

Artigo

Validação de Método Analítico para a Determinação de Tuberculostáticos em Formulação de Dose Fixa Combinada por Eletroforese Capilar

Castex, M. G.; Abrantes, S. M. P.*

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (6), 2237-2256. Data de publicação na Web: 4 de dezembro de 2017

<http://rvq.sbg.org.br>

Analytical Method Validation for Determination of Tuberculostatics in Fixed Dose Combination by Capillary Electrophoresis

Abstract: The World Health Organization (WHO) has proposed a standard therapeutic protocol for tuberculosis utilizing combinations of drugs formulated in fixed and appropriated doses according to the phases of the disease and weight range of patients. This guidance aimed to reduce the occurrence of new cases and to minimize the development of resistance to the drugs involved in this therapy. In these combinations, isoniazid and rifampicin are always present. At the same time, to fight such a disease like tuberculosis, which is funded by the Brazilian public health system, the availability of analytic methods that are reliable, fast, low cost and less polluting, compared to liquid chromatography (HPLC), shows to be extremely important to the public budget, particularly in Brazil, that has achieved the sixth position in the world's drug consumer's market. Capillary Electrophoresis (CE) is an analytical tool that has been rapidly growing in the last two decades for being a technique of high performance and low cost requiring low volume samples and little or no use of organic solvents further on low environmental impact. This work was carried out a method validation for the analysis of isoniazid and rifampicin in tablets of Fixed Dose Combination (FDC) by CE. The used analytical method proved to be useful for quantitative determination of isoniazid and rifampicin in FDC tablets. It was proved that the working range is linear for the concentration interval of 200 to 700 µg/mL and 500 to 1000 µg/mL for isoniazid and rifampicin, respectively. The matrix of DFC 2 in 1 tablet does not interfere in the results for the analysis of isoniazid and rifampicin (no matrix effect). Method repeatabilities for rifampicin and isoniazid of 3.17 % and 2.64 %, respectively, were acceptable when compared by the acceptance criterion of 3.30 % for variation coefficient of repeatability calculated by Horwitz equation. Intermediate precisions of isoniazid and rifampicin of 1.41 % and 1.67 %, respectively, were acceptable when compared to the variation coefficients of reproducibility of 1.97 % and 1.67 % for isoniazid and rifampicin, respectively, calculated by Horwitz equation. Recuperation of 95.00 % for isoniazid and 97.59 % for rifampicin were acceptable for the criteria of acceptance of the European Community of 80 to 110 % for the concentration studied.

Keywords: Isoniazid; Rifampicin; Capillary Electrophoresis; Validation.

Resumo

A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs o protocolo de tratamento quimioterápico padrão para tuberculose utilizando associações de fármacos formulados em doses fixas e adequadas conforme a fase da doença e faixa de peso do paciente. Essa medida visou reduzir a ocorrência de novos casos da doença e minimizar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos envolvidos na terapia. Nessas associações, a isoniazida e a rifampicina estão sempre presentes. Ao mesmo tempo, para o combate de uma doença como a tuberculose, cujo custeio se faz gratuitamente pelo sistema público de saúde brasileiro, a disponibilização de métodos analíticos confiáveis, rápidos, de baixo custo e menos poluentes, comparados à cromatografia líquida (CLAE), mostra-se extremamente interessante ao orçamento público, particularmente no Brasil, que galgou a sexta posição no ranking dos maiores consumidores de medicamentos no mundo. Eletroforese capilar (EC) é uma ferramenta analítica que vem se desenvolvendo rapidamente nas últimas duas décadas, por ser uma técnica de alto desempenho e baixo custo, requerer menor volume de amostra e exigir pequena ou nenhuma utilização de solventes orgânicos, além de baixo impacto ambiental. Neste trabalho realizou-se a validação de um método para análise de isoniazida e rifampicina em comprimidos de Doses Fixas Combinadas (DFC) por EC. O método analítico empregado provou ser aplicável para determinação quantitativa de isoniazida e rifampicina nos comprimidos de DFC. Comprovou-se que a faixa de trabalho é linear para o intervalo de concentração de 200 a 700 µg/mL e 500 a 1000 µg/mL para isoniazida e rifampicina, respectivamente. A matriz do comprimido DFC 2 em 1 não influencia nas respostas obtidas para análise de isoniazida e rifampicina (não tem efeito matriz). As repetibilidades do método para rifampicina e isoniazida de 3,17 % e 2,64 %, respectivamente, foram aceitáveis quando comparadas com o critério de aceitação de 3,30 % obtido para o coeficiente de variação de repetibilidade calculado pela equação de Horwitz. As precisões intermediárias da isoniazida e rifampicina de 1,41 % e 1,67 %, respectivamente, foram aceitáveis quando comparadas aos coeficientes de variação de reprodutibilidade de 1,97 % e 1,67 % para isoniazida e rifampicina, respectivamente, calculados pela equação de Horwitz. A taxa de recuperação de 95,00 % para isoniazida e 97,59 % para rifampicina foram aceitáveis para os critérios da Comunidade Europeia, de 80 a 110 % para a concentração estudada.

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

* Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Av. Brasil 4365, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

 shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20170133](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170133)

Validação de Método Analítico para a Determinação de Tuberculostáticos em Formulação de Dose Fixa Combinada por Eletroforese Capilar

Monica G. Castex,^a Shirley de M. P. Abrantes^{b,*}

^a Laboratório Químico Farmacêutico do Exército, R. Licínio Cardoso 96, Triagem, CEP 20911-015, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

^b Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Av. Brasil 4365, Manguinhos, CEP 21040-900, Rio de Janeiro-RJ, Brazil.

