [Cu <sup>2+</sup> ]	-0,0629	± 0,005	0,001
[HAc/NaAc] x [HAc/NaAc]	-0,00690	± 0,005	0,277
[Cu <sup>2+</sup> ] x [HAc/NaAc]	-0,0223	± 0,004	0,268

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 mostram que apenas os termos [HAc/NaAc] x [HAc/NaAc] e [Cu<sup>2+</sup>] x [HAc/NaAc] não são significativos, ou seja, o parâmetro quadrático do tampão e a interação Cu<sup>2+</sup> com tampão não produzem alterações significativas no sinal de absorvância.

O ajuste do modelo foi avaliado através da análise de variância (ANOVA) e os resultados estão apresentados na Tabela 4.5.

**Tabela 4.5** Resultados da ANOVA para o ajuste do modelo linear nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de Variação	Soma Quadrática	v	Média Quadrática
Regressão	3,88 x 10 <sup>-1</sup>	5	7,75 x 10 <sup>-2</sup>
Resíduo	8,57 x 10 <sup>-4</sup>	6	1,43 x 10 <sup>-4</sup>
Falta de ajuste	6,41 x 10 <sup>-4</sup>	3	2,14 x 10 <sup>-4</sup>
Erro Puro	2,16 x 10 <sup>-4</sup>	3	7,20 x 10 <sup>-5</sup>
Total	3,89 x 10 <sup>-1</sup>	11	3,53 x 10 <sup>-2</sup>
% de variação explicada	99,8		
% máxima de variação explicável	99,9		
F <sub>calc</sub>	2,97		

Os resultados indicam que não há evidência de falta de ajuste no modelo, no intervalo de 95% de confiança, pois o valor  $F_{\text{calc}}$  foi igual a 2,97 menor que o  $F_{\text{tab}(0,05;3;3)}$ , 9,28. Assim, foi possível obter a superfície de resposta para o modelo (Figura 4.6). A análise do gráfico de superfície de resposta confirma que a melhor condição experimental para a formação do complexo CuETB é tampão HAc/NaAc (-1) e  $\text{Cu}^{2+}$  (+1).

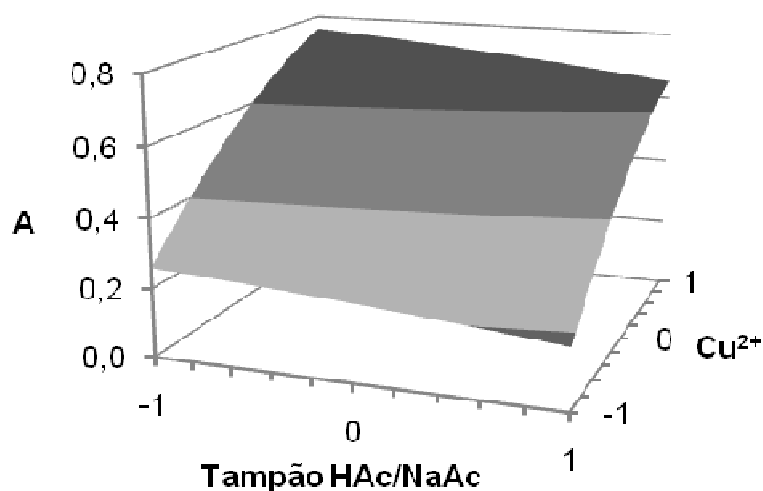
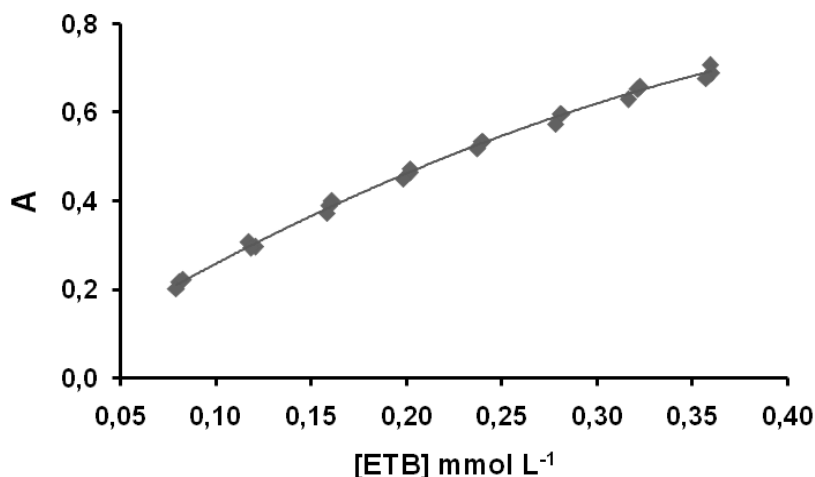


Figura 4.6 Superfície de resposta para o modelo ajustado.

#### 4.2.2 Análise de Formulação Farmacêutica

Após a otimização da metodologia, esta foi aplicada a análise de comprimidos contendo ETB.2HCl. A quantificação foi realizada por curva de calibração externa em oito níveis de concentração e em triplicata genuína (Figura 4.7). Um modelo polinomial foi ajustado usando o método dos mínimos quadrados (Equação 4.1):

$$\hat{y} = 0,009 (\pm 0,015) + 2,719 X (\pm 0,154) - 2,282 X^2 (\pm 0,346) \quad (4.1)$$



**Figura 4.7** Curva de calibração externa para a quantificação espectrofotométrica.

O ajuste do modelo polinomial foi avaliado usando o teste de hipóteses *a priori* (Equação 1.45). O valor do  $F_{\text{calc}}$  foi igual a 2,66, menor que 2,74, valor do  $F_{\text{tab}(6;16;0,05)}$ . Portanto, não há evidências de falta de ajuste para o modelo, no intervalo de 95% de confiança.

Após o ajuste do modelo, cinco amostras genuínas foram preparadas e analisadas pelo método espectrofotométrico e por CZE. Testes estatísticos como teste de normalidade (Shapiro-Wilk), homogeneidade das variâncias (Levene) e teste t para amostras independentes foram realizadas para verificar evidências de diferença significativa entre as metodologias (MONTGOMERY, 2005). A Tabela 4.6 mostra os resultados da determinação de ETB.2HCl em formulações farmacêuticas por espectrofotometria em comparação com o método por CZE descrito no item 4.1.

Analisando os resultados do teste de Shapiro-Wilk verificou-se que ambas as metodologias seguem uma distribuição normal, pois os  $p$ -valores foram iguais a 0,075 e 0,703 para espectrofotometria e CZE, respectivamente, ambos maiores que 0,05. Em seguida, foi realizado o teste de Levene que indicou que as variâncias das metodologias não são significativamente diferentes ( $p$ -valor: 0,203 > 0,050). Após a verificação da homogeneidade das variâncias selecionou-se o teste t não-pareado com variância agrupada. O resultado do teste t mostrou que não há evidências de diferença significativa entre as metodologias por espectrofotometria e por CZE, dentro do intervalo de 95% de confiança ( $p$ -valor: 0,095 > 0,050).

**Tabela 4.6** Análise estatística dos teores de ETB.2HCl determinados por CZE e por espectrofotometria

Réplicas genuínas	1	2	3	4	5	média	s
*Espectrofotometria (mg)	413,8	395,4	421,5	413,8	395,4	408,0	11,9
**CZE (mg)	392,8	382,7	397,6	404,9	400,1	395,6	8,4

s: desvio padrão;

Teor declarado: 400,0 mg;

Teste de normalidade (Shapiro-Wilk):  $p$ -valor: 0,075\*; 0,703\*\*;

Homogeneidade das variâncias:  $p$ -valor (Levene): 0,203;

Teste t para amostras independentes:  $p$ -valor: 0,095.

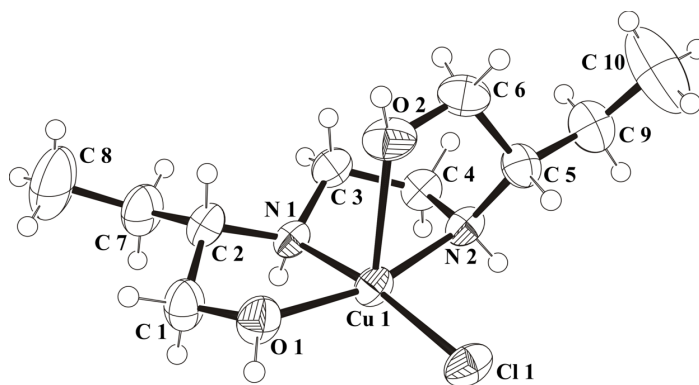
Para a determinação espectrofotométrica da amostra farmacêutica, a repetitividade foi de 2,92%, a porcentagem de recuperação ficou na faixa de 101 a 104%, o LD e o LQ foram calculados através do método sinal-ruído (Equações 1.48 e 1.50) e os valores determinados foram 0,6 e 1,9 mg L<sup>-1</sup> de ETB.2HCl, respectivamente.

#### 4.2.3 Considerações

O método espectrofotométrico otimizado mostrou-se mais simples e rápido que o desenvolvido por HASSAN & SHALABY. No método espectrofotométrico descrito na literatura (HASSAN & SHALABY, 1992), o processo de preparo da amostra é longo e árduo, envolvendo etapas como aquecimento, arrefecimento e filtração, antes de fazer a leitura de absorbância. Na quantificação de ETB.2HCl, o método espectrofotométrico otimizado forneceu resultados semelhantes aos obtidos por CZE.

Esse trabalho foi realizado com a colaboração das alunas de iniciação científica Luiza F. Marcellos e Juliana P. Vasconcelos. Também foi realizado um trabalho em paralelo pelo grupo de pesquisa da Prof.<sup>a</sup> Renata Diniz, desta instituição, que obteve a estrutura cristalina do complexo CuETB (Figura 4.8).

O manuscrito, envolvendo a otimização da metodologia analítica e a cristalização do complexo, está submetido ao **Journal of Brazilian Chemical Society**: “FARIA, A.F.; MARCELLOS, L.F.; VASCONCELOS, J.P.; DE SOUZA, M.V.N.; JÚNIOR, A.L.S.; DO CARMO, W.R.; DINIZ, R.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; Alternative UV spectrophotometry methodology for ethambutol analysis in pharmaceutical formulations.”



**Figura 4.8** Estrutura cristalina do complexo CuETB.

### 4.3 ANÁLISE SIMULTÂNEA DOS TUBERCULOSTÁTICOS DE PRIMEIRA ESCOLHA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS POR CZE SOB DETECÇÃO UV

A determinação simultânea de ETB, ISO, RIF e PIR utilizando detecção UV não foi reportada na literatura até o momento; provavelmente, devido à baixa absorvidade molar do ETB, que torna esta análise simultânea um grande desafio. Além disto, a associação destes quatro medicamentos em um único comprimido (4-DFC) é recomendada pela OMS (WHO, 2001; PANCHAGNULA et al., 2004) e foi recentemente disponibilizada para o tratamento da TB no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Portanto, o desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos simples, eficiente, robusto, de baixo custo, rápido e adequado para análise de rotina de controle de qualidade é necessário.

Dentro desse contexto, este trabalho propõe o desenvolvimento, otimização e validação de uma metodologia alternativa por CZE utilizando detecção direta em 262 nm para a determinação simultânea de ETB, ISO, RIF e PIR em diferentes formulações farmacêuticas.

#### 4.3.1 Otimização do Sistema de Eletrólito

Analisando a curva de mobilidade efetiva ( $\mu_{ef}$ ) (TAVARES, 1996) na Figura 4.9, pode-se verificar que ISO e RIF estão como espécies catiônicas na faixa de pH de 0 a 5,5 e o ETB de 0 a 8,0; enquanto que a PIR está neutra em quase todo o intervalo de pH. Inicialmente, uma análise por CE pode ser realizada por CZE, se os analitos estiverem ionizados, ou por MEKC, se os analitos forem espécies neutras. Por CZE, o problema seria a PIR devido ao seu comportamento neutro. Quanto ao modo de MEKC, uma alternativa seria a utilização de SDS como surfactante aniônico em pH próximo a 9,0 (ACEDO-VALENZUELA et al., 2002). O principal problema desta abordagem é a baixa absorvidade do ETB no UV, o que exigiria uma condição de contorno, como a adição de um cromóforo ao sistema de eletrólito para realização de detecção indireta ou uma reação de derivatização para formar um



aduto cromóforo. A Figura 4.10 mostra os espectros eletrônicos do ETB, ISO, RIF e PIR.

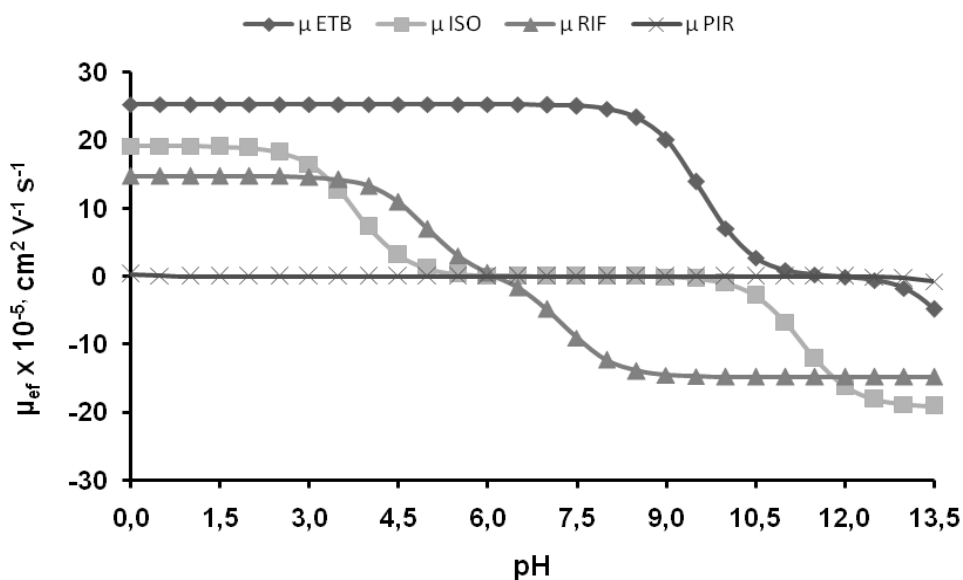


Figura 4.9 Curva de mobilidade efetiva para ETB, ISO, RIF e RIR.

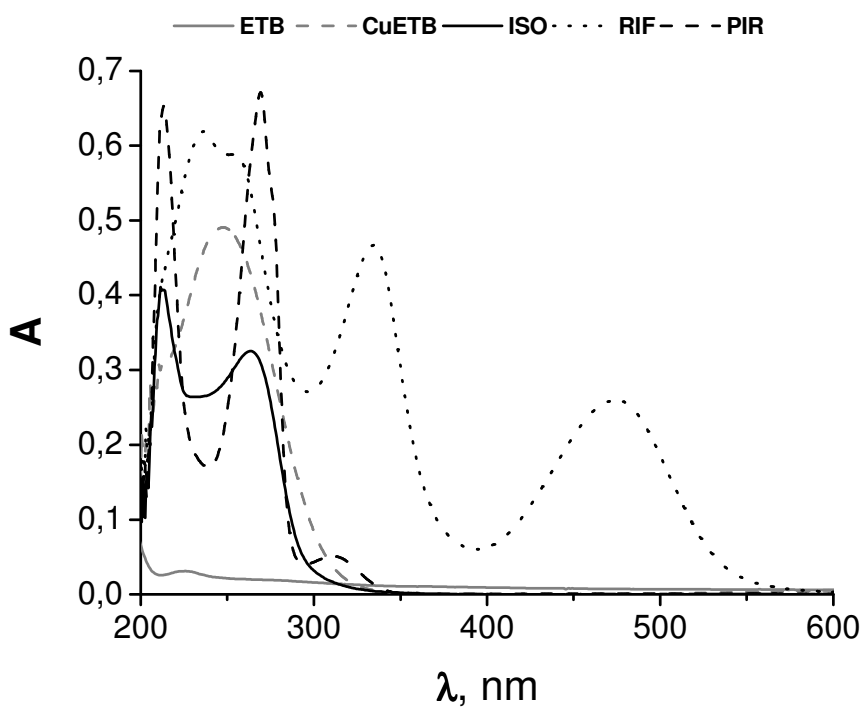


Figura 4.10 Espectros UV-vis de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de ETB, CuETB (com adição de  $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ ), ISO, RIF e PIR. Todas as soluções foram diluídas em  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução tampão HAc/NaAc.

Uma alternativa interessante seria adicionar  $\text{Cu}^{2+}$  ao sistema de eletrólito, como realizado para análise de ETB e sua impureza, para formar complexo com ETB. Entretanto, a análise simultânea dos quatro fármacos por CZE com detecção UV, só seria possível se o  $\text{Cu}^{2+}$  também interagisse com a PIR formando um composto carregado.

Tendo como base a discussão anterior, um planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  foi realizado para otimizar o sistema de eletrólito, a fim de obter a separação simultânea de ETB, ISO, RIF e PIR sob detecção UV. Os fatores selecionados foram Brij 35,  $\text{Cu}^{2+}$  e tampão HAc/NaAc. Brij 35 foi selecionado para verificar qual o nível de concentração seria capaz de impedir a decomposição da RIF. A RIF sofre hidrólise ácida formando 3-formilrifampicina, esta reação é duas vezes mais rápida na presença de ISO (SHISHOO et al., 1999). Além disto, 3-formilrifampicina reage com a ISO para formar isonicotinil hidrazona (SINGH et al., 2001), reação que é catalisada por ETB e PIR (BHUTANI et al., 2005). De acordo com JINDAL et al., 1994, o uso de tensoativos na preparação da solução de RIF aumenta a sua solubilidade em água e inibe sua decomposição. O íon  $\text{Cu}^{2+}$  foi usado como aditivo para formar aduto cromóforo com ETB e aduto catiônico com PIR, e o tampão HAc/NaAc foi usado para manter o pH entre 4,5 e 5,0 (JIANG et al., 2002), conforme devidamente justificado no item 4.1.

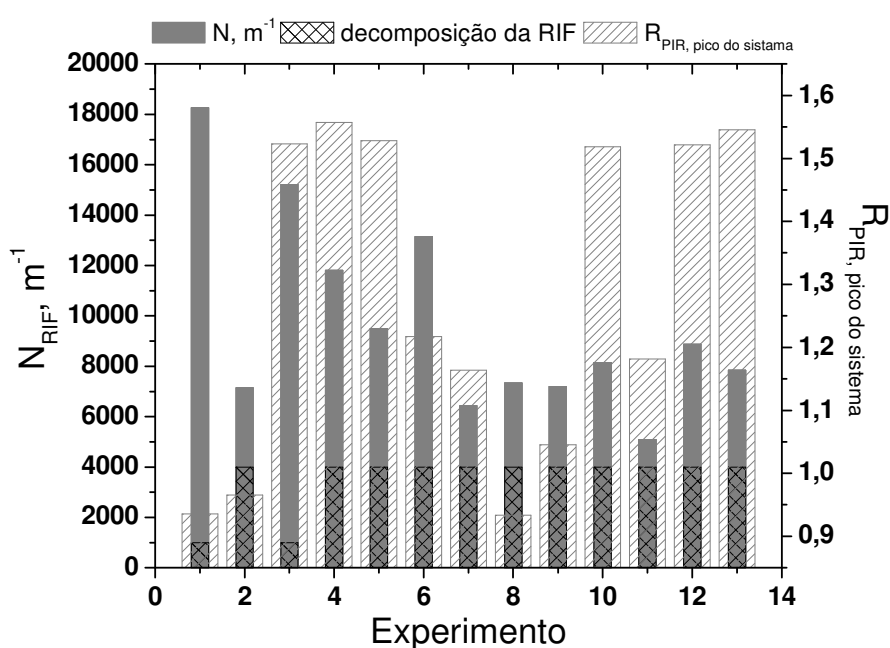
A Tabela 4.7 mostra a matriz de planejamento para um Box-Behnken  $3^3$ . Parâmetros instrumentais tais como tensão, temperatura no cartucho, comprimento de onda, tempo de injeção e comprimento capilar foram mantidos constantes. Mistura dos padrões para cada experimento foi diluída em solução aquosa contendo Brij 35 e  $\text{CuSO}_4$  nas concentrações descritas na Tabela 4.7.

A Figura 4.11 apresenta as respostas quantitativas ( $N_{\text{RIF}}$  e  $R_{\text{PIR,pico do sistema}}$ ) e qualitativas (ausência e presença de decomposição no pico da RIF) monitoradas para o planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$ :

**Tabela 4.7** Matriz de planejamento para um Box-Behnken 3<sup>3</sup>

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
HAc/NaAc	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	0	0	0	0	0
Cu <sup>2+</sup>	-1	-1	+1	+1	0	0	0	0	-1	+1	-1	+1	0
Brij 35	0	0	0	0	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	0

Tampão HAc/NaAc (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 50; (0) 60; (+1) 70; Cu<sup>2+</sup> (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 7,5; (0) 10; (+1) 12,5; Brij 35 (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 1,5; (0) 2,0; (+1) 2,5.

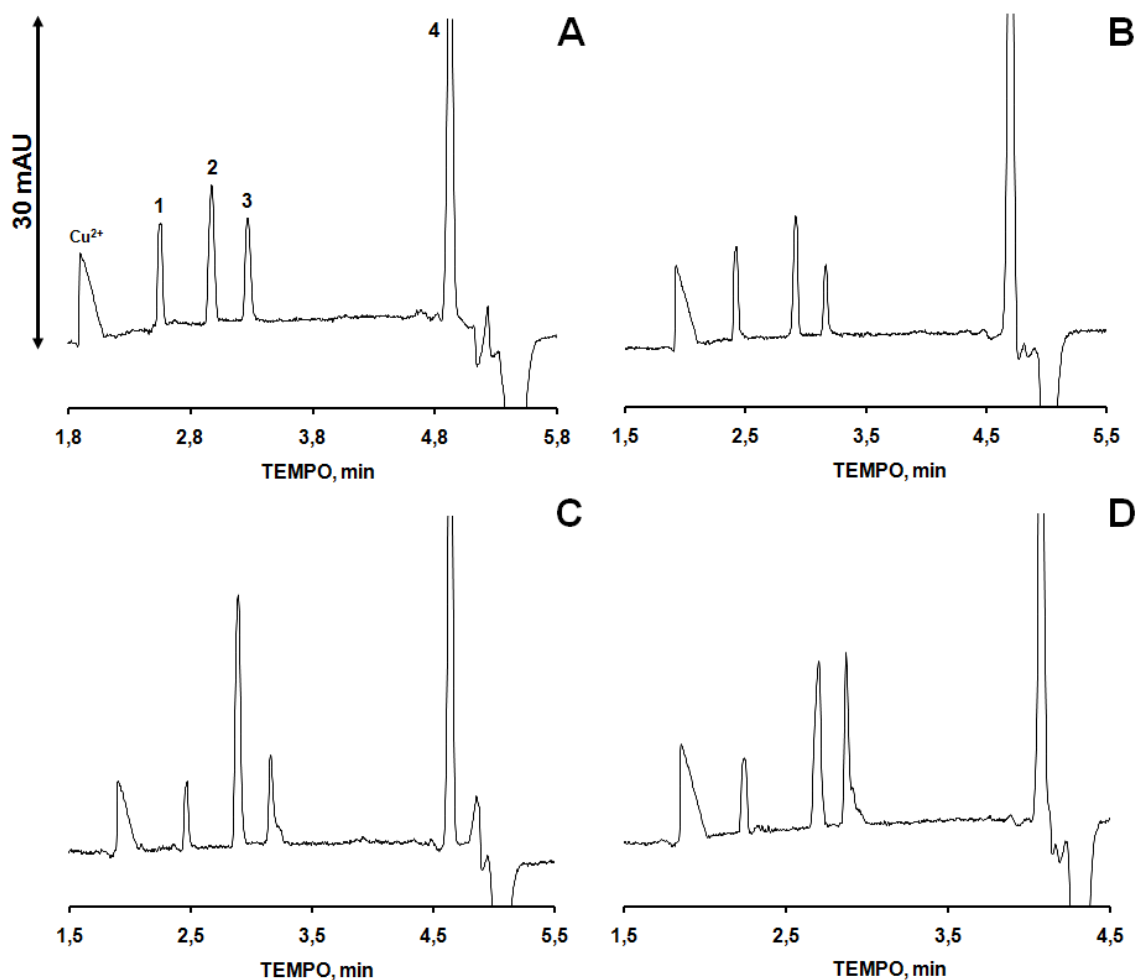


**Figura 4.11** Gráfico de número de pratos da RIF ( $N_{RIF}$ ), valor arbitrário de 4000 para ausência e 1000 para presença de decomposição no pico da RIF e  $R_{PIR, \text{pico do sistema}}$  versus experimento realizado para planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>.

Analisando os resultados apresentados na Figura 4.11, verificou-se que apenas o experimento 3 apresentou, simultaneamente, resolução maior que 1,50 para o par crítico ( $R_{PIR, \text{pico do sistema}}$ ), ausência de degradação da RIF e maior número de pratos para a RIF. Comparando o experimento 3 com 1, em que a concentração  $Cu^{2+}$  diminuiu de 12,5 mmol L<sup>-1</sup> para 7,5 mmol L<sup>-1</sup>, a co-migração da PIR com o EOF foi observada. Uma explicação para este comportamento é que no nível (-1) não há  $Cu^{2+}$  suficiente reagir com a PIR produzindo carga efetiva positiva capaz de deslocar a PIR do EOF. Além disso, comparando o experimento 3 com 4, observou-se que a

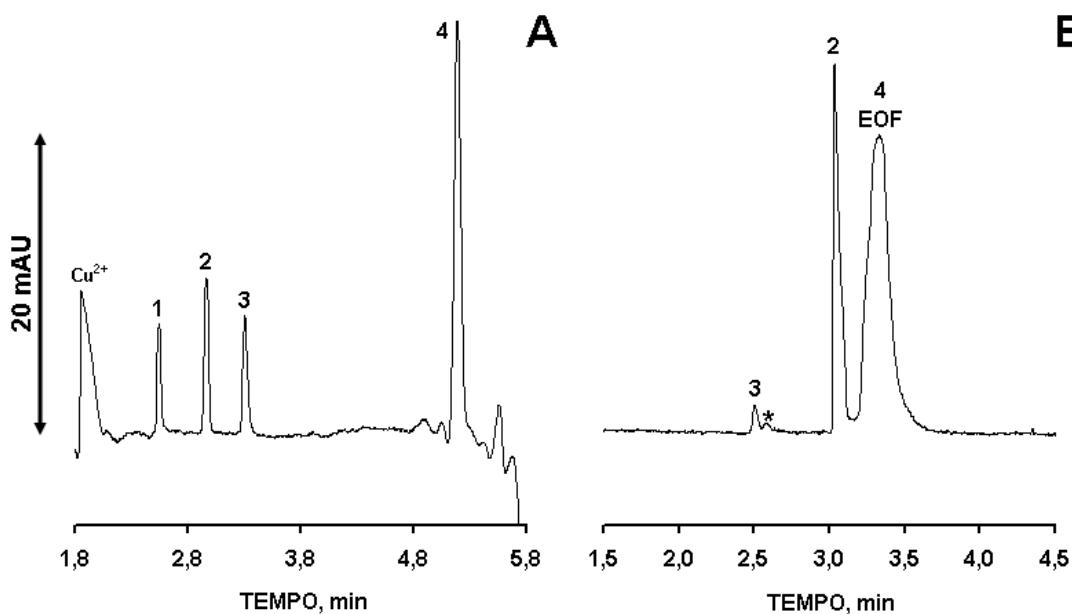
variação da concentração do tampão de 50 para 70 mmol L<sup>-1</sup> provocou deformação do pico da RIF. Esta deformação pode ser atribuída à ocorrência de degradação do composto no capilar, devido a efeito antagônico no nível (+1) de tampão. Finalmente, comparando o experimento 3 com 2, nos quais apenas a concentração de tensoativo foi mantida constante (0), a deformação do pico da RIF e co-migração da PIR com o EOF foram observados simultaneamente, quando a concentração do tampão variou do nível (+1) para (-1) e de Cu<sup>2+</sup> do nível (-1) para (+1). Assim, pode-se concluir que existe uma correlação entre a concentração do tampão e de Cu<sup>2+</sup>, para um nível de tensoativo, que delimita o desempenho da separação, no contexto de evitar a degradação da RIF e a co-migração da PIR com o EOF, simultaneamente. Portanto, o eletrólito constituído de 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão HAc/NaAc (pH 4,6) e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>, e o preparo das soluções de padrões em 2,0 mmol L<sup>-1</sup> de Brij 35 e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> foram otimizados.

A Figura 4.12 apresenta os quatro eletroferogramas considerados representativos para todo o conjunto experimental. A letra A representa o experimento 3, a letra B o experimento 1, a letra C o experimento 10 com perfil semelhante aos experimentos 4, 5, 12 e 13 e a letra D o experimento 9 com perfil semelhante aos experimentos 2, 6, 7, 8 e 11.



