



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química

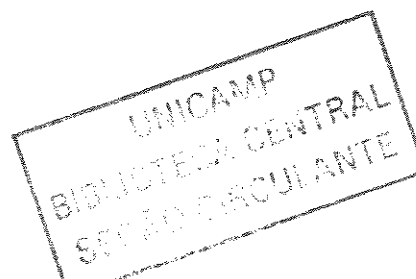
Dissertação de Mestrado

2004-08842
"CONCEITOS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
CROMATOGRÁFICOS, APLICADOS NA
DETERMINAÇÃO DE OMEPRAZOL E
IMPUREZAS EM CÁPSULAS E COMPRIMIDOS"

Autor: Marcelo Ribani

Orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins

Janeiro 2004



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	71/Unicamp
	R352c
V	EX
TOMBO BC	58640
PROC.	16-117-04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	23-06-04
Nº CPD	

CM00198296-4

Bibid: 317482

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R352c

Ribani, Marcelo.

Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de Omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos / Marcelo Ribani. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientador: Carol H. Collins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Validação de métodos. 2. Métodos cromatográficos. 3. Omeprazol. I. Collins, Carol H. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

DEDICATÓRIA

A Deus por tudo

*A minha esposa, pelo carinho, amor e dedicação, sem você nada
seria possível.*

*A minhas filhas,
Esther, Giulia e Hanna,
que em cada sorriso e brincadeira tornaram possível encontrar a
fortaleza para prosseguir sempre.*

Aos meus pais.

*A todos que se preocupam em propagar a importância da
metrologia na química analítica moderna.*

AGRADECIMENTOS

Ao Tecpar pela liberação e ajuda para realização deste trabalho.

*À minha orientadora Profa. Dra. Carol H. Collins,
Pelos ensinamentos, apoio e amizade, sempre provocando
iniciativas, mas não perdendo o objetivo do trabalho. Posso dizer
que foi um privilégio ser seu aluno, meu profundo agradecimento.*

*À Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim,
Minha orientadora do coração, que mesmo sem a obrigação,
sempre esteve presente.*

*À amiga, Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli,
Pela assistência em todos os aspectos do trabalho e estudo.*

*Ao Prof. Dr. Lúcio Flávio Costa Melo,
Pelas sugestões e boa vontade. Aprendemos juntos a trabalhar
com validação no decorrer do trabalho.*

*Ao amigo, Prof. Dr. Bill Jorge Costa,
Pelo incentivo e apoio, despertando sempre iniciativas além da
pesquisa.*

*Ao grupo do Laboratório de Medicamentos do Tecpar, Malú,
Joel, Janaína, Clélia e aos estagiários Giane, Sabrina e Larissa,
Pela valiosa colaboração profissional, pelas conversas e
prontidão efetiva no dia-a-dia.*

*Ao grupo do LabCrom César, Zahra, Nilva, Daniel, Dania, Laís, Camila, Allan, Lúcia, Líka, Leonardo, Priscila, Josimara, Vanessa, Alessandra, Dione, Karen, Louise,
Pelo companheirismo e incentivo, mesmo estando muitas vezes longe do laboratório, sempre fui muito bem recebido.*

*Ao Grupo de Confiabilidade Metrológica recém formado no Tecpar (GCAM),
Que continuemos galgando os objetivos de imbuir na sociedade a importância da metrologia.*

CURRICULUM VITAE

MARCELO RIBANI

Rua Edílson A.Saldanha Raffo, 245
CEP: 82115-250 Curitiba - PR.
Tel. (+5541) 338-3481 (Residencial)
(+5541) 316-3102 (Comercial)

e-mail: ribani@tecpar.br

Brasileiro
35 anos
Casado

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Química Industrial - Escola Superior de Química Oswaldo Cruz, São Paulo, SP – 1992.
- Curso Técnico em Química Industrial - Colégio São Judas Tadeu, São Paulo, SP - 1988

2. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

- “Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos”
Marcelo Ribani, Carla Beatriz Grespan Bottoli, Carol Hollingworth Collins, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, Lúcio Flávio Costa Melo
Química Nova QN 0165

3. ARTIGOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- “Verificação de níveis de ácido benzóico e sórbico em suco natural de maracujá por CLAE”
Rosemary Hoffmann Ribani, **Marcelo Ribani**
VII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. CURITIBA: IPARDES, 1999,v.1,p.92.
- “Teor de colesterol em diferentes tipos de ovos comercializados na cidade de Curitiba”
Gisele M. Buckenzo, Sônia Cachoeira Stertz, Renato Sossela de Freitas, Rosemary Hoffmann Ribani, **Marcelo Ribani**
XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2000, FORTALEZA. LIVRO DE RESUMOS. 2000,v.2,p.5.227.

- “Elaboração de bebida rica em vitamina C à base de extrato de erva-mate (*Ilex paraguaiensis*)”
Ricardo Celupi Neto, Sônia Cachoeira Stertz, Rosemary Hoffmann Ribani, **Marcelo Ribani**, Renato Sossela de Freitas, Adriana Burgardt
XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2000, FORTALEZA. LIVRO DE RESUMOS. 2000,v.3,p.11.56.
- “Desenvolvimento e validação de metodologia analítica com uso de Glutathione, para determinação de vitamina C total em suco de laranja por CLAE”
Ricardo Celupi Neto, **Marcelo Ribani**, Renato Sossela de Freitas
VIII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. CURITIBA: PUC, 2003,MAS401.
- “Avaliação experimental das diferentes maneiras de estimar limite de detecção e limite de quantificação em cromatografia líquida”
Carla B.G. Bottoli, **Marcelo Ribani**, Carol H. Collins, Isabel C.S.F. Jardim
XII ENQA – ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA – MARANHÃO – SÃO LUÍS, 2003,SE 018.

4. PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- 2º Congresso Brasileiro de Produtos Farmacêuticos Cosméticos e afins, São Paulo – SP (1989)
- 7º Congresso Paulista de Farmacêuticos, São Paulo – SP (1989)
- VI Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFPR – Paraná (1999)
- VII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFPR – Paraná (2001)
- VIII Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFPR – Paraná (2003)
- XII ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica – Maranhão – São Luís (2003)

RESUMO

Título: “Conceitos de validação de métodos cromatográficos, aplicados na determinação de omeprazol e impurezas em cápsulas e comprimidos”.

Para garantir que o método analítico gere informações confiáveis, exatas e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação.

O objetivo fundamental deste trabalho é expor os principais conceitos e parâmetros de validação em análise de fármacos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), mostrando as diferenças e similaridades entre as diretrizes estabelecidas pelas diferentes agências reguladoras (Guias), do Brasil e de outros países, ordenar os parâmetros de validação numa sequência lógica e orientar quais devem ser as etapas num processo de validação.

Neste trabalho também foi desenvolvido e validado um método para determinação de Omeprazol em cápsulas e comprimidos, aplicando os conceitos de validação de métodos, utilizando ferramentas estatísticas para expressar os resultados de precisão e exatidão. Os valores de limite de detecção e quantificação, obtidos por diferentes procedimentos mostram que, em análises cromatográficas, a melhor metodologia é a baseada no uso dos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável. Os menores valores de LD foram os obtidos pelo método visual e pelo método da relação sinal-ruído. Estes valores estão sujeitos a uma avaliação subjetiva, sujeita a erros e a grandes variações, que foram confirmadas, por resultarem em valores fora da faixa linear dinâmica de concentração do método.

ABSTRACT

Title: “Considerations on the validation of chromatographic methods, applied to the determination of Omeprazol and impurities in capsules and tablets”.

To guarantee that an analytical procedure gives reliable, exact and interpretable information about a sample, it should be submitted to an evaluation called validation.

The fundamental objective of the present work is to describe the main concepts and parameters of validation used in the analysis of drugs by high performance liquid chromatography (HPLC), showing the differences and similarities between the directives established by different regulatory agencies of Brazil and of other countries, to arrange the validation parameters in a logical sequence and to give suggestions with respect to the steps necessary in a validation process.

In this work an approach was also developed and validated for the determination of Omeprazol in capsules and tablets, applying the validation concepts and using statistical tools to express the results of precision and accuracy. The values of the detection limit (LD) and the quantification limit (LQ) obtained showed that, in chromatographic analyses, the best method is that based on the use of the parameters obtained from the analytical curve, which are statistically reliable. It was shown that smaller values of LD were obtained by the visual approach and by the method using the signal-to-noise ratio. These values may reflect a subjective evaluation, prone to errors and large variations. This was confirmed by showing that these methods result in values, which fall outside the linear range of concentration of the method.

SUMÁRIO

<u>OBJETIVOS</u>	1
<u>I.1 - OBJETIVOS</u>	2
<u>CAPÍTULO II</u>	3
<u>CONCEITOS DE VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS</u>	3
<u>II.1 - INTRODUÇÃO</u>	4
<u>II.2 - VALIDAÇÃO</u>	5
<u>II.3 - CONFORMIDADE DO SISTEMA</u>	7
<u>II.4 - LEGISLAÇÃO</u>	9
<u>II.5 - PROCESSO DE VALIDAÇÃO</u>	13
<u>II.6 - PARÂMETROS ANALÍTICOS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS</u>	15
<u>II.6.1 - SELETIVIDADE</u>	15
<u>II.6.2 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO</u>	18
<u>II.6.2.1.1 - PADRONIZAÇÃO EXTERNA</u>	23
<u>II.6.2.1.2 - PADRONIZAÇÃO INTERNA</u>	23
<u>II.6.2.1.3 - SUPERPOSIÇÃO DE MATRIZ</u>	24
<u>II.6.2.1.4 - ADIÇÃO DO ANALITO</u>	25
<u>II.6.3 - PRECISÃO</u>	28
<u>II.6.3.1 - NÍVEIS DE PRECISÃO</u>	29
<u>II.6.3.1.1 - REPETITIVIDADE</u>	30
<u>II.6.3.1.2 - PRECISÃO INTERMEDIÁRIA</u>	31

<u>II.6.3.1.3 - REPRODUTIBILIDADE</u>	32
<u>II.6.4 - EXATIDÃO</u>	33
<u>II.6.4.1 - MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS (CRM)</u>	34
<u>II.6.4.2 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS</u>	35
<u>II.6.4.3 - ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO</u>	36
<u>II.6.4.4 - ADIÇÃO DO ANALITO</u>	38
<u>II.6.5 - LIMITE DE DETECÇÃO (LD)</u>	38
<u>II.6.6 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)</u>	40
<u>II.6.7 - ROBUSTEZ</u>	41
<u>CAPÍTULO III</u>	43
<u>INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO OMEPRAZOL</u>	43
<u>III.1 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO OMEPRAZOL</u>	44
<u>CAPÍTULO IV</u>	46
<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	46
<u>IV.1 - MATERIAIS E MÉTODOS</u>	47
<u>IV.1.2 – PADRÕES E REAGENTES ANALÍTICOS</u>	47
<u>IV.1.3 – PREPARO DA MATRIZ</u>	47
<u>IV.1.4 – AMOSTRAS UTILIZADAS</u>	47
<u>IV.1.5 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS</u>	48
<u>IV.1.6 – CONDIÇÕES ANALÍTICAS DO SISTEMA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA</u>	48
<u>IV.1.7 – PARÂMETROS ANALÍTICOS AVALIADOS NA VALIDAÇÃO</u>	49
<u>IV.1.7.1 – ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE OMEPRAZOL</u>	49

<u>IV.1.7.2 - SELETIVIDADE</u>	51
<u>IV.1.7.2.1 – COMPRIMENTO DE ONDA IDEAL PARA O ESTUDO</u>	51
<u>IV.1.7.2.2 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DE SEPARAÇÃO</u> ..	51
<u>IV.1.7.2.3 – CURVA ANALÍTICA COM ADIÇÃO DE ANALITO PURO</u> .	52
<u>IV.1.7.3 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO</u>	52
<u>IV.1.7.4 – EXATIDÃO E PRECISÃO</u>	53
<u>IV.1.7.5 - LIMITE DE DETECÇÃO (LD) DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL</u>	54
<u>IV.1.7.6 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL</u>	55
<u>IV.1.7.7 – ROBUSTEZ</u>	55
<u>IV.1.7.8 – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS COMERCIAIS</u>	57
<u>CAPÍTULO V</u>	58
<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	58
<u>V.1. – ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE OMEPRAZOL</u>	59
<u>V.2 – SELETIVIDADE</u>	64
<u>V.2.1 – DEFINIÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA IDEAL PARA O ESTUDO</u>	64
<u>V.2.2 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DE SEPARAÇÃO</u>	64
<u>V.2.3 – CURVA ANALÍTICA COM ADIÇÃO DE PADRÃO</u>	68
<u>V.3 – LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO</u>	69
<u>V.3.1 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO DO OMEPRAZOL</u> ...	69
<u>V.3.2 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO</u>	71

<u>V.4 - EXATIDÃO E PRECISÃO</u>	73
<u>V.5 -LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL</u>	74
<u>V.5.1 – LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL OBTIDO PELO MÉTODO VISUAL</u>	74
<u>V.5.2 – LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL OBTIDAS PELO MÉTODO DA RELAÇÃO SINAL-RUÍDO.....</u>	75
<u>V.5.3 – LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL OBTIDAS PELO MÉTODO BASEADO NOS PARÂMETROS DA CURVA ANALÍTICA ...</u>	76
<u>V.6 – LQ DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL</u>	78
<u>V.7 –ROBUSTEZ</u>	79
<u>V.8 - APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS COMERCIAIS</u>	80
<u>CAPÍTULO VI.....</u>	83
<u>ROTEIRO PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....</u>	83
<u>VI - ROTEIRO PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS.....</u>	84
<u>CAPÍTULO VII.....</u>	86
<u>CONCLUSÕES</u>	86
<u>VII - CONCLUSÕES</u>	87
<u>CAPÍTULO VIII</u>	90
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	90
<u>VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	91
<u>ANEXO 1.....</u>	96