* shirley.abrantes@incqs.fiocruz.br

Recebido em 22 de dezembro de 2016. Aceito para publicação em 30 de novembro de 2017

1. Introdução

- 1.1. Tuberculose
- 1.2. O controle da tuberculose
- 1.3. Tratamento
- 1.4. Fármacos do medicamento DFC
- 1.5. Métodos analíticos de compêndios oficiais
- 1.6. Eletroforese capilar (EC)
- 1.7. Validação

2. Metodologia

- 2.1. Equipamentos
- 2.2. Amostras e reagentes
- 2.3. Soluções
- 2.4. Preparo da Amostra de DFC 2 em 1
- 2.5. Condições analíticas de eletromigração estudadas no modo eletroforese capilar em zona livre (CZE)
- 2.6. Condicionamento do capilar
- 2.7. Validação intralaboratorial

3. Resultados e discussão

4. Conclusão

1. Introdução

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta principalmente os pulmões, podendo também atingir outros órgãos do corpo, como os rins, meninges (membranas que envolvem o cérebro), gânglios, intestinos, ossos, ou outros locais do organismo. É causada por uma bactéria em forma de pequenos bastões cujo nome científico é *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK), em homenagem ao seu descobridor, o cientista alemão Robert Koch. Outras espécies de micobactérias também podem causar a tuberculose, são elas: *Mycobacterium bovis*, *M. africanum* e *M. microti*.^{1,2,3} A transmissão direta ocorre através do ar quando uma pessoa inala pequenas gotas de saliva, contendo o BK, expelidas por um indivíduo acometido pela TB pulmonar ao falar, tossir ou espirrar. A transmissão da doença só ocorre pelo ar, portanto não se transmite TB pelo uso comum de pratos, talheres, roupas de cama, toalhas e vaso sanitário, nem pelo contato com o sangue ou secreções sexuais. Contudo, a má alimentação, falta de higiene, tabagismo, alcoolismo, pessoas imunodepressivas, como portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), diabetes, insuficiência renal crônica, favorece o estabelecimento da doença.^{2,3,4,5}

Com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em 1981, ocorreu um aumento no número de casos notificados de TB em pessoas infectadas pelo VIH. Além disso, os intensos movimentos migratórios populacionais, o desmantelamento dos sistemas de saúde pública, a crise social/financeira mundial, o empobrecimento da população, a urbanização caótica e a ausência de controle social vêm dificultando o controle da doença.^{5,6}

A TB continua sendo um importante problema de saúde mundial, exigindo o

desenvolvimento de estratégias para o seu controle, considerando os aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública, merecendo atenção dos profissionais de saúde e da sociedade como um todo.⁷

1.2. O controle da tuberculose

A manutenção da tuberculose como um problema de saúde pública faz com que novas respostas devam ser pensadas no sentido de promover a padronização das ações dos serviços de saúde, garantindo o acesso aos pacientes, visando não apenas o seu atendimento e bem-estar, mas, em sentido mais amplo, a consolidação do Sistema Único de Saúde (SUS) em suas diretrizes.⁷ A integralidade no SUS, em especial a garantia ao acesso, é assegurada pela Constituição Federal Brasileira, no artigo 196:

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

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a TB como uma emergência global de saúde pública e passou a recomendar a Estratégia de Tratamento Diretamente Observado (DOTS - *Direct Observed Treatment Strategy*) para o controle da doença. Em 1996, o Ministério da Saúde (MS) lançou o Plano Emergencial para o Controle da Tuberculose, recomendando a implantação do DOTS para o controle da doença no Brasil, sendo oficializado em 1999 por meio do Programa Nacional de Combate à Tuberculose (PNCT). Essa estratégia pode ser entendida como um conjunto de boas práticas para o controle da doença e está fundamentada nos componentes a seguir:^{8,9}

- Compromisso político com fortalecimento de recursos humanos

e garantia de recursos financeiros, elaboração de planos de ação (com definição de atividades, metas, prazos e responsabilidades) e mobilização social;

- Diagnóstico de casos por meio de exames bacteriológicos de qualidade;
- Tratamento padronizado com a supervisão da tomada da medicação e apoio ao paciente;
- Fornecimento e gestão eficaz de medicamentos;
- Sistema de monitoramento e avaliação ágil que possibilite o monitoramento dos casos, desde a notificação até o encerramento do caso.

1.3. Tratamento

A melhor forma de assegurar a cura do paciente é a utilização dos princípios básicos para o tratamento, que são: associação medicamentosa adequada, doses corretas e uso por tempo suficiente, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos.⁷

A apresentação de comprimidos em doses fixas combinadas (DFC) proporciona comodidade e maior eficácia à terapêutica, como por exemplo através da administração, na fase inicial da doença, de quatro fármacos (4 em 1), nas seguintes dosagens: rifampicina 150 mg, isoniazida 75 mg, pirazinamida 400 mg e etambutol 275 mg,^{7,10} seguidos de manutenção de tratamento com DFC (2 em 1) contendo os dois fármacos já consagrados: rifampicina 300 mg com isoniazida 200 mg ou rifampicina 150 mg com isoniazida 100 mg, conforme peso do paciente.

O esquema básico com quatro fármacos é indicado pela OMS, e mundialmente utilizado, para os dois primeiros meses (fase intensiva), e o esquema com dois fármacos, para os quatro meses seguintes (fase de manutenção), apresentando excelentes

resultados quanto à efetividade, em particular pela maior adesão ao tratamento.

Os medicamentos de DFC possuem diversas vantagens sobre os fármacos utilizados isoladamente (monoterapia). Dentre elas, destaca-se a diminuição dos erros de prescrição porque as doses recomendadas são padronizadas pela OMS; a quantidade de comprimidos ingeridos é menor, dando maior conforto e favorecimento da adesão do paciente ao tratamento. Além disso, em caso de esquecimento na ingestão do comprimido de DFC, os pacientes não podem optar por qual medicamento irão ingerir, evitando assim o risco da monoterapia e o consequente desenvolvimento da resistência aos quimioterápicos (o BK rapidamente se torna resistente aos fármacos quando eles são utilizados separadamente).⁹

Atualmente a produção, distribuição e comercialização de medicamentos no país são reguladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).^{11,12}

O controle sanitário dos medicamentos após a comercialização, desempenhado pela agência, conta com as vigilâncias estaduais e municipais e com o auxílio dos Laboratórios Centrais (LACEN) e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), que têm como uma de suas funções a avaliação analítica de alimentos, produtos biológicos, medicamentos e produtos para saúde, para fornecer subsídios e elucidar dúvidas quanto à qualidade mínima dos produtos sujeitos à vigilância sanitária. Tais órgãos de controle vêm ao longo dos anos comprovando a possível ineficácia terapêutica de muitos medicamentos, levando ao recolhimento desses do mercado.¹³

1.4. Fármacos do medicamento DFC

Rifampicina

A Rifampicina (RMP ou R) é um antibiótico bactericida e um dos tuberculostáticos ativos mais conhecidos. É uma substância semissintética produzida a partir da RMP B, obtida pela fermentação da *Streptomyces mediterranei*. A partir da sua utilização em 1966, a RMP vem sendo utilizada como o fármaco fundamental no tratamento da TB, apresentando um sucesso terapêutico da ordem de 95 %. A concentração inibitória mínima (CIM) para o *M. tuberculosis* é de 0,05 - 0,50 µg/mL.¹⁴ O impacto e a eficácia desse fármaco no combate à TB podem ser observados pela redução do tratamento de doze para seis meses, quando combinada com a isoniazida e pirazinamida.¹⁵ Ele é um fármaco bactericida que atua tanto no bacilo em crescimento e metabolicamente ativo quanto na fase estacionária, com metabolismo reduzido.¹⁶