**Figura 4.12** Separação de mistura de padrões: (1) ETB, (2) ISO, (3) RIF e (4) PIR, diluída em solução aquosa  $\text{CuSO}_4$  e Brij 35 nas concentrações descritas na Tabela 4.7; solução estoque de RIF foi preparada em Brij 35 na concentração descrita na Tabela 4.7. Eletroferograma: (A) experimento 3; (B) experimento 1; (C) experimento 10 com perfil semelhante aos experimentos 4, 5, 12 e 13; (D) experimento 9 com perfil semelhante aos experimentos 2, 6, 7, 8 e 11. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +25 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; capilar: 75  $\mu\text{m}$  x 48,5 cm; eletrólito conforme descrito na Tabela 4.7.

Após a otimização da metodologia, um procedimento simples foi realizado para confirmar a interação dos analitos com  $\text{Cu}^{2+}$ . Foram realizados dois experimentos, por CE, o primeiro utilizando as condições otimizadas e o segundo utilizando às mesmas condições, exceto a adição de  $\text{Cu}^{2+}$ . Ao comparar os dois eletroferogramas na Figura 4.13, verificou-se que a RIF sofreu decomposição na ausência de  $\text{Cu}^{2+}$ , confirmando a interação Cu-RIF; e a PIR deslocou do pico do EOF, sugerindo a formação de um complexo catiônico com  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Figura 4.13** Separação de mistura de padrões (1) ETB, (2) ISO, (3) RIF, (4) PIR; (-) produto de degradação da RIF. Eletroferogramas: (A) nas condições otimizadas descritas na Figura 4.12, (B) nas mesmas condições experimentais, exceto adição de  $\text{Cu}^{2+}$  no eletrólito e na diluição dos padrões.

#### 4.3.2 Seleção do Padrão Interno

Após a otimização do sistema de eletrólito e do preparo dos padrões, verificou-se a necessidade do uso de um padrão interno. Foram realizados alguns experimentos e a sparfloxacina (SPFLX) foi selecionada em função de apresentar comportamento químico semelhante aos analitos de interesse. Realizou-se um estudo da voltagem aplicada, variando-a de +20 a +27 kV a fim de otimizar a resolução entre os picos ETB e do padrão interno. A Figura 4.14 apresenta os resultados de  $R_{\text{ETB,PI}}$  e tempo de migração do padrão interno ( $t_{\text{PI}}$ ). A voltagem de +22 kV foi selecionada, pois apresentou, simultaneamente,  $R_{\text{ETB,PI}}$  maior que 1,50 e menor tempo de análise.

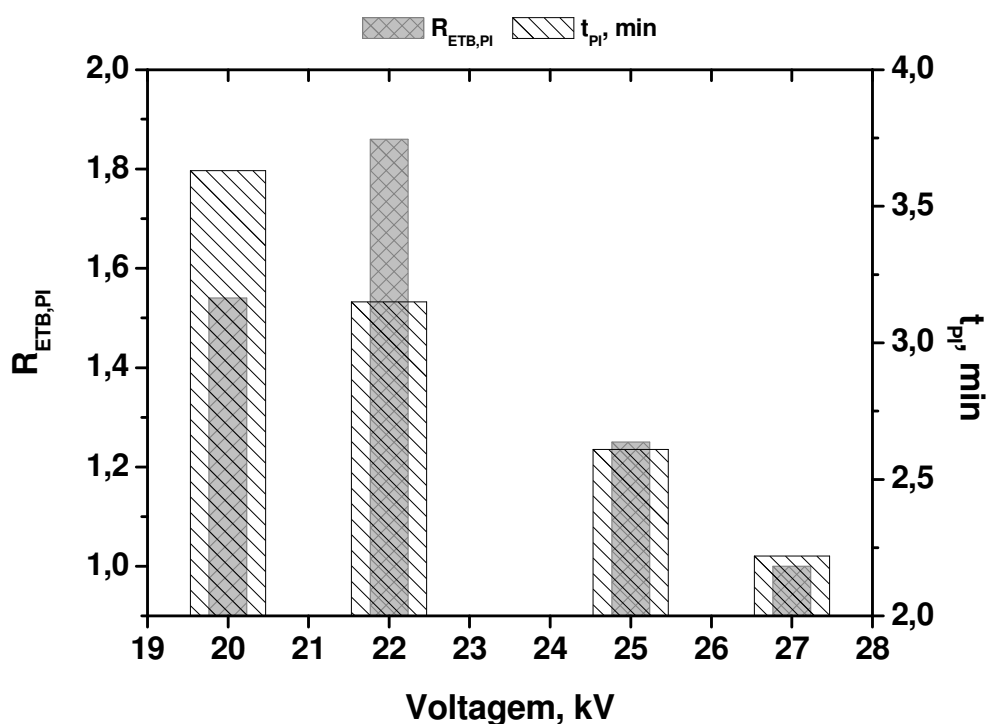
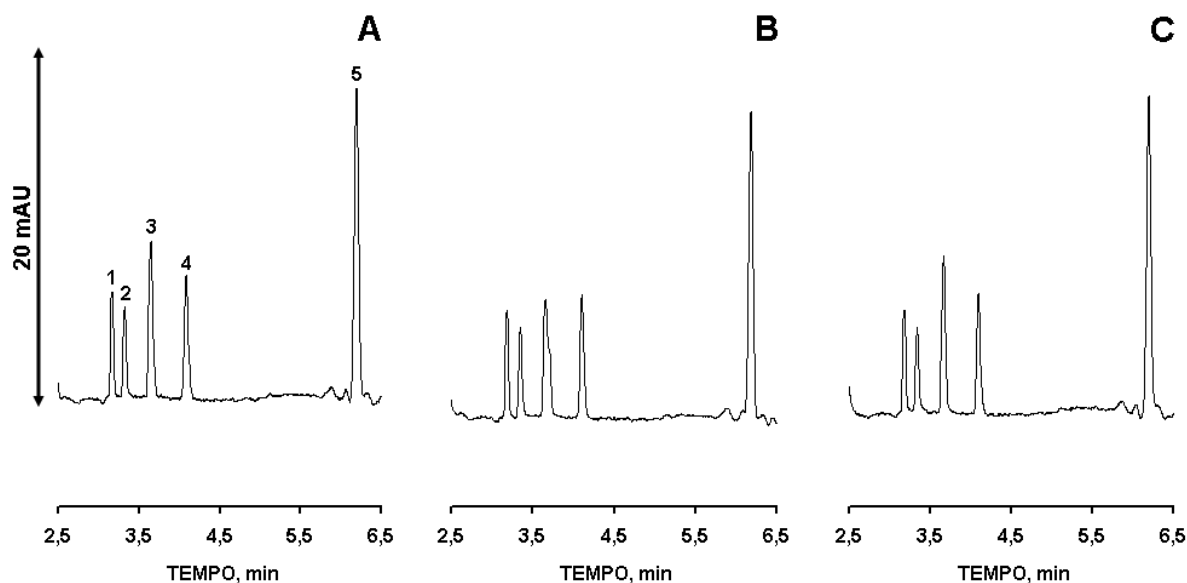


Figura 4.14 Gráfico de  $R_{ETB,PI}$  e  $T_{PI}$  versus tensão aplicada.

#### 4.3.3 Estudo da Estabilidade do Eletrólito e da Solução de RIF

Após otimização das condições experimentais, realizou-se um estudo para avaliar a estabilidade do sistema de eletrólito e da solução de RIF. Uma mistura de padrões contendo  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de ETB, ISO, RIF e PIR foi submetida a 40 injeções consecutivas utilizando o mesmo sistema de eletrólito. Em seguida, as soluções de eletrólito foram trocadas por soluções frescas e a mesma mistura de padrões foi submetida a mais 40 injeções consecutivas. Observou-se que a partir da 33ª corrida o pico da ISO apresentou sinais de deformação. Portanto, recomenda-se substituir o sistema de eletrólito a partir da 30ª injeção. Além disto, foi possível verificar que a solução aquosa de RIF, preparada em  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de Brij 35 e  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ , não sofreu decomposição durante 18 h de monitoramento. A Figura 4.15 mostra o eletroferograma da 1ª e da 33ª análise, com o mesmo eletrólito, e da 41ª análise, ou seja, da 1ª análise após a substituição do eletrólito.



**Figura 4.15** Separação de mistura de padrões (1) ETB, (2) SPFLX – PI, (3) ISO, (4) RIF, (5) PIR. Eletroferogramas: (A) 1ª corrida, (B) 33ª corrida, (C) 1ª corrida após substituição do eletrólito. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +22 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; capilar: 75  $\mu\text{m}$  x 48,5 cm; eletrólito: 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc e 12,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ .

#### 4.3.4 Validação

Após desenvolvimento e otimização da metodologia, alguns parâmetros de validação como linearidade, seletividade, precisão, exatidão, LD, LQ e robustez foram avaliados. Inicialmente, foi realizado estudo de conformidade do sistema.

##### 4.3.4.1 Conformidade do Sistema

A conformidade do sistema foi avaliada por dois parâmetros: resolução entre os pares de picos adjacentes e repetitividade em área e em tempo de migração. A resolução e repetitividade foram calculadas para 25 injeções consecutivas de mistura de padrões e os resultados estão apresentados na Tabela 4.8.



Todos os valores de %CV (Equação 1.46) para a razão área do padrão pela área do PI e para o tempo de migração dos padrões foram menores que 5,00%, e as resoluções para os pares de picos adjacentes foram maiores que 1,50. Portanto, o sistema está apto para realização dos procedimentos de validação.

**Tabela 4.8** Resultados do estudo de conformidade do sistema

Padrão	%CV		Resolução
	Área (Padrão/PI)	T <sub>mig</sub> (Padrão)	
ETB <sup>1</sup>	2,49	1,69	1,94 <sup>R<sub>1,2</sub></sup>
SPFLX (PI) <sup>2</sup>	-----	-----	2,60 <sup>R<sub>2,3</sub></sup>
ISO <sup>3</sup>	2,38	1,90	3,14 <sup>R<sub>3,4</sub></sup>
RIF <sup>4</sup>	3,59	2,14	13,9 <sup>R<sub>4,5</sub></sup>
PIR <sup>5</sup>	2,39	3,14	-----

n = 25.

#### 4.3.4.2 Parâmetros de Validação

A seletividade foi avaliada pelo método de adição de padrão. Os valores dos coeficientes angulares das curvas de calibração externa e de adição de padrão foram muito próximos para todos os analitos (Tabela 4.9), o que é um indicativo de que a seletividade é adequada.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Equação 1.43) e do teste de hipótese *a priori* (Equação 1.45) (Tabela 4.9). Todos os valores de  $R^2$  foram iguais ou superiores a 0,998, o que é um indicativo de um ajuste provavelmente adequado dos dados. Os valores de  $F_{\text{calc}}$ , obtidos a partir do teste de hipóteses *a priori*, foram iguais a 3,00, 2,96, 3,00 e 2,99 para ETB, ISO, RIF e PIR, respectivamente. Portanto, os valores de  $F_{\text{calc}}$  foram menores que o  $F_{\text{tab}(0,05;4;12)} = 3,26$ , não evidenciando falta de ajuste no intervalo de 95% de confiança. Com base nos resultados de  $R^2$  e  $F_{\text{calc}}$ , pode-se concluir que o método apresentou uma relação

linear entre razão da área do padrão pela área do PI e razão da concentração do padrão pela concentração do PI, dentro da faixa de aplicação estudada de 16 a 96 mg L<sup>-1</sup> para ETB, de 8 a 48 mg L<sup>-1</sup> para ISO, de 10 a 60 mg L<sup>-1</sup> para RIF e de 24 a 144 mg L<sup>-1</sup> para PIR.

A repetitividade (Equação 1.46) foi avaliada em área, através da razão da área do padrão pela área do PI, e em tempo de migração para as curvas de padronização externa e de adição de padrão. Os maiores valores de %CV estão apresentados na Tabela 4.9, sendo estes menores que 5% indicando boa precisão.

A exatidão foi determinada através da porcentagem de recuperação (%R) na faixa de aplicação para cada analito. A %R média está mostrada na Tabela 4.9, e pode-se observar que os resultados ficaram dentro do intervalo de 95-105%, indicando uma exatidão adequada.

O LD (Equação 1.48) e o LQ (Equação 1.50) foram calculados pelo método relação sinal-ruído. Os valores determinados (Tabela 4.9) foram considerados adequados para análise de formulação farmacêutica.

**Tabela 4.9** Resultados estatísticos para linearidade, seletividade, repetitividade, recuperação, LD e LQ

	Linearidade e Seletividade					Repetitividade (%CV)		%R	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
	Curva	Inclinação	Intercepto	R <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	Área	t <sub>m</sub>			
ETB	A	0,477 ± 0,009	- 0,0272 ± 0,0275	0,999	3,00	3,61	3,58	98,7	2,9	9,7
	B	0,476 ± 0,008	0,618 ± 0,014	0,999		2,53	1,56			
ISO	A	0,921 ± 0,019	- 0,0671 ± 0,0294	0,998	2,96	3,17	4,15	97,9	0,8	2,5
	B	0,922 ± 0,018	0,198 ± 0,017	0,998		2,10	1,70			
RIF	A	0,874 ± 0,007	- 0,0443 ± 0,0130	0,999	3,00	3,29	2,48	100	0,6	2,1
	B	0,865 ± 0,017	1,08 ± 0,02	0,998		1,77	1,96			
PIR	A	3,18 ± 0,05	-0,179 ± 0,210	0,999	2,99	3,87	4,93	98,4	1,4	4,8
	B	3,22 ± 0,05	8,80 ± 0,13	0,999		1,78	3,19			

A: curva de calibração externa (n=3); B: curva de adição de padrão (n=6); F<sub>0,05;4;12</sub> = 3,26.

Um planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  foi realizado a fim de avaliar a robustez do método em três pontos críticos: resolução entre PIR e pico do sistema, decomposição da RIF e resolução entre ETB e PI. Os fatores selecionados foram concentração de  $\text{Cu}^{2+}$ , concentração de Brij 35 e voltagem aplicada.

Tabela 4.10 apresenta a matriz de planejamento, onde os experimentos 13, 14 e 15 são replicas do ponto central, e os resultados.

**Tabela 4.10** Matriz de planejamento para o Box-Behnken  $3^3$  e resultados para avaliação da robustez

Experimento	Brij 35	$\text{Cu}^{2+}$	Voltagem	$R_{\text{ETB, PI}}$	$R_{\text{PIR, pico do sistema}}$	$N_{\text{RIF}} (\times 10^4), \text{m}^{-1}$
1	-1	-1	0	1,86	2,77	6,69
2	+1	-1	0	1,84	2,87	6,43
3	-1	+1	0	1,78	2,81	6,82
4	+1	+1	0	1,75	3,12	6,66
5	-1	0	-1	2,12	4,40	6,71
6	+1	0	-1	1,82	3,86	6,96
7	-1	0	+1	1,92	3,64	7,19
8	+1	0	+1	2,01	3,80	6,97
9	0	-1	-1	1,81	3,02	6,96
10	0	+1	-1	1,76	3,48	7,23
11	0	-1	+1	1,90	3,12	7,00
12	0	+1	+1	1,88	3,59	6,87
13	0	0	0	1,92	3,34	6,89
14	0	0	0	1,93	3,50	6,79
15	0	0	0	1,96	3,48	6,77

Brij 35 ( $\text{mmol L}^{-1}$ ): (-1) 1,8; (0) 2,0; (+1) 2,2;  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{mmol L}^{-1}$ ): (-1) 12,0; (0) 12,5; (+1) 13,0; Voltagem (kV): (-1) 21,5; (0) 22,0; (+1) 22,5.

Analisando os resultados na Tabela 4.10, verificou-se que pequenas variações na concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  e na voltagem aplicada não provocaram alterações significativas nas resoluções,  $R_{\text{PIR, pico do sistema}}$  e  $R_{\text{ETB, PI}}$ , pois em todos os

experimentos as resoluções foram maiores que 1,50. Além disto, não foi detectada decomposição da RIF nos 15 experimentos realizados, o que foi quantitativamente confirmado através da variação pouco significativa no  $N_{RIF}$ ,  $6,68 (\pm 0,21) \times 10^4 \text{ m}^{-1}$ . Portanto, a decomposição da RIF não ocorreu com pequenas variações na concentração de Brij 35 e  $\text{Cu}^{2+}$ .

Análise de regressão por superfície de resposta para as respostas monitoradas ( $R_{PIR, \text{pico do sistema}}$ ,  $R_{ETB,PI}$  e  $N_{RIF}$ ) foram realizadas usando o modelo quadrático completo (Equação 1.41). Os estimadores dos parâmetros populacionais do modelo foram calculados pelo método dos mínimos quadrados através da Equação 1.36. As matrizes **X** e **y** usadas para determinação dos estimadores para  $R_{ETB,PI}$  estão apresentadas abaixo, matrizes similares foram utilizadas para determinar os estimadores para  $R_{PIR, \text{pico do sistema}}$  e  $N_{RIF}$ .

$$\mathbf{X} = \begin{matrix} & \text{M} & X_1 & X_2 & X_3 & X_1^2 & X_2^2 & X_3^2 & X_{12} & X_{13} & X_{23} \\ \begin{matrix} +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \\ +1 \end{matrix} & \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 & +1 & +1 & 0 & +1 & 0 & 0 \\ +1 & +1 & -1 & 0 & +1 & +1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & +1 & +1 & 0 & +1 & +1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ +1 & +1 & +1 & 0 & +1 & +1 & 0 & +1 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & -1 & +1 & 0 & +1 & 0 & +1 & 0 \\ +1 & +1 & 0 & -1 & +1 & 0 & +1 & 0 & -1 & 0 \\ -1 & -1 & 0 & +1 & +1 & 0 & +1 & 0 & -1 & 0 \\ +1 & +1 & 0 & +1 & +1 & 0 & +1 & 0 & +1 & 0 \\ 0 & -1 & -1 & 0 & +1 & +1 & 0 & 0 & 0 & +1 \\ 0 & +1 & -1 & 0 & +1 & +1 & 0 & 0 & 0 & -1 \\ -1 & +1 & -1 & +1 & 0 & +1 & +1 & 0 & 0 & -1 \\ +1 & 0 & +1 & +1 & 0 & +1 & +1 & 0 & 0 & +1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \end{matrix} \quad \mathbf{y} = \begin{matrix} R_{ETB,PI} \\ \begin{bmatrix} 1,86 \\ 1,84 \\ 1,78 \\ 1,75 \\ 2,12 \\ 1,82 \\ 1,92 \\ 2,01 \\ 1,81 \\ 1,76 \\ 1,90 \\ 1,88 \\ 1,92 \\ 1,93 \\ 1,96 \end{bmatrix} \end{matrix}$$

onde:  $X_1$  é o fator Brij 35;

$X_2$  é o fator  $\text{Cu}^{2+}$ ;

$X_3$  é o fator voltagem;

$X_1^2$  é o parâmetro quadrático para o Brij 35;

$X_2^2$  é o parâmetro quadrático para o  $\text{Cu}^{2+}$ ;

$X_3^2$  é o parâmetro quadrático para a voltagem;

$X_{12}$  é a interação Brij 35 com  $\text{Cu}^{2+}$ ;

$X_{13}$  é a interação Brij 35 com voltagem;

$X_{23}$  é a interação  $\text{Cu}^{2+}$  com voltagem.

A Tabela 4.11 mostra os valores calculados para os coeficientes e  $p$ -valores para os três modelos ajustados. Usando um nível de significância de 5%, é considerado que um fator afeta a resposta se os coeficientes diferirem de zero e o  $p$ -valor for menor que 0,050 (RAGONESE et al., 2002).

Os resultados apresentados na Tabela 4.11 mostram que apenas os termos: constante ( $b_0$ ), [Brij 35],  $[\text{Cu}^{2+}] \times [\text{Cu}^{2+}]$  e [Brij 35] x Voltagem; constante ( $b_0$ ),  $[\text{Cu}^{2+}]$ ,  $[\text{Cu}^{2+}] \times [\text{Cu}^{2+}]$  e Voltagem x Voltagem; constante ( $b_0$ ) e Voltagem x Voltagem são significativos para  $R_{\text{ETB,PI}}$ ,  $R_{\text{PIR,pico do sistema}}$  e  $N_{\text{RIF}}$ , respectivamente. Sendo assim, todos os fatores afetam os resultados da  $R_{\text{ETB,PI}}$ . Entretanto, para a  $R_{\text{PIR,pico do sistema}}$  apenas a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  e a voltagem contribuem significativamente e para o  $N_{\text{RIF}}$  apenas a variação na voltagem foi relevante.

O ajuste dos modelos foi avaliado através de análise de variância (ANOVA) e os resultados estão apresentados na Tabela 4.12.

**Tabela 4.11** Estimadores dos modelos para  $R_{ETB,PI}$ ,  $R_{PIR,pico}$  do sistema e  $N_{RIF}$

Termo	$R_{ETB,PI}$			$R_{PIR,pico}$ do sistema			$N_{RIF}$		
	Coeficiente	Erro padrão	<i>p</i> -valor	Coeficiente	Erro padrão	<i>p</i> -valor	Coeficiente	Erro padrão	<i>p</i> -valor
Constante	1,94	$\pm 1,20 \times 10^{-2}$	$3,90 \times 10^{-5}$	3,44	$\pm 5,03 \times 10^{-2}$	$2,14 \times 10^{-4}$	$6,82 \times 10^4$	$\pm 3,72 \times 10^2$	$3,00 \times 10^{-5}$
[Brij 35]	$- 3,25 \times 10^{-2}$	$\pm 7,36 \times 10^{-2}$	$4,76 \times 10^{-2}$	$3,75 \times 10^{-3}$	$\pm 3,08 \times 10^{-2}$	$9,14 \times 10^{-1}$	$- 4,94 \times 10^2$	$\pm 2,28 \times 10^2$	$1,65 \times 10^{-1}$
[Cu <sup>2+</sup> ]	$- 3,00 \times 10^{-2}$	$\pm 7,36 \times 10^{-2}$	$5,52 \times 10^{-2}$	$1,53 \times 10^{-1}$	$\pm 3,08 \times 10^{-2}$	$3,85 \times 10^{-2}$	$6,33 \times 10^2$	$\pm 2,28 \times 10^2$	$1,11 \times 10^{-1}$
Volt.	$2,50 \times 10^{-2}$	$\pm 7,36 \times 10^{-2}$	$7,68 \times 10^{-2}$	$- 7,62 \times 10^{-2}$	$\pm 3,08 \times 10^{-2}$	$1,32 \times 10^{-1}$	$2,25 \times 10^2$	$\pm 2,28 \times 10^2$	$4,49 \times 10^{-1}$
[Brij 35] x [Brij 35]	$4,17 \times 10^{-4}$	$\pm 1,08 \times 10^{-2}$	$9,73 \times 10^{-1}$	$3,75 \times 10^{-2}$	$\pm 4,54 \times 10^{-2}$	$4,95 \times 10^{-1}$	$- 1,11 \times 10^3$	$\pm 3,35 \times 10^2$	$7,87 \times 10^{-2}$
[Cu <sup>2+</sup> ] x [Cu <sup>2+</sup> ]	$- 1,30 \times 10^{-1}$	$\pm 1,08 \times 10^{-1}$	$6,92 \times 10^{-3}$	$- 5,85 \times 10^{-1}$	$\pm 4,54 \times 10^{-2}$	$5,96 \times 10^{-3}$	$- 5,39 \times 10^2$	$\pm 3,35 \times 10^2$	$2,44 \times 10^{-1}$
Volt. x Volt.	$3,04 \times 10^{-2}$	$\pm 1,08 \times 10^{-2}$	$1,07 \times 10^{-1}$	$4,48 \times 10^{-1}$	$\pm 4,54 \times 10^{-2}$	$1,01 \times 10^{-2}$	$2,51 \times 10^3$	$\pm 3,35 \times 10^2$	$1,71 \times 10^{-2}$
[Brij 35] x [Cu <sup>2+</sup> ]	$- 2,50 \times 10^{-3}$	$\pm 1,04 \times 10^{-2}$	$8,33 \times 10^{-1}$	$5,25 \times 10^{-2}$	$\pm 4,36 \times 10^{-2}$	$3,52 \times 10^{-1}$	$2,37 \times 10^2$	$\pm 3,22 \times 10^2$	$5,18 \times 10^{-1}$
[Brij 35] x Volt.	$9,75 \times 10^{-2}$	$\pm 1,04 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-2}$	$1,75 \times 10^{-1}$	$\pm 4,36 \times 10^{-2}$	$5,86 \times 10^{-2}$	$-1,16 \times 10^2$	$\pm 3,22 \times 10^2$	$6,74 \times 10^{-2}$
[Cu <sup>2+</sup> ] x Volt.	$7,50 \times 10^{-3}$	$\pm 1,04 \times 10^{-2}$	$5,46 \times 10^{-1}$	$2,50 \times 10^{-3}$	$\pm 4,36 \times 10^{-2}$	$9,59 \times 10^{-1}$	$- 9,95 \times 10^2$	$\pm 3,22 \times 10^2$	$8,97 \times 10^{-2}$

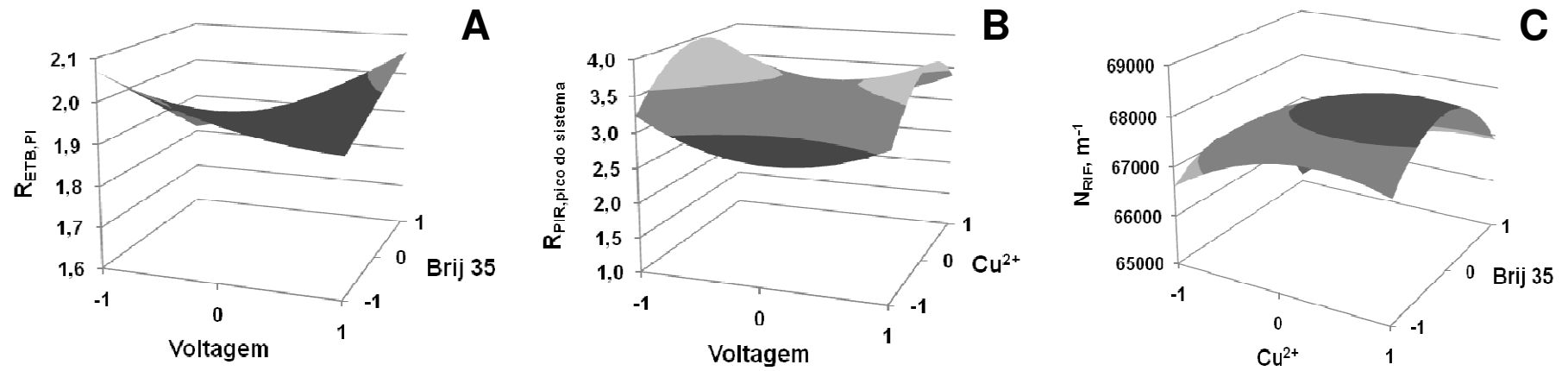
Volt.: voltagem.

**Tabela 4.12** Resultados da ANOVA para o ajuste dos modelos lineares nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados

Fonte de Variação	R <sub>ETB,PI</sub>			R <sub>PIR,pico do sistema</sub>			N <sub>RIF</sub>		
	SQ	v	MQ	SQ	v	MQ	SQ	v	MQ
Regressão	$1,26 \times 10^{-1}$	9	$1,40 \times 10^{-2}$	2,53	9	$2,81 \times 10^{-1}$	$4,62 \times 10^7$	9	$5,14 \times 10^6$
Resíduo	$1,14 \times 10^{-2}$	5	$2,29 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-1}$	5	$5,54 \times 10^{-2}$	$1,22 \times 10^7$	5	$2,44 \times 10^6$
Falta de ajuste	$1,06 \times 10^{-2}$	3	$3,52 \times 10^{-3}$	$2,62 \times 10^{-1}$	3	$8,73 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^7$	3	$3,78 \times 10^6$
Erro Puro	$8,67 \times 10^{-4}$	2	$4,33 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-2}$	2	$7,62 \times 10^{-3}$	$8,30 \times 10^5$	2	$4,15 \times 10^5$
Total	$1,39 \times 10^{-1}$	14	$9,90 \times 10^{-3}$	2,82	14	$2,01 \times 10^{-1}$	$5,84 \times 10^7$	14	$4,17 \times 10^6$
F <sub>calc</sub>	8,1			11,5			9,1		



Os modelos de regressão ajustados não apresentam falta de ajuste no nível de confiança de 95%, uma vez que, os valores de  $F_{\text{calc}}$  obtidos pela ANOVA para  $R_{\text{ETB,PI}}$ ,  $R_{\text{PIR,pico do sistema}}$  e  $N_{\text{RIF}}$  foram iguais a 8,1, 11,5 e 9,1, respectivamente, menores que o valor  $F_{\text{tab}(0,05; 3;2)}$ , 19,3. Assim, foi possível obter três superfícies de resposta para cada modelo, a superfície considerada mais significativa, para cada modelo, está representada na Figura 4.16. A análise dos gráficos de superfície de resposta confirma que pequenas variações nas concentrações de Brij 35, de  $\text{Cu}^{2+}$  e na voltagem não provocaram alterações significativas nas respostas monitoradas. Portanto, o método possui robustez nos intervalos investigados.