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1:</u> Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações.....	9
<u>Tabela 2:</u> Parâmetros de validação do INMETRO, ANVISA, USP, ICH e IUPAC.	10
<u>Tabela 3:</u> Parâmetros analíticos requeridos, de acordo com a classificação da USP e ANVISA.....	12
<u>Tabela 4 :</u> Parâmetros avaliados na determinação da robustez do método.....	56
<u>Tabela 5 :</u> Combinação utilizada para parâmetros nominais ou com variação. ..	56
<u>Tabela 6:</u> Fatores para verificar a separação entre os compostos (conforme figura 13).....	67
<u>Tabela 7:</u> Valores obtidos de recuperação em percentagem.	73
<u>Tabela 8:</u> Valores de LD e LQ determinados por três métodos diferentes.....	78
<u>Tabela 9:</u> Resultados das concentrações obtidas utilizando o teste de Youden.	79
<u>Tabela 10:</u> Variação do parâmetro no resultado da robustez da metodologia. ...	79
<u>Tabela 11:</u> Teores de Omeprazol em amostras comerciais com a incerteza associada.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Determinação gráfica das curvas de linearidade através da: (a) curva analítica clássica; (b) gráfico da razão sinal/concentração vs. concentração em escala logarítmica.....	22
Figura 2: Inter-relação entre os diferentes métodos de construção da curva analítica.....	26
Figura 3: Estrutura química do Omeprazol (a) e seus produtos de degradação, 5-hidroxi-omeprazol (b) e omeprazol sulfona (c).....	45
Figura 4: Estabilidade da solução de Omeprazol, sem adição da matriz, em fase móvel pH=7,0 (solução 2).	59
Figura 5: Estabilidade da solução de Omeprazol, com adição da matriz, em fase móvel pH=7,0 (solução 4).	60
Figura 6: Estabilidade da amostra de Omeprazol em fase móvel pH=7,0 (solução 6).....	60
Figura 7: Solução de Omeprazol com a matriz pó incorporada, dissolvido na fase móvel.	61
Figura 8: Degradação do Omeprazol em meio ácido clorídrico 0,1 mol L ⁻¹ , na presença da matriz (solução 7).	62
Figura 9: Degradação do Omeprazol em meio hidróxido de sódio 0,1 mol L ⁻¹ (solução 8).....	63
Figura 10: Oxidação do Omeprazol com solução de peróxido de hidrogênio 3% (solução 9).....	63
Figura 11: Espectros no UV sobrepostos dos padrões de Omeprazol, 5-hidroxi-omeprazol e omeprazol sulfona em fase móvel com a matriz (pó) incorporada. 64	
Figura 12: Cromatograma do Omeprazol com adição da matriz.	65

Figura 13: Cromatograma do Omeprazol com adição da matriz (pó) e impurezas.	66
Figura 14: Cromatograma da matriz (pó) na fase móvel.	66
Figura 15: Cromatograma de uma amostra de cápsula de Omeprazol comercial.	67
Figura 16: Curva analítica do Omeprazol com adição do analito e sem adição da analito e as equações das retas.	68
Figura 17: Curva analítica do Omeprazol ($100 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$), para $n=3$	70
Figura 18: Relação da área/concentração e concentração correspondente em escala log. para o Omeprazol.	70
Figura 19: Curva analítica do omeprazol sulfona ($10,3 - 1033,8 \text{ ng mL}^{-1}$).	71
Figura 20: Curva analítica do 5-hidroxi-omeprazol ($11,1 - 990,0 \text{ ng mL}^{-1}$).	71
Figura 21: Relação da área/concentração e concentração correspondente em escala log do Omeprazol sulfona.	72
Figura 22: Relação da área/concentração e concentração correspondente em escala log do 5-hidroxi-omeprazol.	73
Figura 23: LD do omeprazol sulfona pelo método visual.	74
Figura 24: LD do 5-hidroxi-omeprazol pelo método visual.	75
Figura 25: LD do omeprazol sulfona pelo método da relação sinal-ruído.	76
Figura 26: Determinação do LD do 5-hidroxi-omeprazol pelo método da relação sinal-ruído.	76
Figura 27: LD do Omeprazol sulfona pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica.	77
Figura 28: LD do 5-hidroxi-omeprazol pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica.	77

Figura 29: Cromatograma da amostra de omeprazol comprimido comercial A. 81

Figura 30: Cromatograma da amostra de omeprazol cápsula comercial B...... 81

Figura 31: Cromatograma da amostra de omeprazol cápsula comercial C...... 82

Figura 32: Cromatograma da amostra de omeprazol cápsula comercial D...... 82

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANVISA : Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CCD : Cromatografia em Camada Delgada
- CE : Eletroforese Capilar
- CRM : Certificated Reference Material
- CV : Coeficiente de variação
- EUA : Estados Unidos da América
- FDA : Food, Drugs and Administration
- GARP : Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas
- GC : Cromatografia Gasosa
- HPLC : Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- ICH : International Conference on Harmonization
- IEC : International Electrotechnical Commission
- INMETRO : Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- ISO : International Standard Organization
- IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry
- LD : Limite de Detecção
- LGC : Laboratory of the Government Chemist
- LQ : Limite de Quantificação
- N : Número de pratos da coluna cromatográfica
- NIST : National Institute of Standards and Technology
- r : Coeficiente de correlação
- $R(\%)$: Valor obtido para recuperação em porcentagem
- r' : Limite de repetitividade

- r^2 : Coeficiente de determinação ou de correlação múltipla ou eficiência da regressão
- R_s : Resolução cromatográfica
- RSD : Estimativa do desvio padrão relativo
- s : Estimativa do desvio padrão amostral
- teste t : Teste estatístico de Student
- TF : Fator cauda
- t_M : Tempo de retenção de um composto não retido
- t_{n-1} : Valor crítico da distribuição t de Student com $n - 1$ graus de liberdade
- USP : United States Pharmacopeia
- WHO : World Health Organization
- x_i : Valor medido
- \bar{X} : Média aritmética amostral de um pequeno número de medições
- σ : Desvio padrão da população
- μ : Média verdadeira (média da população)

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

I.1 - OBJETIVOS

O objetivo fundamental deste trabalho é expor os principais conceitos e parâmetros de validação em análise de fármacos por HPLC, mostrando as diferenças e similaridades entre as diretrizes estabelecidas pelas diferentes agências reguladoras (guias), do Brasil e de outros países, ordenando os parâmetros de validação numa seqüência lógica e orientando quais devem ser as etapas num processo de validação.

Desenvolver e validar uma metodologia para determinação de Omeprazol em cápsulas e comprimidos comerciais e algumas impurezas (5-hidroxi-omeprazol e omeprazol sulfona), aplicando somente os parâmetros necessários para garantir que a metodologia seja validada, com resultados metrologicamente confiáveis.

Os conceitos de validação de metodologia foram aplicados em cápsulas e comprimidos comerciais, com determinação por HPLC e os resultados obtidos foram aplicados para expressar a incerteza da medição em um intervalo de confiança de 95%.

CAPÍTULO II

CONCEITOS DE VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

II.1 - INTRODUÇÃO

Um processo analítico pode ser dividido em desenvolvimento de método, otimização, validação e fase de aplicação. O objetivo de uma análise é gerar informações confiáveis, exatas e interpretáveis sobre a amostra e garantir que o método analítico preencha estes requisitos. Para tornar o método validado, deve-se observar as diretrizes a serem seguidas numa sequência lógica. Atualmente, nenhum método analítico deve ser usado rotineiramente se não for totalmente validado. A necessidade de demonstrar a comparabilidade e a rastreabilidade das medições químicas, isto é, sua qualidade, está sendo cada vez mais exigida. Isto é explicado pelo fato de que tais medições têm um papel chave no diagnóstico de doenças, na identificação das tendências globais da biosfera e na avaliação dos efeitos de vários contaminantes no meio ambiente. Além disso, uma fração significativa da produção industrial e do comércio exterior (alimentos, insumos agrícolas, medicamentos, etc.) é também dependente das medições químicas. Desta forma, uma informação ou um resultado analítico, originado de uma medição química, ao ser considerado como um recurso, tem certas características, entre as quais se destaca a exatidão. Sob este aspecto, uma informação é inútil caso não seja exata. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir à decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis¹. Para garantir que o método analítico gere informações confiáveis, exatas e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado¹. Para o registro de novos produtos, os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a

validação de metodologia analítica. A maioria dos países tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas na validação de metodologias analíticas¹⁻¹⁵. Os requisitos são, em geral, os mesmos para todas as técnicas, com algumas variações que dependem do método e do protocolo escolhido. Entre as técnicas analíticas, as de separação, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE), vêm destacando-se na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos.

Neste contexto, esta dissertação tem como objetivo expor os principais aspectos da validação em análise química, mostrando as diferenças e similaridades entre as diretrizes estabelecidas pelas diferentes agências reguladoras, do Brasil e de outros países, e propor um roteiro de validação para uso em métodos cromatográficos.

II.2 - VALIDAÇÃO

Vários autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras. Algumas definições podem ser transcritas:

- “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária)⁵.
- “Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer” (Eurachem Working Group)¹⁰.

- “Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” (ISO/IEC 17025 – International Organization Standardization)¹³.
- A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP – United States Pharmacopeia)¹⁴.
- “Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado” (WHO - World Health Organization)¹⁵.

Vários artigos e revisões têm sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos^{1,11,16-24}, os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação. Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos^{11,22,25,26}, descritos a seguir.

O primeiro, chamado de *validação no laboratório* (do inglês *in house validation*) consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado¹¹. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, onde são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. Pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à *validação completa* (*full validation*)¹¹.

O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho e a validação interlaboratorial. Verifica-se como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a

reprodutibilidade da metodologia e a incerteza associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação. Protocolos internacionalmente aceitos têm sido estabelecidos para a validação completa, mais precisamente o Protocolo Harmonizado Internacional²⁷ e o procedimento ISO²⁸. Estes protocolos requerem um número mínimo de laboratórios e materiais testes para serem incluídos no estudo interlaboratorial para validação completa do método analítico.

II.3 - CONFORMIDADE DO SISTEMA

Antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, deve-se avaliar se o sistema utilizado para a análise é capaz de fornecer dados de qualidade aceitável. Esta avaliação é alcançada com experimentos de conformidade do sistema (system suitability), definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis. A conformidade do sistema pode causar dúvidas quanto ao seu alcance e, por isso, é encontrada em duas abordagens.

A primeira utiliza testes para verificar se a resolução e a repetitividade do sistema cromatográfico são adequadas para a análise a ser realizada. Assim, a conformidade do sistema é realizada antes que o desenvolvimento do método e a validação tenham sido completados. Os critérios selecionados são baseados no desempenho do método determinado durante a validação. Por exemplo, se o tempo de retenção da amostra fizer parte do critério de conformidade do sistema, a sua variação (estimativa do desvio padrão) pode ser determinada durante a validação, que pode ter uma variação de 3 %, por exemplo (baseado nos resultados de validação) durante o uso rotineiro³.

A segunda abordagem considera o sistema como um todo e inclui, além do sistema cromatográfico, a calibração e manutenção dos equipamentos e instrumentos utilizados em todo o procedimento analítico, dentro das especificações. Neste caso, a conformidade do sistema se baseia no conceito de que os equipamentos, componentes eletrônicos, operações analíticas e amostras constituem um sistema integral que pode ser avaliado como um todo. Pode-se dizer então que a conformidade do sistema é a verificação para garantir a sua qualidade antes ou durante a análise de amostras desconhecidas.

Alguns autores consideram que apenas quando o sistema estiver qualificado, a validação do método pode ser desenvolvida. Algumas vezes os critérios para avaliação da conformidade do sistema são definidos antes da validação¹⁴ ou durante as análises³. Estes testes garantem que o desempenho do sistema é apropriado para o uso. É interessante considerar que o ICH (International Conference on Harmonization) e a USP tratam a conformidade do sistema, sem qualquer diferença destacável. O ICH² estabelece a conformidade do sistema como uma parte integrante da validação do método, enquanto a USP¹⁴ a trata em uma seção separada no capítulo 621.

Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados, de acordo com a US-FDA (U. S. Food, Drug and Administration), estão na Tabela 1⁸. O mínimo de dois destes critérios são requeridos para demonstrar a conformidade do sistema de algum método.

Os testes de conformidade do sistema representam um sub-conjunto dos procedimentos de validação do método e eliminam a necessidade de uma revalidação do método por servirem como um controle destes parâmetros.

Tabela 1: Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações ⁸.

Parâmetro	Recomendação
Fator de retenção	O pico deve ser bem resolvido de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido (t_M), $k > 2$.
Repetitividade	RSD < 2% para $n > 5$ é desejável
Resolução (Rs)	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, produto de degradação)
Fator de cauda (TF)	$TF \leq 2$
Número de pratos da coluna sendo usada (N)	Em geral deve ser > 2000 para HPLC

Assim como o sistema cromatográfico deve ser qualificado para sua utilização, todos os equipamentos e variáveis que são utilizados em uma metodologia analítica (balança analítica, vidraria, etc.), também devem ser qualificados e validados, para que a metodologia utilizada seja confiável.

II.4 - LEGISLAÇÃO

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos cromatográficos, apesar de não haver uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a um credenciamento (*accreditation*) de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estas instituições disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos,

respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003⁵ e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003¹². Suas similaridades e diferenças podem ser melhor visualizadas na tabela 2, que contém também os parâmetros da USP¹⁴, ICH² e IUPAC¹¹.

Tabela 2: Parâmetros de validação do INMETRO¹², ANVISA⁵, USP¹⁴, ICH² e IUPAC¹¹.