A RMP apresenta fórmula molecular $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ e massa molar de 822,94 g/mol e

sua estrutura química está representada na Figura 1. É um pó cristalino de cor marrom avermelhado, possui ponto de fusão (PF) de 183 à 188 °C, com decomposição. É levemente solúvel em água. Apresenta características anfóteras com pKa de 1,7 referente à hidroxila na posição 4 e pKa 7,9 em função do nitrogênio no grupo piperazina. Seu ponto isoelétrico é 4,8. Sua solubilidade e estabilidade variam de acordo com o pH, devido à sua natureza anfótera. A máxima estabilidade redox da RMP é verificada em soluções com pH próximo da neutralidade, em seu ponto isoelétrico. Em pH de 2 a solubilidade em água é igual a 100 mg/mL, já em pH 5,3 a sua solubilidade se reduz para 4,0 mg/mL e em pH de 7,5 a solubilidade em água passa para 2,8 mg/mL. A adição de ácido ascórbico à solução aumenta a solubilidade da RMP e diminui a sua oxidação.^{17,18, 47}

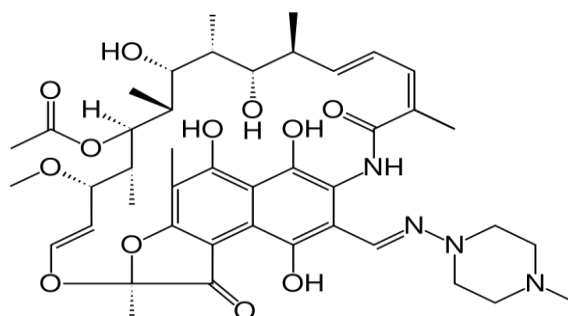


Figura 1. Estrutura química da rifampicina

Isoniazida

A isoniazida (INH ou H) é um dos mais importantes fármacos no tratamento da tuberculose. É utilizada desde 1952. Tem estrutura simples, constituída de um anel piridina e um grupo hidrazida, e sua CIM para o *Mycobacterium tuberculosis* varia de 0,02-0,20 µg/mL.¹⁴ Derivado sintético do ácido isonicotínico possui ação bacteriostática, nos bacilos em crescimento lento, e bactericida, para microrganismos em rápida divisão, como nos bacilos intracelulares.¹ É

considerado um fármaco de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de tuberculose. Devido à possibilidade de gerar resistência microbiana, deve estar associada simultaneamente com outros tuberculostáticos. Se não houver contra-indicação ou resistência ao medicamento, ela é incluída em todos os esquemas terapêuticos.¹⁹ Sua estrutura química ($C_6H_7N_3O$) está representada na Figura 2 e apresenta massa molar de 137,14 g/mol. É um pó cristalino branco ou incolor, possui uma faixa de fusão de 170 a 174 °C. É facilmente solúvel em água, ligeiramente

solúvel em etanol, pouco solúvel em éter. Seus valores de pka são 1,8; 3,5 e clorofórmio e praticamente insolúvel em 10,8.^{20, 21}

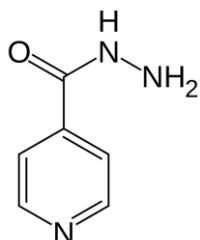


Figura 2. Estrutura química da isoniazida

1.4. Procedimento analítico de compêndios oficiais

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

A USP recomenda o uso de um método para a dosagem dos fármacos 2 em 1 por CLAE com detector por ultravioleta (UV). Na Ph. Int. o procedimento analítico para a determinação do teor de INH é realizado separadamente da determinação da RMP. Os diluentes para a análise de RMP só diferem nas proporções: o diluente da USP usa 96:4 e o da Ph. Int. usa 60:40 da mistura tampão fosfato pH ~ 7 e metanol, respectivamente.

A técnica de análise da RMP e INH na USP baseia-se em uma eluição por gradiente utilizando duas misturas nas proporções de tampão fosfato, pH 6,8 e metanol em fase octadecilsilano. A leitura é efetuada em um comprimento de onda de 238 nm.²² Os dois fármacos analisados numa única corrida, na mesma coluna e mesmo comprimento de onda.

Na Ph. Int., o método de análise da INH, utiliza-se fase móvel contendo uma solução de acetato de amônio e acetato de cobre pH

5,0 e metanol (94:6) em um método isocrático em fase de octadecilsilano com leitura efetuada em um comprimento de onda de 240 nm. Já a análise da RMP é realizada em um comprimento de onda de 254 nm, em fase de sílica, com 5 µm de diâmetro de partícula, derivatizada com octadecilsilil, com o método isocrático.⁴⁸ Nesse caso, são duas corridas diferentes, duas colunas, com dois comprimentos de onda.

1.5. Eletroforese capilar (EC)

A EC é uma técnica de instrumentação analítica utilizada para separação de moléculas e íons de origem química ou biológica. É definida como o transporte, em solução eletrolítica, de substâncias carregadas eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com as diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas. Em relação à CLAE, a EC tem uma série de vantagens a oferecer podendo-se citar: análises rápidas, os custos operacionais reduzidos, o pequeno consumo de solventes orgânicos, além de uma maior eficiência na separação (maior número de pratos teóricos)²³. Os fármacos, em condições de bases fracas, estão protonadas (carregadas positivamente) em baixos valores de pH. Portanto, uma solução eletrolítica com baixo valor de pH pode ser utilizada em

análise de drogas básicas. Drogas ácidas podem ser resolvidas utilizando-se um pH próximo a 7 ou superior. A separação de fármacos neutros requer a utilização do modo de separação por cromatografia eletrocinética micelar²⁴.