**Figura 4.16** Superfície de resposta obtida para: (A)  $R_{ETB,PI}$ , (B)  $R_{PIR,pico do sistema}$  e (C)  $N_{RIF}$ , mantendo constante no nível (0) os fatores  $Cu^{2+}$ , Brij 35 e voltagem, respectivamente.

## 4.3.5 Quantificação

Foram realizadas análises de quatro medicamentos: 4-DFC, ainda em fase de teste, não disponível para consumo; 2-DFC: associação comercial contendo ISO e RIF; medicamentos comerciais contendo ETB ou PIR, isoladamente. Os teores quantificados foram comparados com os teores declarados pelos fabricantes através do teste t (Equação 4.2), no nível de 95% de confiança. Resultados da determinação dos teores dos princípios ativos ETB, ISO, RIF e PIR nas amostras analisadas estão apresentados na Tabela 4.13.

$$t_{\text{calc}} = \frac{|\bar{X} - \mu_0|}{s} \sqrt{n} \quad (4.2)$$

onde:  $\bar{X}$  é a média experimental;

$\mu_0$  é o valor declarado;

$s$  é o desvio padrão;

$n$  é o número de medidas.

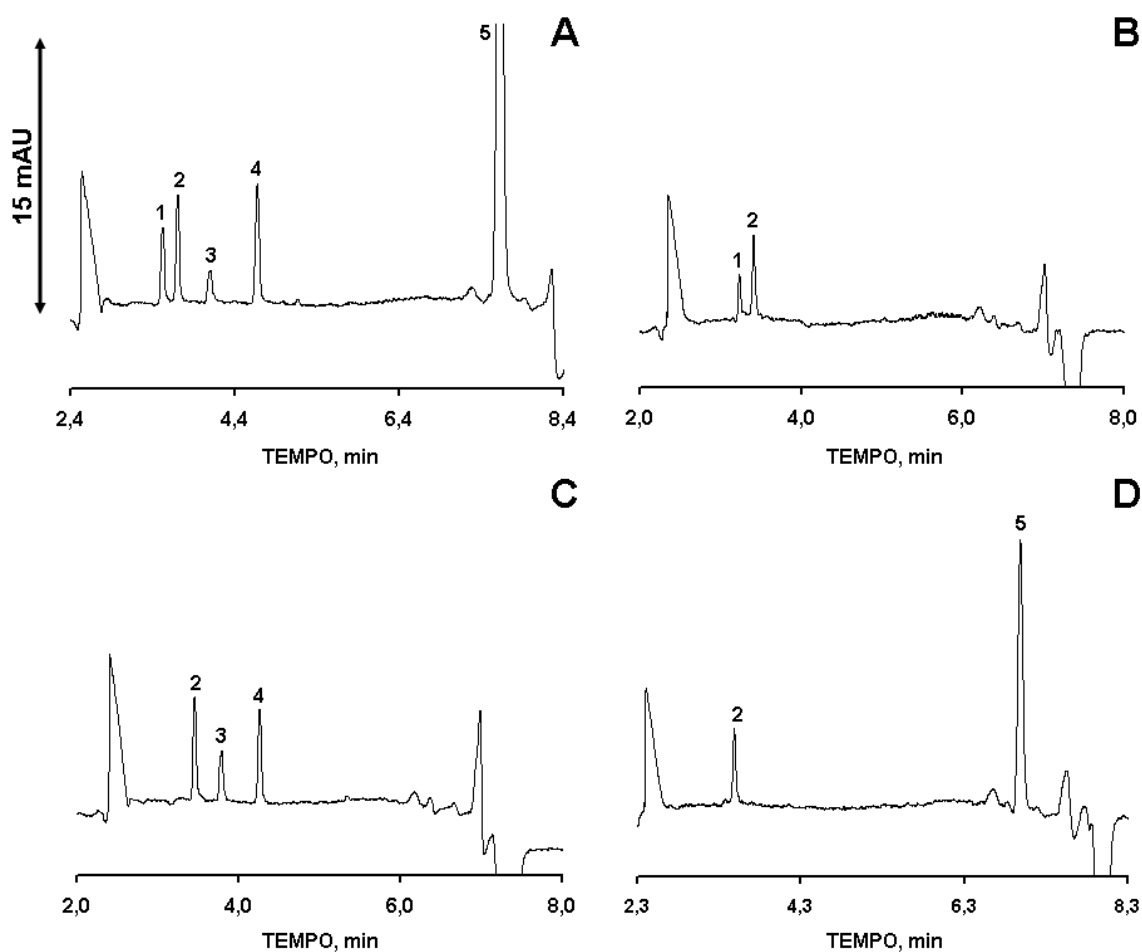
**Tabela 4.13** Resultados da determinação dos teores dos princípios ativos ETB, ISO, RIF e PIR, em diferentes formulações farmacêuticas

Fármaco	Fabricante	Teor declarado (mg)	Teor encontrado (mg)	$t_{\text{calc}}$
ETB	A <sup>a</sup>	825	628,2 ± 4,5	106,4
	B <sup>b</sup>	400	400,4 ± 1,8	0,4347
ISO	A	225	145,0 ± 0,9	219,6
	C <sup>b</sup>	100	99,1 ± 2,4	0,7404
RIF	A	450	579,4 ± 5,2	61,01
	C	150	152,2 ± 2,7	1,667
PIR	A	1200	1300 ± 14	17,50
	D <sup>b</sup>	500	500,1 ± 1,5	0,1283

<sup>a</sup>n = 6; <sup>b</sup>n = 4;  $t_{0,05; 3} = 2,353$ ;  $t_{0,05; 5} = 2,015$ ; A: 4-DFC; B: ETB; C: 2-DFC; D: PIR.

Analisando os resultados na Tabela 4.13 verificou-se que a amostra 4-DFC apresentou teores com elevada discrepância dos teores declarados, o que pode ser justificado pelo fato de ser uma amostra teste, e a existência de problemas associados à qualidade das DFC é conhecida (BHUTANI et al., 2005; SHISHOO et al., 1999; SINGH et al., 2001). Esta justificativa pode ser confirmada pelos valores de %R obtidos para a amostra 4-DFC, que ficou no intervalo de 95,1 a 103%, portanto, dentro da faixa recomendada de  $100 \pm 5\%$ . E pelo fato, da quantificação das demais amostras, já disponíveis no comércio, terem obtidos teores próximos aos declarados. Os valores de  $t_{\text{calc}}$  para as amostras 2-DFC, ETB e PIR foram menores que  $t_{\text{tab}}$ , ou seja, não há evidências de diferenças significativas entre estes teores.

A Figura 4.17 apresenta os eletroferogramas das amostras analisadas.



**Figura 4.17** Eletroferogramas das amostras analisadas: (A) 4-DFC, (B) ETB, (C) 2-DFC, (D) PIR, onde (1) ETB, (2) PI, (3) ISO, (4) RIF, (5) PIR. Condições experimentais: injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; voltagem: +22 kV; temperatura no cartucho: 25°C; detecção UV direta em 262 nm; capilar: 75  $\mu\text{m}$  x 48,5 cm; eletrólito: 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão HAc/NaAc e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>.

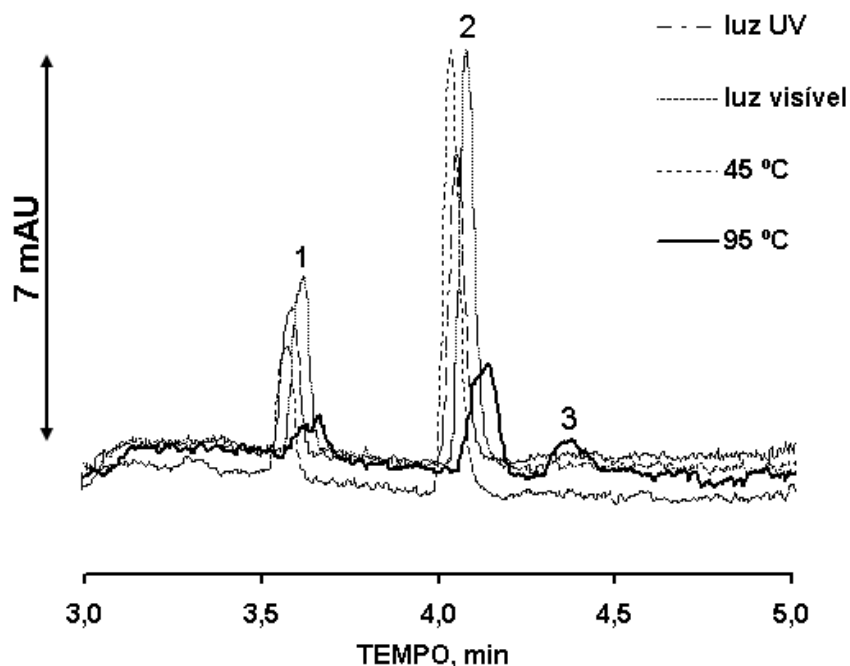
#### 4.3.6 Detecção de Produtos de Degradação

A fim de verificar se o método é capaz de detectar a decomposição nas formulações comerciais contendo ISO e RIF, a formulação 2-DFC foi submetida a quatro condições (SHISHOO et al., 1999):

- (I) Exposição à luz visível por 43 h;
- (II) Exposição à luz UV por 1 h;
- (III) Aquecimento até 45 °C;
- (IV) Aquecimento até 95 °C.

Não foi verificada nenhuma alteração no perfil dos eletroferogramas nos casos I, II e III. Entretanto, com a temperatura de 95 °C observou-se diminuição intensa no sinal da ISO e da RIF, e formação de pico de baixa intensidade próximo a RIF, provavelmente do seu produto de degradação (Figura 4.18).

Portanto, foi possível verificar uma boa estabilidade da associação frente a situações que podem ocorrer durante armazenamento e transporte do fármaco. Apenas na situação extrema, 95 °C, a decomposição dos princípios ativos ocorreu. Também, foi possível verificar a capacidade do método em detectar a ocorrência do processo de decomposição.



**Figura 4.18** Electroferograma da amostra 2-DFC: (1) ISO, (2) RIF e (3) produto de degradação, diluída em  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de Brij 35 e  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Condições experimentais: eletrólito:  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc e  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ ; voltagem: +22 kV; temperatura no cartucho:  $25^\circ\text{C}$ ; detecção UV direta em 262 nm; capilar:  $75 \mu\text{m} \times 48,5 \text{ cm}$ ; injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5s; para a amostra (IV) injeção hidrodinâmica: 30 mbar.10 s.

#### 4.3.7 Estudo de Caracterização dos Complexos

Um estudo por EPR foi realizado a fim de confirmar a ligação dos fármacos ETB, ISO, RIF e PIR com  $\text{Cu(II)}$ . Neste caso, as mesmas condições otimizadas para CE foram utilizadas no preparo dos padrões. A Figura 4.19 mostra os espectros de EPR obtidos das soluções dos analitos diluídas na proporção 2:1 v/v em etanol, congeladas em nitrogênio a 77K, ilustrando sinais em torno de 3100 G, com algumas linhas detectáveis.

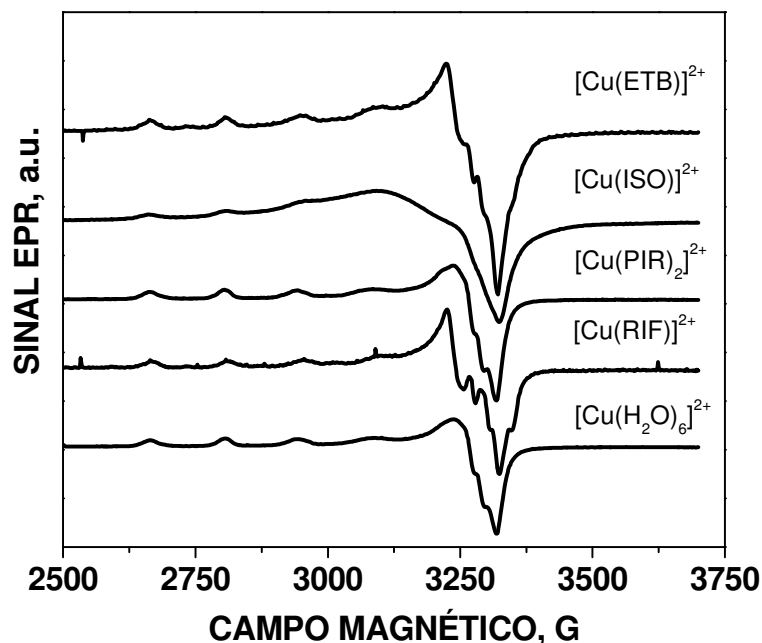


Figura 4.19 Espectros de EPR dos complexos dos analitos com Cu(II) e do íon  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ .

Os valores dos parâmetros paramagnéticos (Tabela 4.14) confirmaram que todos os fármacos formam complexos. E que estes apresentaram simetria tetragonal com o elétron desemparelhado no orbital  $d_{x^2-y^2}$ , indicado pelo sinal de EPR com  $g_{\parallel} > g_{\perp}$ , com quatro ligantes fortemente ligados na posição equatorial e nenhum, um ou dois ligantes fracamente ligados na posição axial. Além disto, os desdobramentos hiperfinos paralelos,  $A_{\parallel}$ , observados para estes complexos de Cu(II) tetragonal estão na faixa de  $150 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  e os desdobramentos hiperfinos perpendiculares,  $A_{\perp}$ , em torno de  $20 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ , semelhante ao efeito de Jahn-Teller para o íon  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  (SOLOMON et al., 1996).

Outra diferença notável nesses espectros foi observada no sinal  $g_{\perp}$  na série de complexos com os ligantes ETB, ISO, RIF e PIR. Todos apresentavam quantidades diferentes de estrutura multipletto superhiperfino devido a átomos de  $^{14}\text{N}$  em torno do íon metálico, próximo de 3300G, indicando uma forte coordenação destes ligantes com Cu(II) em um campo ligante aproximadamente tetragonal (ALVES et al., 2001). De fato, a análise de raios-X para  $\{[\text{Cu}(\text{PIR})_2(\text{ClO}_4)_2]_n\}$ , revelou que os íons de cobre deste complexo estão hexa-coordenado e ligados entre si através do ligante PIR para formar uma estrutura molecular bidimensional polimérica infinita (SEKISAKI, 1973) corroborando com os dados de EPR. Além disto, a ISO

parece ter formado um complexo de geometria quadrática plana com o cobre (HANSON et al., 1981).

**Tabela 4.14** Resultados de EPR para os complexos de Cu(II) com os fármacos

Complexo	g <sub>//</sub>	A <sub>//</sub>		g <sub>⊥</sub>	A <sub>⊥</sub>	
		G	10 <sup>-4</sup> cm <sup>-1</sup>		G	10 <sup>-4</sup> cm <sup>-1</sup>
[Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup>	2,361	140,0	154,3	2,075	20,60	19,96
[Cu(ETB)] <sup>2+</sup>	2,356	143,2	157,5	2,090	24,40	23,81
[Cu(ISO)] <sup>2+</sup>	2,354	144,3	158,6	2,100	26,5	25,98
[Cu(PIR) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	2,361	138,9	153,1	2,076	20,40	19,77
[Cu(RIF)] <sup>2+</sup>	2,352	142,1	156,0	2,091	25,00	24,41

$$A \text{ (cm}^{-1}\text{)} = g\beta A(G) = 0,46686 \times 10^{-4} g A(G).$$

No entanto, para o ligante RIF nenhuma informação sobre a sua estrutura geométrica com Cu(II) foi encontrada na literatura. Contudo, a determinação das constantes de estabilidade pelo método pH-métrico para complexos de RIF com Cu(II) em soluções de metanol/água em diferentes temperaturas, foi descrito por SHEHATTA et al., 2001. A formação do complexo RIF-Cu<sup>2+</sup> é espontânea, mais favorável a temperaturas mais baixas com um valor de  $\Delta G$  negativo, provavelmente devido ao ganho de uma estabilização extra devido à distorção tetragonal de sua simetria octaédrica. Uma inspeção nas curvas de titulação indicou que o processo de complexação ocorre com a liberação de íons de hidrogênio. O número de íons Cu(II) por ligante foi de 1:1 e 1:2 (metal: ligante) em mistura 50% (v/v) MeOH:H<sub>2</sub>O, 0,0500 mol L<sup>-1</sup> de KCl, e em diferentes temperaturas (com log K<sub>1</sub> = 8,94, log K<sub>2</sub> = 6,60 em 303,15 K).

Cabe ressaltar que o estudo de caracterização dos complexos por EPR foi realizado no Instituto de Química da USP pela Prof.<sup>a</sup> Ana M. da Costa Ferreira e pelo Prof. Wendel A. Alves (UFABC).



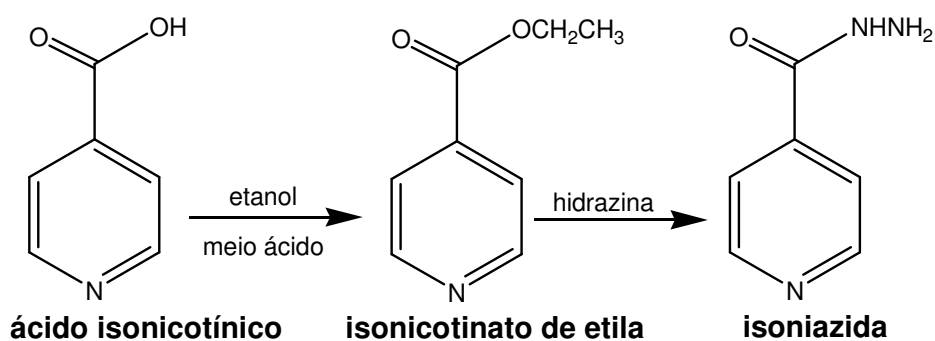
#### 4.3.8 Considerações

O método desenvolvido, otimizado e validado apresentou vantagens, frente às metodologias descritas na literatura, tais como: capacidade de análise simultânea dos quatro fármacos usando detecção UV; sistema de eletrólito simples e de baixo custo; preparo das amostras sem passos de derivatização; curto tempo de análise; capacidade de ser utilizado em análises de rotina de formulações farmacêuticas.

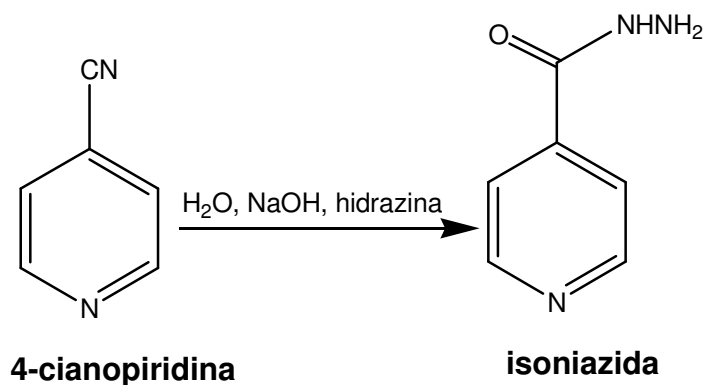
Esse trabalho foi publicado em 2010: "FARIA, A.F.; DE SOUZA, M.V.N.; BRUNS, R.E.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs by capillary zone electrophoresis using direct UV detection. **Talanta**, England, v. 82, n. 1, p. 333-339, jun. 2010."

#### 4.4 ANÁLISE SIMULTÂNEA DE ISO, SUAS IMPUREZAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO CZE

A síntese industrial da ISO pode ser realizada por dois mecanismos diferentes. Um utiliza como material de partida o ácido isonicotínico (AIN), que é esterificado e reage com a hidrazina para formar ISO (KLEEMANN et al., 2001) (Esquema 1 na Figura 4.20). No outro, o fármaco é obtido em apenas uma etapa com a reação entre 4-cianopiridina (CPD) e hidrazina em meio básico (SITTIG, 1988) (Esquema 2 na Figura 4.20). Portanto, AIN, isonicotinato de etila (INE) e CPD são as potenciais impurezas que podem interferir na qualidade final do medicamento.



Esquema 1

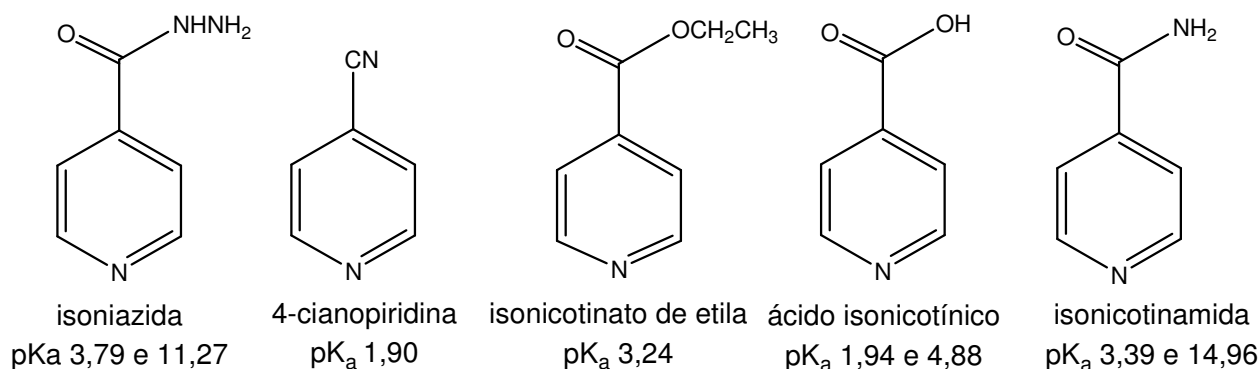


Esquema 2

**Figura 4.20** Esquema 1: Esquema reacional da fabricação industrial da ISO a partir do AIN; Esquema 2: Esquema reacional de fabricação industrial da ISO a partir da CPD.

Para monitoramento da qualidade do fármaco é necessário também verificar se há ocorrência de degradação do seu princípio ativo. BHUTANI et al., 2007, realizaram um estudo sobre o comportamento da ISO sob diferentes condições reacionais, e verificaram que o AIN foi formado por hidrólise (HCl, H<sub>2</sub>O e NaOH) e sob degradação fotolítica. A isonicotinamida (IND) foi formada em água sob ausência de luz e com degradação oxidativa.

Com o intuito de auxiliar nos procedimentos para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas, foi otimizada uma metodologia alternativa por CZE com detecção UV para análise simultânea de ISO, suas impurezas de síntese e produtos de degradação (Figura 4.21).



**Figura 4.21** Estrutura química da ISO, suas principais impurezas e produtos de degradação.

#### 4.4.1 Seleção do Comprimento de Onda

A Figura 4.22 mostra os espectros eletrônicos de 10 mg L<sup>-1</sup> de ISO, INE, IND, CPD e AIN em meio aquoso usados para selecionar o comprimento de onda de absorção adequado para análise simultânea destes compostos. O comprimento de onda selecionado foi 270 nm, pois forneceu uma absorbância razoável para todos os compostos simultaneamente.

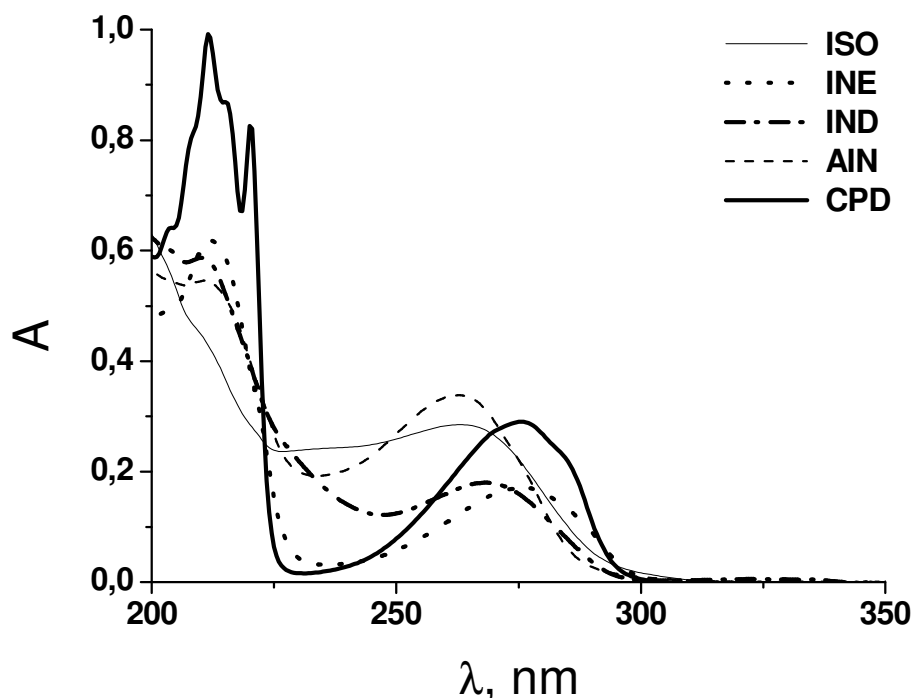


Figura 4.22 Espectros UV de solução aquosa  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de ISO, INE, IND, CPD e AIN.

#### 4.4.2 Otimização do Sistema de Eletrólito

Analisando a curva de  $\mu_{\text{ef}}$  (TAVARES, 1996) na Figura 4.23, pode-se verificar que a separação de todos os analitos é teoricamente possível em pH menor que 2,0. No entanto, esta possibilidade é no mínimo questionável, pois os analitos em questão terão que migrar apenas em função da  $\mu_{\text{ep}}$ , sob um EOF tendendo a zero, o que pode acarretar em tempo de análise relativamente longo.

Outra possibilidade seria a MEKC, utilizando SDS como tensoativo aniônico em pH em torno de 9,0 sob um EOF normal. Contudo, este tipo de abordagem considera a interação dinâmica entre os analitos neutros (ISO, IND, INE e CPD) e a cavidade hidrofóbica da micela, o que pode resultar ou não na migração diferenciada destes compostos em um intervalo de migração compreendido entre o soluto não retido e o soluto retido todo o tempo na cavidade micelar.

Uma terceira possibilidade seria o uso de CZE através da reação dos analitos com íon metálico a fim de formar adutos catiônicos. A reação de complexação da ISO com Cu(II) tem sido comprovada em estudos realizados nos últimos dois anos (FLIEGER et al., 2009; KRIZA et al. 2009; KRIZA et al. 2010-a; KRIZA et al. 2010-b;

ZHANG et al, 2010). Uma vez que, EIN, IND e CPD apresentam estruturas químicas similares a da ISO, provavelmente, a reação de complexação destes compostos com Cu(II) também ocorrerá. Logo, a hipótese de formação de aduto catiônico para EIN, IND e CPD é motivadora, pois sob um fluxo EOF, as  $\mu_{ep}$  e  $\mu_{eo}$  se somam resultando em maior eficiência e tempo de análise mais curto.

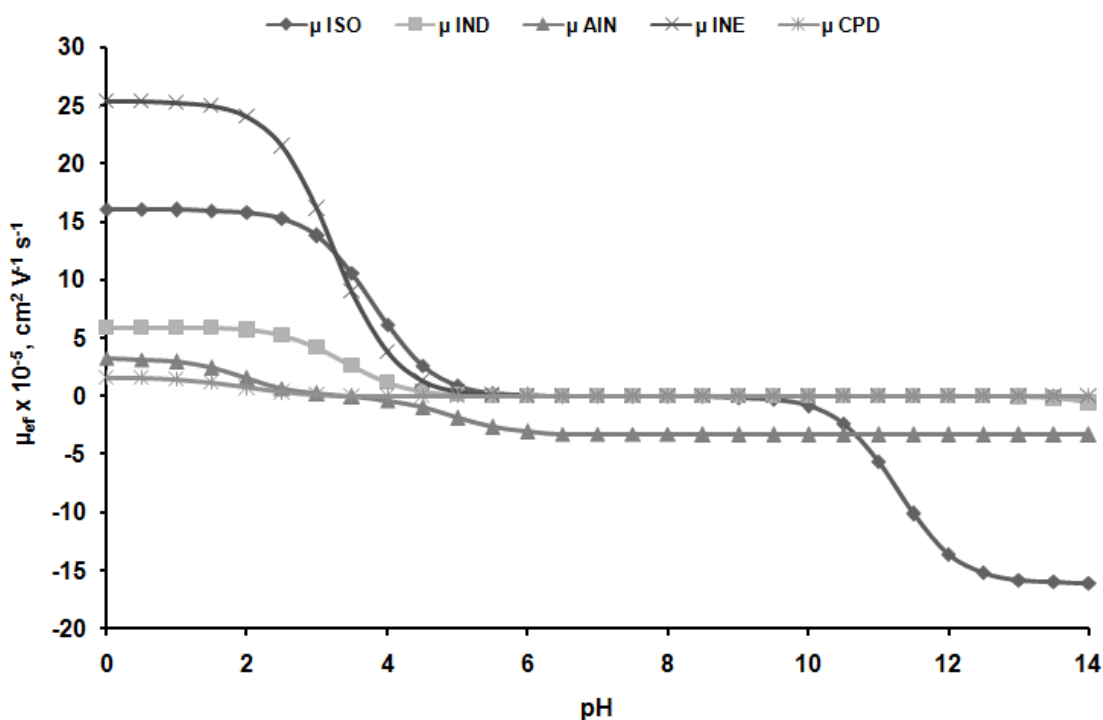


Figura 4.23 Curva de mobilidade efetiva para ISO, IND, AIN, INE e CPD.