INMETRO	ANVISA, USP, ICH	IUPAC
Especificidade/Seletividade	Especificidade/Seletividade	Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalo	Intervalo
Linearidade	Linearidade	Linearidade e Calibração
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Determinação ou Quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-	Sensibilidade (inclinação da curva)
Exatidão e tendência	Exatidão	Exatidão e tendência
Precisão Repetitividade Precisão Intermediária Reprodutibilidade	Precisão Precisão Repetibilidade Precisão Intermediária -	Precisão Repetitividade Precisão Intermediária Reprodutibilidade
Robustez	Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-	Incerteza de medição

Apesar da existência destes documentos, ainda não está claro como deve ser executada a validação de metodologia. O parâmetro de conformidade do sistema não é mencionado por nenhum destes documentos, apesar de ser fundamental a avaliação deste parâmetro no início de qualquer procedimento de validação.

É importante esclarecer que *requerimentos* (ou *resoluções*) são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidos e *guias* são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação. Na USP¹⁴, capítulos com numeração menor que 1000, tais como conformidade do sistema, capítulo 621, e dissolução, capítulo 711, são requerimentos. Estes testes devem ser realizados satisfatoriamente para registro do produto no mercado farmacêutico. Os guias são encontrados na USP em capítulos com numeração maior que 1000; por exemplo, validação de métodos, capítulo 1225. Os guias são recomendações e são intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado²⁹.

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através do ICH^{2,3}, na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos.

A USP¹⁴ e a ANVISA⁵ classificam os métodos em 4 categorias e os parâmetros analíticos requeridos em cada categoria se encontram na tabela 3.

CATEGORIA I: Para quantificação de macrocomponentes em matérias-primas ou ingredientes ativos em produtos farmacêuticos acabados (matrizes).

CATEGORIA II: Para determinação de impurezas em matérias-primas ou componentes de degradação em produtos farmacêuticos acabados.

CATEGORIA III: Para determinação de características físico-químicas em drogas a granel ou em produtos acabados

CATEGORIA IV: Testes de Identificação.

Tabela 3: Parâmetros analíticos requeridos, de acordo com a classificação da USP¹⁴ e ANVISA⁵.

Parâmetro analítico	Ensaio Categoria I	Ensaio Categoria II		Ensaio Categoria III	Ensaio Categoria IV
		Quantitativo	Qualitativo		
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Limite de Detecção	Não	Sim	Sim	*	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Faixa de aplicação	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Sim	Não

* Pode ser exigido dependendo da natureza do ensaio.

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)¹¹ também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos, que tem sido utilizado pela ISO (International Standard Organization)¹¹. A norma internacional ISO/IEC 17025¹³, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração, no item 5.4.5, apresenta a validação de métodos como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação. O US-FDA^{29,30} também tem proposto guias sobre validação de métodos.

Assim, órgãos como ICH, IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e outros exigem o item *validação de métodos analíticos* como um requisito fundamental no credenciamento para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica^{3-8,11,12,13,31}. O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos analíticos cromatográficos.

Como estas instituições são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios, é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método têm, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira diferente, para aplicações diferentes.

II.5 - PROCESSO DE VALIDAÇÃO

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e que sejam possíveis de serem realizados^{1,16}. Também devem ser conduzidos de forma que os efeitos possam ser minimizados com o uso do método, variação da faixa de concentração e tipos de amostras propostas no campo de aplicação.

Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método para análise de quantidades pequenas. A frequência com que o método será utilizado, muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês, etc., também influencia no tipo de estudo de validação que é necessário. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Por exemplo, se um método será usado para análise qualitativa em nível muito baixo de concentração, não há necessidade de testar e validar a linearidade do método sobre toda a faixa linear dinâmica do equipamento. O objetivo do método pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares onde o método será utilizado, ou

seja, se o método foi desenvolvido para ser utilizado em um instrumento e laboratório específico, não há necessidade de usar instrumentos de outras marcas ou incluir outros laboratórios nos experimentos de validação²³. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário.

É essencial que os estudos de validação sejam representativos. Eles devem ser conduzidos a fim de fornecer uma visão realista do número de efeitos que ocorram durante o uso do método, bem como cobrir as faixas de concentração e tipos de amostras.

Erros em medições analíticas podem estar presentes devido a diferentes fontes de incerteza e relacionados aos diferentes níveis de concentração. As maneiras utilizadas para representar estas fontes (para uma concentração específica do analito) envolve a determinação de¹¹:

- erro aleatório de medição (repetitividade)
- efeito da corrida cromatográfica (erros sistemáticos e aleatórios)
- efeito do laboratório (controle de temperatura, vidraria calibrada, pureza de reagentes, pessoal treinado, balanças calibradas, etc.)
- efeito da variação da matriz sobre o analito
- variações da metodologia

Através destas diferentes fontes de erros pode ser necessário um trabalho extenso para avaliar se o resultado analítico está correto e qual a fonte de incerteza associada. Através dos estudos de validação, minimizam-se estas fontes de erros e encontram-se quais os aspectos que estão influenciando o resultado analítico¹¹.

II.6 - PARÂMETROS ANALÍTICOS UTILIZADOS NA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

Os parâmetros analíticos utilizados para validação de métodos cromatográficos são:

- seletividade
- linearidade e faixa de aplicação
- precisão
- exatidão
- limite de detecção
- limite de quantificação
- robustez

Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico²³, características de desempenho^{10,11} e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito²³.

Algumas recomendações sobre validação de métodos têm incluído outros termos além dos relacionados. O INMETRO¹² e a IUPAC¹¹ incluem os termos “sensibilidade”, “incerteza de medição”, “aplicabilidade”, “recuperação” e “variação do tipo de matriz”. O ICH² propõe ainda a “conformidade do sistema” como um parâmetro inicial, antes de começar o procedimento de validação.

II.6.1 - SELETIVIDADE

A seletividade de um método é a sua capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como: outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, e outros compostos de propriedades

similares que possam estar presentes. Isso garante que o pico cromatográfico seja exclusivamente do composto de interesse^{14,31}.

Entender os diferentes mecanismos que podem causar interferências durante a detecção, pode ajudar na estruturação dos testes e achar soluções para os problemas encontrados. A medição pode ser alterada porque os reagentes, matriz da amostra ou outros componentes alteram a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse ou porque estes compostos afetam diretamente a resposta. O efeito de erros constantes (interferências) e erros proporcionais (efeito da matriz) podem ocorrer ao mesmo tempo.

Testes de especificidade, como descritos pelo INMETRO¹², necessitam de uma pesquisa cuidadosa do conhecimento disponível na área de aplicação, para que se encontre todos os componentes que precisam ser testados. Assim sendo, o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais iniciais ou do processo, subprodutos e produtos de degradação ou metabólitos e reagentes em branco devem ser analisados. Às vezes, quando não se dispõe de impurezas-padrões ou de referência, se faz necessário expor, de modo intencional, todos os componentes e a matriz a condições extremas: calor (50 °C e 60 °C), ácido (HCl 0,1 mol L⁻¹), base (NaOH 0,1 mol L⁻¹), oxidação (H₂O₂ 3%), radiação UV/Visível, luz fluorescente, para determinar possíveis produtos de degradação¹.

O mesmo significado tem sido freqüentemente utilizado para o termo especificidade^{1,5,14,22,23}. Esta situação gera confusão desnecessária e pode ser evitada utilizando somente o termo seletividade, como sugerido pela IUPAC³². Por outro lado, é importante esclarecer que, para algumas instituições, como o INMETRO¹², seletividade e especificidade são parâmetros distintos, sendo propostos testes de especificidade e testes de seletividade.

Um método que produz resposta para um único analito, pode ser chamado de **específico** e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de **seletivo**^{16,21}. Desde que poucos métodos respondem a apenas um analito, o termo seletividade é mais apropriado.

Apenas depois de assegurada a seletividade do método, os demais parâmetros analíticos devem ser analisados. A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método. Ela deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, podendo coeluir com o composto de interesse.

A seletividade pode ser assegurada de várias maneiras. Comparando os cromatogramas da matriz isenta do analito e da matriz adicionada do analito, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito^{1,3,4,23}. Deve-se observar que o analito incorporado à matriz precisa ser mantido da mesma forma ativa para ser garantida a seletividade.

A segunda maneira é através da avaliação com detectores como arranjo de diodos e espectrômetro de massas, que permitem a comparação do espectro do composto separado com o do analito puro, utilizado como uma indicação da presença do composto puro^{16,19,32}. Estas duas maneiras são as mais utilizadas.

O método de adição de analito também pode ser aplicado para os estudos de seletividade, quando não for possível obter uma matriz isenta do analito^{12,19,33}. Neste caso é construída uma curva analítica com adição do analito na amostra e outra sem a amostra. Os resultados destas duas curvas e seus coeficientes são então representados em um mesmo gráfico em função da concentração do analito adicionado. Se as inclinações de regressão destas duas curvas forem as mesmas, não há interferência da matriz.

Outro procedimento para avaliar a seletividade é através da coleta do composto de interesse e realização de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura do analito como, por exemplo, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos¹⁹.

Para garantir a seletividade, nos últimos anos também estão sendo empregados métodos quimiométricos³⁴.

II.6.2 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação^{2,14,23}.

A correlação entre o sinal medido (área de pico cromatográfico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie³⁵. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta por,

$$y = ax + b \quad (\text{equação 1})$$

onde **y** é o sinal medido, **x** a massa ou concentração da espécie a ser quantificada e **a** e **b** os coeficientes angular e linear da reta, respectivamente. Essas retas são chamadas de *curvas analíticas*, também conhecidas como *curvas de calibração*, que são equações que mostram a resposta de um método analítico como uma função de uma quantidade conhecida do constituinte a ser medido³⁶.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada utilizando o método matemático conhecido como regressão linear³⁷. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação, r^{*38} . Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão^{12,19,39}. No Brasil, a ANVISA⁵ recomenda um coeficiente de correlação maior que 0,99 e o INMETRO¹² um valor acima de 0,90. Cabe salientar que somente um coeficiente de correlação próximo da unidade não assegura a linearidade da curva. A ANVISA⁵ não recomenda nenhum teste para assegurar a linearidade, somente verificar o coeficiente de correlação, o que, analiticamente falando, pode conter um erro. Já o INMETRO¹² é mais criterioso e faz um tratamento estatístico dos dados na curva através do teste t (Student) com 95% de confiabilidade, para verificar se os pontos não estão fora deste intervalo.

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação 1, só é válida até um determinado intervalo de massas ou concentrações da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentrações, dentro do qual se pode construir uma curva analítica linear, é a *faixa linear dinâmica*³⁵. Ainda que as causas para a perda de linearidade sejam características de cada técnica, este é um fenômeno que pode ocorrer com qualquer conjunto de dados. Assim, o

* O termo r significa coeficiente de correlação e r^2 coeficiente de determinação ou coeficiente de correlação múltipla^{39,40} ou eficiência da regressão³⁸. O r expressa a relação de x e y na curva, onde os valores ideais são 1 ou -1, ou seja, quanto mais próximo da unidade maior a probabilidade de existir uma relação linear definida. Valores de r^2 próximos a 1 são um indicativo de um bom ajuste entre a equação escolhida e os dados experimentais e, valores de r abaixo de 0,95 ($r^2 \leq 0,90$) indicam que a regressão não é eficiente³⁸.

cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve ser acompanhado de uma cuidadosa inspeção, para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da faixa linear dinâmica correspondente. Augusto *et al.*³⁵ descrevem uma forma de calcular se os pontos de uma curva analítica estão inseridos na faixa linear, baseando-se em relações geométricas do gráfico de regressão. Este método envolve a determinação de um fator de resposta e sua relação com a concentração do analito. Uma outra abordagem é dividir os dados do sinal pelas suas respectivas concentrações, fornecendo as respostas relativas^{16,17}. Um gráfico é construído com as respostas relativas no eixo y e as concentrações correspondentes, em escala logarítmica, no eixo x. A linha obtida deve ser horizontal sobre toda a faixa linear. São desenhadas outras linhas horizontais paralelas no gráfico, para 95 e 105 % da linha central média das relações. Conclui-se que o método é linear até o ponto onde a resposta relativa intercepta a linha de 95 ou 105 %. A Figura 1 mostra uma comparação da determinação do intervalo linear dinâmico através da curva analítica clássica (Figura 1a) e da sua representação logarítmica (Figura 1b). A construção da curva com a concentração em escala logarítmica permite melhor visualização da faixa linear¹⁶.

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade do método²³. A faixa de aplicação é a faixa de concentração que precisa ser linear na curva analítica, é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método e depende do uso em questão. Várias recomendações sobre qual deve ser a faixa de aplicação são encontradas na literatura:

- A IUPAC¹¹ especifica que os pontos da curva analítica devem ser igualmente espaçados sobre a faixa de concentração de interesse e que

esta faixa compreenda 0–150 % (para impurezas) ou 50–150 % (para macro-componentes) do valor esperado, dependendo de qual destas duas opções for mais adequada.

- Para produtos formulados, a ICH, entre outros, recomenda uma variação de ± 20 % do valor declarado ou esperado^{1,3,8}.
- A ANVISA⁵ especifica um intervalo compreendido entre 80-120 % da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120 % do limite máximo especificado para determinação de impurezas.
- Para resíduos, o GARP (Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas)⁴¹ recomenda uma faixa de concentração com valores variando entre a metade e o quádruplo da concentração do limite de quantificação.