1.6. Validação

O controle de qualidade de produtos farmacêuticos apresenta-se como um conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamentos, para que satisfaçam as normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade.²⁵ Para garantir que os resultados do controle de qualidade sejam verdadeiros, é necessária a utilização de métodos oficiais ou validados. A validação é um dos meios universalmente reconhecidos como uma parte necessária para a garantia do sistema de qualidade na química analítica. Thompson e colaboradores destacam que métodos analíticos validados e, portanto confiáveis, são requeridos para a submissão a agências reguladoras nacionais e internacionais em todas as áreas de análise.²⁶

O objetivo de uma validação no controle de qualidade de formulações farmacêuticas é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.²⁵ Segundo o INMETRO (2016)²⁷, a validação é necessária para:

- Métodos não normatizados;
- Métodos criados/desenvolvidos no próprio laboratório;
- Métodos normatizados usados fora dos escopos para os quais foram desenvolvidos;
- Ampliações e modificações de métodos normatizados.²⁷

O objetivo deste trabalho foi validar um

método analítico para a determinação de fármacos tuberculostáticos isoniazida e rifampicina em formulações DFC 2 em 1 por eletroforese capilar.

2. Metodologia

2.1. Equipamentos

Equipamento de eletroforese capilar HP 3CE, com detector (espectrofotométrico) por conjunto de diodos, equipado com controle de temperatura por ar forçado, eletrodos de platina e “ChemStation Software”, modelo G1601A, para controle do equipamento e tratamento de dados; sistema de purificação de água marca Millipore, modelo Milli Academic, EUA; voltímetro acoplado a eletrodo de vidro, com referência prata-cloreto de prata; marca Corning, modelo 440, calibrado diariamente com soluções pH= 4,0 e 10; agitador de tubos marca Marconi (vortex), modelo MA 162; banho ultrassônico, marca Branson Ultrasonic, modelo 3200.

2.2. Amostras e reagentes

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

Substância Química de Referência (SQR) isoniazida (INCQS); rifampicina (USP); matéria-prima de isoniazida do Laboratório Químico Farmacêutico do Exército (LQFEx); matéria-prima de rifampicina (LQFEx); comprimidos de isoniazida 200 mg + rifampicina 300 mg (Farmanguinhos); metanol, Merck; ácido bórico hexahidratado, peso molecular: 61,83 g/mol, Merck; solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M, Agilent; solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 M, Agilent; água grau reagente, tipo I, ultrapura Millipore e acetonitrila grau Lichrosolv, Merck.

2.3. Soluções

Solução extratora: solução de acetonitrila a 10 % em solução tampão de borato de sódio 10 mM pH 9,85.

Eletrólito de corrida: solução tampão de borato de sódio 60 mM pH 9,85.

Todas as soluções foram filtradas com membrana filtrante de nylon de 0,22 μm .

2.4. Preparo da Amostra de DFC 2 em 1

a) Amostragem

Vinte comprimidos foram pesados para verificação do peso médio dos comprimidos. Posteriormente, os comprimidos foram triturados e homogeneizados com o auxílio de um gral e pistilo.

b) Procedimento analítico para amostra DFC 2 em 1:

A partir da mistura homogeneizada, são pesadas amostras de 100 mg. Essas amostras são transferidas para balões volumétricos com capacidade de 50 mL e adicionados 10% de seu volume total, ou seja, 5 mL do solvente acetonitrila. A solução sofre o primeiro processo de extração com o auxílio do vortex por 5 minutos. Aproximadamente 40 mL da solução de borato de sódio 10 mM tamponado em pH 9,85 é adicionado no balão e em seguida levado ao ultrassom por 5 minutos. O volume do balão é completado com a mesma solução tampão. A filtração da solução resultante é realizada em membrana filtrante de nylon de 0,22 μm para ser analisada no equipamento de eletroforese capilar.^{28,29}

2.5. Condições analíticas de eletromigração estudadas no modo eletroforese capilar em zona livre (CZE)

Capilar de sílica fundida: 64,5 cm (56 cm de comprimento efetivo) x 50 μm de diâmetro interno; tensão: 20 kV; temperatura do cassete: 25 °C; detector (espectrofotométrico) por conjunto de diodos: monitorando o comprimento de onda de 200 nm; introdução das amostras: hidrodinâmica por pressão a 25 mbar/3s de amostra, seguida de 25 mbar/2s de eletrólito.

2.6. Condicionamento do capilar

Antes do primeiro uso, o capilar foi condicionado por lavagem com metanol por 5 min, solução de NaOH 1 M por 5 min, água por 5 min e eletrólito de corrida por 20 min, respectivamente.

No início de cada dia, o capilar foi condicionado com a passagem, por 30 min, de eletrólito de corrida.

Entre as análises, o capilar foi condicionado com uma solução de NaOH 0,1 M durante 1 min, água por 2 min e eletrólito de corrida por 3 min, respectivamente.

Depois de cada análise o capilar foi lavado com água por 3 min.

Ao final das análises o capilar foi condicionado por lavagem com água por 30 min.

2.7. Validação intralaboratorial

O procedimento para determinação das figuras de mérito de validação seguiu o Procedimento Operacional Padrão do INCQS nº 65.3120.126,³⁰ que é baseado em Thompsom, Ellison and Wood (2002).³¹

Linearidade

Teste de linearidade para isoniazida em solução extratora

Procedimento: Para a avaliação de

linearidade da faixa de trabalho proposta para isoniazida foram feitas 3 soluções concentradas independentes do padrão secundário de isoniazida, na concentração de 2000 µg/mL, gerando o preparo de três curvas analíticas com seis pontos de concentração. Inicialmente, a faixa de trabalho proposta foi de 200 a 700 µg/mL.

Teste de linearidade para rifampicina em solução extratora

Procedimento: Para a avaliação de linearidade para rifampicina foram feitas 3 soluções concentradas independentes do padrão de rifampicina, na concentração de 1800 µg/mL, gerando três curvas analíticas com seis pontos de concentração. Inicialmente, a faixa de trabalho proposta foi de 500 a 1000 µg/mL.

Teste de linearidade foi realizado seguindo o trabalho de Souza e Junqueira (2005)³² os parâmetros de regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MQO). Foram identificados valores atípicos utilizando o teste de resíduos jackknife, removendo valores considerados aberrantes até um máximo de 22,2% do número original de dados.^{33,34} O método MQO requer que os resíduos de regressão sigam uma distribuição normal, sejam homocedásticos e independentes.^{34,35} A normalidade, homoscedasticidade e autocorrelação dos resíduos de regressão foram verificadas por testes de Ryan-Joiner,³⁶ testes de Levene modificados por Brown e Forsythe^{37,38} e testes de Durbin-Watson,³⁹ respectivamente. Para verificar a linearidade da curva de calibração, foram realizados testes de significância e ajuste de regressão no modelo linear através da análise de variância, avaliada por meio da avaliação de parâmetros utilizando o método MQO.^{40,41}

O método utilizado baseia-se na curva de calibração e seu intervalo de confiança.^{41,42} Foi avaliada a linearidade da faixa de trabalho para rifampicina e isoniazida, utilizando uma

planilha desenvolvida por Bazilio e colaboradores (2012)⁴³.