Baseando na discussão anterior, optou-se em realizar um planejamento de experimentos Box-Behnken  $3^3$  para verificar se os analitos neutros formam adutos catiônicos com diferentes  $\mu_{obs}$ , permitindo assim a análise simultânea de ISO, IND, AIN, INE e CPD. Os fatores selecionados foram Brij 35,  $\text{Cu}^{2+}$  e voltagem. Brij 35 foi selecionado para investigar o comportamento da ISO na presença de suas impurezas e produtos de degradação, uma vez que é suscetível de sofrer hidrólise (DE SOUZA et al., 2008);  $\text{Cu}^{2+}$  foi usado para verificar se ocorre a formação de aduto catiônico; voltagem foi avaliada para obter, simultaneamente, resoluções satisfatórias ( $\geq 1,50$ ) e curto tempo de análise.

A Tabela 4.15 mostra a matriz de planejamento para o Box-Behnken  $3^3$  com triplicata no ponto central e as resoluções dos dois pares críticos ( $R_{INE, IND}$  e  $R_{CPD, pico}$

do sistema). Parâmetros instrumentais tais como voltagem, temperatura no cartucho, comprimento de onda, tempo de injeção e dimensões do capilar foram mantidos constantes. As misturas de padrões, para cada experimento, foram diluídas em solução aquosa contendo Brij 35 e  $\text{CuSO}_4$  nas concentrações descritas na Tabela 4.15.

**Tabela 4.15** Matriz de planejamento para o 3<sup>3</sup> Box-Behnken e as resoluções monitoradas

Experimento	Brij 35	Cu <sup>2+</sup>	Voltagem	R <sub>INE,IND</sub>	R <sub>CPD,pico do sistema</sub>
1	-1	-1	0	0,50	0,70
2	+1	-1	0	0,50	0,50
3	-1	+1	0	1,16	1,34
4	+1	+1	0	1,54	1,65
5	-1	0	-1	1,00	1,10
6	+1	0	-1	1,02	1,01
7	-1	0	+1	0,95	1,10
8	+1	0	+1	1,62	1,01
9	0	-1	-1	0,25	0,25
10	0	+1	-1	1,58	1,59
11	0	-1	+1	0,95	0,80
12	0	+1	+1	1,28	1,24
13	0	0	0	1,18	0,99
14	0	0	0	1,15	1,04
15	0	0	0	1,14	0,97

Brij 35 (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 0; (0) 1,00; (+1) 2,00; Cu<sup>2+</sup> (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 0; (0) 6,25; (+1) 12,5;  
 Voltagem (kV): (-1) 20; (0) 22; (+1) 24.

A Figura 4.24 apresenta os quatro eletroferogramas considerados representativos para todo o conjunto experimental. A letra A representa o experimento 2, com perfil semelhante aos experimentos 1, 9 e 11, a letra B representa o experimento 4, a letra C representa o experimento 6, com perfil semelhante aos experimentos 3, 5, 7, 8, 12 e 13 e a letra D representa o experimento 10. O perfil eletroforético apresentado na letra A representa os experimentos que foram realizados sem a adição de Cu<sup>2+</sup> no preparo das soluções

de eletrólitos e padrões, nos quais foi observada co-migração parcial da ISO com IND, INE e CPD.

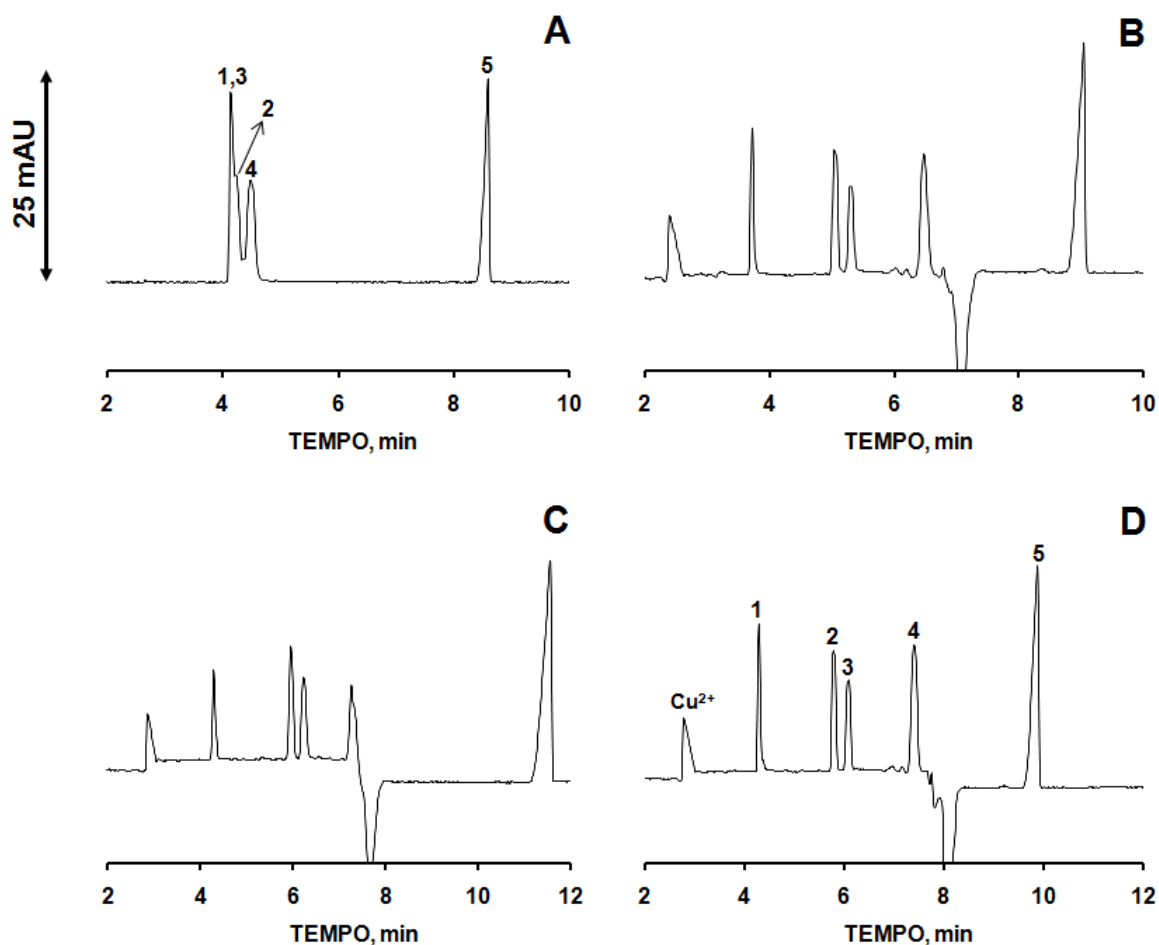
Comparando os experimentos 9 e 10, onde os níveis de Brij 35 (0) e voltagem (-1) foram mantidos, a variação no nível de  $\text{Cu}^{2+}$  de (-1) para (+1) permitiu um aumento significativo nas resoluções de ambos os pares críticos. Logo, foi possível verificar que os analitos neutros em pH 4,6 formam complexos com Cu(II) e migram com mobilidades diferentes, propiciando a separação completa dos analitos.

Analisando os experimentos 5, 6, 7 e 8, nos quais a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  foi mantida no nível (0), verifica-se a ocorrência de um efeito sinérgico com aumento da concentração de Brij 35 e da voltagem para  $R_{\text{INE,IND}}$ . Entretanto, este efeito não foi verificado para  $R_{\text{CPD,pico do sist}}$ , pois a formação do aduto catiônico (CuCPD) é favorecida em nível alto de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Comparando os experimentos 11 e 12, em que a concentração de Brij 35 (0) e a voltagem (+1) foram mantidas constantes, e os níveis de  $\text{Cu}^{2+}$  foram (-1) e (+1), respectivamente, verificou-se que não é necessário apenas manter a concentração de  $\text{Cu}^{2+}$  no nível (+1) para alcançar resolução maior que 1,50. Os fatores Brij 35 e voltagem também afetam nas resoluções dos pares críticos. Este comportamento pode ser confirmado através da análise dos experimentos 3 e 4, onde os níveis de  $\text{Cu}^{2+}$  (+1) e voltagem (0) foram mantidos constantes e a variação na concentração de Brij 35 do nível (-1) para (+1) propiciou a obtenção da resolução desejada.

Portanto, resolução superior a 1,50 para os dois pares críticos ( $R_{\text{INE,IND}}$  e  $R_{\text{CPD,pico do sistema}}$ ) foi alcançada nos experimentos 4 e 10.





**Figura 4.24** Separação de mistura de padrões (1) ISO, (2) INE, (3) IND, (4) CPD e (5) AIN, diluída em solução aquosa contendo  $\text{CuSO}_4$  e Brij 35 nas concentrações descritas na Tabela 4.15. Eletroferogramas: (A) experimento 2, com perfil semelhante aos experimentos 1, 9 e 11; (B) experimento 4; (C) experimento 6, com perfil semelhante aos experimentos 3, 5, 7, 8, 12 e 13; (D) experimento 10. Condições experimentais: eletrólito:  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc e  $\text{CuSO}_4$  na concentração descrita na Tabela 4.15; injeção hidrodinâmica: 30 mbar.5 s; detecção direta em 270 nm; capilar:  $75 \mu\text{m} \times 48,5 \text{ cm}$ ; voltagem: descrita na Tabela 4.15.

#### 4.4.3 Análise por Superfície de Resposta

Análise de regressão por superfície de resposta para as  $R_{\text{INE,IND}}$  e  $R_{\text{CPD,pico}}$  do sistema foram realizadas usando o modelo quadrático completo (Equação 1.41). Os estimadores dos parâmetros populacionais do modelo foram calculados pelo método dos mínimos quadrados através da Equação 1.36. As matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{y}$  usadas para



resposta se os coeficientes diferirem de zero significativamente e o  $p$ -valor for menor que 0,050 (RAGONESE et al., 2002).

Analisando os resultados na Tabela 4.16, verificou-se que apenas o termo  $b_{33}$  (Voltagem x Voltagem) não é significativo para  $R_{INE,IND}$ , ou seja, a  $R_{INE,IND}$  depende de todos os fatores e a interação entre os fatores principais são significativas. No entanto, no modelo ajustado para  $R_{CPD,pico}$  do sistema, apenas os termos  $b_0$ ,  $b_2$ ,  $b_{12}$  e  $b_{23}$  são significativos, ou seja, o  $Cu^{2+}$  e a interação deste fator com Brij 35 e voltagem são determinantes para ajuste da  $R_{CPD, pico}$  do sistema. Estes resultados estão de acordo com a análise qualitativa realizada no item 4.4.2.

**Tabela 4.16** Estimadores do modelo para  $R_{INE,IND}$  e  $R_{CPD,pico}$  do sistema

Termo	$R_{INE,IND}$			$R_{CPD,pico}$ do sistema		
	Coeficiente	Erro padrão	$p$ -valor	Coeficiente	Erro padrão	$p$ -valor
Constante	1,16	$\pm 0,10 \times 10^{-1}$	0,000	$9,97 \times 10^{-1}$	$\pm 0,20 \times 10^{-1}$	0,000
[Brij 35]	$1,33 \times 10^{-1}$	$\pm 0,63 \times 10^{-2}$	0,002	$-8,15 \times 10^{-3}$	$\pm 0,12 \times 10^{-1}$	0,575
[Cu <sup>2+</sup> ]	$4,20 \times 10^{-1}$	$\pm 0,63 \times 10^{-2}$	0,000	$4,47 \times 10^{-1}$	$\pm 0,12 \times 10^{-1}$	0,000
Voltagem	$1,19 \times 10^{-1}$	$\pm 0,63 \times 10^{-2}$	0,002	$2,56 \times 10^{-2}$	$\pm 0,12 \times 10^{-1}$	0,171
[Brij 35] x [Brij 35]	$-4,88 \times 10^{-2}$	$\pm 0,93 \times 10^{-2}$	0,034	$6,64 \times 10^{-2}$	$\pm 0,18 \times 10^{-1}$	0,066
[Cu <sup>2+</sup> ] x [Cu <sup>2+</sup> ]	$-1,81 \times 10^{-1}$	$\pm 0,93 \times 10^{-2}$	0,002	$-1,54 \times 10^{-2}$	$\pm 0,18 \times 10^{-1}$	0,483
Voltagem x Voltagem	$3,82 \times 10^{-2}$	$\pm 0,93 \times 10^{-2}$	0,054	$-1,12 \times 10^{-2}$	$\pm 0,18 \times 10^{-1}$	0,599
[Brij 35] x [Cu <sup>2+</sup> ]	$9,49 \times 10^{-2}$	$\pm 0,89 \times 10^{-2}$	0,009	$1,29 \times 10^{-1}$	$\pm 0,17 \times 10^{-1}$	0,017
[Brij 35] x Voltagem	$1,64 \times 10^{-1}$	$\pm 0,89 \times 10^{-2}$	0,003	$-3,04 \times 10^{-4}$	$\pm 0,17 \times 10^{-1}$	0,979
[Cu <sup>2+</sup> ] x Voltagem	$-2,50 \times 10^{-1}$	$\pm 0,89 \times 10^{-2}$	0,001	$-2,24 \times 10^{-1}$	$\pm 0,17 \times 10^{-1}$	0,005

Os ajustes dos modelos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e os resultados estão apresentados na Tabela 4.17.

**Tabela 4.17** Resultados da ANOVA para o ajuste dos modelos lineares nos parâmetros, pelo método dos mínimos quadrados

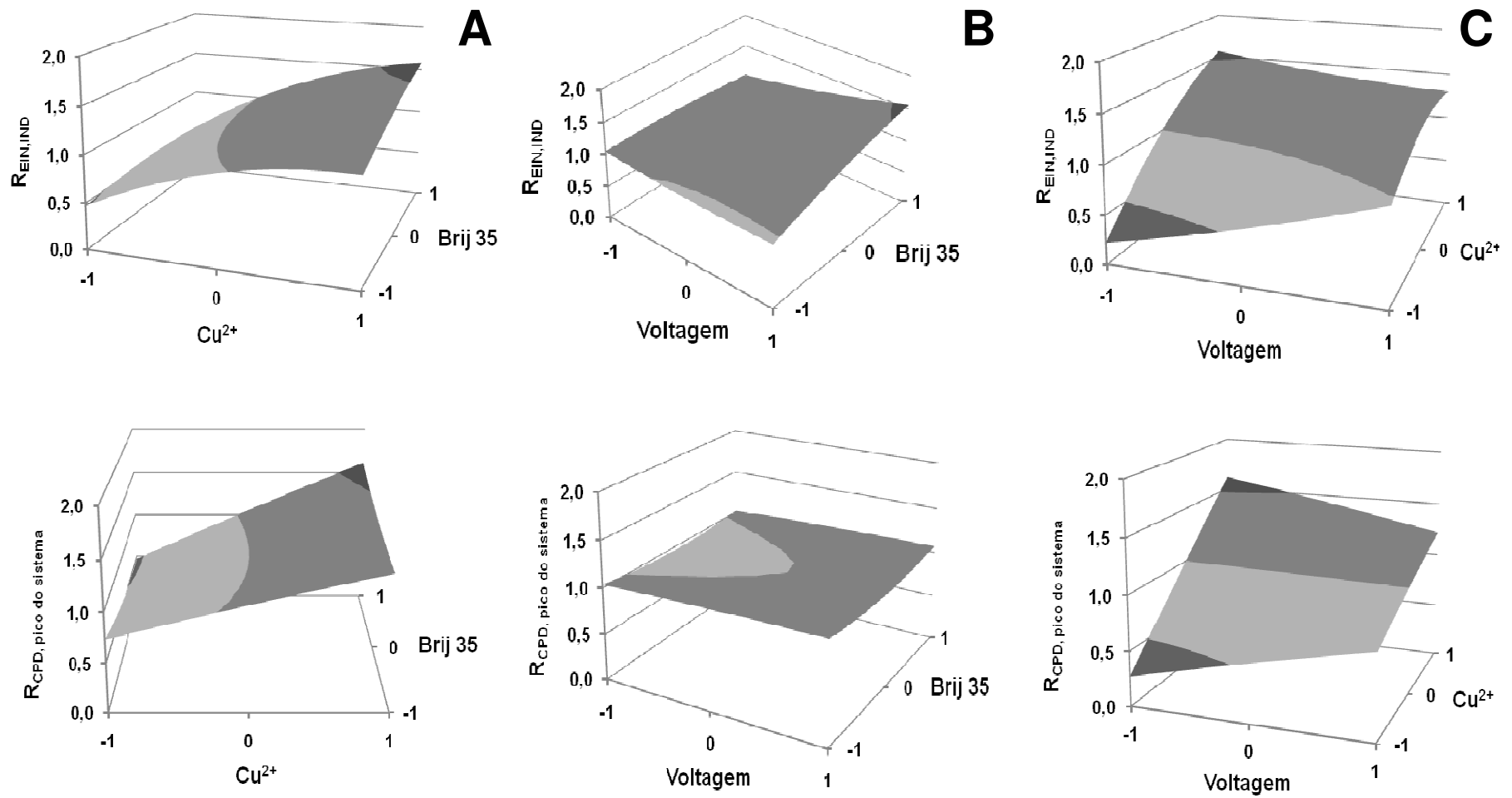
Fonte de Variação	$R_{INE,IND}$			$R_{CPD,pico\ do\ sistema}$		
	SQ	v	MQ	SQ	v	MQ
Regressão	2,19	9	$2,44 \times 10^{-1}$	1,89	9	$2,10 \times 10^{-1}$
Resíduo	$1,57 \times 10^{-2}$	5	$3,13 \times 10^{-3}$	$1,85 \times 10^{-2}$	5	$3,71 \times 10^{-3}$
Falta de ajuste	$1,50 \times 10^{-2}$	3	$5,00 \times 10^{-3}$	$1,61 \times 10^{-2}$	3	$5,37 \times 10^{-3}$
Erro Puro	$6,40 \times 10^{-4}$	2	$3,20 \times 10^{-4}$	$2,43 \times 10^{-3}$	2	$1,22 \times 10^{-3}$
Total	2,20	14	$1,58 \times 10^{-1}$	1,91	14	$1,36 \times 10^{-1}$
$F_{calc}$	15,6			4,42		

Os modelos de regressão ajustados não apresentam falta de ajuste no nível de confiança de 95%, uma vez que, os valores de  $F_{calc}$  obtidos pela ANOVA foram iguais a 15,6 e 4,42 para  $R_{INE,IND}$  e  $R_{CPD,pico\ do\ sistema}$ , respectivamente, sendo menores que o valor  $F_{tab(0,05;3;2)}$ , 19,3. Assim, foi possível obter nove superfícies de resposta para cada modelo, as três superfícies consideradas mais representativas estão representadas na Figura 4.25.

Analisando as superfícies de resposta na Figura 4.25 pôde-se observar que os modelos  $R_{INE,IND}$  e  $R_{CPD,pico\ do\ sistema}$  apresentaram comportamentos semelhantes. As superfícies de resposta obtidas mantendo a voltagem constante no nível (0) indicaram que a região com Brij 35 e  $Cu^{2+}$  no nível (+1) favorece a separação dos analitos, esta condição corresponde ao experimento 4. Por outro lado, as superfícies de resposta obtidas fixando Brij 35 no nível (0) indicaram que a região ótima para separação dos analitos ocorre com  $Cu^{2+}$  e voltagem nos níveis (+1) e (-1), respectivamente, que corresponde ao experimento 10. Portanto, as superfícies de resposta descreveram muito bem os modelos ajustados, uma vez que, estas duas

condições experimentais apresentaram resoluções maiores que 1,50 para  $R_{EIN,IND}$  e  $R_{CPD,pico\ do\ sistema}$ , simultaneamente.

No entanto, as superfícies obtidas, mantendo constante  $Cu^{2+}$  no nível (0), indicaram que a região ótima para a separação ocorre quando Brij 35 e voltagem estão no nível (+1), o que corrobora com a definição de resolução para CZE (Equação 1.21). Esta condição corresponde ao experimento 8, no qual a  $R_{EIN,IND}$  encontrada foi de 1,62, mas  $R_{CPD,pico\ do\ sistema}$  obtida foi 1,01. O baixo valor da  $R_{CPD,pico\ do\ sistema}$  pode ser justificada pela necessidade de uma concentração maior de  $Cu^{2+}$  para favorecer a formação do aduto catiônico entre CPD e  $Cu^{2+}$ .



**Figura 4.25** Superfícies de resposta obtidas para  $R_{INE,IND}$  e  $R_{CPD,pico\ do\ sistema}$ , nas três combinações possíveis, com um fator constante no nível (0): (A) voltagem; (B)  $Cu^{2+}$ ; (C) Brij 35.

## 4.4.4 Seleção da Condição Experimental Ótima

Uma vez que duas condições experimentais, experimentos 4 e 10, apresentaram resultados satisfatórios tornou-se necessário selecionar a melhor condição. Assim, foi realizado um novo conjunto de experimentos através da determinação da mistura padrão contendo ISO, suas impurezas e produtos de degradação em cinco repetições genuínas, nas condições dos experimentos 4 e 10. A Tabela 4.18 mostra os resultados estatísticos (teste de normalidade - Shapiro-Wilk; teste de homogeneidade das variâncias - Levene; teste t para amostras independentes) obtidos para a comparação entre as resoluções dos pares críticos dos experimentos 4 e 10.

**Tabela 4.18** Análise estatística dos experimentos 4 e 10

Replicas Genuínas	$R_{INE, IND}$		$R_{CPD, pico do sistema}$	
	E 4	E 10	E 4	E 10
1	1,542	1,576	1,654	1,594
2	1,516	1,577	1,621	1,590
3	1,532	1,584	1,636	1,587
4	1,500	1,632	1,642	1,572
5	1,581	1,606	1,648	1,582
Média	1,534	1,592	1,640	1,585
s	$3,059 \times 10^{-2}$	$2,393 \times 10^{-2}$	$1,269 \times 10^{-2}$	$8,623 \times 10^{-2}$
<i>Shapiro-Wilk</i>	0,749	0,149	0,694	0,613
<i>p</i> -valor	<i>Levene</i>	0,789	0,456	
	<i>teste t</i>	0,008	0,008	



Analisando os resultados do teste de Shapiro-Wilk verificou-se que ambas as condições experimentais seguem uma distribuição normal, pois os  $p$ -valores foram maiores que 0,05. Em seguida, foi realizado o teste de Levene que indicou que as variâncias das metodologias não são significativamente diferentes, pois os  $p$ -valores foram maiores que 0,050. Após a verificação da homogeneidade das variâncias, selecionou-se o teste  $t$  não-pareado com variância agrupada. Os resultados do teste  $t$  mostraram que há diferenças significativas entre os resultados dos experimentos 4 e 10, dentro do intervalo de 95% de confiança, com  $p$ -valores menores que 0,05.

Assim, a seleção foi baseada na condição que forneceu maior resolução média para os dois pares críticos simultaneamente. Portanto, a condição experimental com eletrólito constituído de 50 mmol L<sup>-1</sup> de tampão HAc/NaAc e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>, diluição dos padrões em 1 mmol L<sup>-1</sup> de Brij 35 e 12,5 mmol L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>, e voltagem de +20 kV foi otimizada, o que corresponde ao experimento 10.

#### 4.4.5 Figuras de Mérito e Análise de Formulação Farmacêutica

Após o desenvolvimento e otimização da metodologia, algumas figuras de mérito, tais como, linearidade, repetitividade, exatidão, LD e LQ foram avaliados. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.19.

A linearidade foi avaliada através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) (Equação 1.43) e do teste de hipótese *a priori* (Equação 1.45). Todos os valores de  $R^2$  foram iguais ou superiores a 0,992, o que é um indicativo de um ajuste provavelmente adequado dos dados. Os valores de  $F_{\text{calc}}$ , obtidos a partir do teste de hipóteses *a priori*, foram iguais a 3,32 para ISO, CPD e AIN e 3,31 para INE e IND. Portanto, os valores de  $F_{\text{calc}}$  foram menores que o  $F_{\text{tab}(0,05;3;10)} = 3,71$ , não evidenciando falta de ajuste no intervalo de 95% de confiança. Com base nos resultados de  $R^2$  e  $F_{\text{calc}}$ , pode-se concluir que o método apresentou uma relação linear entre área e concentração, dentro da faixa de aplicação estudada.

A repetitividade (Equação 1.46) foi avaliada em área e em tempo de migração para as curvas de padronização externa. Os maiores valores de %CV estão apresentados na Tabela 4.19, sendo estes menores que 5% indicando boa precisão.

A exatidão foi determinada através da porcentagem de recuperação (%R) mostrada na Tabela 4.19, e pode-se observar que os resultados ficaram dentro do intervalo de 95-105%, indicando uma exatidão adequada.

O LD (Equação 1.48) e o LQ (Equação 1.50) foram calculados pelo método relação sinal-ruído. Os valores calculados estão apresentados na Tabela 4.19 e foram considerados adequados para análise de formulação farmacêutica. O LD determinado para INE, IND, CPD e AIN permite a detecção destes analitos em concentração mínima de 0,8, 1,5, 0,7 e 0,3%, respectivamente, em relação à concentração da ISO na formulação farmacêutica.

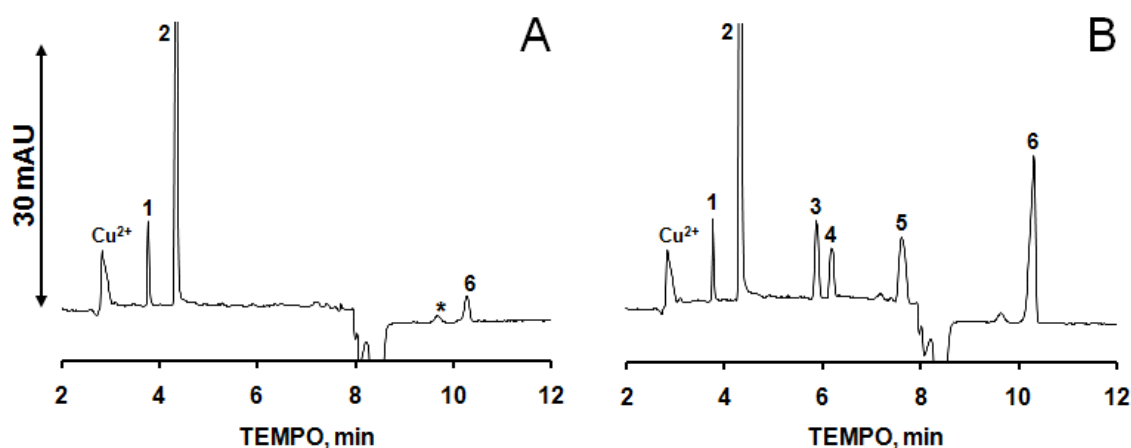
A Tabela 4.19 mostra os resultados da análise dos comprimidos de ISO com teor declarado de 100 mg. Os teores encontrados foram de  $99,3 \pm 1,5$  mg para ISO, 1,50% inferior que o teor declarado pelo fabricante, e  $0,3 \pm 0,0$  mg de AIN. As impurezas INE e CPD e o produto de degradação IND não foram detectados.

**Tabela 4.19** Resultados estatísticos para linearidade, repetitividade, recuperação, LD, LQ e quantificação da amostra

Curva	Linearidade				Repetitividade (%CV)		Teor encontrado	%R	LD	LQ
	Inclinação	Intercepto	R <sup>2</sup>	F <sub>calc</sub>	Área	t <sub>m</sub>	(mg)		(mg L <sup>-1</sup> )	
ISO	0,0821 ± 0,002	- 0,0476 ± 0,1018	0,995	3,32	4,46	1,90	99,3 ± 1,5	100	3,3	11,1
INE	0,0858 ± 0,0018	-0,0198 ± 0,0678	0,994	3,31	2,70	2,69	-----	96,7	4,1	13,8
IND	0,0793 ± 0,0019	- 0,112 ± 0,064	0,992	3,31	2,66	2,75	-----	101	7,5	25,0
CPD	0,112 ± 0,002	0,289 ± 0,068	0,996	3,32	2,76	3,57	-----	98,5	3,3	10,9
AIN	0,377 ± 0,008	- 0,057 ± 0,157	0,995	3,32	3,76	4,67	0,3 ± 0,0	96,7	1,5	5,0

Curva de calibração externa (n=3); F<sub>0,05;3;10</sub> = 3,71; Teor declarado de ISO: 100 mg.