As diretrizes da ICH² e da ANVISA⁵, no Brasil, determinam um mínimo de 5 níveis de concentração para um intervalo linear, juntamente com certos mínimos de variação especificados. O GARP também sugere 5 concentrações que devem ser injetadas em ordem crescente de concentração, no mínimo 3 vezes cada, com estimativa do desvio padrão relativo (RSD) entre as injeções inferior a 5%. A IUPAC¹¹ recomenda 6 ou mais níveis de concentração e o INMETRO¹² recomenda 7 ou mais níveis de concentração. Soares⁴² afirma que um número maior que 6 pontos em uma curva analítica é desnecessário, isto porque a faixa de confiabilidade linear em um nível de confiabilidade de 95% não diminui de maneira vantajosa com mais de 6 pontos no intervalo utilizado na curva analítica.

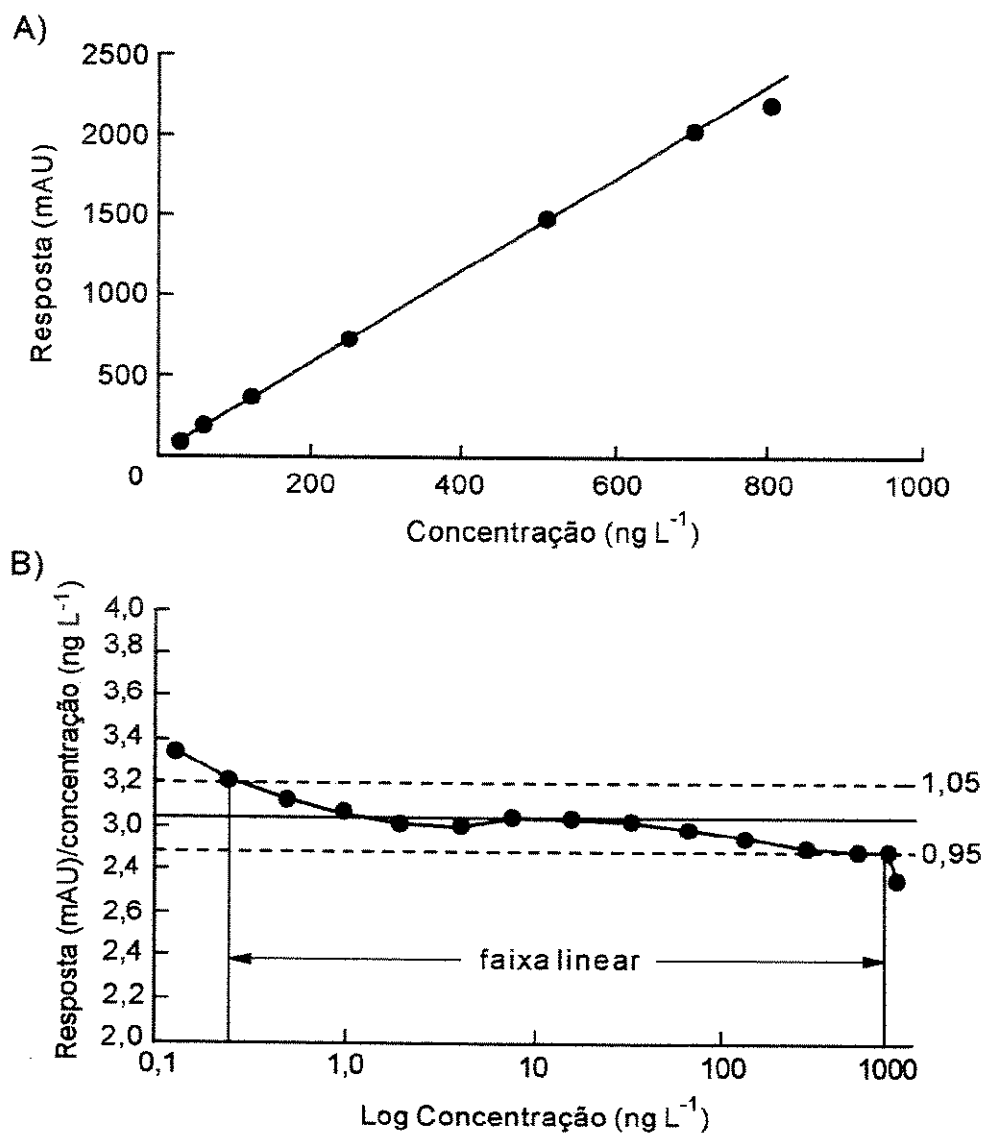


Figura 1: Determinação gráfica das curvas de linearidade através da: (a) curva analítica clássica; (b) gráfico da razão sinal/concentração vs. concentração em escala logarítmica¹⁶.

II.6.2.1 - MÉTODOS DE CALIBRAÇÃO

Dependendo da metodologia aplicada para a quantificação do composto de interesse, os seguintes métodos de calibração podem ser utilizados em cromatografia líquida:

- Padronização externa
- Padronização interna
- Superposição de matriz
- Adição do analito

II.6.2.1.1 - PADRONIZAÇÃO EXTERNA

O método de padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas desta mesma substância com soluções padrão de concentrações conhecidas. Preparam-se soluções do padrão da substância a ser quantificada em diversas concentrações; obtém-se o cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações. Utilizando este gráfico ou a equação da curva resultante, pode-se calcular a concentração desta substância na amostra a partir da área da substância obtida no cromatograma resultante de uma injeção separada. Este método é sensível a erros de preparação das amostras, erros relacionados com a preparação dos padrões e erros de injeção, sendo que estes últimos são minimizados com o uso de injetores rotatórios como os utilizados em HPLC ou com o uso de injetores automáticos em GC^{33,43}.

II.6.2.1.2 - PADRONIZAÇÃO INTERNA

O método de padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas do analito, às quais se adiciona a mesma

quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área do analito / área do padrão interno, que tem concentração constante) com a concentração (variada) do analito. A amostra também é analisada após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma tem-se a concentração da substância na amostra. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra^{33,44} (este último requisito não é necessário quando a detecção é feita por espectrometria de massas, na qual cada composto produz um espectro característico). O método de padronização interna é extremamente útil, especialmente pelo fato de que independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais como temperatura da coluna e quantidade da amostra. Este método é bastante útil em cromatografia gasosa, quando se usa seringa para injeção de amostra⁴⁵.

II.6.2.1.3 - SUPERPOSIÇÃO DE MATRIZ

O método de *superposição de matriz* (matrix-matching) consiste na adição do analito em diversas concentrações em uma matriz similar a da amostra, isenta do analito, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes e é de suma importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré-concentração, extração, separação ou detecção do analito. Assim, sua principal vantagem sobre o método de padronização externa e interna é que ela corresponde melhor a composição da

amostra. Por exemplo, se alguns analitos são determinados em soro humano e uma solução padrão aquosa for usada na calibração, resultados errôneos podem ser obtidos por causa do efeito da matriz; para tais medições uma matriz de soro humano seria melhor para realizar a calibração do que a solução aquosa³³. O método de superposição de matriz tem o inconveniente de não proporcionar a magnitude do efeito de co-extratos, além de aumentar o custo e o tempo das análises⁴⁴. Alguns autores acreditam que o efeito dos co-extratos sobre a resposta do analito deveria ser avaliado pela comparação do método de superposição de matriz com a padronização externa (padrões preparados nos solventes)^{25,46}. Apesar de se obter uma calibração confiável com o método de superposição da matriz, ele é somente uma forma para compensar efeitos da matriz, mas não elimina situações analíticas típicas: a intensidade de um efeito e a concentração de interferentes na matriz podem diferir de uma matriz ou amostra para outra⁴⁶. Assim, em amostras nas quais pode ocorrer o efeito da matriz e não se tem disponível uma matriz isenta do analito, deve se utilizar o método de adição do analito⁴⁶.

II.6.2.1.4 - ADIÇÃO DO ANALITO

O método de adição do analito consiste na adição de quantidades conhecidas do analito que está sendo analisado à quantidade conhecida da amostra. Após obtenção dos cromatogramas, constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades do analito adicionado à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico do analito a ser determinado, sem qualquer adição do analito. A extrapolação da reta define, no eixo das abcissas, a concentração do analito na amostra analisada⁴⁷. O método de adição do analito é trabalhoso, mas é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as

interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta do analito²⁴.

A Figura 2 mostra a inter-relação entre o método de adição do analito, superposição de matriz e padronização externa. De uma forma geral pode-se dizer que o método de padronização externa é realizado quando nenhum erro sistemático proveniente da matriz é suspeito, enquanto o método superposição de matriz compensa o efeito da matriz e o método de adição do analito corrige o efeito da matriz e as mudanças da resposta do instrumento.

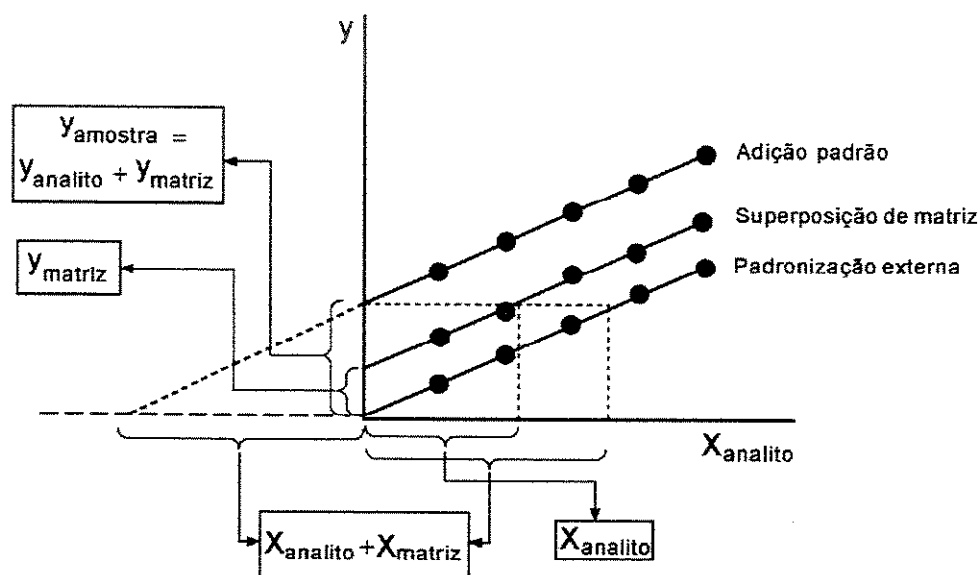


Figura 2: Inter-relação entre os diferentes métodos de construção da curva analítica.

Os métodos de quantificação não têm regras ou guias, exceto que o método final selecionado deve fornecer a melhor exatidão possível, a melhor repetitividade e um alto nível de precisão, de analista para analista, dia por dia e de laboratório para laboratório. O método escolhido para quantificação deve

atingir estes objetivos em um menor tempo possível, com um mínimo de envolvimento do operador, além de utilizar pouca quantidade de amostra. O método de quantificação ideal dependerá da amostra específica, do número de amostras, da complexidade da matriz, da possibilidade de automação e da disponibilidade de padrões.

Quanto aos aspectos práticos, o preparo das soluções pode ser realizado de diversas maneiras. Em uma delas, prepara-se uma solução mais concentrada, a partir da pesagem do padrão, denominada *solução-estoque* e que deve ser preparada pelo menos a cada 6 meses ou com mais frequência, de acordo com o tempo de estabilidade da substância em solução. As soluções preparadas por diluição são chamadas *soluções de trabalho* e recomenda-se que sejam preparadas pelo menos a cada duas ou três semanas⁴¹. Duas abordagens ocorrem no preparo das soluções por diluição. Na primeira, as soluções de trabalho podem partir de uma única solução estoque, através de diluições sucessivas das soluções de trabalho anteriormente preparadas ou através do preparo de todas as soluções diluídas partindo sempre da solução estoque. Este último modo é o mais recomendado, mas dependendo da faixa de concentração em questão, diluições diretamente da solução estoque podem envolver medições de volumes tão pequenos que o erro torna-se grande.

Uma outra maneira de se preparar as soluções seria através da pesagem separada de cada massa de padrão da curva analítica seguida da preparação da solução, ao invés da utilização de diluições consecutivas de uma solução mais concentrada⁴³. Esta é a maneira ideal de se preparar soluções, pois a preparação individual mostra o erro verdadeiro na preparação de todas as soluções padrões, e não erros de diluição. Entretanto, este método torna-se inviável quando se trabalha com análise de traços, já que a quantidade de padrão a ser pesada é tão

pequena que a sensibilidade da balança semimicro analítica não permite tais pesagens devido aos erros associados.

II.6.3 - PRECISÃO

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos, de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas^{2,11}. A precisão é expressa pelo desvio observado entre os resultados ou o desvio dos resultados em relação à sua média.

Tal desvio pode ser expresso através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores dentro da qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável contínua. É uma expressão que estabelece que a média verdadeira está a uma certa distância do valor médio experimental. O intervalo de confiança da média é dado por,

$$\text{intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{equação 2})$$

em que: t_{n-1} = valor crítico da distribuição t de Student com n-1 graus de liberdade. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança³⁹;

e

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{equação 3})$$

em que: s = estimativa do desvio padrão amostral*

\bar{X} = média amostral das medições**

x_i = valor medido

n = número de medições

Normalmente métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2 %. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 20 %, dependendo da complexidade da amostra¹⁶. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas.

Várias recomendações e guias sugerem que a precisão deve ser expressa somente através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), um conceito metrologicamente incorreto, pois a precisão é uma medida da incerteza e considera os erros aleatórios ou indeterminados e deve ser aplicada com métodos estatísticos para garantir a confiabilidade dos resultados.

II.6.3.1 - NÍVEIS DE PRECISÃO

A precisão pode ser considerada em três níveis diferentes:

- repetitividade
- precisão intermediária
- reprodutibilidade

* O desvio padrão, σ é utilizado para um número significativo de amostras, normalmente mais de 20. Na prática, em química analítica, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão, s .

** \bar{X} é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo uma estimativa de μ , a média verdadeira (média da população).