Efeito matriz para isoniazida e para rifampicina

Preparo da matriz: O peso médio programado para o conteúdo de um comprimido DFC 2 em 1 foi de 747,72 mg com as massas exatas dos seguintes componentes: de princípios ativos, 500 mg (isoniazida 200 mg + rifampicina 300 mg); de placebo do núcleo, 200,00 mg e de revestimento do núcleo, 47,72 mg. Para estudo do efeito matriz da isoniazida foi preparada a matriz sem isoniazida, totalizando uma massa tomada de 73 mg (amostra em branco para isoniazida). Já para estudo do efeito matriz para rifampicina a massa tomada de 60 mg (amostra em branco para rifampicina) e foi seguido o procedimento analítico descrito no item 2.4.b).

Teste de efeito matriz para isoniazida e rifampicina

Procedimento: Foram preparadas quatro soluções de trabalho, tanto para isoniazida como para rifampicina, com as faixas de trabalho 200 a 600 µg/mL para isoniazida e 500 a 1000 µg/mL para rifampicina. As soluções, tanto para isoniazida como para rifampicina, continham solução extratora proveniente do tratamento do branco de cada tuberculostático estudado, considerando-se branco a matriz sem o analito de interesse. O estudo de linearidade foi realizado seguindo o trabalho de Souza e Junqueira (2005),³² para as curvas dos dois tuberculostáticos isoniazida e rifampicina em matriz, utilizando uma planilha desenvolvida por Bazilio e colaboradores (2012).⁴³ As homocedasticidades das variâncias dos resíduos das duas curvas em solvente, e, em matriz, para cada tuberculostático, foram avaliadas. Consequentemente os testes *t* das inclinações e interseções foram testados,

para duas curvas em solvente e em matriz, seguindo Procedimento Operacional Padrão do INCQS nº 65.3120.126³⁰ e utilizando uma planilha desenvolvida por Bazilio e colaboradores (2012).⁴³

Teste de homogeneidade para amostra simulada

Preparo da amostra simulando comprimido no laboratório: Cinco gramas de amostra foram preparadas, simulando comprimido DFC 2 em 1. Esta amostra continha revestimento, placebo do núcleo, rifampicina e isoniazida, em concentrações conhecidas e proporcionais a amostra real. Essa mistura de componentes foi homogeneizada e, dez sub-amostras foram analisadas seguindo-se o procedimento descrito no item 2.4.b. Foram realizadas triplicatas de análise, em sequências aleatórias. Essas análises geraram trinta resultados (respostas em área normalizada) e, a partir da equação da curva analítica, foram determinadas as concentrações de cada substância na amostra em percentual m/m. Avaliou-se a homogeneidade do conjunto de dados pela ANOVA.⁴⁴

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

Procedimento: O teste de repetibilidade do método foi obtido paralelamente ao teste de homogeneidade utilizando-se os dez primeiros resultados analíticos das dez primeiras corridas de amostras analisadas. Para avaliar a repetibilidade do método foi calculada a média e o desvio padrão dos resultados obtidos, para obter o valor do coeficiente de variação. O valor do coeficiente de variação obtido foi comparado com o valor de coeficiente de variação estimado pela equação de Horwitz e Albert,⁴⁵ e Bazilio e colaboradores.⁴⁶

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

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

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

Onde:

x_n é o valor a ser considerado como aberrante;

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

S é o desvio padrão gerado pelos valores totais analisados.

Para esse teste, devido à existência de apenas um analista treinado e um equipamento, foi determinada a precisão intermediária pela variação de dias. Por meio da curva de calibração validada, foi determinada a concentração de cada repetição de cada dia. O coeficiente de variação da precisão intermediária $c_t(i)$ (%) (reprodutibilidade parcial) foi determinado conforme Equação 2.

$$c_t(i) (\%) = \frac{s_t(i)}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde $s_t(i) = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}$ (desvio padrão da precisão intermediária relacionada ao tempo), t é o número de dias de análise, n é o número de repetições por

dia, x é a medida da concentração para a repetição, e \bar{x} é a média das concentrações para as repetições. O valor de coeficiente de variação da precisão intermediária obtido foi avaliado conforme Horwitz e Albert⁴⁵ e Bazilio e colaboradores.⁴⁶

Teste de Recuperação Analítica

Com os resultados obtidos no teste de precisão intermediária do terceiro dia foi avaliada a recuperação por meio da Equação 3, pois as concentrações dos analitos na amostra eram conhecidas.

$$R \% = \frac{C_{\text{experimental}}}{C_{\text{fortificada}}} \times 100, \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

$C_{\text{experimental}}$ = concentração experimental da análise;

$C_{\text{fortificada}}$ = concentração da amostra fortificada.

3. Resultados e discussão

3.1. Eletroferogramas de separação de isoniazida e rifampicina

Eletroferogramas de separação dos padrões de isoniazida e rifampicina e da separação dos tuberculostáticos isoniazida e rifampicina do comprimido DFC 2 em 1

As Figura 3 e 4 apresentam os eletroferogramas; nos quais demonstra a separação eletroforética dos padrões de isoniazida (1) 200 $\mu\text{g/ml}$ e rifampicina (2) 800 $\mu\text{g/mL}$, nos tempos de migração de 6,020 min e 7,214 min respectivamente (A) e uma amostra do medicamento DFC 2 em 1 (B) nas condições analíticas descritas no item 2.5.