A Figura 4.26 apresenta os eletroferogramas da amostra farmacêutica e da amostra com adição de padrão.



**Figura 4.26** Eletroferogramas: (A) amostra; (B) amostra com adição de padrão. (1) ETB - PI, (2) ISO, (3) INE, (4) IND, (5) CPD, (6) AIN e (\*) impureza ou produto de degradação; as soluções foram diluídas em  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$  e  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de Brij 35. Condições experimentais: eletrólito:  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de tampão HAc/NaAc e  $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ ; injeção hidrodinâmica:  $30 \text{ mbar} \cdot 5 \text{ s}$ ; detecção direta em  $270 \text{ nm}$ ; capilar:  $75 \mu\text{m} \times 48,5 \text{ cm}$ ; voltagem:  $+20 \text{ kV}$ .

#### 4.5 Considerações

Uma metodologia inédita capaz de analisar simultaneamente ISO, suas impurezas obtidas a partir de duas rotas sintéticas e seus principais produtos de degradação foi otimizada. Este método pode ser utilizado como ferramenta auxiliar no controle de qualidade de medicamentos contendo ISO, oferecendo vantagens como, simplicidade, baixo custo e curto tempo de análise quando comparada à metodologia por LC (BHUTANI et al., 2007). A metodologia por LC permitiu a separação de AIN, ISO, IND e 1,2-diisonicotinoilhidrazina usando uma coluna C-18, fase móvel composta de acetonitrila:água (96:4, v/v), em 30 min.

Esse manuscrito está em preparação: "FARIA, A.F.; VASCONCELOS, J.P.; GONÇALVES, R.S.B.; DE SOUZA, M.V.N.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; Simultaneous analysis of isoniazid, its impurities and degradation products by capillary zone electrophoresis."

## 5 CONCLUSÕES

A TB que ficou conhecida como mal do século em meados de 1800, não ficou no passado. O mundo assiste hoje à dramática expansão desta doença, agora associada, principalmente, a pobreza, a co-infecção com o HIV e ao surgimento de bactérias multirrestantes e super-resistentes aos medicamentos. Com o intuito de alcançar melhores respostas no tratamento, a OMS tem recomendado o uso da DFC, que este ano começou a ser distribuída pelo SUS aos pacientes para administração durante a fase intensiva do tratamento.

Neste trabalho foi desenvolvida, otimizada e validada uma metodologia inédita para análise de 4-DFC por CZE com detecção UV. Esta metodologia alcançou o grande desafio ao analisar simultaneamente ETB, ISO, RIF e PIR contornando problemas, tais como: decomposição da RIF, hidrólise da ISO e baixa absorvidade molar do ETB; esta condição foi otimizada através do uso de um planejamento Box-Behnken 3<sup>3</sup>, utilizando como fatores tampão HAc/NaAc, Cu<sup>2+</sup> e Brij 35. Este método apresentou vantagens, frente às metodologias descritas na literatura, como a capacidade de análise simultânea dos quatro fármacos usando detecção UV, o uso de um sistema de eletrólito simples e de baixo custo, preparo das amostras sem passos de derivatização, curto tempo de análise e capacidade de ser utilizado em análises de rotina de formulações farmacêuticas.

Foram também desenvolvidas duas metodologias para análise de ETB utilizando detecção UV, o que foi possível devido a formação do complexo CuETB que possui absorvidade molar satisfatória em 262 nm. A metodologia por CZE apresentou como vantagens: eletrólito condutor simples e de baixo custo, tempo de análise de 2,5 min, aumento significativo na sensibilidade em comparação com a metodologia por CE utilizando detecção UV (RAGONESE et al., 2002) e em comparação com HPLC, determinação simultânea de ETB e sua impureza, utilização de coluna não-específica, ausência de solvente orgânico e reagente de pareamento iônico (JIANG et al., 2002). A metodologia por espectrofotometria mostrou-se mais simples e rápida que o método espectrofotométrico desenvolvido por HASSAN & SHALABY. Apesar de não realizar a quantificação simultânea de ETB e 2A1B, como o desenvolvido por CZE, este método faz uso de um sistema simples que pode ser de maior interesse para laboratórios que realizam trabalhos de rotina do controle de

qualidade do princípio ativo no fármaco. Além disto, a quantificação de ETB.2HCl, pelo presente método forneceu resultados semelhantes aos obtidos por CZE.

Foi ainda otimizada uma metodologia por CZE com detecção UV para análise simultânea da ISO, suas impurezas (AIN, INE e CPD) oriundas de duas rotas sintéticas e produtos de degradação (AIN e IND). Esta metodologia foi aplicada a análise de um fármaco comercial contendo 100 mg de ISO, no qual foi encontrado 0,3 mg de AIN, o que corresponde a 0,4% do teor de ISO. Este método pode ser utilizado como ferramenta auxiliar no controle de qualidade de medicamentos contendo ISO, oferecendo vantagens como, simplicidade, baixo custo e curto tempo de análise quando comparada à metodologia por LC/MS (BHUTANI et al., 2007), que realizou a separação de AIN, ISO, IND e 1,2-diisonicotinoilhidrazina em 30 min.

Portanto, nesta tese foram desenvolvidas duas metodologias para análise de ETB, uma para determinação simultânea de ISO e seus artefatos e um método para análise simultânea de 4-DFC por CZE/UV. As metodologias são complementares e a seleção de qual é a mais adequada depende do intuito da análise. Entretanto, todas forneceram resultados confiáveis dentro dos intervalos de variação estabelecidos pelos órgãos reguladores para formulações farmacêuticas.

## REFERÊNCIAS

ACEDO-VALENZUELA, M.I.; ESPINOSA-MANSILA, A.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; CAÑADA-CAÑADA, F.; Determination of antitubercular drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). **Journal Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin/Heidelberg, v. 374, n. 3, p. 432-436, oct. 2002.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em: 23 março 2010.

ALTRIA, K.D.; ELDER, D.; Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 1023, n. 1, p. 1-14, jan. 2004.

ALTRIA, K.D.; Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 856, n. 1-2, p. 443-463, sept. 1999.

ALVES, W.A.; BAGATIN, I.A.; FERREIRA, A.M.C.; Equilibria and tyrosinase activity of a dinuclear and its analogous tetranuclear imidazolate-bridged copper(II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, Switzerland, v. 321, n. 1-2, p. 11-21, sept. 2001.

BADER, M.; A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. **Journal of Chemical Education**, United States, v. 57, n. 10, p. 703-705, oct. 1980.

BAKER, D.R.; **Capillary Electrophoresis**, New York: Wiley-Interscience, 1995.

BENETTON, S.A.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M.; BORGES, V.M.; Visible spectrophotometric and first-derivative UV spectrophotometric determination of rifampicin and isoniazid in pharmaceutical preparations. **Talanta**, England, v. 47, n. 3, p. 639-643, nov. 1998.

BHUTANI, H.; SINGH, S.; JINDAL, K.C.; CHAKRABORTI, A.K.; Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 39, n. 5, p. 892-899, oct. 2005.

BHUTANI, H.; SINGH, S.; VIR, S. BHUTANI,; K.K.; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A.K.; JINDAL, K.C.; LC and LC-MS study of stress decomposition behaviour of isoniazid and establishment of validated stability-indicating assay method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 43, n. 4, p. 1213-1220, mar. 2007.

BREDA, M.; MARRARI, R.; PIANEZZOLA, E.; BENEDETTI, M.S.; Determination of ethambutol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 729, n. 1-2, p. 301-307, apr. 1996.

BRENNER, M.; HUBER, W.; Herstellung von  $\alpha$ -aminosäureestern durch alkoholyse der methylester. **Helvetica Chimica Acta**, Zürich, Switzerland, v. 36, n. 5, p. 1109-1115, 1953.

CALLERI, E.; DE LORENZI, E.; FURLANETTO, S.; MASSOLINI, 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**, England, v. 29, n. 6, p. 1089-1096, aug. 2002.

CARDOSO, S.H.; DE ASSIS, J.V.; DE ALMEIDA, M.V.; LOURENÇO, M.C.S.; VICENTE, F.R.C.; DE SOUZA, M.V.N.; Synthesis and antitubercular activity of isoniazid condensed with carbohydrate derivatives. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1557-1560, jul. 2009.

CARVALHO, S.A.; DA SILVA, E.F.; DE SOUZA, M.V.N.; LOURENÇO, M.C.S.; VICENTE, F.R.; Synthesis and antimycobacterial evaluation of new *trans*-cinnamic acid hydrazide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, England, v. 18, n. 2, p. 538-541, jan. 2008.

CHENEVIER, P.; MASSISAS, L.; GUEYLARD, D.; FARINOTTI, R.; Determination of ethambutol in plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization. **Journal of Chromatography B**, Netherlands, v. 708, n. 1-2, p. 310-315, apr. 1998.

DANZER, K.; CURRIE, L.A.; Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, England, v. 70, n. 4, p. 993-1014, apr. 1998.  
DE SOUZA, M.V.N. Promising candidates in clinical trials against multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) based on natural products. **Fitoterapia**, Netherlands, v. 80, n. 8, p. 453-460, dec. 2009.



DE SOUZA, M.V.N.; A tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Far-Manguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 1-8, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/11/39>>. Acesso em: 18 janeiro 2010.

DE SOUZA, M.V.N.; Current Status and future prospect for new therapies for pulmonary tuberculosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, United States, v. 12, n.3, p. 167-171, may 2006.

DE SOUZA, M.V.N.; FERREIRA, M.L.; PINHEIRO, A.C.; SARAIVA, M.F.; DE ALMEIDA, M. V.; VALLE, M. S.; Synthesis and biological aspects of mycolic acids: an important target against mycobacterium tuberculosis. **TheScientificWorldJOURNAL**, v. 8, p. 720-751, jul. 2008.

DE SOUZA, M.V.N.; Promising Current Drug Candidates in Clinical Trials and Natural Products Against Multidrug-Resistant Tuberculosis. In: Iqbal Ahmad and Farrukh Aqil. (Org.). **New Strategies Combating Bacterial Infection**. German - Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 2008, cap. 3, p. 71-87.

DE SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A.; Fármacos no Combate à Tuberculose: Passado, Presente e Futuro. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 678-682, jul./agos. 2005.

ESPINOSA-MANSILA, A.; ACEDO VALENZUELA, M.I.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; SALINAS, F.; CAÑADA CAÑADA, F.; 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**, Netherlands, v. 427, n. 1, p. 129-136, jan. 2001.

ESPINOSA-MANSILA, A.; ACEDO VALENZUELA, M.I.; MUÑOZ DE LA PEÑA, A.; CAÑADA CAÑADA, F.; SALINAS LÓPEZ, F.; Determination of antitubercular drugs in urine and pharmaceuticals by LC using a gradient flow combined with programmed diode array photometric detection. **Talanta**, England, v. 58, n. 2, p. 273-280, aug. 2002.

**Etambutol**. Disponível em:

<<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/Tuberculose/doc/ETAMBUTOL.html>>. Acesso em 18 janeiro 2010.

FARIA, A.F.; DE SOUZA, M.V.N.; DE ALMEIDA, M.V.; DE OLIVEIRA, M.A.L.; Simultaneous separation of five fluoroquinolones antibiotics by capillary zone

electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 579, n. 2, p. 185-192, oct. 2006.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G.C.; DA SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L.A.; DOS REIS, P.S.; SOUZA, A.S.; DOS SANTOS, W.N.L.; Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 597, n. 2, p. 179-186, aug. 2007.

FLIEGER, J.; PANETH, P.; GIELZAK-KOCWIN, K.; TATARCZAK, M.; Micropreparative isolation of Cu(II) complexes of isoniazid and ethambutol and determination of their structures. **Journal of Planar Chromatography-Modern TLC**, v. 22, n. 2, p. 83-88, apr. 2009.

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**, England, v. 20, n. 4, p. 681-686, aug. 1999.

GONG, Z.; BASIR, Y.; CHU, D.; MCCORT-TIPTON, M.; A rapid and robust liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of anti-tuberculosis drugs-ethambutol and pyrazinamide in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Netherlands, v. 877, n. 16-17, p. 1698-1704, jun. 2009.

HANSON, J.C.; CAMERMAN, N.; CAMERMAN, A.; Structure of a copper-isoniazid complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, United States, v. 24, n. 11, p. 1369-1371, Nov. 1981.

HARRIS, D.C.; Introdução às separações analíticas. In: **Análise Química Quantitativa**, 7<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: LTC, 2008, p. 566-567.

HASSAN, S.S.M.; SHALABY, A.; Determination of ethambutol in pharmaceutical preparations by atomic absorption spectrometry, spectrophotometry and potentiometry. **Mikrochimica Acta**, Austria, v. 109, n. 5-6, p. 193-199, sept. 1992.

HILL, A.R.C.; REYNOLDS, S.L.; Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **The Analyst**, England, v. 124, n. 6, p. 953-958, jun. 1999.

HSIEH, Y.; WHANG, C.; Analysis of ethambutol and methoxyphenamine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 1122, n. 1-2, p. 279-282, jul. 2006.

International Conference on Harmonisation (ICH), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 16 março 2010.

IQUEGO, Laboratório Farmacêutico do Estado de Goiás. **IQUEGO-Etambutol**. Disponível em: <[www.iquego.com.br/pdf/bula\\_etambutol.pdf](http://www.iquego.com.br/pdf/bula_etambutol.pdf)>. Acesso em: 30 novembro 2009.

**Isoniazida**. Disponível em: <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/Tuberculose/doc/ISONIAZIDA.html>>. Acesso em: 18 janeiro 2010.

**Isoniazida**. Disponível em: <[http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos\\_old/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&id=3%3Ap&Itemid=139&limitstart=20](http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos_old/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=3%3Ap&Itemid=139&limitstart=20)>. Acesso em: 09 março 2010.

JENKE, D.R.; Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. **Instrumentation Science & Technology**, United States, v. 26, n. 1, p. 1-18, jan. 1998.

JIANG, Z.; WANG, H.; LOCKE, D.C.; Determination of ethambutol by ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 456, n. 2, p. 189-192, apr. 2002.

JINDAL, K.C.; CHAUDHARY, R.S.; SINGLA, A.K.; GANGWAL, S.S.; KHANNA, S.; Dissolution test method for rifampicin-isoniazid fixed dose formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 12, n. 4, p. 493-497, apr. 1994.

JU-YING, H.; ZHI-MING, Z.; DAO-YUAN, Z.; MING-MIN, Y.; Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in pharmaceuticals and human urine by cloud point extraction-high performance liquid chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 6, jun. 2009.

KHUHAWAR, M.Y.; RIND, F.M.A.; Liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood. **Journal of Chromatography B**, Netherlands, v. 766, n. 2, p. 357-363, jan. 2002.

KLEEMANN, A.; ENGEL, J.; KUTSCHER, B.; REICHERT, D.. **Pharmaceutical Substances**. 4th ed.. Germany: Georg Thieme Verlag, 2001.

KRIZA, A.; ABABEI, L.; STANICA, N.; RAU, I.; Complex combinations of some transitional metals with the isonicotinic acid hydrazide. **Revista de Chimie**, v. 60, n. 8, p. 774-777, aug. 2009.

KRIZA, A.; ABABEI, L.V.; CIOATERA, N.; RAU, I.; STANICA, N.; Synthesis and structural studies of complexes of Cu, Co, Ni and Zn with isonicotinic acid hydrazide and isonicotinic acid (1-naphthylmethylene)hydrazide. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 75, n. 2, p. 229-242, 2010-a.

KRIZA, A.; ABABEI, L.V.; STANICA, N.; RAU, I.; ROGOZEA, E.A.; Spectral and thermal studies about the complexes of some divalent transitional metals with isonicotinic acid hydrazide. **Revista de Chimie**, v. 61, n. 1, p. 21-26, jan. 2010-b.

LAFEPE, Medicamentos. **LAFEPE Rifampicina**. Disponível em: <[http://www.lafepe.pe.gov.br/medicamento\\_detalhes.php?id\\_med=18](http://www.lafepe.pe.gov.br/medicamento_detalhes.php?id_med=18)> Acesso em: 30 novembro 2009.

LOURENÇO, M.C.S.; FERREIRA, M.L.; DE SOUZA, M.V.N.; PERALTA, M.A.; VASCONCELOS, T.R.A.; HENRIQUES, M.G.M.O.; Synthesis and anti-mycobacterial activity of (*E*)-*N'*-(monosubstituted-benzylidene) isonicotinohydrazide derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, France, v. 43, n. 6, p. 1344-1347, jun. 2008.

MADAN, J.; DWIVEDI, A.K.; SINGH, S.; Estimation of antitubercular drugs combination in pharmaceutical formulations using multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 538, n. 1-2, p. 345-353, may 2005.

Ministério da Saúde. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota\\_tecnica\\_versao\\_28\\_de\\_agosto\\_v\\_5.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf)>. Acesso em: 25 novembro 09.

MONTGOMERY, D.C.. **Design and Analysis of Experiments**. 6th ed.. England: Ed. Wiley, 2005, p. 23-48.

Nakano, Y.; Nohta, H.; Todoroki, K.; Saita, T.; Fuiito, H.; Mori, M.; Yamaguchi, M.; Liquid Chromatographic Determination of Ethambutol in Serum Samples Based on Intramolecular Excimer-forming Fluorescence Derivatization. **Analytical Science**, Japan, v. 20, n. 3, p. 489-494, mar. 2004.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.. **Como Fazer Experimentos**. 3ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2007.

NGUYEN, D.T.T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.L.; Validation of an ultra-fast UPLC-UV method for the separation of antituberculosis tablets. **Journal of Separation Science**, Germany, v. 31, n. 6-7, p. 1050-1056, feb. 2008.

PALOMINO, J.C.; RAMOS, D.F.; DA SILVA, P.A.; New anti-tuberculosis drugs: strategies, sources and new molecules. **Current Medicinal Chemistry**, Netherlands, v. 16, n. 15, p.1898-1904, may 2009.

PANCHAGNULA, R.; AGRAWAL, S.; ASHOKRAJ, Y.; VARMA, M.; SATEESH, K.; BHARDWAJ, V.; BEDI, S.; GULATI, I.; PARMAR, J.; LAL KAUL, C.; BLOMERG, B.; FOURIE, B.; ROSCIGNO, G.; WIRE, R.; LAING, R.; EVANS, P.; MOORE, T.; Fixed dose combinations for tuberculosis: Lessons learned for clinical, formulation and regulatory perspective. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, Spain, v. 26, n. 9, p. 703-721, nov. 2004.

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**, England, v. 18, n. 6, p. 1013-1020, jan. 1999.

**Pirazinamida**. Disponível em:

<<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/Tuberculose/doc/PIRAZINAMIDA.html>>. Acesso em: 18 janeiro 2010.

**Pirazinamida**. Disponível em:

<[http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos\\_old/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&id=3%3Ap&Itemid=139&limitstart=20](http://www2.far.fiocruz.br/farmanguinhos_old/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=3%3Ap&Itemid=139&limitstart=20)>. Acesso em: 09 março 2010.

RAGONESE, R.; MACKA, M.; HUNGHERS, J.; PETOEZ, P.; The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, England, v. 27, n. 6, p- 995-1007, mar. 2002.

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

**Rifampicina**. Disponível em:

<<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/Tuberculose/doc/RIFAMPICIN A.html>>. Acesso em: 18 janeiro 2010.

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

SASSAKI, H. **Alerta à Tuberculose: Prevenção e Diagnóstico**. Disponível em:<[www.segs.com.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=9877&Itemid=157](http://www.segs.com.br/index.php?option=com_content&task=view&id=9877&Itemid=157)>. Acesso em: 06 outubro 2009.

SEKISAKI, M.; The crystal structure of bis(pyrazine-2-carboxamide)copper(II) perchlorate. **Acta Crystallographica B**, England, v. B29, n. 2, p. 327-33, feb. 1973.

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

SHEHATTA, I.; KENAWY, I.; ASKALANY, A.H.; HASSAN, A.A.; Thermodynamic of metal complexation of the macrocyclic antibiotic rifampicin. **Canadian Journal of Chemistry**, Canada, v. 79, n. 1, p. 42-49, jan. 2001.

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**, Netherlands, v. 190, n. 1, p. 109-123, nov. 1999.

SINGH, S.; MARIAPPAN, T.T.; SANKAR, N.; SARDA, N.; SINGH, B.; A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from antitubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. **International Journal of Pharmaceutics**, Netherlands, v. 228, n. 1-2, p. 5-17, oct. 2001.

SITTIG, M.. **Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia**. 2th ed.. United States of America: Noyes Publications, 1988.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.; Eletroforese Capilar e Eletrocromatografia Capilar. In: **Princípios da Análise Instrumental**, 5ª ed., Porto Alegre: Bookman, 2002, p. 686, 694, 695, 696, 697-700.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R.; Curvas de Titulação para Sistemas Ácido/Base Complexos. In: **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª ed. Norte-americana, São Paulo: Cengage Learning, 2006, p. 398-399.

SOLOMON, E.I.; SUNDARAM, U.M.; MACHONKIN, T.E.; Multicopper Oxidases and Oxygenases. **Chemical Reviews**, United States, v. 96, n. 7, p. 2563-2606, nov. 1996.

SONG, S.H.; JUN, S.H.; PARK, K.U.; YOON, Y.; LEE, J.H.; KIM, J.Q.; SONG, J.; Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs and their major metabolic ratios by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, England, v. 21, n. 7, p. 1331-1338, apr. 2007.

SOUZA, A.S.; DOS SANTOS, W.N.L.; Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 597, n. 2, p. 179-186, aug. 2007.

STEDRY, M.; JAROS, M.; VCELAKOVA, K.; GAS, B.; Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eigenpeaks in univalent weak electrolytes. **Electrophoresis**, Germany, v. 24, n. 3, p. 536-547, feb. 2003.

TARGINO, R. **Novo remédio contra tuberculose começa a chegar a estados na próxima semana**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL1274263-5598,00.html>>. Acesso em: 01 dezembro 2009.

TAVARES, M.F.M.; Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 173-181, mar./abr. 1996.

TAVARES, M.F.M.; Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 493-511, set./out. 1997.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R.; Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, England, v. 74, n. 5, p. 835-855, may 2002.

United States Food and Drug Administration (US-FDA). **Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation**, 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>>. Acesso em: 16 março 2010.

United States Pharmacopeia/National Formulary (USP 29-NF 24). **Validation of compendial methods**, 2006. Disponível em: <[http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0\\_c1225.html](http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html)>. Acesso em: 16 março 2010.

UNSANAN, S.; SANCAR, M.; BEKCE, B.; CLARK, P.M.; KARAGOZ, T.; IZZETTIN, F.V.; ROLLAS, S.; Therapeutic monitoring of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin in tuberculosis patients using LC. **Chromatographia**, Germany, v. 61, n. 11-12, p. 595-598, jun. 2005.

VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.H.; VAN DE WIEL, H.J.; Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 391, n. 2, p. 159-171, may 1999.

VARELDZIS, B.P.; GROSSET, J.; DE KANTOR, I.; CROFTON, J.; LASZLO, A.; FELTEN, M.; RAVIGLIONE, M. C.; KOLCHI, A.; Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues: World Health Organization recommendations. **Tubercle and Lung Disease**, Scotland, v. 75, n. 1, p. 1-7, feb. 1994.

VEUTHEY, J.L.; Capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin/Heidelberg, v. 381, n. 1, p. 93-95, jan. 2005.

VILLELA, F. **Brasil terá novo medicamento para tratar tuberculose**. Disponível em: < [www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2009/03/23/materia.2009-03-23.6722693936/view](http://www.agenciabrasil.gov.br/noticias/2009/03/23/materia.2009-03-23.6722693936/view)>. Acesso em: 06 outubro 2009.

WATSON, D.G. **Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist**. 1 Ed. Toronto: Churchill Livingstone, 1999, p. 293-300.



WHO, World Health Organization. **Informal consultation on 4-drug fixed-dose combinations (4FDCs) compliant with the WHO model list of essential drugs.** Geneva, Switzerland, aug. 2001. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/TDR\\_TB\\_4FDC\\_02.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/TDR_TB_4FDC_02.1.pdf)>. Acesso em: 09 março 2010.

WHO, World Health Organization. **Tuberculosis.** XDR-TB Extensively Drug-resistant Tuberculosis. Disponível em: <[www.who.int/tb/challenges/xdr/en/index.html](http://www.who.int/tb/challenges/xdr/en/index.html)>. Acesso em: 14 dezembro 2009.

YOUSSEF, R.M.; MAHER, H.M.; A new hybrid double divisor ratio spectra method for the analysis of ternary mixtures. **Spectrochimica Acta Part A**, Alexandria, v. 70, n. 5, p. 1152-1166, oct. 2008.

ZHANG, H.; ZHANG, Y.; WEI, XJ.; DU, XZ.; LI, QM.; A novel spectrophotometric method for the determination of isoniazid using Cu(II) as spectroscopic probe ion. **Chinese Journal of Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 518-522, mar. 2009.

## APÊNDICE A

Journal of Chromatography A, 1202 (2008) 224–228



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

Short communication

## Optimization of an electrolyte system for analysis of ethambutol in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis using complexation with copper(II)

Adriana F. Faria<sup>a</sup>, Marcus V.N. de Souza<sup>b</sup>, Roy E. Bruns<sup>c</sup>, Marccone A.L. de Oliveira<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil<sup>b</sup> Instituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Físico Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 April 2008

Received in revised form 2 July 2008

Accepted 4 July 2008

Available online 11 July 2008

## Keywords:

Capillary zone electrophoresis

Ethambutol

2-Amino-1-butanol

Complexation

Pharmaceutical formulation

## ABSTRACT

An alternative methodology for the determination of ethambutol by capillary zone electrophoresis (CZE) under direct UV detection at 262 nm, using acetic acid/sodium acetate buffer solution (pH 4.6) containing copper(II) sulphate to form the ethambutol–copper(II) complex, within analysis time of 2.5 min is proposed. The optimum CE conditions for the background electrolyte were established performing experiments of a 3<sup>2</sup> factorial design. Complex formation was evidenced by the UV hatochromic shift and the [CuETB]<sup>0</sup> and [CuETB]<sup>2+</sup> chemical structures were indicated by LC–MS analysis. After some validation parameters have been performed, such as linearity ( $r=0.999$ ), selectivity (comparison between slope of the calibration curve of the external standard and calibration curve of the standard addition), area precision (RSD%: <2.13 for ETB and <1.94 for 2A1B), recovery mean (101.7% for ETB and 99.95% for 2A1B) and quantification limit ( $\text{mg L}^{-1}$ : 10.17 for ETB and 19.70 for 2A1B), the method was successfully applied to ETB analysis in pharmaceutical formulation samples. It is possible to determine the presence of the 2A1B impurity at concentrations of less than 1% ETB content.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ethambutol (ETB) is a synthetic antimycobacterial agent with substantial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, and most strains of *Mycobacterium kansasii*. ETB is effective adjunct therapy for the treatment of tuberculosis (TB) but is not indicated as a monotherapy. The standard first-line treatment against active TB is a combination of the rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ETB drugs given in combination over a period of 6–9 months [1,2]. ETB degrades to 2-amino-1-butanol (2A1B) and permitted amounts of this degradant should be less than 1% of the ETB-2 HCl content [3].

Owing to the importance of ETB in TB treatment, the development and optimization of selective, sensitive, reproducible and fast analytical methods are necessary. However, the direct determination of ETB by UV detection is difficult because of its low molar absorptivity. Since this behavior inhibits HPLC applications, auxiliary procedures such as derivatization and complexation are necessary [4–8]. Lacroix et al. attempted to circumvent these dif-

ficulties by measuring the 270 nm absorbance of the ETB–copper sulfate complex. However, their technique required the use of two analytical columns and the synthesis of the internal standard [5]. Gamberini and Ferioli proposed the use of chemical derivatization with phenylethylisocyanate and the subsequent measurement of the 254 nm absorbance, but their result presented low sensitivity [6]. Chenevier et al. also proposed the use of chemical derivatization with phenylethylisocyanate, in order to increase the sensitivity under UV detection at 200 nm within analysis time of 15 min [7]. Ion-pair reversed phase liquid chromatography to permit the formation of the cationic  $\{[\text{Cu}_2\text{EBT}]^{2+}(\text{SO}_4)^{2-}\}$  complex in solution was developed by Jiang et al. The complexation was performed in the column after  $\text{CuSO}_4$  addition to the mobile phase and pH adjustments using diluted hydrochloride acid. This methodology was suggested for potential application in the monitoring of raw material and the quality control of pharmaceutical formulations [8]. Other detections mode for HPLC such as mass spectrometric and fluorescence has been described for ETB analysis in biologic fluids [9–12].