II.6.3.1.1 - REPETITIVIDADE

A repetitividade^{***} (repeatability) representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade:

- mesmo procedimento
- mesmo analista
- mesmo instrumento usado sob as mesmas condições
- mesmo local
- repetições em um curto intervalo de tempo

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em preparações separadas e é algumas vezes denominada precisão intra-ensaio^{1,49}. A ICH² e ANVISA⁵ sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado e expressam estes valores somente com a estimativa do desvio padrão. O INMETRO¹² recomenda um número maior ou igual a sete amostras, em uma concentração similar ao valor esperado.

Não se deve confundir repetitividade com precisão instrumental, medida pelas injeções repetitivas, sequenciais da mesma amostra, tipicamente 10 ou mais vezes, seguida pela média dos valores da área do pico ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções. O ideal é que o RSD, para precisão instrumental, seja $\leq 1\%$. Esta precisão já deve ter sido verificada no parâmetro “Conformidade do Sistema”.

^{***} O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia⁴⁸, sendo utilizado pelo INMETRO¹². Por outro lado, a ANVISA⁵ utiliza o mesmo conceito para o termo repetibilidade.

O INMETRO¹² e a ISO⁵⁰ recomendam sete ou mais repetições (na mesma concentração) e a partir destas medições sucessivas, calcular o limite da repetitividade (r'). O limite de repetitividade associa a estimativa do desvio padrão relativo, isto é, a precisão destas sete ou mais medições que foram realizadas durante a validação, com um intervalo de confiança de 95%. Este limite de repetitividade é um fator que será utilizado após a validação em uso rotineiro, para verificar se a amplitude entre resultados feitos em duplicata de uma mesma amostra possuem diferenças significativas ou não em um determinado intervalo de confiança^{12,50}.

Para um nível de confiança de 95%, para o qual é calculado o limite de repetitividade (r'), o valor do parâmetro t de Student, para infinitos graus de liberdade é 1,96 (anexo1). Sendo feitas medidas em duplicatas tem-se $t\sqrt{n}$ igual a 2,8. Dessa forma, para medidas em duplicatas r' é determinado por,

$$r' = 2,8 \times s \quad (\text{equação 4})$$

s = estimativa do desvio padrão de repetitividade associada aos resultados considerados para duplicata.

II.6.3.1.2 - PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como²:

- diferentes dias ou
- diferentes analistas ou
- diferentes equipamentos ou
- uma combinação destes fatores³.

A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada, porém é menos eficiente quando comparada com os estudos de repetitividade e reprodutibilidade. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, ou estatisticamente sem diferenças no resultado.

O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação da ICH³ e ANVISA⁵ ou do INMETRO¹² para o cálculo de repetitividade descrita acima. A precisão intermediária é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) também conhecido como coeficiente de variação (CV), ou através do desvio associado a um número estatisticamente significativo de amostras.

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

II.6.3.1.3 - REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.)⁴⁸. A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX, etc. É muito comum encontrar desacordo entre métodos analíticos. Isto aparece quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum em estudos colaborativos. Frequentemente altas variações são observadas entre os resultados. Assim, os dados provenientes de apenas um laboratório não são suficientes para avaliar o método. Estudos colaborativos são indispensáveis para avaliação da

reprodutibilidade e também podem ser de grande ajuda para avaliar a exatidão do método^{51,52}.

A IUPAC não aconselha tirar conclusões com menos de cinco laboratórios e recomenda oito laboratórios em seu guia atual¹⁰. Além disso, mais crítico que o número de laboratórios envolvidos é que estes possuam competência e habilidades similares àqueles que usarão o método em rotina.

A documentação que apóia os estudos de precisão em nível de reprodutibilidade deve incluir estimativa do desvio padrão, estimativa do desvio padrão relativo e intervalo de confiança. Horwitz *et al.*⁵² estabeleceram uma relação matemática para expressar a dependência entre os valores do RSD e a concentração da substância, pelo exame de resultados cumulativos de estudos colaborativos envolvendo grande faixa de compostos de interesse, matrizes e técnicas analíticas. Os valores obtidos por esta relação matemática são introduzidos num gráfico e originam a denominada Trombeta de Horwitz⁵², que estabelece que, para baixas concentrações, o intervalo de confiança é maior que para altas concentrações.

II.6.4 - EXATIDÃO

A exatidão representa o grau de concordância entre o valor verdadeiro dos resultados individuais ou um resultado individual encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro^{2,11}. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza⁵³, é puramente teórico e para que tenha significado prático, a estimativa do valor verdadeiro (\bar{x}) deve substituí-lo.

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes

limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em baixos níveis de concentração.

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH² estabelece que um mínimo de 9 determinações envolvendo um mínimo de 3 diferentes níveis de concentração, por exemplo, ensaios em triplicata para 3 níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA⁵.

Qualquer que seja o processo utilizado para avaliar a exatidão, ela será expressa pela média (\bar{x}).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são :

- materiais de referência;
- comparação de métodos;
- ensaios de recuperação;
- adição do analito;

II.6.4.1 - MATERIAIS DE REFERÊNCIA CERTIFICADOS (CRM)

Os métodos cromatográficos dependem fortemente dos padrões de referência e materiais de referência para fornecerem dados exatos. Materiais de referência certificados (CRM) são materiais de referência, acompanhados de um certificado, que possui o valor de concentração de uma dada substância em uma matriz, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Já os padrões de referência são substâncias puras isenta de matrizes e qualquer outro composto. Os materiais de referência certificados e padrões de referência, são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (National Institute of Standards and Technology - USA), LGC (Laboratory of the Government Chemist - UK), USP, etc.

O US-FDA reconhece duas categorias de padrões de referências: compendial e não compendial. Os padrões de referência compendiais podem ser obtidos de fontes como a USP e não necessitam de caracterização posterior. Os padrões de referência não compendiais são substâncias com elevado teor de pureza que podem ser obtidas através de um esforço razoável e devem ser cuidadosamente caracterizados para garantir sua identidade, potência e pureza. É recomendável que fatores de correção de pureza sejam incluídos em qualquer cálculo existente no método.

Os valores obtidos pelo laboratório, a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas, devem ser comparados com os valores certificados do material de referência para verificar a exatidão do método.

II.6.4.2 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

Consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. Esta abordagem assume que a precisão do método de referência é conhecida. Estatisticamente é utilizado o teste t emparelhado³⁹ para verificar se entre os dois resultados diferem significativamente a um determinado nível de confiança.

As análises são efetuadas em replicata, utilizando os dois métodos em separado (o método em desenvolvimento e o método de referência), sobre as mesmas amostras, numa faixa de concentrações em que se pretende validar o método.

II.6.4.3 - ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

A recuperação ou fator de recuperação, R , é definida como a proporção da quantidade de analito, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada⁵⁴.

A informação de recuperação pode ser estimada de CRM (onde a quantidade de analito é previamente conhecida), quando disponíveis, ou através de padrões de referência adicionados às matrizes isentas do analito ou ainda através de um composto *substituto* (surrogate). O substituto é definido como um composto ou elemento puro adicionado ao material teste, cujo comportamento químico e físico é representativo do analito na forma nativa³³. Diz-se que o composto é um substituto porque este é transferido para a amostra e pode não estar efetivamente no mesmo equilíbrio que se encontra o analito na forma nativa, então determina-se a recuperação do substituto, fazendo uma “correção de recuperação” para o analito de interesse⁵⁴. Os compostos substitutos, adicionados nas amostras, podem ser de vários tipos:

- padrão do analito adicionado à matriz isenta de analito ou à amostra (fortificação, incorporação, dopagem, enriquecimento, todos termos provenientes do inglês, “*spiking*”).
- uma versão do analito modificado isotopicamente.
- composto quimicamente diferente do analito, mas representativo de seu comportamento. Algumas vezes este composto é denominado padrão interno^{23,33}.

A limitação do procedimento de recuperação é a de que o analito adicionado não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de analitos adicionados em uma forma que proporcione uma melhor recuperação, ocasionando

avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação do analito, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados.

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração do analito. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada do composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando o analito em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. Para análises em nível de resíduos, o GARP recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação⁴¹. Para componentes de maiores concentrações, níveis de adição podem ser 50, 75, 100, 125 e 150 % do nível esperado para o analito²⁴.

As medidas de recuperação são as mais comuns devido à dificuldade em se obterem CRM (que para certas aplicações nem existem) e é expressa em termos de porcentagem da quantidade medida do analito em relação à quantidade adicionada na matriz (branco ou placebo), em um determinado número de ensaios⁵⁵.

$$R (\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (\text{equação 6})$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120 %, com precisão de até ± 20 %⁴¹. Porém,

dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120 %, com precisão de até $\pm 15 \%$ ⁴¹.

II.6.4.4 - ADIÇÃO DO ANALITO

No método de adição do analito, quantidades conhecidas do analito são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra, que já contenham quantidades (desconhecidas) do analito⁵⁶. A concentração do analito na amostra original pode ser determinada gráfica e matematicamente, como já foi mostrado anteriormente. Em geral, para adição do analito, uma boa abordagem é adicionar 25, 50 e 100 % da concentração esperada do analito na matriz⁵⁷. A amostra sem adição do analito e cada uma das amostras com o analito adicionado devem ser analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada. Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem o analito. Um exemplo seria a análise de β -caroteno em amostras de mamão, nas quais níveis de β -caroteno sempre estarão presentes.

II.6.5 - LIMITE DE DETECÇÃO (LD)

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^{2,11,58}.

O LD pode ser expresso de 3 maneiras diferentes:

a) Através do método visual para determinação do LD:

No método visual utiliza-se a matriz com adição de concentrações conhecidas do analito, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal

analítico pela menor concentração visivelmente detectável. Um exemplo de aplicação deste método é na cromatografia em camada delgada (CCD). Este procedimento também pode ser realizado utilizando os parâmetros de detecção no método de integração do sistema analítico.

b) Através do método da relação sinal-ruído:

Este método somente pode ser aplicado em sistemas analíticos que apresentam o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz⁴¹ e um branco ou matriz isenta do composto de interesse destas amostras. Assim é estabelecida uma concentração mínima na qual o analito pode ser facilmente detectado. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitáveis como estimativas do limite de detecção.

c) Através do método baseado em parâmetros da curva analítica.

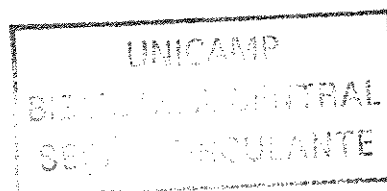
O limite de detecção (LD) pode ser expresso como,

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 7})$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação, ou do erro residual da equação da linha de regressão, para três diferentes curvas.

S = inclinação, em inglês “slope”, ou coeficiente angular da curva analítica.



Para calcular estes dados com critérios estatísticos rigorosos, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de quantificação. Softwares como Microsoft Excel® ou Microcal Origin® podem calcular os parâmetros da curva e a estimativa do desvio padrão relativo destes parâmetros.

II.6.6 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, com um certo limite de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental^{2,11,58}.

Como o LD, o LQ é expresso como uma concentração, sendo que a precisão e exatidão das determinações também devem ser registradas. Esse critério é uma boa regra a ser seguida, porém não se deve esquecer que a determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração e a precisão e exatidão exigidas. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medida torna-se menos precisa. Se houver a necessidade de uma maior precisão, uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. O método analítico e seu respectivo uso ditam esse compromisso.

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado utilizando três vezes o valor de LD obtido pelo método visual, da relação sinal-ruído ou pela estimativa do desvio padrão do coeficiente linear de três curvas analíticas (s) e a inclinação da curva analítica (S), ou a partir da equação 8,

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{equação 8})$$

O método mais utilizado é o da relação sinal-ruído para técnicas analíticas em geral, porém em técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas, a

medição do ruído não é trivial e, às vezes, é subjetiva (já que a curva analítica é construída com a área e não somente o sinal do detector). Além disso, tanto o LD quanto o LQ podem ser afetados pelas condições cromatográficas. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em LD e LQ mais baixos. A determinação cromatográfica desses parâmetros deve considerar tanto o tipo quanto o tempo de uso da coluna.

O melhor caminho para resolver este problema de LD e LQ é a metodologia baseada no uso da estimativa do desvio padrão do coeficiente linear de três curvas analíticas, que é estatisticamente mais confiável.

Uma breve revisão da história, dos tópicos e discussões sobre limites de detecção e quantificação foi feita por Currie⁵⁸. O texto começa com um breve sumário histórico dos limites de detecção na química e termina com uma revisão das deliberações da ISO e da IUPAC e suas posições harmonizadas sobre o conceito e nomenclatura.

II.6.7 - ROBUSTEZ

De acordo com o INMETRO¹², a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face à pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos⁵⁹.

Na verificação da robustez do método, para uma única modificação deliberada, pode-se aplicar o teste t (Student)^{39,60} emparelhado e comparar com o valor sem a modificação. Se não houver uma diferença estatisticamente significativa a um nível de confiança de 95% (por exemplo), pode-se dizer que este parâmetro não afeta o método, apresentando robustez para esta modificação.

Para determinar a robustez de um método para várias modificações, o INMETRO¹² recomenda o teste de Youden. Trata-se de um teste que permite não só avaliar se uma pequena e deliberada modificação no método pode refletir em uma diferença estatisticamente significativa, como também ordenar se uma ou a combinação das influências podem causar diferenças significativas nos resultados finais. Por este método são realizados oito ensaios separadamente para determinar quais os efeitos, das sete diferentes etapas no procedimento analítico, afetam o resultado. As oito medições podem ser realizadas em ordem aleatória.