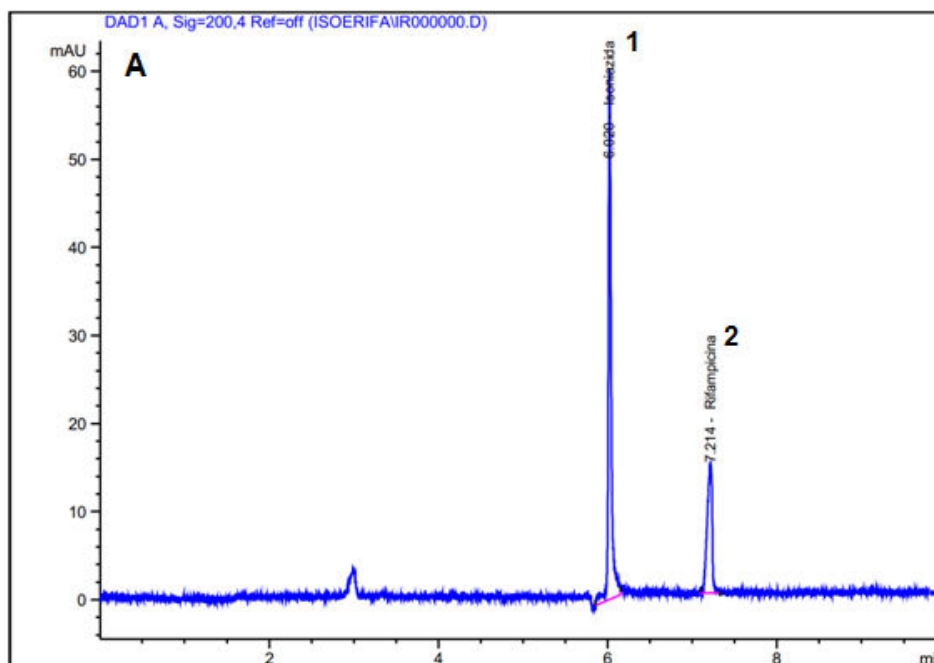


Figura 3. Eletroferograma de separação de isoniazida (1), (6,020 min) e rifampicina (2), (7,214 min) em capilar de 64,5 cm de comprimento total, 56 cm de comprimento efetivo, 50 μm de diâmetro interno, solução tampão de borato de sódio 60 mM pH 9,85 como eletrólito de corrida, 20 kV de tensão, 25 °C de temperatura e 200 nm de comprimento de onda

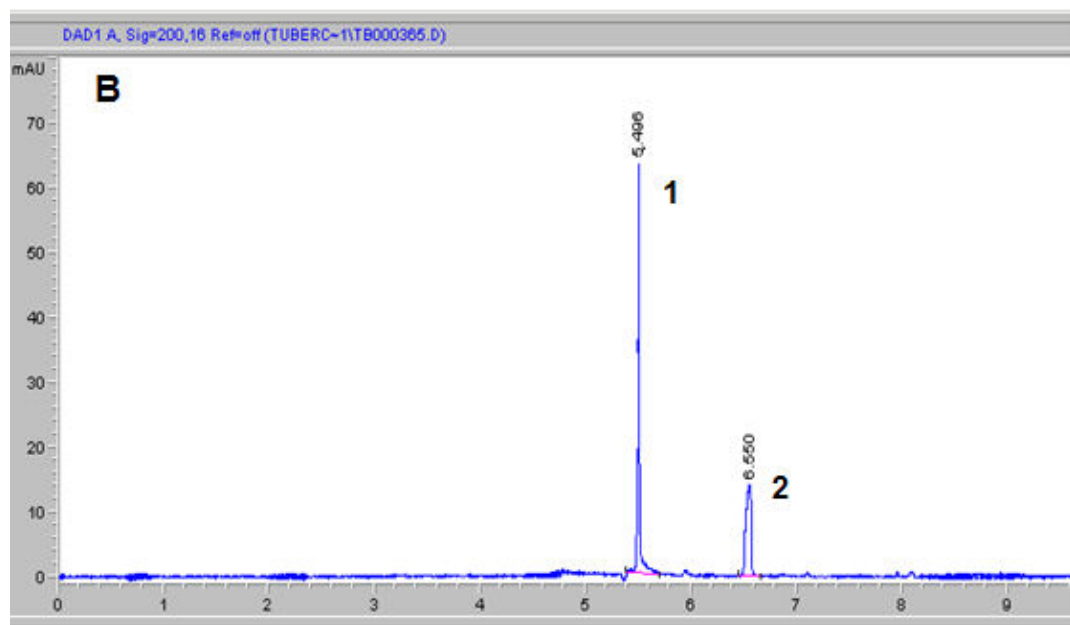


Figura 4. Eletroferograma de separação de isoniazida (1), (5,496 min) e rifampicina (2), (6,550 min) de comprimido DFC 2 em 1 em capilar de 64,5 cm de comprimento total, 56 cm de comprimento efetivo, 50 μm de diâmetro interno, solução tampão de borato de sódio 60 mM pH 9,85 como eletrólito de corrida, 20 kV de tensão, 25 °C de temperatura e 200 nm de comprimento de onda

3.2. Avaliação da linearidade para isoniazida e rifampicina

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

Com o auxílio de uma planilha desenvolvida por Bazilio e colaboradores (2012)⁴³, os dados analíticos obtidos foram avaliados. Os valores aberrantes foram desconsiderados e os testes estatísticos

referentes às premissas de linearidade foram efetuados.

Resumo dos resultados referente à faixa de análise linear para isoniazida:

A Tabela 1 apresenta as concentrações corrigidas das soluções de trabalho utilizadas na confecção da curva analítica e suas respectivas respostas de análise em área normalizada. Já a Tabela 2, apresenta o resumo da avaliação de linearidade para os dados da Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações das soluções de trabalho e resposta analítica por área normalizada para isoniazida

Nível	Concentração $\mu\text{g/mL}$	Resposta Área Normalizada
1	196	0,109
	196	0,119
	194	0,113
2	298	0,175
	300	0,177
	296	0,179
3	400	0,237
	399	0,241
	397	0,246
4	499	0,326
	502	0,310
	496	0,313
5	603	0,384
	604	0,390
	599	0,382
6	702	0,445
	706	0,459
	697	0,450

Os dados em negrito na Tabela 1 foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores aberrantes (outliers). Esses dados não foram considerados na avaliação das premissas.

Tabela 2. Resumo da avaliação de linearidade dos dados de concentração e resposta analítica.

Resumo da Avaliação
Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$)
Segue a normal $\chi^2 \leq \chi^2_{\alpha}$
Homogeneidade de variância
Há homoscedasticidade: ($p > 0,05$)
Autocorrelação dos resíduos ($\alpha = 0,05$)
Não há autocorrelação ($d > \chi^2$)
Regressão e teste de desvio de linearidade
Regressão é significativa: ($p < 0,001$)
Não há desvio da linearidade ($p > 0,05$)

Discussão: Comprovou-se que a faixa de trabalho é linear no intervalo de concentração de 200 a 700 $\mu\text{g/mL}$ e o ponto de 500 $\mu\text{g/mL}$ é equivalente à concentração da solução final de isoniazida na tomada de amostra do comprimido.