Regarding CE procedures, Ragonese et al. proposed using a Box–Behnken design for the optimization of the electrolyte system, which was useful for the separation of ETB and 2A1B by UV detection at 200 nm within 4 min. However, in spite of its impor-

\* Corresponding author. Tel.: +55 32 21023310; fax: +55 32 21023314.  
E-mail address: [marcone.oliveira@ufjf.edu.br](mailto:marcone.oliveira@ufjf.edu.br) (M.A.L. de Oliveira).

tance, this methodology presents low sensitivity being necessary the use of high ETB concentrations of the order of magnitude of  $10^3 \text{ mg L}^{-1}$  to obtain satisfactory analytical signal [13]. Hsieh et al. carried out another approach through the simultaneous analysis of ETB and methoxyphenamine using CE under electrochemiluminescence detection in 8 min [14].

However, there is still ample space in the literature for ETB analysis by CE under UV–vis detection. Within this context, a simple and fast methodology for ETB analysis by CZE is proposed. The method was successfully applied to ETB analysis in pharmaceutical formulation samples for which it is possible to determine the presence of the 2A1B impurity at concentrations of less than 1% ETB content.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and solutions

All chemicals were analytical grade. Acetic acid, sodium hydroxide and copper(II) sulphate pentahydrate were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), ethambutol dihydrochloride (ETB-2HCl) from Genix Indústria Farmacêutica (Goiás, GO, Brazil) and 2-amino-1-butanol from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Aqueous acetic acid/sodium acetate buffer (HAc/NaAc) (pH 4.6) (buffer solution-BS) stock solution containing a concentration of  $100.0 \text{ mmol L}^{-1}$  and aqueous copper(II) sulphate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) stock solution containing  $40.00 \text{ mmol L}^{-1}$  were used for electrolyte solution preparation.

Aqueous ETB stock solution containing  $20.00 \text{ mmol L}^{-1}$  was used during CE procedures, such as method optimization and sample quantification, after adequate dilution in the background electrolyte (BGE).

UV–vis electronic spectra were obtained under the following conditions: **ETB**:  $2.45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; **Cu<sup>2+</sup>**:  $2.45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; **2A1B**:  $5.61 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; **Cu–ETB**: mixture containing  $2.45 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  of ETB and  $2.45 \times 10^{-4} \text{ mol Cu}^{2+}$ ; **Cu–2A1B**: mixture containing  $2.61 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  of 2A1B and  $2.45 \times 10^{-4} \text{ mol of Cu}^{2+}$ . All solutions were diluted in  $60.00 \text{ mmol L}^{-1}$  of BS.

### 2.2. Sample solutions

Six ethambutol dihydrochloride tablets were individually weighed and ground to homogeneously fine powders. The powder corresponding to 12.50 mg of active ingredient for each tablet was weighed and dissolved in 25.00 mL of water in a volumetric flask. After 5 min of sonication, the suspensions were filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  millipore filter (São Paulo, SP, Brazil) in order to obtain clear solutions. The samples were diluted to  $50.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  in the BGE.

### 2.3. Cu–ETB crystallization

86.90 mg ETB-2HCl and 159.0 mg of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  were added to an aqueous solution containing  $60.00 \text{ mmol L}^{-1}$  of BS. The solution was maintained at room temperature until crystal formation. The crystals obtained were dissolved in a solution containing methanol and water (1:1, v/v) before analysis by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS).

### 2.4. Instrumentation

The experiments involving separation optimization were conducted in a CE system (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipped with a DAD set at 262 nm, a temperature control device, maintained at  $25^\circ\text{C}$ , and data acquisition and treatment

software (HP ChemStation, rev A.06.01). Samples were injected hydrodynamically (30 mbar 5 s) and the electrophoretic system was operated under normal polarity and constant voltage conditions of +25 kV. For all experiments, a fused-silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)  $48.5 \text{ cm}$  ( $40 \text{ cm}$  effective length)  $\times 75 \mu\text{m ID} \times 375 \mu\text{m OD}$  was used.

The experiments involving chemical characterization by liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) were carried out with a Waters model ZQ-LC/MS 2000.

The absorption spectra measurements were made in a double-beam in time UV–vis spectrophotometer system (model UV-1601PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) using quartz regular cells of optical path equal to 1.0 cm.

### 2.5. Analytical procedures

When a new capillary was used, it was conditioned by a pressure flush of  $1.00 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH solution (30 min), deionized water (5 min) and electrolyte solution (10 min). In between runs, the capillary was replenished with  $0.20 \text{ mol L}^{-1}$  NaOH solutions (2 min), deionized water (2 min) and fresh electrolyte solution (3 min, pressure flush).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Study of the ethambutol–copper(II) complex formation

Based on the complexation study of ETB with copper(II) performed by Jiang et al., a acetic acid/sodium acetate buffer solution (pH 4.6) was used in order to maintain the pH in the 4.0–5.0 interval, because according to the literature the recovery and sensitivity were poor with a pH under 4.0 and over 5.0 owing to the occurrence of cupric hydroxide precipitation [8]. Fig. 1 shows the electronic UV–vis spectra for copper(II) sulphate, ETB, 2A1B, Cu–ETB and Cu–2A1B. Analyzing the spectra, it is possible to observe a bathochromic shift on comparison of the absorption bands for free copper(II) (250 nm) and Cu–ETB (262 nm), which suggests complexation occurrence. It is also possible to note a small change in the absorption band of Cu–2A1B in comparison with 2A1B. Based on the UV–vis spectral analysis, the wavelength at 262 nm was selected for the optimization study by CE.

A complementary study by LC–MS was performed in order to evaluate the Cu–ETB complex formed. The results obtained indicate the presence of two main compounds: one with  $m/z$  266.2 and

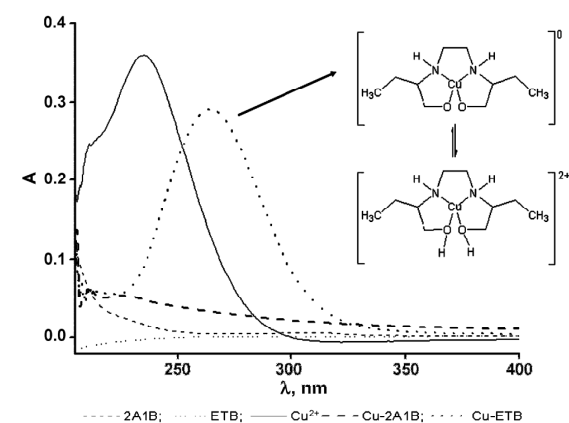


Fig. 1. Electronic UV–vis spectra for copper(II) sulphate, ETB, 2A1B, Cu–ETB and Cu–2A1B.

**Table 1**  
3<sup>2</sup> factorial design and resolution results for critical peak pairs

Experiments	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BS	–	0	+	–	0	+	–	0	+
Cu <sup>2+</sup>	–	–	–	0	0	0	+	+	+
R <sub>Na<sup>+</sup>/Cu-2A1B</sub>	1.88	1.92	1.00	2.69	2.20	1.29	2.69	2.14	1.93
R <sub>Cu-2A1B/Cu<sup>2+</sup></sub>	1.00	1.67	3.40	1.00	1.00	2.00	1.00	1.00	1.11

BS (mmol L<sup>-1</sup>): (–) 50.00; (0) 60.00; (+) 70.00; Cu<sup>2+</sup> (mmol L<sup>-1</sup>): (–) 5.00; (0) 7.50; (+) 10.00.

**Table 2**  
Statistical results obtained from linearity calculations

Compound	Slope	Intercept	r	F <sub>calculated</sub>
ETB <sup>a</sup>	0.141 ± 0.002	–0.197 ± 0.142	0.999	3.22
FTR <sup>b</sup>	0.141 ± 0.003	6.994 ± 0.739	0.999	
2A1B <sup>a</sup>	0.054 ± 0.000	–0.035 ± 0.019	0.999	3.28
2A1B <sup>b</sup>	0.054 ± 0.001	–0.037 ± 0.063	0.999	

<sup>a</sup> Calibration curve of external standard (n = 3).

<sup>b</sup> Calibration curve of standard additions (n = 6).

relative intensity of 100% and the other with m/z 268.2 and relative intensity of 55% (not shown). The first one was attributed to the neutral [CuETB]<sup>0</sup> complex and the second as cationic [CuETB]<sup>2+</sup> (Fig. 1). We believe that the cationic complex is dominant in the running buffer, since the 4.6 pH is more favorable for a charged form and the complex presents a short migration time (about 2.5 min) and is distant from the electrosmotic flow.

3.2. Background electrolyte optimization

Since the Cu–ETB complexation was observed, a 3<sup>2</sup> factorial design of experiments (DOE) [15] with three level (–1, 0, 1) and two factors (BS and Cu<sup>2+</sup>) was carried out in order to determine the optimum concentration of each variable. Table 1 shows the concentration levels selected for the factors, the combination of the experiments carried out and the resolution results for critical peak pairs. Other experimental conditions, such as voltage, injection volume, wavelength, capillary dimensions and cartridge temperature were maintained constant for these experiments.

The parameters used for selection of the optimum experiment took into account resolutions (R) of the critical peak pairs of Na<sup>+</sup>/Cu-2A1B and Cu-2A1B/Cu<sup>2+</sup>, since that they were considered the most important for separation performance. Analyzing the results presented in Table 1, only experiment 2 (BS: 60.00 mmol L<sup>-1</sup> and Cu<sup>2+</sup>: 5.00 mmol L<sup>-1</sup>) presented resolutions above 1.50 for both critical peak pairs. Thus, this experiment was selected as the optimal one and used for the analysis of pharmaceutical formulation tablets.

3.3. Validation parameters for the optimized method

After development and optimization of the methodology, some validation parameters, such as linearity, selective, precision, recov-

ery, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined.

3.3.1. Selective and linearity

Due to the difficulty in obtaining a matrix free of the active ingredient, it was necessary to use the method of standard addition to evaluate the method selectivity. Therefore, calibration curves for the standard addition method and calibration curves for the external standard method were compared [16]. The similarity in the slopes of the calibration curves (Table 2) indicates that the method presents appropriate selectivities for ETB and 2A1B determinations.

Linearity was evaluated taking into account the correlation coefficient (r). A correlation coefficient equal to or higher than 0.999 is considered evidence of ideal data fitting to line regression performed through least-square treatment.

Another way to verify the linearity could be through the application of the *a priori* linearity hypothesis test [17]. This test consists of comparing the deviations of the means from the calibration line (the residual standard deviation s<sub>y,x</sub>) with that of the y values from their means (s<sub>y</sub>) by using equation 1, where m<sub>i</sub> is the number of measurements for the i<sup>th</sup> calibration point, p is the number of calibration points and m is the total number of measurements.

$$F_{\text{calculated}} = \frac{s_{y,x}^2}{s_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p - 2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m - p)} \quad (1)$$

The test is carried out by comparing F<sub>calculated</sub> and F<sub>α;p-2;m-p-F<sub>critical</sub></sub>. If F<sub>calculated</sub> ≥ F<sub>critical</sub>, the linear model cannot be applied. In this case F<sub>critical</sub> = F<sub>0.05,3,10</sub> = 3.71 was higher than F<sub>calculated</sub> for ETB (3.22) and 2A1B (3.28), respectively. Therefore, the null hypothesis is not rejected, indicating that the linearity test was considered to be satisfactory, as summarized in Table 2. As a result, the method was found selective and its linearity was considered to be suitable for the concentration range studied.

3.3.2. Precision and accuracy

Precision was evaluated from the RSDs in area and migration time for the 0–125.0 mg L<sup>-1</sup> range and accuracy by means of percentage recovery. All values of RSD were less than 5.0% and recovery was 100.0 ± 5.0%, showing that the method presents acceptable precision and recovery [18] (Table 3).

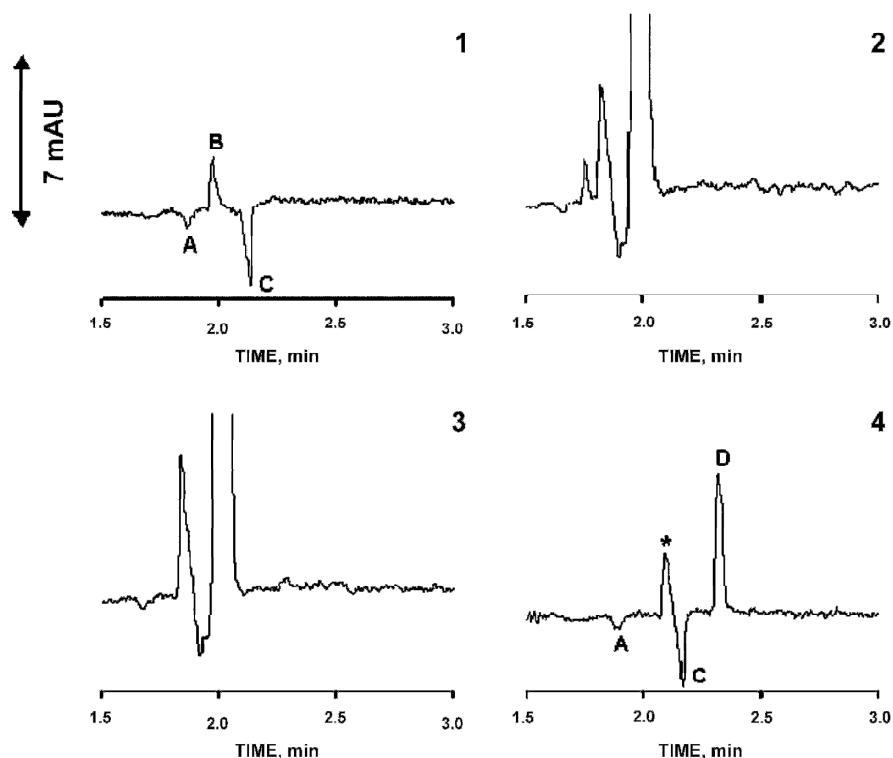
3.3.3. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

In this work, LOD and LOQ took into account the signal–noise relation through the standard deviation calculation of the baseline (noise) and the height of the peak (signal) of the analyte in the sample [18]. LOD and LOQ were calculated corresponding to signal–noise relations equal to 3 and 10, respectively. The LOD and LOQ values obtained were 3.05 and 5.91 mg L<sup>-1</sup> and 10.17 and 19.70 mg L<sup>-1</sup> for ETB and 2A1B, respectively.

**Table 3**  
RSD (%) in area and migration time for samples obtained from the repeatability study and recovery (%) obtained from the accuracy evaluation

Standard concentration added (mg L <sup>-1</sup> )	Area (RSD%) <sup>a</sup>		Migration time (RSD%) <sup>a</sup>		Recovery (%) <sup>a</sup>	
	ETB	2A1B	ETB	2A1B	ETB	2A1B
0	2.13	–	3.67	–	–	–
25.00	1.20	1.94	2.96	1.44	103.2	97.27
50.00	0.90	1.29	3.09	0.99	103.1	104.0
75.00	0.85	0.29	2.26	1.44	100.7	98.89
100.0	1.46	0.41	2.10	1.32	103.2	98.56
125.0	0.42	0.43	0.92	2.09	98.52	101.0

<sup>a</sup> n = 6.



**Fig. 2.** Electropherograms of 2A1B standard (1), fortified sample with 2A1B (2), concentrated sample (3), diluted sample (4) and the matrix effect (\*). Operational conditions: 5 s injection at 30 mbar pressure, +25 kV applied voltage, 25 °C cartridge temperature and direct detection at 262 nm. BGE: 60.0 mmol L<sup>-1</sup> HAc/NaAc buffer (pH 4.6) and 5.00 mmol L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>. Peaks: (A) Na<sup>+</sup>; (B) Cu-2A1B, (C) copper(II) and (D) Cu-ETB.

### 3.3.4. Pharmaceutical formulations analysis

The quantification was performed by the standard addition method. However, the presence of 2A1B in concentrations up to 0.45% relative to ETB-2HCl was not detected. The amount found for ETB was  $390.8 \pm 1.2$  mg for a 400.0 mg label claim.

Fig. 2 show electropherograms obtained for ETB and 2A1B standard and ETB tablet. In the sample it is possible to observe the presence of a peak due to the matrix effect, which does not interfere with the analyte detection. The A and C peaks were confirmed by means of BGE simulation using the peakmaster 5.2 program [19] and peaks B and D by standard addition.

## 4. Conclusions

An alternative methodology for ethambutol analysis in pharmaceutical formulations using complexation with copper(II) by CZE under direct UV detection was proposed. The 3<sup>2</sup> DOE was found to be a useful tool to determine optimal concentrations for the BGE (HAc/NaAc buffer (pH 4.6) and copper(II)), which resulted in the separation of critical peak pairs. The chemical structures for the [CuETB]<sup>0</sup> and [CuETB]<sup>2+</sup> complexes formed were suggested based on LC-MS analysis. As advantages the method presents simple BGE preparation, short analysis time and improvement of the sensitivity in comparison with other CE methodology using UV detection. In comparison with HPLC, absence of derivatization steps in the sample preparation and

the necessity of separation column selection are interesting features.

## Acknowledgments

The authors wish to acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-400618/2004-4, 154931/2006-3 and 476386/2007-1) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais of Brazil (FAPEMIG-CEX-APQ 1906-5.02-07) for fellowships and financial support.

## References

- [1] M.V.N. de Souza, *Drug Disc.* 1 (2006) 33.
- [2] M.V.N. de Souza, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 12 (2006) 167.
- [3] A.C. Moffat, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, Second ed., The Pharmaceutical Press, London, 1986, p. 592.
- [4] M. Yan, T. Guo, H.T. Song, Q.C. Zhao, Y. Sui, *J. Chromatogr. Sci.* 45 (2007) 269.
- [5] C. Lacroix, F. Cerutti, J. Nouveau, S. Menager, O. Lafont, *J. Chromatogr.* 415 (1987) 85.
- [6] G. Gamberini, V. Ferioli, *Farmaco* 43 (1988) 357.
- [7] P. Chenevier, L. Massias, D. Gueylard, R. Farinotti, *J. Chromatogr. B* 708 (1998) 310.
- [8] Z. Jiang, H. Wang, D.C. Locke, *Anal. Chim. Acta* 456 (2002) 189.
- [9] J.E. Conte, E. Lin, Y.P. Zhao, E. Zurlinden, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 113.
- [10] S.H. Song, S.H. Jun, K.U. Park, Y. Yoon, J.H. Lee, J.Q. Kim, J. Song, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1331.

228

*A.F. Faria et al. / J. Chromatogr. A 1202 (2008) 224–228*

- [11] M. Breda, P. Marrari, E. Pianezzola, M.S. Bebedetti, *J. Chromatogr. A* 729 (1996) 301.
- [12] Y. Nakano, H. Nohta, K. Todoroki, T. Saita, H. Fuiito, M. Mori, M. Yamaguchi, *Anal. Sci.* 20 (2004) 489.
- [13] R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes, P. Petoez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 995.
- [14] Y. Hsieh, C. Whang, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 279.
- [15] R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B.B. Neto, *Statistical Design—Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2006, p. 265.
- [16] A.F. Faria, M.V.N. de Souza, M.A.L. de Oliveira, *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (2008) 389.
- [17] K. Danzer, L.A. Currie, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 993.
- [18] ICH Guideline: Q2B, *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1995.
- [19] M. Stedry, M. Jaros, K. Vcelakova, *B. Gas. Electrophoresis* 24 (2003) 536.

## APÊNDICE B

570

Electrophoresis 2010, 31, 570–574

José Alberto Fracassi da Silva<sup>1,2</sup>  
Nathan Vitorazzi de Castro<sup>1</sup>  
Dosil Pereira de Jesus<sup>1,2</sup>  
Adriana F. Faria<sup>3</sup>  
Marcus V. N. De Souza<sup>4</sup>  
Marcone Augusto Leal de Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Chemistry Institute, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária, Brazil

<sup>4</sup>Instituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Received July 1, 2009

Revised September 18, 2009

Accepted September 22, 2009

## Research Article

## Fast determination of ethambutol in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection

A method for the determination of ethambutol (EMB), a first-line drug against tuberculosis, based on CE with capacitively coupled contactless conductivity detection is proposed. The separation of EMB and its main product of degradation were achieved in less than 3 min with a resolution of 2.0 using a BGE composed of 50 mmol/L histidine and 30 mmol/L MES, pH 6.30. By raising the pH to 8.03, the analysis time was reduced to 1.0 min, but with a significant loss of resolution (0.7). Using the best separation conditions, linearity of 0.9976 ( $R^2$ , five data points), sensitivity of  $1.26 \times 10^{-4}$  V min  $\mu\text{mol}^{-1}$  L, and LOD and quantification of 23.5 and 78.3  $\mu\text{mol/L}$ , respectively, were obtained. Recoveries at four levels of concentration ranged from 95 to 102% and the concentration range studied ranged from 100 to 500  $\mu\text{mol/L}$ . The results obtained for the determination of EMB in pharmaceutical formulations were compared with those obtained by using CE with photometric detection.

**Keywords:**

CE / Contactless conductivity detection / Drug analysis / Electrochemical detection / Tuberculosis  
DOI 10.1002/elps.200900404

### 1 Introduction

Tuberculosis (TB) is a contagious disease that nowadays is a worldwide problem that correlates the AIDS epidemic of the mid-1980. Other problems that make TB a global health problem are inconsistent or partial treatments that are responsible for the advent of multi-drug resistant strains and the lack of new drugs in the market. At present, TB is responsible for more than 1.7 million deaths each year and it is estimated that there are around one billion people infected with this disease worldwide [<http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/>]. Currently, the treatment against TB involves three or four different kinds of antibacterial drugs given in combination over periods of 6–9 months. These drugs usually are isoniazid (INH-1952), rifampicin (RIP-1965), pyrazinamide (PZA-1970) and ethambutol (EMB-1968) (Fig. 1) [1, 2]. Multiple combinations are necessary to prevent the emergence of multi drug resistant strains organisms, which would lead to treatment failure [2].

**Correspondence:** Dr. José Alberto Fracassi da Silva, University of Campinas, Chemistry Institute, P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

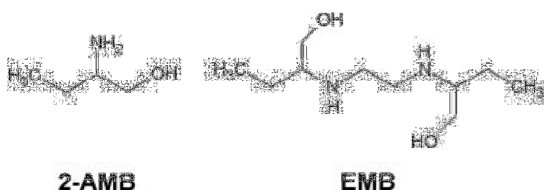
**E-mail:** fracassi@iqm.unicamp.br

**Fax:** +55-19-3521-3023

**Abbreviations:** 2-AMB, 2-amino-1-butanol; C<sup>4</sup>D, capacitively coupled contactless conductivity detection; EMB, ethambutol; HIS, L-histidine; TB, tuberculosis

EMB is a first-line drug that was synthesized in 1960 but was used in the treatment of TB only after 1968. It is important to highlight that (S,S)-EMB is the isomeric form used, because (R,R)-EMB causes blindness. This aminoalcohol affects the biosynthesis of mycolic acids, which are an important class of compounds, basically found in the cell walls of a group of bacteria known as *Mycolata* taxon. For example, mycolic acids are important for the survival of *Mycobacterium tuberculosis*, the agent responsible for the disease known as TB, being able to help to fight against hydrophobic drugs and dehydration, and also allow this bacteria be more effective in the host's immune system by growing inside macrophages. In this context, peptidoglycan and arabinogalactan are important polysaccharides in the mycobacterial cell walls, which are linked by covalent attachment with arabinogalactan, a polymer composed primarily of D-galactofuranosyl and D-arabinofuranosyl residues. The probable mechanism of action of EMB involves the inhibition of the arabinofuranosyl transferases, important enzymes that promote the polymerization of arabinose into the arabinan domain of arabinogalactan.

Owing to the importance of EMB in TB treatment, the development and optimization of selective, sensitive, reproducible and fast analytical methods are necessary. Since the direct photometric determination of EMB is difficult, due to its low molar absorptivity and lack of fluorescence, derivatization and complexation strategies have been proposed for the analysis of EMB [3–6].



**Figure 1.** Chemical structures of EMB, the first-line drug against TB, and its main degradation product 2-AMB.

CE is an attractive technique for the analysis of pharmaceuticals and it has been successfully applied for the quality control of both raw materials and final products, and also for the investigation of metabolic products in biological environments [7, 8]. Using CE, Ragonese *et al.* proposed a Box-Behnken design for the optimization of conditions for the analysis of EMB and 2-amino-1-butanol (2-AMB) using UV-vis detection at 200 nm [9]. Hsieh *et al.* used CE and an electrochemiluminescence detector for the simultaneous separation and detection of EMB and methoxyphenamine [10]. Recently, Faria *et al.* developed and validated an alternative method using CZE under direct UV detection at 262 nm using an acetic acid/sodium acetate buffer solution (pH 4.6) containing copper(II) sulfate to form the EMB-copper(II) complex. The method was successfully applied to determine EMB and demonstrated that it is possible to quantify the AMB impurity in pharmaceutical formulation samples [11].

Capacitively coupled contactless conductivity detection ( $C^4D$ ) is an attractive and simple detection strategy for CZE and has received growing attention since its introduction in 1998 [12, 13]. The technique has been reviewed in detail [14–16] and its theoretical and practical principles of operation can be found elsewhere [17, 18].  $C^4D$  is particularly of interest for the detection of ionic species and offers a good choice for applications where the analytes do not present either significant molar absorptivity or native fluorescence.

This study reports on EMB determination in pharmaceutical formulations using CE with  $C^4D$ . Different BGE were evaluated, the parameters of the separation were optimized and the method was validated. The separation of EMB and 2-AMB, the main degradation product of the EMB, was also evaluated.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Reagents and solutions

All solutions were prepared using deionized water from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) with resistivity greater than 18 M $\Omega$  cm. All chemicals were of analytical grade and used as received.

L-histidine (HIS) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). MES was purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Sodium hydroxide, sodium phosphate, sodium dihydrogen phosphate, disodium hydrogen

phosphate, sodium benzoate, benzoic acid, sodium tetraborate decahydrate, and boric acid were purchased from Synth (LabSynth, Diadema, SP, Brazil). (*S,S*)-Ethambutol dihydrochloride (EMB·2HCl) was purchased from Genix Indústria Farmacêutica (Goiás, Brazil) and (–)-2-AMB from Sigma.

### 2.2 CE equipment

A homemade CE system was employed during this study. The main parts of the equipment consist of a 0–30 kV high-voltage power supply (Spellman, NY, USA), a hydrodynamic injector assembled with an aquarium pump and a three-way solenoid valve (Cole Parmer, IL, USA), and a  $C^4D$ . Construction of the  $C^4D$  was previously described [19]. The MFG-4202 signal generator employed in this study was obtained from Minipa (São Paulo, SP, Brazil). The frequency and amplitude of the sinusoidal signal were 500 kHz and 6.0 V<sub>pp</sub> (peak to peak voltage). The other parts of the equipment were of common use in CE, such as platinum electrodes and a plexiglas<sup>®</sup> box. For control and data acquisition, the system was interfaced to a Pentium IV<sup>®</sup> computer through a NI-USB 6009 module (National Instruments, www.ni.com), while software written in Labview 7.1 was developed for this purpose. The electropherograms were obtained at room temperature, measured at  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

The capillaries used in this study were 75  $\mu\text{m}$  id, 40 cm length (30 cm effective), or 50  $\mu\text{m}$  id, 50 cm length (40 cm effective) fused-silica capillaries from Agilent Technologies (CA, USA), or a 50  $\mu\text{m}$  id, 48 cm length (38 cm effective) capillary purchased from Microtube (São Paulo, Brazil). The capillaries were previously treated with a 0.1 mol/L NaOH solution for 30 min. Before the analyses and between BGE, the capillaries were flushed with 0.1 mol/L NaOH for 5 min, deionized water for 10 min and with the new electrolyte for 15 min.

Hydrodynamic injections were performed at 11 kPa (1.6 psi, 110 mbar) for 10 s.

### 2.3 Sample preparation

Six tablets of EMB (400 mg per tablet, FURP, São Paulo, Brazil) were ground in a ceramic mortar. A mass of the powder equivalent to 100 mg of EMB was weighed ( $\pm 0.1$  mg) and transferred to a 50 mL volumetric flask (stock sample). A volume of 750  $\mu\text{L}$  of this stock sample was diluted to 25 mL and this solution was filtered (0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter, Millipore) prior to injection in the CE capillary.

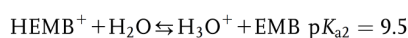
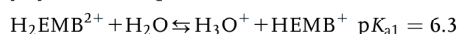
## 3 Results and discussion

In CZE, the separation of charged species is a function of the mobilities of the ions [20]. For species that participate in



rapid equilibria, the effective mobility ( $\mu_{\text{ef}}$ ), rather than the electrophoretic mobility, has to be taken into account [8]. In this way, strategies for the optimization of the separation of species in CZE are based on the tuning of the operational parameters, and the composition of the BGE plays an important role in the optimization. Thus, pH and the presence of additives (*i.e.* complexing agents or organic solvents) have to be determined in order to achieve a suitable separation.