A IUPAC¹¹ utiliza o mesmo conceito de robustez para a palavra em inglês “ruggedness”. A USP também utiliza o termo “ruggedness” mas com uma definição diferente que lembra reprodutibilidade: “A robustez de um método analítico é o nível de precisão intermediária dos resultados dos testes obtidos pelas análises de algumas amostras sob uma variedade de condições normais de teste, tais como diferentes laboratórios, diferentes analistas, diferentes instrumentos, diferentes lotes de reagentes, diferentes dias, etc.”¹⁴.

Em HPLC, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de fase orgânica na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento.

CAPÍTULO III

INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO OMEPRAZOL

III.1 - INFORMAÇÕES TÉCNICAS DO OMEPRAZOL.

O composto Omeprazol, uma mistura racêmica do 5-metoxi-2-[[[4-metoxi-3,5-dimetil-piridinil)metil]sulfinil]-1-hidroxi-benzimidazol, é um fármaco que reduz a secreção ácida gástrica através de mecanismo de ação altamente seletivo. É utilizado como uma mistura racêmica para tratamentos de curta e longa duração para várias desordens ácidas gastrointestinais. O Omeprazol produz inibição específica da enzima H^+K^+ -ATPase (bomba de prótons) nas células parietais, reduzindo a acidez estomacal⁶¹⁻⁶³.

O (R)-(+)-Omeprazol é metabolizado estereoseletivamente no fígado, principalmente por hidroxilação, pelo citocromo polimórfico P450 enzima CYP2C19, enquanto que o (S)-(-)-Omeprazol é metabolizado para sulfona pela CYP3A4. Devido a esta diferença metabólica, Esomeprazol, o (S)-enantiômero do Omeprazol, tem sido comercializado pela Astra Zeneca sob a marca registrada de Nexium®⁶⁴.

O Omeprazol pode ser transformado em dois principais metabólitos, o 5-hidroxi-omeprazol e o omeprazol sufona⁶⁵, como pode ser observado na figura 3.

A USP descreve uma metodologia para quantificação de Omeprazol¹⁴ e impurezas totais em matéria-prima, utilizando como fase móvel uma mistura de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹ e acetonitrila (70:30), coluna cromatográfica C-18 e detecção ultra-violeta à 272 nm. Porém esta metodologia não faz menção ao produto acabado (cápsula ou comprimido).

Por definição metabólito é qualquer substância produzida ou utilizada durante o metabolismo (digestão). Produtos de degradação são todos os compostos químicos formados a partir de um composto, através de algum tipo de reação. Impurezas são todas as substâncias diferentes do analito, encontrados em uma amostra. Neste trabalho foi utilizado o termo “impurezas” para os compostos diferentes do Omeprazol.

Este trabalho utilizou a mistura racêmica do Omeprazol que é o produto comercial, porém não foi objetivo deste trabalho separar os enantiômeros e sim analisá-los como sendo um único composto.

Para isto, foi desenvolvido e validado um método para determinação, por HPLC, de Omeprazol e algumas impurezas, omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol, em cápsulas e comprimidos.

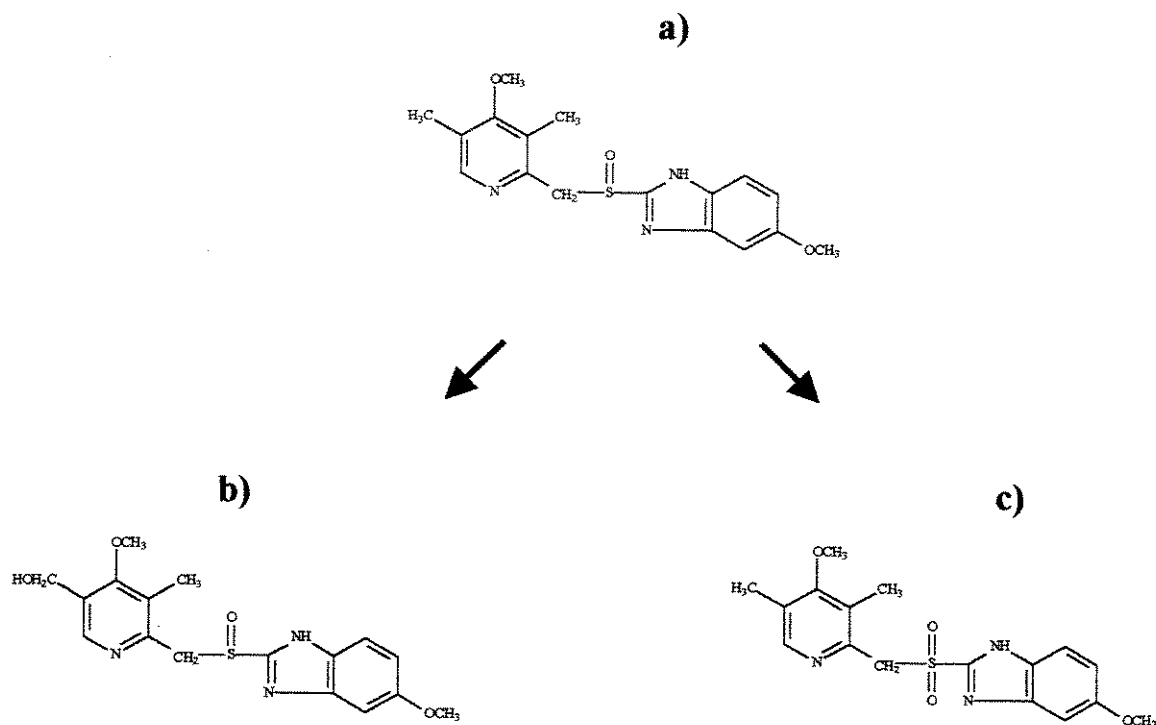


Figura 3: Estrutura química do Omeprazol (a) e seus produtos de degradação, 5-hidroxi-omeprazol (b) e omeprazol sulfona (c).

CAPÍTULO IV

MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1.2 – PADRÕES E REAGENTES ANALÍTICOS

Padrões: Omeprazol (99,0%), omeprazol sulfona (99,8%) e 5-hidroxi-omeprazol (100,0%), cedidos pela empresa Astra Zeneca (Suécia) .

Reagentes: água ultra pura grau 1 (ASTM D1193-91)⁶⁶, acetonitrila grau HPLC (Merck), ácido fosfórico P.A. (Merck), hidróxido de amônio 35% P.A. (Merck).

Compostos utilizados na simulação da matriz (pó): sorbitol P.A. (Merck), óxido de magnésio USP (Buschle e Lepper), lactose anidra P.A. (Merck), fosfato de sódio dibásico P.A. (Merck) e estearato de magnésio USP (Buschle e Lepper).

IV.1.3 – PREPARO DA MATRIZ

Matriz (pó), mistura preparada em laboratório para simular a composição de uma cápsula ou comprimido. Esta matriz foi preparada na seguinte proporção: uma parte de sorbitol, duas partes de óxido de magnésio, uma parte de lactose anidra, uma parte de fosfato de sódio dibásico e duas partes de estearato de magnésio.

IV.1.4 – AMOSTRAS UTILIZADAS

Foram utilizadas quatro amostras de Omeprazol comercializadas nas farmácias da região de Curitiba, todas com valor declarado de 20 mg de Omeprazol.

Três das amostras utilizadas eram cápsulas e uma na apresentação de comprimido.

As amostras de cápsulas e comprimidos foram pesadas individualmente e foi calculada a massa média do conteúdo com vinte cápsulas e comprimidos. Após a determinação da massa média, o conteúdo das cápsulas e os comprimidos

foram moídos e homogeneizados, conforme os procedimentos de amostragem da USP¹⁴.

IV.1.5 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Cromatógrafo a líquido Agilent® modelo HP1100, com detector espectrofotométrico de absorção no UV-Vis de comprimento de onda variável, injetor automático, forno de colunas, bomba quaternária e sistema de aquisição e tratamento de dados ChemStation.

Cromatógrafo a líquido Merck Hitachi modelo D-7000 com detector por arranjo de diodos, forno de colunas, bomba quaternária e sistema de aquisição de dados Merck Hitachi LabChrom.

A coluna cromatográfica utilizada foi da marca Waters®, Nova Pak C-18, 150 mm x 3,9 mm, com partículas esféricas capeadas de 4 µm.

Espectrofotômetro UV-Vis Cintra, duplo feixe com varredura espectral.

Banho de ultra-som, marca Unique, com controle de tempo e temperatura.

Sistema de ultrapurificação de água, modelo Milli-Q® Plus, marca Millipore.

Balança analítica mecânica, marca Mettler, modelo H35AR.

pH metro marca Orion modelo EA 940 com eletrodo de vidro combinado.

Balão volumétrico de vidro âmbar de 100 mL, classe A.

Pipetas volumétricas de vidro de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20 mL, classe A.

IV.1.6 – CONDIÇÕES ANALÍTICAS DO SISTEMA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Vazão da bomba: 1 mL min⁻¹, com eluição isocrática.

Fase móvel : 750 mL de água ultrapura grau 1 com pH = 7,0 (o pH foi ajustado em 7,0 com ácido fosfórico P.A. e hidróxido de amônio P.A.) e 250 mL de acetonitrila grau HPLC.

Volume de injeção: 20 µL.

Coluna : Nova Pak C-18 à temperatura de 30 °C.

Deteção: UV-Vis no comprimento de onda de 300 nm.

Tempo de equilíbrio do sistema: 60 minutos.

IV.1.7 – PARÂMETROS ANALÍTICOS AVALIADOS NA VALIDAÇÃO

IV.1.7.1 – ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE OMEPRAZOL

Para verificar a estabilidade do Omeprazol nas diferentes soluções de diluição, por um período maior que quatro horas, a degradação do omeprazol foi acompanhada cromatograficamente pela diminuição da área resultante no tempo.

a) Estabilidade do Omeprazol dissolvido somente na fase móvel.

Solução 1 - Foram pesados 20,0 mg de Omeprazol em um balão volumétrico âmbar de 100 mL, completando-se o volume desta solução com a fase móvel.

Solução 2 – Diluiu-se 10 mL da solução 1 em outro balão âmbar de 100 mL e completou-se o volume com a fase móvel.

A solução 2 foi analisada cromatograficamente a cada trinta minutos, construindo-se um gráfico de área em relação ao tempo.

b) Estabilidade do Omeprazol com a matriz (pó) incorporada, dissolvidos na fase móvel.

Solução 3 - Foram pesadas 20,0 mg de Omeprazol e 250,0 mg de matriz (pó) em um balão volumétrico âmbar de 100 mL, completando-se o volume desta solução com a fase móvel.

Solução 4 – Diluiu-se 10 mL da solução 3 em outro balão âmbar de 100 mL e completou-se o volume com a fase móvel.

A solução 4 foi analisada cromatograficamente a cada sessenta minutos construindo-se um gráfico de área em relação ao tempo.

c) Estabilidade da amostra comercial de Omeprazol dissolvido na fase móvel.

Solução 5 – Conforme item 1.4 deste capítulo, pesou-se o respectivo a uma cápsula em um balão volumétrico âmbar de 100 mL, completando-se o volume desta solução com a fase móvel.

Solução 6 – Diluiu-se 10 mL da solução 5 em outro balão âmbar de 100 mL e completou-se o volume com a fase móvel.

A solução 6 foi analisada cromatograficamente a cada sessenta minutos construindo-se um gráfico da área em relação ao tempo.

Solução 7 – Pesou-se 20,0 mg de Omeprazol e 250,0 mg de matriz (pó) em um balão volumétrico âmbar de 100 mL, completando-se o volume desta solução com ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi analisada cromatograficamente.

Solução 8 – Pesou-se 20,0 mg de Omeprazol e 250,0 mg de matriz (pó) em um balão volumétrico âmbar de 100 mL, completando-se o volume desta solução com hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi analisada cromatograficamente.

Solução 9 – Pesou-se 20,0 mg de Omeprazol e 250,0 mg de matriz (pó) em um balão volumétrico âmbar de 100 mL, completando-se o volume desta solução com peróxido de hidrogênio 3%. Esta solução foi analisada cromatograficamente.

IV.1.7.2 - SELETIVIDADE

IV.1.7.2.1 – COMPRIMENTO DE ONDA IDEAL PARA O ESTUDO

Primeiramente foi determinado o comprimento de onda ideal para trabalhar com os compostos envolvidos no estudo (Omeprazol, omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol), fazendo uma varredura espectral de 200 a 400 nm.

IV.1.7.2.2 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DE SEPARAÇÃO

Para determinar se algum dos compostos coeluiu com o analito de interesse, foram analisadas cromatograficamente as seguintes soluções:

- a) Solução da Matriz (pó): Foram pesados 250 mg de matriz (pó), em um balão âmbar de 100 mL, e dissolveu-se em fase móvel.
- b) Solução da Matriz (pó) + analito: Foram pesados 250 mg de matriz (pó) e 20 mg de Omeprazol, em um balão âmbar de 100 mL, dissolveu-se em fase móvel.
- c) Solução da amostra de Omeprazol: Conforme item 1.4, pesou-se o respectivo a uma cápsula de Omeprazol, em um balão âmbar de 100 mL, e dissolveu-se em fase móvel.
- d) Solução da Matriz (pó) + analito + impurezas: Foram pesados 250 mg de matriz (pó), 20 mg de Omeprazol, 20 mg de 5-hidroxi-omeprazol e 20 mg de omeprazol sulfona, em um balão âmbar de 100 mL, e dissolveu-se em fase móvel. Dez mL desta solução foram diluídos em outro balão âmbar de 100 mL.

Cada solução diluída foi analisada cromatograficamente. Com base nos cromatogramas obtidos, foram calculados os parâmetros de resolução entre os picos, fator cauda e número de pratos (eficiência).

IV.1.7.2.3 – CURVA ANALÍTICA COM ADIÇÃO DE ANALITO PURO

Para garantir que não havia interferência da matriz nas amostras de Omeprazol, foram avaliados os coeficientes lineares da curva analítica da amostra comercial com adição do analito puro e da curva analítica da matriz (pó) com o analito puro.