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

A Tabela 3 apresenta as concentrações corrigidas das soluções de trabalho utilizadas na confecção da curva analítica de rifampicina e as respectivas respostas de análise em área normalizada. A avaliação das

premissas de linearidade teve comportamento semelhante da isoniazida.

Os dados em negrito na Tabela 3 foram avaliados e retirados do conjunto de dados

por se tratarem de valores aberrantes (outliers). Esses dados não foram considerados na avaliação das premissas.

Tabela 3. Concentração das soluções de trabalho de rifampicina e respostas analíticas em área normalizada

Nível	Concentração $\mu\text{g/mL}$	Resposta Área Normalizada
1	501	0,169
	501	0,182
	501	0,174
2	602	0,205
	602	0,198
	602	0,200
3	701	0,230
	702	0,229
	702	0,243
4	801	0,248
	801	0,270
	801	0,286
5	901	0,288
	902	0,292
	902	0,310
6	1000	0,319
	1000	0,326
	1000	0,359

Discussão: A faixa de trabalho nas concentrações de 500 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ é linear, o ponto 800 $\mu\text{g/mL}$ é equivalente à concentração da solução final da amostra do comprimido.

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

Com o auxílio da planilha desenvolvida por Bazilio e colaboradores (2012).⁴³ Foram determinadas a linearidade e as comparações estatísticas entre as inclinações e interseções, para os valores obtidos nas curvas analíticas.

Resumo dos resultados referentes ao estudo do efeito matriz

De acordo com as avaliações estatísticas, pôde-se constatar que a matriz do comprimido 2 em 1 não influencia nas

respostas obtidas para análise de isoniazida e rifampicina. As variâncias dos resíduos das curvas analíticas em solvente e em matriz demonstraram-se heterogêneas. O valor calculado para t foi menor do que o valor crítico de t na comparação de inclinação e interseção das curvas analíticas.

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

Os resultados do percentual m/m de rifampicina na amostra estão na Tabela 4.

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

A Tabela 5 apresenta os percentuais m/m de isoniazida na amostra que serão utilizados no teste de homogeneidade da amostra.

Tabela 4. Resultados dos ensaios analíticos para o teste de homogeneidade em percentual m/m de rifampicina na amostra simulando comprimido DFC 2 em 1

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

Tabela 5. Teor de isoniazida em percentual m/m apresentado nas análises da amostra simulando comprimido DFC 2 em 1

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

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

Avaliação da repetibilidade analítica

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

No Quadro 1, apresentam-se os resultados da avaliação de repetibilidade analítica da rifampicina.

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

No Quadro 2 apresenta os resultados da avaliação da repetibilidade analítica para isoniazida.

Discussão: O método mostrou-se repetitivo para ambas substâncias analisadas da amostra do comprimido DFC 2 em 1.^{45,46}

Avaliação da precisão intermediária

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

Os resultados referentes ao teste de avaliação da precisão intermediária estão apresentados na Tabela 6.

Quadro 1. Avaliação da repetibilidade analítica para rifampicina

Desvio Padrão	1,34
Média	42,18
CV (%)	3,17
CV Horwitz	3,30

Quadro 2. Avaliação da repetibilidade analítica para isoniazida

Desvio Padrão	0,70
Média	26,67
CV (%)	2,64
CV Horwitz	3,30

Tabela 6. Cálculos de precisão intermediária para isoniazida.

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

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

Os resultados referentes ao teste de avaliação da precisão intermediária estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Cálculos de precisão intermediária para rifampicina

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

Os resultados foram satisfatórios, pois estavam coerentes em relação ao valor de referência adotado, estimados conforme equação Horwitz e Albert⁴⁵ e Bazilio e colaboradores⁴⁶ em validação intralaboratorial onde, para cada concentração estimada pode-se obter um valor limite de reprodutibilidade.

Resultados da avaliação da recuperação analítica

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

A Tabela 8 resume os resultados obtidos nos testes de recuperação analítica de isoniazida.

Tabela 8. Resultados de recuperação analítica de isoniazida.

Concentração Experimental % m/m	Percentual Recuperado %	Concentração Fortificada %
25,76	92,91	27,72
25,30	92,25	27,42
26,06	95,13	27,39
26,39	95,78	27,56
26,51	96,53	27,46
26,43	97,00	27,25
26,05	95,41	27,31
Média 95,00		

A recuperação de 95,00 % determinada pelo teste de recuperação é aceitável pelo critério da Comunidade Europeia.⁴⁹

A Tabela 9 apresenta os resultados conseguidos nos testes de recuperação de rifampicina.

Tabela 9. Resultados da avaliação da recuperação analítica do método em questão, referente à quantificação de rifampicina:

Concentração Experimental % m/m	Percentual Recuperado %	Concentração Fortificada % m/m
40,74	98,31	41,44
39,05	95,26	40,99
39,92	97,48	40,95
39,92	96,92	41,19
40,86	99,54	41,05
39,99	98,17	40,74
39,77	97,44	40,82
Média 97,59		

Discussão: A recuperação de 97,59 % é aceitável pelo critério da Comunidade Europeia.⁴⁹

4. Conclusão

Com o desenvolvimento deste trabalho, pôde-se concluir que o método analítico

empregado por eletroforese capilar é aplicável para a determinação quantitativa dos princípios ativos isoniazida e rifampicina em comprimidos DFC 2 em 1. Todas as figuras de mérito representantes desta validação apresentaram resultados adequados em relação aos critérios de aceitação.