From the structure of EMB (Fig. 1), it is possible to note the presence of two amino groups, with  $\text{p}K_{\text{a}}$  of 6.3 and 9.5 [21]. The two equilibria involved are:

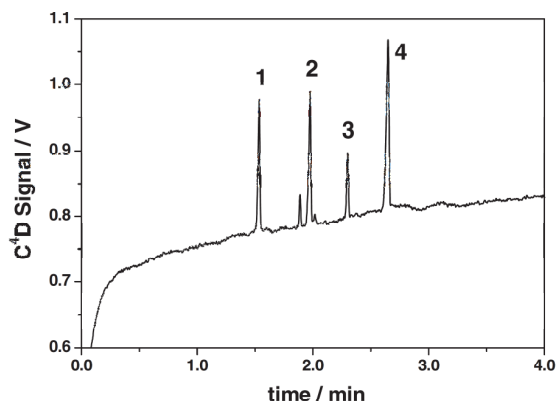


At pH values below 9.5 most species are in the protonated, mono-cationic form, and at pH values below 6.3 most species are in the doubly charged cationic form. Thus, the separation of EMB in CZE can be approached as a cation separation. Well-established protocols are known for the separation of cations in CZE [7] employing different detectors. As the EMB does not present significant UV-visible absorption of radiation or fluorescence, indirect methods of detection are commonly found.  $\text{C}^{4\text{D}}$  is very suitable for both direct and indirect detection of inorganic ions. In this study both methods were evaluated for the determination of EMB in pharmaceutical formulations.

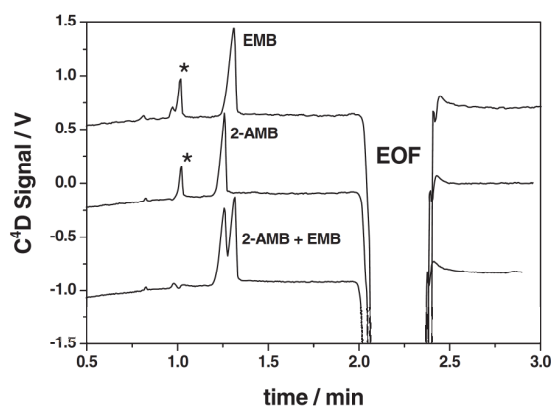
In  $\text{C}^{4\text{D}}$ , the sensitivity depends on the difference of mobilities of the analyte and the co-ion as well as the mobilities of the analyte and counter-ion [17, 18]. So, as a rule of thumb, low-mobility BGE ions provide a good starting point for optimization of detection in CE- $\text{C}^{4\text{D}}$ . A BGE composed of an equimolar mixture of MES and HIS promotes a stable background with very low conductivity, which is suitable for  $\text{C}^{4\text{D}}$  detection in CE. The separation of a model mixture containing  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ , and  $\text{EMB}^{2+}$  using 30 mmol/L MES/HIS (pH 6.0) as BGE is shown in Fig. 2. Although the effective mobility of  $\text{EMB}^{2+}$  is low, a positive peak is obtained. It is also interesting to note that, due to its double charge, the peak height of  $\text{EMB}^{2+}$  is greater than the lithium peak, which guarantees good sensitivity for this approach.

During method development, we are also concerned about the separation of EMB in the presence of its main degradation product 2-AMB. Using an equimolar mixture of MES and HIS, the peaks of EMB and 2-AMB could only be baseline separated at low concentrations. Figure 3 depicts the non-resolved separation of a mixture of 2-AMB and EMB at 300  $\mu\text{mol/L}$ . Although a very fast separation could be obtained using these operational conditions, poor resolution might be a problem for routine analysis. A more favorable situation can be obtained by the use of a slightly higher pH buffer, prepared by mixing MES and HIS at concentrations of 30 and 50 mmol/L, respectively.

Using these conditions, the complete separation of 2-AMB and EMB was obtained, with an analysis time close to



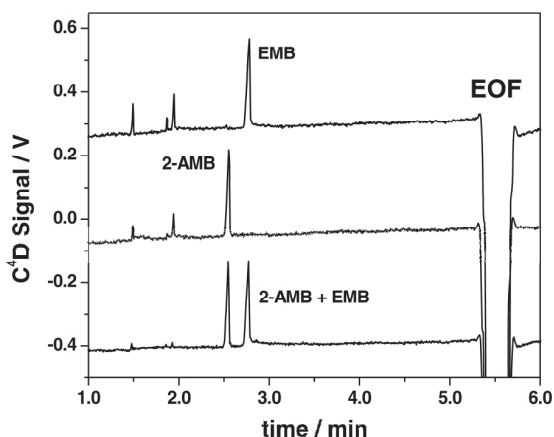
**Figure 2.** Separation of a standard cation solution containing (1) ammonium, (2) sodium, (3) lithium, and (4) EMB, each at 100  $\mu\text{mol/L}$ . Conditions: BGE: 30 mmol/L MES/HIS, pH 6.07; Separation voltage: 20 kV; injection: hydrodynamic at 11 kPa for 10 s; capillary: 50  $\mu\text{m}$  id, 50 cm (total), 40 cm (effective);  $\text{C}^{4\text{D}}$  operating at 500 kHz and 6  $V_{\text{pp}}$ .



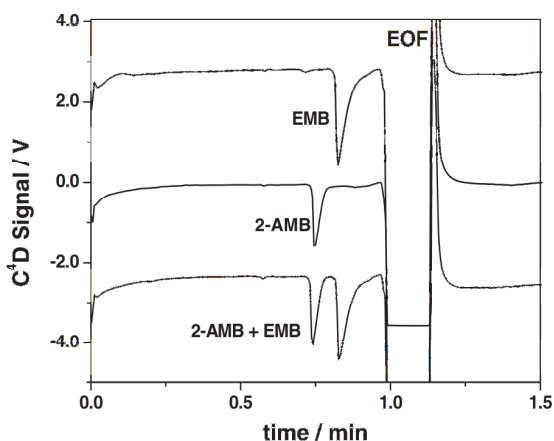
**Figure 3.** Fast separation of 300  $\mu\text{mol/L}$  EMB and 2-AMB. Conditions: capillary: 75  $\mu\text{m}$  id, 40 cm (total), 30 cm (effective);  $\text{C}^{4\text{D}}$  operating at 500 kHz and 6  $V_{\text{pp}}$ . Other conditions as in Fig. 2. The asterisks indicate unidentified peaks.

3 min for each run (Fig. 4). One can also note the reduction in peak sensitivity (28.0  $\text{V min mol}^{-1} \text{L}$ ) when compared with the system composed of the equimolar mixture of MES/HIS at 30 mmol/L (75.6  $\text{V min mol}^{-1} \text{L}$ ). This difference is attributed to the quantity of analyte injected, since in the former case a 50  $\mu\text{m}$ , 48 cm capillary was used, in comparison with a 75  $\mu\text{m}$  and 40 cm capillary for the latter case. But this reduction in sensitivity may not be a problem considering the determination of EMB in pharmaceutical formulations. The determination of EMB in biological matrices was not explored in this study.

The separation 2-AMB and EMB in high pH BGE was also evaluated. Very fast separations were observed for a BGE composed by 4.0 mmol/L sodium tetraborate adjusted to pH 8.03 with boric acid (Fig. 5). By raising the pH of the



**Figure 4.** Separation of 100 µmol/L 2-AMB and EMB. Conditions: BGE: 30 mmol L<sup>-1</sup> MES, 50 mmol L<sup>-1</sup> HIS; capillary: 50 µm id, 48 cm (total), 38 cm (effective). Other conditions as in Fig. 2.



**Figure 5.** Fast separation and indirect detection of a mixture of 2-AMB and EMB at 100 µmol/L. Conditions: BGE: 4.0 mmol/L sodium tetraborate, pH 8.03 (adjusted with boric acid); capillary: 75 µm id, 40 cm (total), 30 cm (effective). Other conditions as in Fig. 2.

BGE, the equilibria are shifted to the formation of the free bases, reducing the effective mobilities of EMB and 2-AMB. As a consequence, the peaks appear closer to the zone driven by the EOF. Also, in this case pronounced peak tailing can be observed, which indicates that adsorption of the analytes on the capillary wall occurs to a higher degree. The LOD and quantification obtained with this BGE were 24.2 and 80.8 µmol/L, respectively.

A comparison of some separation and detection parameters for different BGE employed in the separation of EMB and 2-AMB is summarized in Table 1. The calculated resolution of 2-AMB and EMB for the BGE containing sodium tetraborate is smaller than that predicted by a simple visual inspection of the electropherogram in Fig. 5, due to the pronounced tailing of EMB, although this does not interfere in the separation of 2-AMB and EMB. Another inherent characteristic of the detection system based on conductivity is the electrodispersion of the zones originated from mobility differences between analyte and BGE, which causes a triangular shape to the peaks and reduction of the plate numbers. Despite the electrodispersion, good values were obtained by using 50 µm, 48 cm capillaries.

A BGE composed of benzoic acid and sodium benzoate, as well as phosphate buffers at different values of pH were also tested, but no further improvements were achieved.

In view of the good results presented by the use of BGE composed of 30 mmol/L MES and 50 mmol/L HIS, using a capillary of 50 µm id and 48 cm in length (38 cm effective), these parameters were chosen for the evaluation of the figures of merit of the method.

The sensitivity for the calibration curve ranging from 100 to 500 µmol/L was determined to be  $(1.26 \pm 0.04) \times 10^{-4} \text{ V min } \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$  ( $R^2 = 0.9976$ , five data points). The LOD and quantification, calculated using the error in the intercept and the slope of the calibration curve, were 23.5 and 78.3 µmol/L, respectively. The recoveries were performed at four concentration levels and the results are summarized in Table 2. The percentages summarized in Table 2 are the average values for six determinations.

The results obtained in this study for the determination of EMB in tablets (FURP) for the same lot were compared with that reported for CE-UV [11]. The value of

**Table 1.** Comparison of some separation and detection parameters for different BGE employed in the separation of EMB and 2-AMB

	$t_m$ (min)		Peak sensitivity <sup>a)</sup> (V min mol <sup>-1</sup> L)		Plate numbers/m		Resolution
	2-AMB	EMB	2-AMB	EMB	2-AMB	EMB	
BGE1 <sup>b)</sup>	1.26	1.31	75.6	117.4	26 630	13 638	0.50
BGE2 <sup>c)</sup>	2.55	2.78	28.0	34.5	174 425	68 541	2.02
BGE3 <sup>d)</sup>	0.74	0.82	127.1	332.5	13 616	8163	0.70

a) Peak area divided by the concentration of the standard solution (300 µmol/L). These values must not be taken as the slopes of the calibration curves.

b) 30 mmol/L MES, 30 mmol/L HIS, pH 6.07; capillary: 75 µm, 40 cm (30 cm effective).

c) 30 mmol/L MES, 50 mmol/L HIS, pH 6.30; capillary: 50 µm, 48 cm (38 cm effective).

d) 4.0 mmol/L sodium tetraborate, pH 8.03; capillary: 75 µm, 40 cm (30 cm effective).

574 J. A. F. da Silva *et al.**Electrophoresis* 2010, 31, 570–574**Table 2.** Recoveries for six determinations at four levels of concentration of EMB

Level	[EMB]/ $\mu\text{mol/L}$			Recovery
	Sample	Added	Determined	
1	18.02	100.6	121 $\pm$ 3	102 $\pm$ 3
2	36.05	100.6	136 $\pm$ 2	100 $\pm$ 2
3	72.10	100.6	165 $\pm$ 3	95 $\pm$ 2
4	180.2	201.2	388 $\pm$ 6	102 $\pm$ 2

395.3  $\pm$  17 mg *per tablet* obtained in this study does not differ significantly (95% significance) from the 390.8  $\pm$  1.2 mg *per tablet* reported by Faria *et al.* [11].

#### 4 Concluding remarks

A fast CE method for the direct determination of EMB in tablets was established. The method is quite simple and only requires grinding the tablets, dilution to the desired concentration, and filtration prior to injection in the CE system. The resolution of EMB and of 2-AMB, the main degradation product of EMB were good enough for application in quality control of EMB in tablets. The calibration curves were linear up to 1000  $\mu\text{mol/L}$  (not shown), but for practical purposes calibrations were performed from 100 to 500  $\mu\text{mol/L}$ . The results for the determination of EMB in the same lot of tablets with the CE-UV method are in agreement at the 95% confidence level. The results presented in this study demonstrate that CE-C<sup>4</sup>D can be an interesting alternative for the determination of amino compounds, such as EMB, in pharmaceutical formulations.

*The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants no. 04/09079-0 and 06/07309-3), the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) for fellowships and financial support and Dr. Carol H. Collins for the English revision.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

#### 5 References

- [1] de Souza, M. V. N., *Curr. Opin. Pulmon. Med.* 2006, 12, 167–171.
- [2] de Souza, M. V. N., *Recent Pat. Anti-infect. Drug Discovery* 2006, 1, 33–44.
- [3] Lacroix, C., Cerutti, F., Nouveau, J., Menager, S., Lafont, O., *J. Chromatogr. B* 1987, 415, 85–94.
- [4] Gamberini, G., Ferioli, V., *Farmaco* 1988, 43, 357–363.
- [5] Chenevier, P., Massias, L., Gueylard, D., Farinotti, R., *J. Chromatogr. B* 1998, 708, 310–315.
- [6] Jiang, Z., Wang, H., Locke, D. C., *Anal. Chim. Acta* 2002, 456, 189–192.
- [7] Shintani, H., Polonsky, J. (Eds.), *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*, Blackie Academic & Professional, New York 1997.
- [8] Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, CRC Press, Boca Raton 2008.
- [9] Ragonese, R., Macka, M., Hughes, J., Petoez, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 995–1007.
- [10] Hsieh, Y., Whang, C., *J. Chromatogr. A* 2006, 1122, 279–282.
- [11] Faria, A. F., de Souza, M. V. N., Bruns, R. E., de Oliveira, M. A. L., *J. Chromatogr. A* 2008, 1202, 224–228.
- [12] da Silva, J. A. F., do Lago, C. L., *Anal. Chem.* 1998, 70, 4339–4343.
- [13] Zemann, A. J., Schnell, E., Volgger, D., Bonn, G. K., *Anal. Chem.* 1998, 70, 563–567.
- [14] Kuban, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2009, 30, 176–188.
- [15] Kuban, P., Hauser, P. C., *Anal. Chim. Acta* 2008, 607, 15–29.
- [16] Pumera, M., *Talanta* 2007, 74, 358–364.
- [17] Brito-Neto, J. G. A., da Silva, J. A. F., Blanes, L., do Lago, C. L., *Electroanalysis* 2005, 17, 1198–1206.
- [18] Brito-Neto, J. G. A., da Silva, J. A. F., Blanes, L., do Lago, C. L., *Electroanalysis* 2005, 17, 1207–1214.
- [19] da Silva, J. A. F., Guzman, N., do Lago, C. L., *J. Chromatogr. A* 2002, 942, 249–258.
- [20] Riekkola, M.-L., Jönsson, J. A., Smith, R. M., *Pure Appl. Chem.* 2004, 76, 443–451.
- [21] Lemke, T. L., in: Williams, D. A., Lemke, T. L. (Eds.), *Tuberculostatic Agents. In: Foye's Medicinal Chemistry*, Academic Press, New York 2002.

## APÊNDICE C

Talanta 82 (2010) 333–339



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs by capillary zone electrophoresis using direct UV detection

Adriana F. Faria<sup>a</sup>, Marcus V.N. de Souza<sup>b</sup>, Roy E. Bruns<sup>c</sup>, Marccone A.L. de Oliveira<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Cidade Universitária CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil<sup>b</sup> Instituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brazil<sup>c</sup> Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 March 2010

Received in revised form 15 April 2010

Accepted 17 April 2010

Available online 24 April 2010

## Keywords:

Capillary zone electrophoresis

Ethambutol

Isoniazid

Rifampicin

Pyrazinamide

Pharmaceutical formulation

## ABSTRACT

An alternative methodology for simultaneous analysis of ethambutol, isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis under UV direct detection with an analysis time of 8.0 min is proposed. Background running was based on the effective mobility curve of the analytes and an optimum separation condition was achieved using a 3<sup>3</sup> Box Behnken design, with Brij 35, Cu<sup>2+</sup> and acetic acid/sodium acetate buffer as factors. An electrolyte consisting of 50.0 mmol L<sup>-1</sup> of acetic acid/sodium acetate buffer, 12.5 mmol L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub>, and standard and sample solutions prepared in 2.00 mmol L<sup>-1</sup> of Brij 35 and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub> were optimized. After evaluating validation parameters, the method was successfully applied to the analysis of samples in the form of tablets and sachets.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Human tuberculosis (TB) is a communicable disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Nowadays, TB is transmitted by a single agent that operates worldwide. Its resurgence is due to epidemic HIV infection that dramatically increases transmission, morbidity and mortality of the disease. Tuberculosis is treated with a combination of ethambutol (ETB), isoniazid (ISO), rifampicin (RIF) and pyrazinamide (PYR) for periods of 6–9 months (Fig. 1). These four drugs are considered the best choice, since they combine maximum efficacy with an acceptable degree of toxicity [1,2].

The World Health Organization (WHO) recommends the combined use of multiple drugs to minimize the emergence of resistant strains. In order to follow this recommendation, fixed dose combinations (FDC) has been implemented, which take into account the association of two or more tuberculostatics in a single pharmaceutical formulation. FDC utilization increases treatment adherence, reduces the risk of resistance, lowers treatment costs and reduces errors in drug administration and distribution [3,4]. The combination of drugs has therapeutic advantages, but it brings about new research challenges for the pharmaceutical industry involving stability studies of combined drugs and their simultaneous analysis [5].

Several analytical methodologies have been developed in the last decade to analyze different FDCs. Among the methods most frequently used are UV-vis spectrophotometry combined with multivariate regression methods [6–9] and separation techniques. High performance liquid chromatography (HPLC) [10–13] and ultra performance liquid chromatography (UPLC) [14] with UV detection have been used for ISO, RIF and PYR quantification. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) was applied to the simultaneous determination of ETB, ISO, RIF, PYR and two metabolites, acetylisoniazide and 25-desacetyl rifampicine [15]. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using UV detection was used as an alternative method for ISO, RIF and PYR determinations [16].

In fact, HPLC is the first option in pharmaceutical analysis. However, to the best of our knowledge, all HPLC–UV methods reported in the literature have not considered the simultaneous determination of ETB, ISO, RIF and PYR due to the low ETB molar absorptivity, making their simultaneous analysis very challenging. Furthermore, a new drug association containing ETB, ISO, RIF and PYR in a single tablet (4-FDC) was recently made available by WHO for TB treatment, necessitating the development and optimization of quality control methods that are simple, efficient, robust, inexpensive, fast and suitable for routine analysis [17]. Within this context, this work proposes the development, optimization and validation of an alternative capillary electrophoresis (CE) methodology using direct UV detection at 262 nm for single or simultaneous deter-

\* Corresponding author. Tel.: +55 32 21023310; fax: +55 32 21023314.  
E-mail address: [marcone.oliveira@ufjf.edu.br](mailto:marcone.oliveira@ufjf.edu.br) (M.A.L. de Oliveira).

334

A.F. Faria et al. / Talanta 82 (2010) 333–339

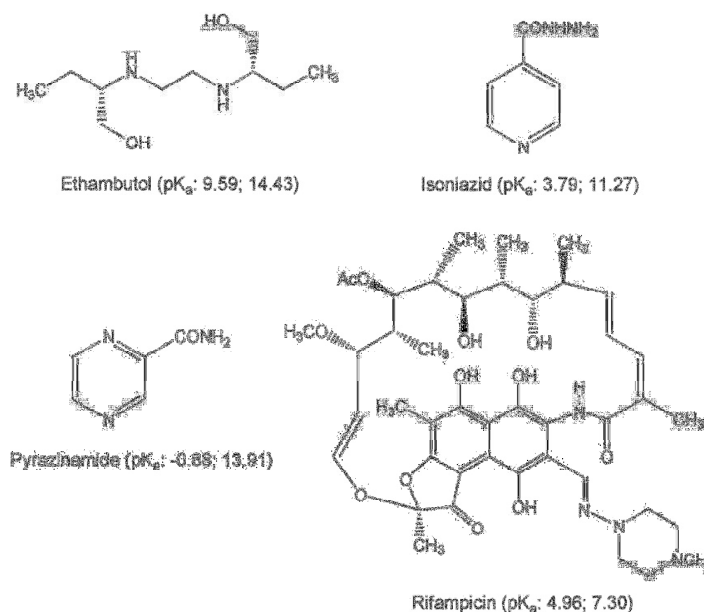


Fig. 1. ETB, ISO, RIF and PYR chemical structures.

mination of ETB, ISO, RIF and PYR in different pharmaceutical formulations.

## 1. Experimental

### 1.1. Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade. Acetic acid (HAc), sodium hydroxide (NaOH), copper II sulfate pentahydrate ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), sodium lauryl sulfate (SDS) and methanol (MeOH) were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil); polyoxyethylene 23 lauryl ether (Brij 35<sup>®</sup>) was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA); sparfloxacin (SPFLX) was purchased from Xiamen Mchem Pharma Group (Xiamen, China); ethambutol dihydrochloride (ETB·2HCl) was purchased from Genix Pharmaceutical Industry (Goiás, Brazil); isoniazid was purchased from Taizhou Jiangbei Chemical Factory (Taizhou, China), rifampicin was purchased from Xiamen Mchem Laboratories Ltd (Xiangyang, China) and pyrazinamide was purchased from AB Farm Química Ltda (Goiás, Brazil). The 4-FDC sachet was manufactured by Svizera Labs (Mumbai, India) and distributed by Svizera Europe BV (Almere, The Netherlands).

The  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  aqueous acetate buffer (HAc/NaAc) (pH 4.6) stock solution used in the present work was prepared as follows: mass corresponding to  $100.0 \text{ mmol L}^{-1}$  of acetic acid and  $50.0 \text{ mmol L}^{-1}$  of NaOH were weighed and dissolved in a volumetric flask of 100 mL. An aqueous stock solution of  $50.0 \text{ mmol L}^{-1}$  of  $\text{CuSO}_4$  was used to prepare the background electrolyte (BGE) and dilute standards and samples. Also an aqueous stock solution of  $50.0 \text{ mmol L}^{-1}$  of Brij 35 was used to prepare and dilute standard solutions and samples. The BGE solution was prepared by appropriate dilution of stock solutions of HAc/NaAc buffer (pH 4.6) and  $\text{CuSO}_4$ .

SPFLX stock solution (internal standard—IS) containing  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  was prepared in MeOH. Aqueous stock solutions containing  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  of ETB and ISO, and  $2000 \text{ mg L}^{-1}$  of PYR were independently prepared and stored in a refrigerator.

A stock aqueous solution containing  $60.0 \text{ mg L}^{-1}$  of RIF and  $2.00 \text{ mmol L}^{-1}$  of Brij 35 (maximum concentration capable of dissolving RIF without decomposition) was prepared daily. The compound was dissolved in an aqueous solution containing Brij 35 in an ultrasound bath for about 60 min.

### 1.2. Samples

#### 1.2.1. 4-FDC sample

For the 4-FDC sample, the solid contents of the sachet were weighed and then two procedures were performed:

- Minimum level of the standard addition curve (solution 1):  $13.8 \text{ mg}$  of the sachet sample corresponding to  $2.00 \text{ mg}$  RIF was weighed and transferred to a  $100 \text{ mL}$  volumetric flask. Then aliquots of Brij 35,  $\text{CuSO}_4$  and IS were added so that the final concentrations were  $2.00$ ,  $12.5$  and  $20.0 \text{ mmol L}^{-1}$  (fixed additive composition—FAC), respectively.
- Maximum level of the standard addition curve (solution 6):  $13.8 \text{ mg}$  of the sachet sample corresponding to  $2.00 \text{ mg}$  RIF and  $4.00 \text{ mg}$  of RIF standard were weighed and transferred to a  $100 \text{ mL}$  volumetric flask together with FAC. Aliquots of ETB, ISO and PYR were added to this volumetric flask so that the final concentrations were  $64.0$ ,  $32.0$  and  $95.0 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. The solutions were maintained under sonication in order to complete RIF dissolution and the final volume was adjusted with deionized water.

For the intermediate levels of the standard addition calibration curve, the following mixtures were made to a final volume of  $10.0 \text{ mL}$ : Level 2:  $8.75$  and  $1.25 \text{ mL}$ ; Level 3:  $7.50$  and  $2.50 \text{ mL}$ ; Level 4:  $5.00$  and  $5.00 \text{ mL}$  and level 5:  $2.50$  and  $7.50 \text{ mL}$  for solutions 1 and 6, respectively. Each procedure described above was performed six times, and the solutions were filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  Millipore filter (São Paulo, Brazil) to obtain clear solutions.

### 1.2.2. 2-FDC sample

For the combination of 150 mg RIF and 100 mg ISO, four capsules were opened and weighed. The weight corresponding to 20.0 mg of RIF was transferred to a 100 mL volumetric flask together with FAC. After 60 min of sonication, the volume was completed with deionized water and the solutions were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter to obtain clear solutions.

### 1.2.3. ETB and PYR samples

For the formulations containing 400 mg of ETB.2HCl or 500 mg of PYR, four tablets were weighed and homogeneously grounded to fine powders. The weight corresponding to 400 mg ETB or 500 mg of PYR was transferred to two different volumetric flasks of 25.0 mL and dissolved in deionized water. After 10 min of sonication the solutions were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore filter to obtain clear solutions. Then, a 750 or 800  $\mu\text{L}$  aliquot of the sample solution of ETB and PYR was transferred to two different volumetric flasks of 10.0 mL together with FAC and the final volume adjusted with deionized water.

For the 2-FDC, PYR and ETB samples, quantification by external calibration was performed in quadruplicate.

### 1.3. Calibration curves

External calibration curves were prepared for the four drugs in triplicate ( $n=3$ ) from the dilution of standard solutions and the addition of aliquots of Brij 35,  $\text{Cu}^{2+}$  and IS so that the concentration was 2.00, 12.5 and 20.0  $\text{mmol L}^{-1}$  respectively. The concentration ranges were: ETB from 8.00 to 64.0  $\text{mg L}^{-1}$ , ISO from 4.00 to 32.0  $\text{mg L}^{-1}$ , RIF from 5.00 to 40.0  $\text{mg L}^{-1}$  and PYR from 12.0 to 95.0  $\text{mg L}^{-1}$ . These curves were used to quantify the ETB, ISO and 2-FDC samples.

Calibration curves for standard addition were prepared, six replicates for the sample of 4-FDC as shown in sample preparation.

### 1.4. Instrumentation

The experiments involving separation optimization were conducted in a CE system (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipped with a DAD set at 262 nm, a temperature control device, maintained at 25  $^{\circ}\text{C}$ , and data acquisition and treatment software (HP ChemStation, rev A.06.01). Samples were injected hydrodynamically (30 mbar 5 s) and the electrophoretic system was operated under normal polarity and constant voltage conditions of +25.0 and +22.0 kV. For all the experiments, a 48.5 cm (40.0 cm effective length)  $\times$  75  $\mu\text{m}$  ID  $\times$  375  $\mu\text{m}$  OD fused-silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) was used.

### 1.5. Analytical procedures

Conditioning of new capillaries was carried out by a pressure flush of 1.00  $\text{mol L}^{-1}$  NaOH solution (30 min), deionized water (5 min) and electrolyte solution (10 min). In between runs, the capillary was replenished with 0.200  $\text{mol L}^{-1}$  NaOH solutions (2 min), deionized water (2 min) and fresh electrolyte solution (3 min, pressure flush).

## 2. Results and discussion

### 2.1. Background electrolyte optimization

By analyzing the effective mobility ( $\mu_{\text{eff}}$ ) curve [18] in Fig. 2, RIF and ISO are found to present a cationic feature within the 0–5.5 pH and the 0–8 ETB ranges, while PYR presents neutral behavior within virtually all intervals. Initially, a possible analysis by CE would be to consider the analytes as a cationic or neutral species.

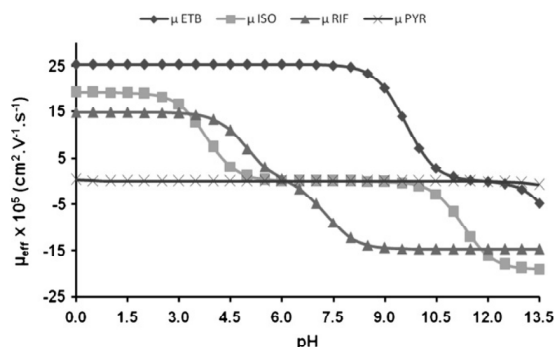


Fig. 2. Effective mobility curve for ETB, ISO, RIF and PYR.

As a cation, the problem would be PYR in view of the results above. As regards the MEKC mode, the alternative analysis would be to use sodium dodecyl sulfate (SDS) as an anionic surfactant in pH of about 9.0, as described by Acedo-Valenzuela et al. [16]. However, the main problem in these approaches is due to ETB presenting low molar absorptivity in the UV range, which would require a boundary condition such as an additive chromophore in the electrolyte system in order to achieve indirect UV detection or a derivatization reaction to form an adduct chromophore. Fig. 3 shows the electronic spectra of ETB, ISO, RIF and PIR in aqueous solution each at the 10.0  $\text{mg L}^{-1}$  concentration level. However, an interesting alternative methodology would be a complexation study of ETB with copper (II) performed by Jiang et al. [19] using HPLC and adapted by Faria et al. [20] for ETB and its impurity analysis by CZE. For both approaches it was possible to form ETB complexes with copper and achieve good UV signals at 262 nm.