IV.1.7.3 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO

Foram preparadas soluções estoques individuais de cada composto em estudo, com a matriz (pó), dissolvidos na fase móvel. Todas as soluções foram preparadas e utilizadas no mesmo dia:

a) As soluções de Omeprazol foram preparadas nas seguintes concentrações:

100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Foi construído um gráfico pela regressão linear das áreas resultantes da análise cromatográfica versus cada concentração do Omeprazol.

A linearidade no intervalo de concentração utilizada, foi confirmada pela construção de um outro gráfico, relacionando área/concentração no eixo das ordenadas (eixo y) e a concentração correspondente em escala logarítmica no eixo das abscissas (eixo x).

Após verificar o intervalo de linearidade estabeleceu-se a faixa de aplicação do método para o Omeprazol.

b) Foi preparada uma solução estoque de omeprazol sulfona com concentração de 10,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e através de diluições sucessivas obtiveram-se as seguintes concentrações:

10,3 ng mL⁻¹, 20,7 ng mL⁻¹, 51,7 ng mL⁻¹, 103,4 ng mL⁻¹, 206,8 ng mL⁻¹, 516,9 ng mL⁻¹, 1033,8 ng mL⁻¹

Foi construído um gráfico pela regressão linear das áreas resultantes da análise cromatográfica versus cada concentração do omeprazol sulfona.

A linearidade no intervalo de concentração utilizada foi confirmada pela construção de um outro gráfico, relacionando área/concentração no eixo das abscissas (eixo y) e a concentração correspondente em escala logarítmica no eixo das ordenadas (eixo x).

Após verificar o intervalo de linearidade estabeleceu-se a faixa de aplicação do método para o omeprazol sulfona.

c) Foi preparada uma solução estoque de 5-hidroxi-omeprazol com concentração de 11,1 µg mL⁻¹ e através de diluições sucessivas, obtiveram-se as seguintes concentrações:

11,1 ng mL⁻¹, 22,3 ng mL⁻¹, 55,7 ng mL⁻¹, 111,3 ng mL⁻¹, 222,7 ng mL⁻¹, 556,7 ng mL⁻¹, 990,0 ng mL⁻¹

Foi construído um gráfico pela regressão linear das áreas resultantes da análise cromatográfica versus cada concentração do 5-hidroxi-omeprazol.

A linearidade no intervalo de concentração utilizada foi confirmada pela construção de um outro gráfico, relacionando área/concentração no eixo das abscissas (eixo y) e a concentração correspondente em escala logarítmica no eixo das ordenadas (eixo x). Após verificar o intervalo de linearidade estabeleceu-se a faixa de aplicação do método para o 5-hidroxi-omeprazol.

IV.1.7.4 – EXATIDÃO E PRECISÃO

Para calcular a exatidão e a repetitividade, prepararam-se oito soluções contendo 30 mg de Omeprazol e 250,0 mg da matriz (pó), em balão volumétrico

âmbar de 100 mL. Utilizou-se a fase móvel como solvente de dissolução e esta solução ficou em banho de ultra-som por 30 minutos para dissolução. Após a dissolução, estas soluções ficaram com a concentração teórica de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram filtradas em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade, antes de serem injetadas no sistema cromatográfico.

Após a execução da análise e cálculo pela curva analítica, a concentração obtida para o padrão de Omeprazol adicionado foi dividida pelo valor efetivamente adicionado (concentração teórica) e multiplicado por 100, obtendo-se assim a percentagem de recuperação (R), conforme equação 6:

A média (\bar{x}) obtida das oito repetições dos resultados práticos de recuperação, foi utilizada para expressar a exatidão do método.

A estimativa do desvio padrão em termos relativos, foi utilizada para expressar o limite de repetitividade (r'), conforme a equação 5.

Este valor de r' será utilizado após a validação para verificar se a amplitude entre os resultados em duplicatas possui uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança.

IV.1.7.5 - LIMITE DE DETECÇÃO (LD) DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL

O LD foi calculado de 3 maneiras diferentes para os compostos omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol:

a) Através do método visual:

Foram preparadas soluções de Omeprazol sulfona nas concentrações de:

$103,4 \text{ ng mL}^{-1}$, $51,7 \text{ ng mL}^{-1}$, $20,7 \text{ ng mL}^{-1}$, $10,3 \text{ ng mL}^{-1}$ e 5 ng mL^{-1} .

Também foram preparadas soluções de 5-hidroxi-omeprazol nas concentrações de:

111,3 ng mL⁻¹, 55,7 ng mL⁻¹, 22,3 ng mL⁻¹, 11,1 ng mL⁻¹.

Foi verificado visualmente, nos cromatogramas individuais, qual a concentração que resultasse no menor sinal visualmente perceptível e que permitisse distinguir entre ruído e sinal analítico.

b) Através do método da relação sinal-ruído:

Para determinar a relação sinal-ruído, foram feitas três injeções da matriz isenta das impurezas e do composto de interesse. Foi calculada a média do ruído resultante, medido em milímetros, na região do tempo de retenção do composto. Estabelecendo-se a relação sinal-ruído de 3:1 para expressar o LD composto.

Foi preparada uma solução na concentração correspondente ao sinal do LD calculado, para confirmar a relação estabelecida.

c) Através do método baseado nos parâmetros da curva analítica.

O limite de detecção (LD) foi expresso conforme equação 7.

Após o cálculo destes valores, prepararam-se soluções na concentração do LD encontrado para confirmar estes resultados visualmente.

IV.1.7.6 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL

Para o cálculo dos LQ, multiplicou-se por três os valores de LD calculados conforme itens **IV.1.7.5 a, b e c**.

IV.1.7.7 – ROBUSTEZ

Foi utilizado o teste de Youden para verificar quais dos parâmetros apresentados na tabela 4, poderiam ser afetados na quantificação de solução de 300 µg mL⁻¹ de Omeprazol.

Tabela 4 : Parâmetros avaliados na determinação da robustez do método.

Parâmetros	Nominal (+)	Variação(-)
Tempo de dissolução (min)	30	40
Quantidade de amostra (g)	0,25	0,5
pH solução de dissolução	7,0	6,8
Solvente para dissolução	Fase móvel	Água
Exposição à luz	Balão âmbar	Balão não âmbar
Agitação	Sim	Não
pH fase móvel	7,0	6,8

Estes parâmetros foram distribuídos aleatoriamente, segundo o teste de Youden, conforme tabela 5, sendo indicado por (+) a utilização do parâmetro nominal e (-) a utilização da variação no parâmetro.

Os resultados de percentagem da concentração obtidos, para cada uma das oito combinações ensaiadas, foram codificados por letras minúsculas (a,b,c,d,e,f,g,h).

Tabela 5 : Combinação utilizada para parâmetros nominais ou com variação.

Parâmetros	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo de dissolução	+	+	+	+	-	-	-	-
Quantidade de Amostra	+	+	-	-	+	+	-	-
pH solução de dissolução	+	-	+	-	+	-	+	-
Solvente para dissolução	+	+	-	-	-	-	+	+
Exposição à luz	+	-	+	-	-	+	-	+
Agitação	+	-	-	+	+	-	-	+
pH Fase Móvel	+	-	-	+	-	+	+	-
Resultado	a	b	c	d	e	f	g	h

O efeito que cada variação do parâmetro causada na metodologia foram calculados pelas fórmulas:

Tempo de extração =	$(a+b+c+d) / 4 - (e+f+g+h) / 4$
Quantidade de amostra =	$(a+b+e+f) / 4 - (c+d+g+h) / 4$
pH solução de dissolução =	$(a+c+e+g) / 4 - (b+d+f+h) / 4$
Solvente para dissolução =	$(a+b+g+h) / 4 - (c+d+e+f) / 4$
Exposição à luz =	$(a+c+f+h) / 4 - (b+d+e+g) / 4$
Agitação =	$(a+d+e+h) / 4 - (b+c+f+g) / 4$
pH fase móvel =	$(a+d+f+g) / 4 - (b+c+e+h) / 4$

A influência da variação no parâmetro foi avaliada comparando-se os valores calculados pelas fórmulas, frente ao valor resultante obtido pelo método com os parâmetros nominais. O resultado que sofreu uma variação maior que 2 desvios padrão do resultado obtido pelo método com os parâmetros nominais foi considerado um parâmetro que causa alteração na metodologia.

IV.1.7.8 – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS COMERCIAIS

Quatro amostras de Omeprazol comercial, vendidas nas farmácias da região de Curitiba, sendo três cápsulas e um comprimido, foram submetidas a análise, em duplicatas, para verificar como a metodologia respondia para o produto e para expressar a incerteza associada aos resultados.

As amostras foram identificadas com letras maiúsculas A (para comprimido), B, C e D (para cápsulas). O procedimento de amostragem foi seguido conforme especificações da USP e os resultados foram expressos com o intervalo de 95 % de confiança, conforme a equação 2.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. – ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE OMEPRAZOL

A figura 4 apresenta a degradação da solução 2 de Omeprazol na fase móvel sem a matriz (pó), conforme item IV.1.7.1, pela diminuição da área num período de 390 minutos.

Utilizando somente o Omeprazol em fase móvel, sua degradação é muito rápida. Num período de 120 minutos (2 horas), há uma perda de mais de 10% em área do produto, como pode ser visto na figura 4.

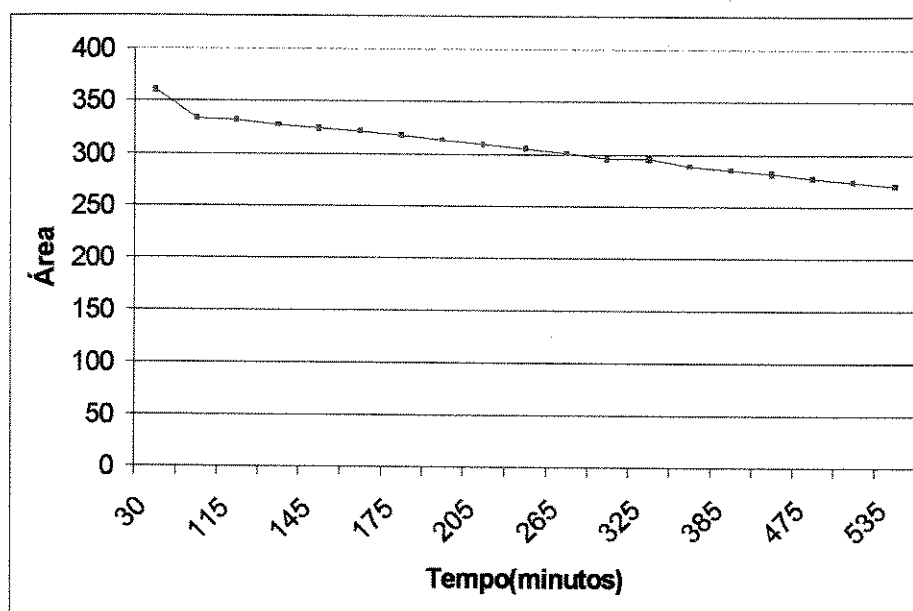


Figura 4: Estabilidade da solução de Omeprazol, sem adição da matriz, em fase móvel pH=7,0 (solução 2).

A figura 5 apresenta a estabilidade da solução de Omeprazol em fase móvel na presença da matriz (pó), pela diminuição da área num período de 990 minutos, enquanto a figura 6 indica a estabilidade da amostra real de Omeprazol dissolvida na fase móvel.

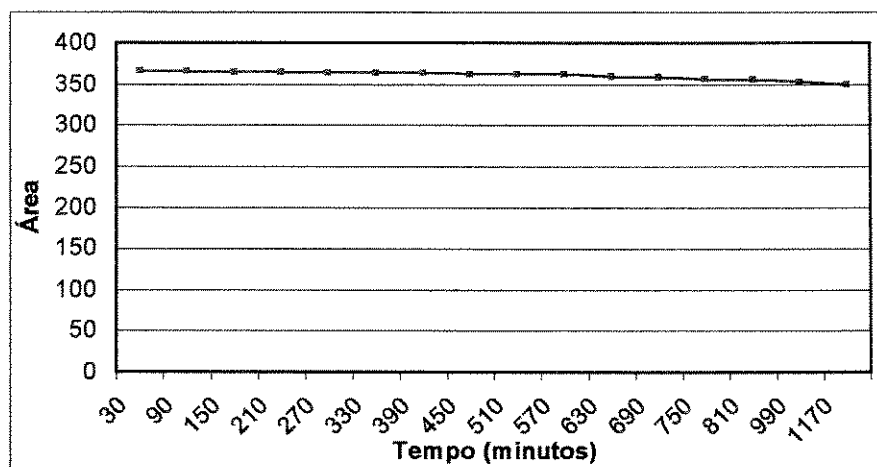


Figura 5: Estabilidade da solução de Omeprazol, com adição da matriz, em fase móvel pH=7,0 (solução 4).

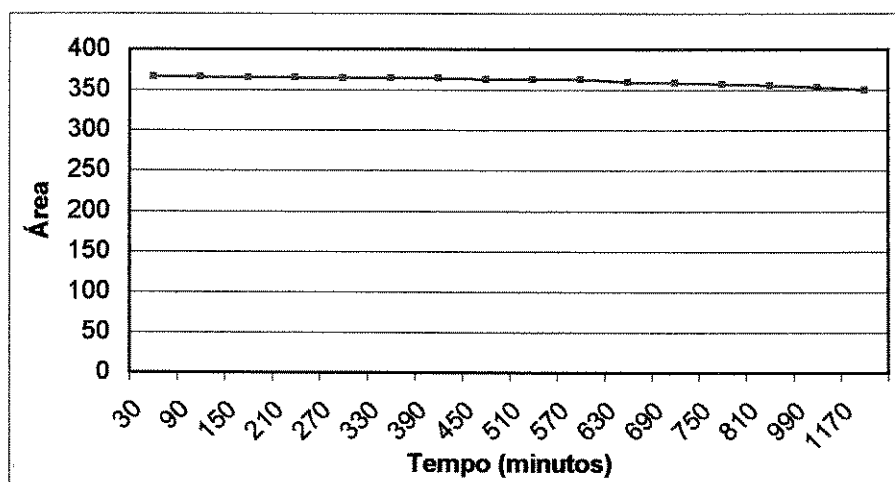


Figura 6: Estabilidade da amostra de Omeprazol em fase móvel pH=7,0 (solução 6).