Referências Bibliográficas

- ¹ Bastos, D. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília, **2006**.
- ² Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. 6a. Ed. rev. e atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- ³ Rede TB. Rede brasileira de pesquisas em tuberculose: Sobre a Tuberculose 2012. Disponível em: <<http://redetb.org/sobre-a-tuberculose>>. Acesso em: 13 fevereiro 2012.
- ⁴ Furtado, A. P. A.; Avaliação da incerteza de medição do ensaio de dissolução de comprimidos de pirazinamida 500 mg. *Monografia de Especialização em Vigilância Sanitária* – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010.
- ⁵ Secretaria de Saúde. Divisão de Controle da Tuberculose CVE-SES/SP. Perguntas e respostas. 2010. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculosis/>>. Acesso em: 13 fevereiro 2012.
- ⁶ Conde, M. B.; Souza, G. M.; Kritski, A. L. Tuberculose sem medo. Editora Atheneu. 1a. Ed. São Paulo: 2002. Rede brasileira de pesquisas em tuberculose – Rede – TB. Disponível em: <<http://redetb.org/a-historia-da-tuberculose>>. Acesso em: 13 fevereiro 2012.
- ⁷ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tdo_tb.pdf>. Acesso em: 29 janeiro 2012.
- ⁸ Brasil. Ministério da Saúde. Portal da saúde. Tuberculose. Brasília, 2012. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31081>. Acesso em: 13 fevereiro 2012.
- ⁹ WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Geneva, 2009.
- ¹⁰ Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Brasília, 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5.pdf>. Acesso em: 29 janeiro 2012.
- ¹¹ Brasil. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, 27 de jan. de 1999. Seção 1, p. 1.
- ¹² Bueno, E. À sua Saúde: a Vigilância Sanitária na História do Brasil. 1a. Ed. Brasília: editora ANVISA, 2005.
- ¹³ Souza, P. R.; *Dissertação de Mestrado*, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.
- ¹⁴ Zhang, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology* **2005**, *45*, 529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Souza, M. V. N. Rifampicina, um importante fármaco no combate à tuberculose. *Revista Brasileira de Farmácia* **2005**, *86*, 92. [[Link](#)]
- ¹⁶ Blumberg, H. M.; Burman, W. J.; Chaisson, R. E.; Daley, C. L.; Etkind, S. C.; Friedman, L. N.; Fujiwara, P.; Grzemska, M.; Hopewell, P.

- C.; Iseman, M. D.; Jasmer, R. M.; Koppaka, V.; Menzies, R. I.; O'Brien, R. J.; Reves, R. R.; Reichman, L. B.; Simone, P. M.; Starke, J. R.; Vernon, A. A.; American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine* **2003**, *167*, 603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Gallo, G. G.; Radaelli, P. Analytical Profiles of Drug Substances: Rifampicin. London-Chicago: Pharmaceutical Press, 1976, 5, p. 467.
- ¹⁸ Connors, K. A.; Amidon, G. L.; Stella, V. J. Chemical Stability of Pharmaceuticals – a Handbook for Pharmacists. John Wiley & Sons: Canadá, 1986.
- ¹⁹ Katzung, B. G. *Farmacologia: Básica & Clínica*. 9a. Ed. Editora Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro 2005.
- ²⁰ Brewer, G. A.; Analytical Profiles of Drugs Substances: Isoniazid. London-Chicago: Pharmaceutical Press, 1977, 6, 183.
- ²¹ Merck. The Merck Index. 14 Ed. Raheway, 2006.
- ²² The United States Pharmacopeia 37. National Formulary 32: 2014. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2014.
- ²³ Altria, K. D.; Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, *856*, 443. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Heiger, D. N. High Performance Capillary Electrophoresis – An Introduction. 3^a Ed. França: Hewlet Packard Company, 1997.
- ²⁵ Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 de jun. de 2003. Seção 1, p. 56.
- ²⁶ Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2006**, *78*, 145.
- ²⁷ INMETRO. Orientações sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2016.
- ²⁸ Azevedo, M. L. G.; Simões, A. C.; Abrantes, S. Análise de isoniazida por eletroforese capilar: confecção de uma curva analítica. *Revista Analytica* **2008**, *32*, 50.
- ²⁹ Ribeiro, F. A. L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; da Silva, L. R.; Schneider, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova* **2008**, *31*, 164. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ INCQS - INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. *Validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear*: POP nº 65.3120.126. Revisão 04. Rio de Janeiro, 2015.
- ³¹ Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized guidelines for a single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry* **2002**, *74*, 835. [[CrossRef](#)]
- ³² de Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytical Chimica Acta* **2005**, *552*, 25. [[CrossRef](#)]
- ³³ Belsley, D. A.; Kuh, E.; Welsch, R. E. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. Wiley: New York, 1980.
- ³⁴ Horwitz, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies: Revised 1994 (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **1995**, *67*, 331. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Bomfim, M. V. J.; Abrantes, S. M. P.; Zamith, H. P. S. Validação de método analítico para determinar a migração de ϵ -caprolactama das embalagens para alimentos gordurosos. *Química Nova* **2010**, *33*, 1114. [[CrossRef](#)]

- ³⁶ Ryan, T. A., Joiner, B. L. Normal probability plots and tests for normality. Pennsylvania State University, The States College. 1976.
- ³⁷ Levene, H. Em *Robust tests for equality of variances*. Olkin, I.; Ghurye, S. G.; Hoeffding, W.; Madow, W. G.; Mann, H. B., eds.; Contributions to probability and statistics. Stanford University Press: Stanford, 1960.
- ³⁸ Brown, M. B.; Forsythe, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances. *Journal of the American Statistical Association* **1974**, *69*, 364. [CrossRef]
- ³⁹ Durbin, J.; Watson, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. *Biometrika* **1951**, *38*, 159. [CrossRef]
- ⁴⁰ Draper, N. R.; Smith, H.; *Applied regression analysis*. Wiley: New York, 1998.
- ⁴¹ Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for analytical chemistry*. Ellis Horwood Limited: New York, 1993.
- ⁴² Huber, W. Basic calculations about the limit of detection and its optimal determination. *Accreditation and Quality Assurance*. **2003**, *8*, 213. [CrossRef]
- ⁴³ Bazilio, F. S.; Bomfim, M. V. J.; Almeida R. J.; Abrantes, S. M. P.; Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Revista Analytica* **2012**, *59*, 60.
- ⁴⁴ ISO Guide 35 Reference materials - General and statistical principles for certification. International Organization for Standardization (ISO), Geneva. 2006.
- ⁴⁵ Horwitz, W., Albert, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *Journal of AOAC International* **2006**, *89*, 1095.
- ⁴⁶ Bazilio, F. S.; Bomfim, M. V. J.; Almeida, R. J.; Abrantes, S. M. P. Intralaboratory validation of an analytical method for determining the migration of bis(2-ethylhexyl) adipate from packaging to fat foods. *Accreditation and Quality Assurance* **2014**, *19*, 195. [CrossRef]
- ⁴⁷ Singh, S.; Mariappan, T. T.; Sankar, R.; Sarda, N.; Singh, B.; A critical review of probable reasons for the poor variable bioavailability of rifampicin from antitubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solution to the problem. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, *228*, 5. [CrossRef]
- ⁴⁸ The International Pharmacopoeia. 4.ed., 4st suppl., Geneva: WHO, 2014.
- ⁴⁹ União Europeia (UE): Directiva 2002/657/EC da Comissão. Official Journal European, 2002, 17.8, p.8.