Taking into account the previous discussion, a study using a  $3^3$  Box-Behnken design was performed to optimize a background electrolyte in order to achieve simultaneous separation of ETB, ISO, RIF and PYR under UV detection through on-column ETB derivatization. The factors selected were Brij 35,  $\text{Cu}^{2+}$  and HAC/NaAc buffer. Brij 35 was selected to verify which concentration level would be capable of preventing RIF degradation, because RIF undergoes acid hydrolysis resulting in 3-formylrifampicin, which is two times faster in the presence of ISO [21]. Furthermore, 3-formylrifampicin reacts with ISO to form isonicotinil hydrazone, which is catalyzed by PYR and ETB [5,22]. According to Jindal et al. the use of surfactants in the preparation of RIF solution increases its solubility in water and

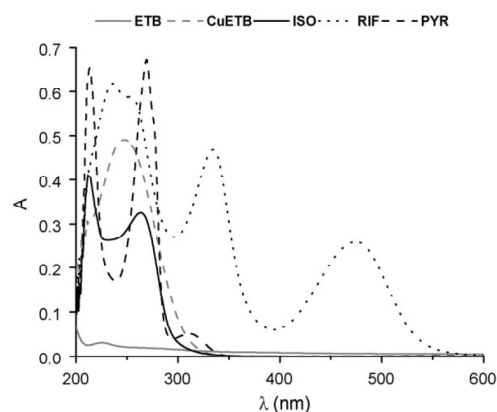


Fig. 3. Electronic spectra for ETB, ISO, RIF, PYR and CuETB.

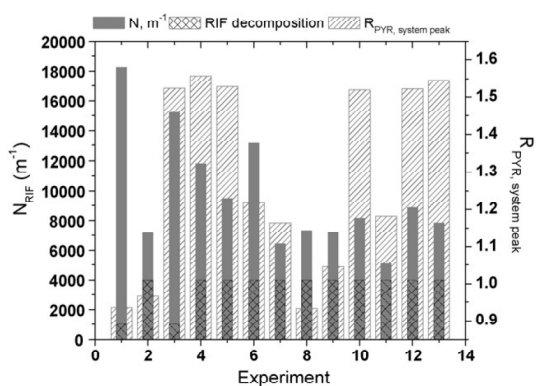
336

A.F. Faria et al. / Talanta 82 (2010) 333–339

**Table 1**  
3<sup>3</sup> Box-Behnken design for electrolyte optimization.

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Buffer HAc/NaAc	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0	0	0
Cu <sup>2+</sup>	-1	-1	1	1	0	0	0	0	-1	1	-1	1	0
Brij 35	0	0	0	0	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0

HAc/NaAc buffer (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 50.0, (0) 60.0, (1) 70.0; Cu<sup>2+</sup> (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 7.50, (0) 10.0, (1) 12.5; Brij 35 (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 1.50, (0) 2.00, (1) 2.50.



**Fig. 4.** Plot containing resolution between PYR and system peak, lack (1000) or presence (4000) of RIF decomposition and theoretical plate by meter obtained for 3<sup>3</sup> Box-Behnken design performed for electrolyte optimization.

inhibits its degradation [23]; Cu<sup>2+</sup> was used as an additive to form a chromophoric adduct with ETB and a cationic adduct with PYR; and the HAc/NaAc buffer was used to maintain the pH within the 4.5 and 5.0 pH range so that copper precipitation does not occur [19]. Table 1 shows the contrast matrix for the 3<sup>3</sup> Box-Behnken design. Instrumental parameters such as voltage, cartridge temperature, detection wavelength, injection time and capillary length were maintained constant. Standard mixtures for each experiment were diluted in aqueous solution containing Brij 35 and CuSO<sub>4</sub> to obtain the concentration levels described in Table 1. The monitored responses were the resolution between PYR and the system peak (flow electroosmotic peak—EOF) and RIF plate number (*N*).

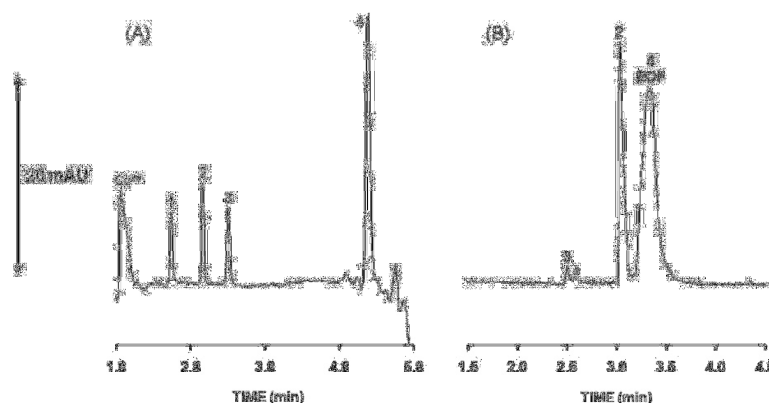
By analyzing the 3<sup>3</sup> Box-Behnken design results in Fig. 4, experiment 3 was the only one found to simultaneously exhibit resolution minimum of 1.50, lack of RIF decomposition and higher theoretic

cal plates. Comparing experiment 1 with 3, that differs only in its CuSO<sub>4</sub> concentration level, 7.50 mmol L<sup>-1</sup> instead of 12.5 mmol L<sup>-1</sup>, co-migration of the PYR peak together with the electroosmotic flow (EOF) peak could be observed. The explanation for this behavior is that the 7.50 mmol L<sup>-1</sup> of Cu<sup>2+</sup> is not sufficient to produce an effective positive charge for PYR capable of producing the migrating shift of the EOF peak. Moreover, by comparing experiment 4 with 3, whose single difference is the level of buffer concentration, there was increased RIF peak deformation, which can be attributed to the occurrence of on-column compound degradation due to the antagonistic effect of the concentration level of this buffer. Finally, comparing experiment 2 with 3, for which only the level of surfactant remained constant, increased RIF peak deformation and PYR co-migration together with the EOF peak were observed. Thus, it can be concluded that there is a correlation between the buffer and the Cu<sup>2+</sup> concentration for a definite level of surfactant that delimits the separation performance in the context of avoiding RIF degradation and PYR co-migration with the EOF peak. Therefore, quantitative and qualitative analysis show that the electrolyte consisting of 50.0 mmol L<sup>-1</sup> of HAc/NaAc buffer (pH 4.6) and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub>, and standard and sample solution prepared in 2.00 mmol L<sup>-1</sup> of Brij 35 and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub> can be used as an optimum condition for drug determination.

After method optimization, a fast procedure was performed in order to confirm the interaction among RIF and PYR with Cu<sup>2+</sup>. Initially, an experiment was carried out using the CE optimal conditions, but without the addition of Cu<sup>2+</sup>. By comparing the two electropherograms in Fig. 5, it was possible to show that RIF presents decomposition in absence of Cu<sup>2+</sup> while PYR forms a cationic complex in presence of Cu<sup>2+</sup>.

2.2. Internal standard selection

After electrolyte system optimization and standard preparations, the need for using an internal standard (IS) was verified.



**Fig. 5.** Standard mixture separations of (1) ETB, (2) ISO, (3) RIF, (4) PYR and (\*) RIF degradation product. (A) electropherogram obtained at the optimized conditions: electrolyte: 50.0 mmol L<sup>-1</sup> HAc/NaAc buffer and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>, hydrodynamic injection: 30 mbar 5 s, voltage: +22.0 kV, direct detection at 262 nm, capillary: 75 μm × 48.5 cm (40.0 cm effective length); (B) electropherogram obtained under the same experimental conditions in letter (A), but without the addition of Cu<sup>2+</sup> to the electrolyte system and standard dilutions.

**Table 2**  
Statistical results for linearity, selectivity, precision, accuracy and LOQ.

Linearity and selectivity						Precision (%RSD)		%Recovery	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )
Curve	Slope	Intercept	r	F <sub>calculated</sub>	Area	Time			
FTB	EC	0.477 ± 0.009	- 0.0272 ± 0.0275	0.999	3.00	3.61	0.215	98.7	9.65
	SAC	0.476 ± 0.008	0.618 ± 0.014	0.999		2.53	0.362		
ISO	EC	0.921 ± 0.019	- 0.0671 ± 0.0294	0.999	2.96	3.17	1.61	97.8	2.50
	SAC	0.922 ± 0.018	0.198 ± 0.017	0.999		2.10	0.508		
RIF	EC	0.874 ± 0.007	- 0.0443 ± 0.0130	0.999	3.00	3.29	0.625	100.4	2.09
	SAC	0.865 ± 0.017	1.08 ± 0.02	0.999		1.77	0.609		
PYR	EC	3.18 ± 0.05	-0.179 ± 0.210	0.999	2.99	3.87	2.31	98.4	4.79
	SAC	3.22 ± 0.05	8.80 ± 0.13	0.999		1.78	1.94		

EC: external calibration curve (n = 3); SAC: standard addition calibration curve (n = 6); F<sub>0.05; f1=4; f2=12</sub> = 3.26.

Therefore, some experiments were performed and SPFLX was selected as the IS since it presents chemical behavior and effective mobility similar to the analytes of interest (not shown). In order to optimize peak resolution between FTB and SPFLX (adjacent peak pair), a study applying +20.0, +22.0, +25.0 and +27.0 kV voltages was performed, which presented resolutions of 1.54, 1.86, 1.25 and 1.00 respectively. Therefore, the voltage of + 22.0 kV was selected because it showed an appropriate R<sub>ETB,SPFLX</sub> and required less analysis time when compared with +20.0 kV.

2.3. Study of the stability of electrolyte solutions and RIF

After optimization of the experimental conditions, a study to evaluate electrolyte system stability was carried out. The mixture of standards containing ETB, ISO, RIF and RIP was subjected to 40 consecutive injections using the same electrolyte system. Then, the electrolyte solutions were exchanged for a fresh solution and the standard mixture resubmitted to 40 consecutive injections. Signs of distortion of the ISO peak were observed that from the 33rd run. Therefore, replacement of the electrolyte at the 30th injection is recommended. Furthermore, the aqueous RIF solution mixed with 2.00 mmol L<sup>-1</sup> of Brij 35 and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> of CuSO<sub>4</sub> was found to be stable since there was no RIF decomposition for a 18-h monitoring.

2.4. Validation parameters

Initially, a system suitability study was performed by twenty-five consecutive injections of the standard mixture using the internal standard. Relative standard deviations (RSD) for repeatability in area and migration time and adjacent peak pair resolutions (RS) were calculated [24,25]. The precision in area and in migration time was below 3.60% and 1.45%, respectively. The adjacent pair resolutions were 1.94 for ETB and SPFLX, 2.60 for SPFLX and ISO, 3.14 for ISO and RIF, and 13.9 for RIF and PYR. Therefore, the system was suitable for carrying out the validation procedure.

The method selectivity was evaluated by comparing the slopes of the addition calibration curves with the external calibration curves [25,26]. The linearity was evaluated using the correlation coefficient (r) and the application of an *a priori* linearity hypothesis test [23,27] (Eq. (1)). The equations of the curves presented in Table 2 were obtained by regression of ratio analyte area/IS area versus ratio analyte concentration/IS concentration. Since the slope values are very similar and all the F<sub>calculated</sub> values are smaller than the F<sub>critical</sub> value, which is 3.26, the method presented acceptable selectivity and linearity results (Table 2).

$$F_{\text{calculated}} = \frac{S_{yx}^2}{S_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p - 2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^m (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m - p)} \quad (1)$$

where m<sub>i</sub> is the number of measurements of the i<sup>th</sup> replicate; p is the number of calibration points; m is the pxmi product.

Precision in area and migration time was evaluated for the six levels of the external calibration and standard addition curves. The highest %RSD in area and in migration time for the external calibration and standard addition curves are shown in Table 2.

Accuracy was assessed by calculating recovery and by performing the t test for the levels determined for the different drugs and the contents declared by the manufacturers [25,28]. Recovery was evaluated for the 4-FDC sample in five concentration levels, which is still being tested and may not be consumed. The percentage mean is shown in Table 3. The values were found to be in agreement with the recommended range of 100.0 ± 5.0%. Quantification was performed for the 4-FDC sample and commercially available samples, such as 2-FDC (ISO–RIF) and formulations containing only ETB or PYR (Table 3). The quantification result for the 4-FDC sample presented high discrepancy compared to the declared content, which can be explained by the fact that it is a sample under testing and not recommended for administration. The variations in the drug levels

**Table 3**  
Sample quantification results.

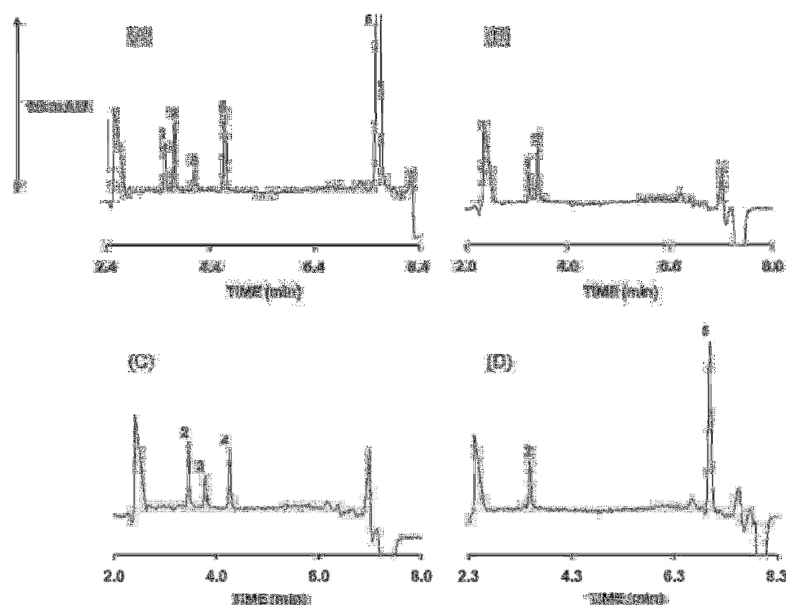
Drug	Sample	Label claim (mg)	Amount found (mg)	t <sub>calculated</sub>
ETB	A <sup>a</sup>	825.0	628.2 ± 4.5	106.4
	B <sup>b</sup>	400.0	400.4 ± 1.8	
ISO	A	225.0	145.0 ± 0.9	219.6
	C <sup>b</sup>	100.0	99.13 ± 2.36	
RIF	A	450.0	579.4 ± 5.2	61.01
	C	150.0	152.2 ± 2.7	
PYR	A	1200	1300 ± 14	17.50
	D <sup>b</sup>	500.0	500.1 ± 1.5	

<sup>a</sup>n = 6; <sup>b</sup>n = 4; t<sub>0.05; 3</sub> = 2.353; t<sub>0.05; 5</sub> = 2.015; A: 4-FDC; B: ETB; C: 2-FDC (ISO-RIF); D: PYR.



338

A.F. Faria et al. / Talanta 82 (2010) 333–339



**Fig. 6.** Sample electropherograms: (A) 4-FDC, (B) ETB (C) 2-FDC (ISO-RIF), (D) PYR, where (1) ETB, (2) SPFLX-PI, (3) ISO, (4) RIF and (5) PYR. Optimum experimental conditions: electrolyte: 50.0 mmol L<sup>-1</sup> HAC/NaAc buffer and 12.5 mmol L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>, hydrodynamic injection: 30 mbar 5 s, voltage: +22.0 kV, direct detection at 262 nm, capillary: 75  $\mu$ m  $\times$  48.5 cm (40.0 cm effective length).

**Table 4**  
3<sup>3</sup> Box-Behnken design for robustness evaluation.

Experiments	Brij 35	Cu <sup>2+</sup>	Voltage	R <sub>ETB, SPFLX</sub>	R <sub>PYR, System peak</sub>	N <sub>RIF</sub> ( $\times 10^4$ ) m <sup>-1</sup>
1	-1	-1	0	1.86	2.77	6.69
2	1	-1	0	1.84	2.87	6.43
3	-1	1	0	1.78	2.81	6.82
4	1	1	0	1.75	3.12	6.66
5	-1	0	-1	2.12	4.40	6.71
6	1	0	-1	1.82	3.86	6.96
7	-1	0	1	1.92	3.64	7.19
8	1	0	1	2.01	3.80	6.97
9	0	-1	-1	1.81	3.02	6.96
10	0	1	-1	1.76	3.48	7.23
11	0	-1	1	1.90	3.12	7.00
12	0	1	1	1.88	3.59	6.87
13	0	0	0	1.92	3.34	6.89
14	0	0	0	1.93	3.50	6.79
15	0	0	0	1.96	3.48	6.77

Brij 35 (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 1.80, (0) 2.00, (1) 2.20; Cu<sup>2+</sup> (mmol L<sup>-1</sup>): (-1) 12.0, (0) 12.5, (1) 13.0; voltage (kV): (-1) 21.5, (0) 22.0, (1) 22.5.

can be explained by the difficulty of maintaining formulation quality, owing to problems such as a change in the RIF crystalline form, adsorption of drug ingredients, drug addition order and formulation decomposition [5,22]. However, based on recovery values, the method has been shown to be effective for quantitative monitoring of these combined drugs. The other samples, already commercially available, had levels close to those reported, which was demonstrated by the  $t_{\text{calculated}}$  values that are smaller than the  $t_{\text{critical}}$  value, indicating no significant differences between the observed levels. Fig. 6 shows the electropherograms for the analyzed samples.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated from the 2-FDC (ISO-RIF) electropherograms and for formulations containing only ETB or PYR, taking into account signal-noise ratios equal to 3 and 10, respectively [24,25]. These values were considered suitable for pharmaceutical formulations (Table 2).

Robustness was evaluated executing a 3<sup>3</sup> Box-Behnken design using Brij 35, Cu<sup>2+</sup> and applied voltage as factors. These factors

were selected in order to evaluate method robustness for three critical analytical characteristics: resolution between the PYR and EOF peaks, RIF decomposition and resolution between ETB and SPFLX. Table 4 shows the results and experimental description performed using a 3<sup>3</sup> Box-Behnken design, where the three experiments at central point are in triplicate for calculating experimental error.

Robustness results are presented in Table 4. Small variations seen in the CuSO<sub>4</sub> concentration and the applied voltage do not interfere with resolution between the PYR and EOF peaks and resolution between ETB and SPFLX. Additionally, no decomposition was detected in any of the 15 experiments performed, because the N of RIF presented negligible variations ( $6.68 \times 10^4 \pm 0.21$ ). Therefore, the decomposition of RIF does not occur with small variations in the concentration of Brij 35 and Cu<sup>2+</sup>. The estimated regression models do not present lack of fit at the 95% confidence interval since the  $F_{\text{calculated}}$  values obtained by ANOVA for R<sub>ETB, SPFLX</sub>, R<sub>PYR, System peak</sub> and N<sub>RIF</sub>, 8.07, 11.48 and 9.14, respectively, were smaller than

the  $F_{0.05;3,2}$  value which is 19.33, characterizing robustness for the range investigated.

### 3. Conclusions

An alternative methodology for the simultaneous analysis of ETB, ISO, RIF and PYR in pharmaceutical formulations using Cu(II) complexation by CZE under direct UV detection was demonstrated. The method presented the following advantages: ability to simultaneously analyze the four drugs using a UV detection system, use of a simple and cheap electrolyte system; sample preparation without off-column derivatization steps and short analysis time. Therefore, CE proved suitable for routine analysis in the quality control of these drugs.

### Acknowledgments

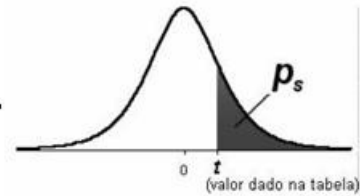
The authors wish to acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—476386/2007-1 and 300593/2008-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais of Brazil (FAPEMIG—CEX-APQ 1906-502/07, CEX APQ 01837/08) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for fellowships and financial support.

### References

- [1] R.G. Ducati, A. Ruffino-Neto, L.A. Basso, D.S. Santos, Mem. Inst. Osvaldo Cruz 101 (2006) 607.
- [2] M.V.N. Souza, Curr. Opin. Pulm. Med. 12 (2006) 167.
- [3] WHO, World Health Organization, Switzerland, Geneva, 2001, [http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/TDR\\_TB\\_4FDC.02.1.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/TDR_TB_4FDC.02.1.pdf).
- [4] S. Agrawal, K.J. Kaur, I. Singh, S.R. Bhade, C.L. Kaul, R. Panchangula, Int. J. Pharm. 233 (2002) 169.
- [5] H. Bhutani, S. Singh, K.C. Jindal, A.K. Chakraborti, J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005) 892.
- [6] S.A. Benetton, E.R.M. Kedor-Hackmann, M.I.R.M. Santoro, V.M. Borges, Talanta 47 (1998) 639.
- [7] H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 681.
- [8] A. Espinosa-Mansila, M.I. Acedo-Valenzuela, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, F. Cañada Cañada, Anal. Chim. Acta 427 (2001) 129.
- [9] J. Madan, A.K. Dwivedi, S. Singh, Anal. Chim. Acta 538 (2005) 345.
- [10] R. Panchagnula, A. Sood, N. Sharda, K. Kaur, C.L. Kaul, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1999) 1013.
- [11] A. Espinosa-Mansila, M.I. Acedo-Valenzuela, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada Cañada, F. Salinas López, Talanta 58 (2002) 273.
- [12] E. Calleri, E. De Lorenzi, S. Furlanetto, G. Massolini, G. Caccialanza, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 1089.
- [13] S. Unsalan, M. Sancar, B. Bekce, P.M. Clark, T. Karagoz, F.V. Izzettin, S. Rollas, Chromatographia 61 (2005) 595.
- [14] D.T.T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.L. Veuthey, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1050.
- [15] S.H. Song, S.H. Jun, K.U. Park, Y. Yoon, J.H. Lee, J.Q. Kim, J. Song, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 1331.
- [16] M.I. Acedo-Valenzuela, A. Espinosa-Mansila, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada Cañada, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 432.
- [17] [http://www.who.int/bulletin/archives/79\(1\)61.pdf](http://www.who.int/bulletin/archives/79(1)61.pdf).
- [18] B.A. Williams, G. Vigh, Anal. Chem. 68 (1996) 1174.
- [19] Z. Jiang, H. Wang, D.C. Locke, Anal. Chim. Acta 456 (2002) 189.
- [20] A.F. Faria, M.V.N. De Souza, R.E. Bruns, M.A.L. De Oliveira, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 224.
- [21] C.J. Shishoo, S.A. Shah, S.S. Rathod, J.S. Savale, J.S. Kotecha, P.B. Shah, Int. J. Pharm. 190 (1999) 109.
- [22] S. Singh, T.T. Mariappan, N. Sankar, N. Sarda, B. Singh, Int. J. Pharm. 228 (2001) 5.
- [23] K.C. Jindal, R.S. Chaudhary, A.K. Singla, S.S. Gangwal, S. Khanna, J. Pharm. Biomed. Anal. 12 (1994) 493.
- [24] M. Ribani, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, L.F.C. Melo, Quim. Nova 27 (2004) 771.
- [25] A.F. Faria, M.V.N. De Souza, M.A.L. De Oliveira, J. Braz. Chem. Soc. 19 (2008) 389.
- [26] United States Pharmacopeia/National Formulary (USP 29-NF 24), 2006, <http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0.c1225.html>.
- [27] K. Danzer, L.A. Currie, Pure Appl. Chem. 70 (1998) 993.
- [28] ICH Guideline, Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodologies. 2005. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>.

## ANEXO A

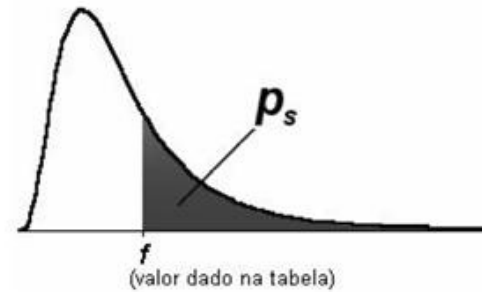
## DISTRIBUIÇÃO t-STUDENT UNICAUDAL



g.l.	$P_s$						
	0,200	0,150	0,100	0,050	0,025	0,010	0,005
1	1,376	1,963	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66
2	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
35	0,852	1,052	1,306	1,690	2,030	2,438	2,724
40	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
50	0,849	1,047	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678
60	0,848	1,045	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
80	0,846	1,043	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639
100	0,845	1,042	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626
1	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,327	2,576

ANEXO B

DISTRIBUIÇÃO F



$p$		Degrees of freedom in numerator (df1)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	12	24	1000	
Degrees of freedom in denominator (df2)	1	0.100	39.88	49.50	53.59	55.83	57.24	58.20	58.91	59.44	60.71	62.00	63.30
	0.050	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	243.9	249.1	254.2	254.2
	0.025	647.6	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.6	976.7	997.3	1017.8	1017.8
	0.010	4052	4999	5404	5624	5764	5859	5928	5981	6107	6234	6363	6363
	0.001	405312	499725	540257	562668	576496	586033	593185	597954	610352	623703	636101	636101
	2	0.100	8.53	9.00	9.16	9.24	9.29	9.33	9.35	9.37	9.41	9.45	9.49
	0.050	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.41	19.45	19.49	19.49
	0.025	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.41	39.46	39.50	39.50
	0.010	98.50	99.00	99.16	99.25	99.30	99.33	99.36	99.38	99.42	99.46	99.50	99.50
	0.001	998.38	998.84	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31	999.31
	3	0.100	5.54	5.46	5.39	5.34	5.31	5.28	5.27	5.25	5.22	5.18	5.13
	0.050	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.74	8.64	8.53	8.53
	0.025	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.34	14.12	13.91	13.91
	0.010	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.87	27.49	27.05	26.60	26.14	26.14
	0.001	167.08	148.49	141.10	137.08	134.58	132.83	131.61	130.62	128.32	125.93	123.52	123.52
	4	0.100	4.54	4.32	4.19	4.11	4.05	4.01	3.98	3.95	3.90	3.83	3.78
	0.050	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	5.91	5.77	5.63	5.63
	0.025	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.75	8.51	8.26	8.26
	0.010	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.37	13.93	13.47	13.47
	0.001	74.13	61.25	56.17	53.43	51.72	50.52	49.65	49.00	47.41	45.77	44.09	44.09
5	0.100	4.06	3.78	3.62	3.52	3.45	3.40	3.37	3.34	3.27	3.19	3.11	
0.050	6.81	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.68	4.53	4.37	4.37	
0.025	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.52	6.28	6.02	6.02	
0.010	18.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	9.89	9.47	9.03	9.03	
0.001	47.18	37.12	33.20	31.08	29.75	28.83	28.17	27.65	26.42	25.13	23.82	23.82	
6	0.100	3.78	3.46	3.29	3.18	3.11	3.05	3.01	2.98	2.90	2.82	2.72	
0.050	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.00	3.84	3.67	3.67	
0.025	8.81	7.26	6.60	6.23	5.99	5.82	5.70	5.60	5.37	5.12	4.86	4.86	
0.010	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.72	7.31	6.89	6.89	
0.001	35.51	27.00	23.71	21.92	20.80	20.03	19.46	19.03	17.99	16.90	15.77	15.77	
7	0.100	3.59	3.26	3.07	2.96	2.88	2.83	2.78	2.75	2.67	2.58	2.47	
0.050	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.57	3.41	3.23	3.23	
0.025	8.07	6.54	5.89	5.52	5.29	5.12	4.99	4.90	4.67	4.41	4.15	4.15	
0.010	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.47	6.07	5.66	5.66	
0.001	29.25	21.69	18.77	17.20	16.21	15.52	15.02	14.63	13.71	12.73	11.72	11.72	
8	0.100	3.46	3.11	2.92	2.81	2.73	2.67	2.62	2.59	2.50	2.40	2.30	
0.050	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.28	3.12	2.93	2.93	
0.025	7.57	6.06	5.42	5.05	4.82	4.65	4.53	4.43	4.20	3.95	3.68	3.68	
0.010	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.67	5.28	4.87	4.87	
0.001	25.41	18.49	15.83	14.39	13.48	12.86	12.40	12.05	11.19	10.30	9.36	9.36	
9	0.100	3.36	3.01	2.81	2.69	2.61	2.55	2.51	2.47	2.38	2.28	2.16	
0.050	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.07	2.90	2.71	2.71	
0.025	7.21	5.71	5.08	4.72	4.48	4.32	4.20	4.10	3.87	3.61	3.34	3.34	
0.010	10.56	8.02	6.99	6.42	6.08	5.80	5.61	5.47	5.11	4.73	4.32	4.32	
0.001	22.86	16.39	13.90	12.56	11.71	11.13	10.70	10.37	9.57	8.72	7.84	7.84	