A solução de Omeprazol com a matriz (pó) simulada em laboratório (solução 4), que pode ser observada na figura 5, e a amostra em fase móvel (solução 6), conforme figura 6, apresentaram maior estabilidade. Observou-se que o Omeprazol na presença da matriz, após 20 horas à temperatura ambiente,

apresentou perda inferior a 3% da área. Assim durante o estudo, utilizou-se a solução de Omeprazol com a matriz incorporada.

O cromatograma da solução de Omeprazol com a matriz pó incorporada dissolvido na fase móvel (solução 4), pode ser observado na figura 7.

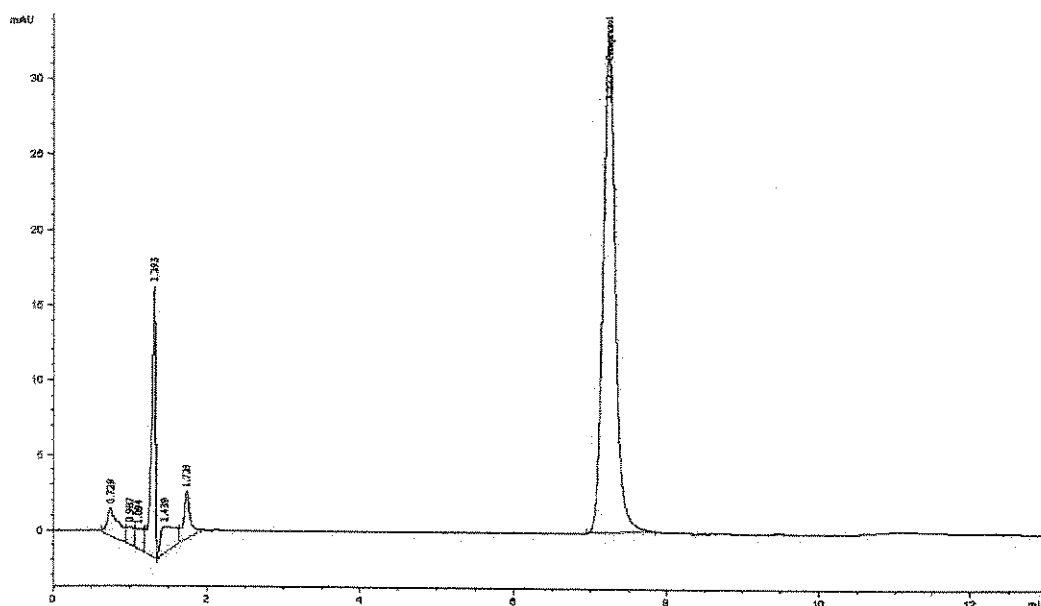


Figura 7: Solução de Omeprazol com a matriz pó incorporada, dissolvido na fase móvel.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

A solução de Omeprazol em meio ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ (solução 7), sofreu degradação como pode ser observado na figura 8.

A amostra de Omeprazol submetida a meio alcalino de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ (solução 8), sofreu uma degradação maior que 90%. Conforme figura 9, foram observados novos compostos próximos ao t_M e um composto de alta absorção no tempo de retenção de 3,8 minutos, que não interferiram na quantificação do Omeprazol no tempo de retenção de 7,6 minutos.

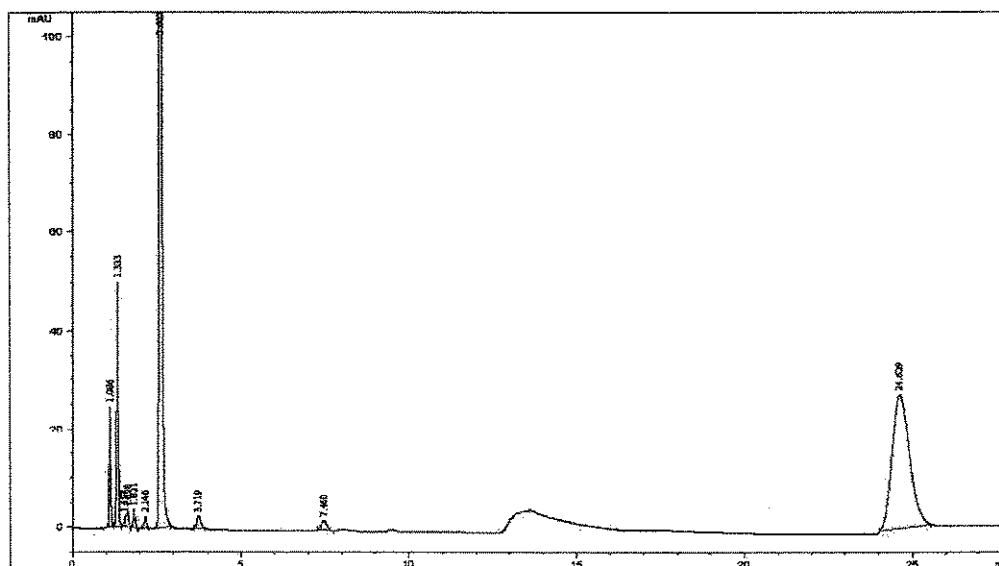


Figura 8: Degradação do Omeprazol em meio ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, na presença da matriz (solução 7).

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de $4 \mu\text{m}$, fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min^{-1} , volume de injeção: $10 \mu\text{L}$, detecção: UV, 300 nm.

A amostra de Omeprazol submetida à solução de peróxido de hidrogênio 3% (solução 9), apresentou vários compostos no início do cromatograma e um composto em 9,5 minutos, que não coeluíram com o Omeprazol (7,6 minutos), como pode ser observado na figura 10.

Podemos observar que o Omeprazol submetida a condições de stress, sofre degradação muito rápida, porém se mantém estável com a matriz pó incorporada e dissolvido na fase móvel.

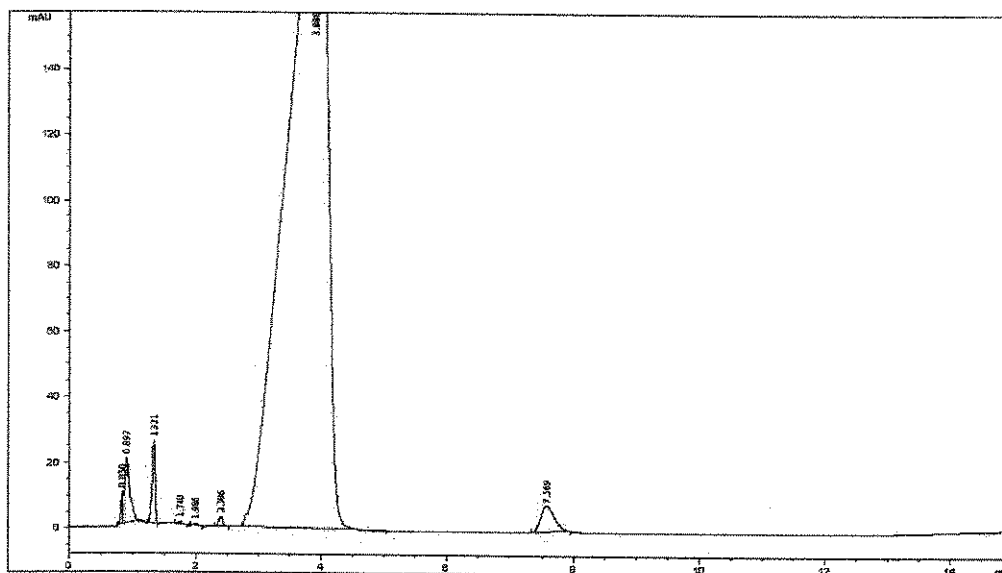


Figura 9: Degradação do Omeprazol em meio hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ (solução 8).

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 µm, fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, detecção: UV, 300 nm.

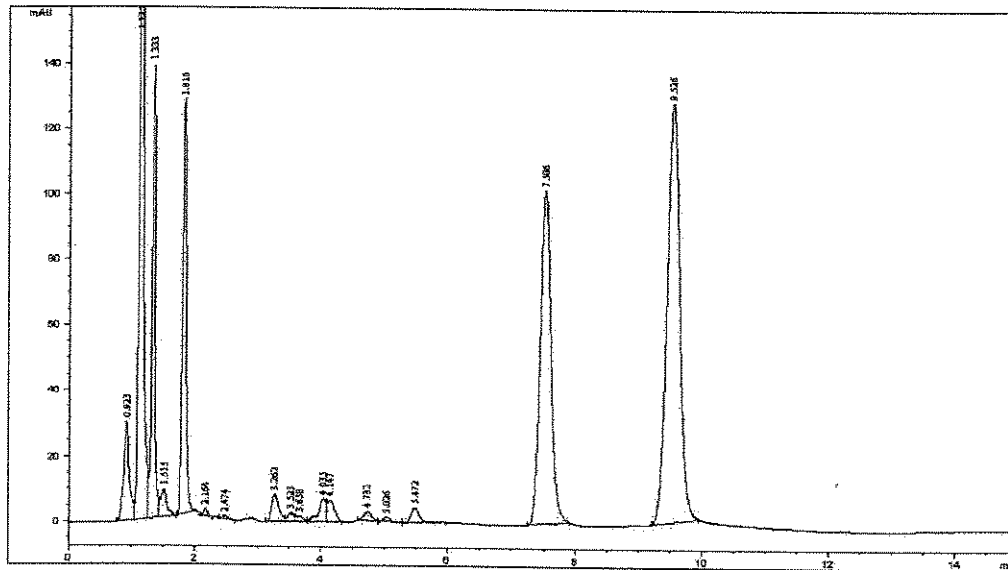


Figura 10: Oxidação do Omeprazol com solução de peróxido de hidrogênio 3% (solução 9).

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 µm, fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, detecção: UV, 300 nm.

V.2 – SELETIVIDADE

V.2.1 – DEFINIÇÃO DO COMPRIMENTO DE ONDA IDEAL PARA O ESTUDO

O comprimento de onda escolhido foi de 300 nm, por ser o comprimento de onda contido na banda de maior absorção, comum a todos os compostos e não presente na fase móvel, conforme figura 11.

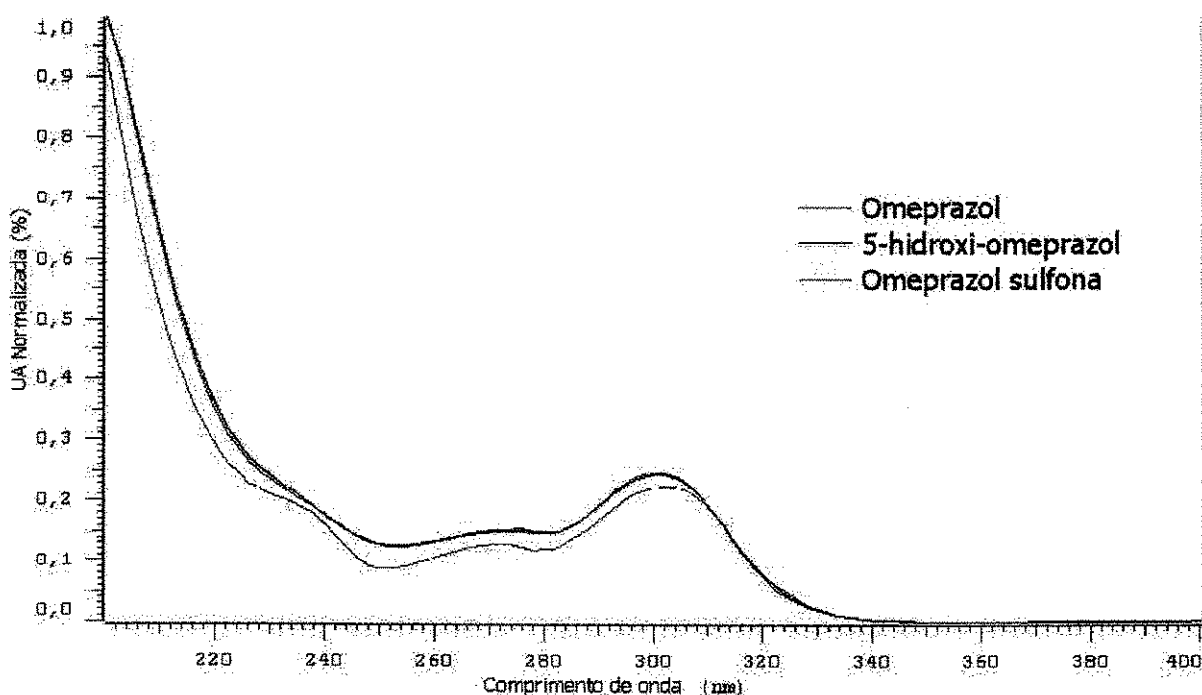


Figura 11: Espectros no UV sobrepostos dos padrões de Omeprazol, 5-hidroxi-omeprazol e omeprazol sulfona em fase móvel com a matriz (pó) incorporada.

V.2.2 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DE SEPARAÇÃO

Pelas figuras 12 e 13, observam-se os tempos de retenção dos padrões, sendo 2,6 , 7,2 e 8,5 minutos, respectivamente para 5-hidroxi-omeprazol, Omeprazol e omeprazol sulfona.

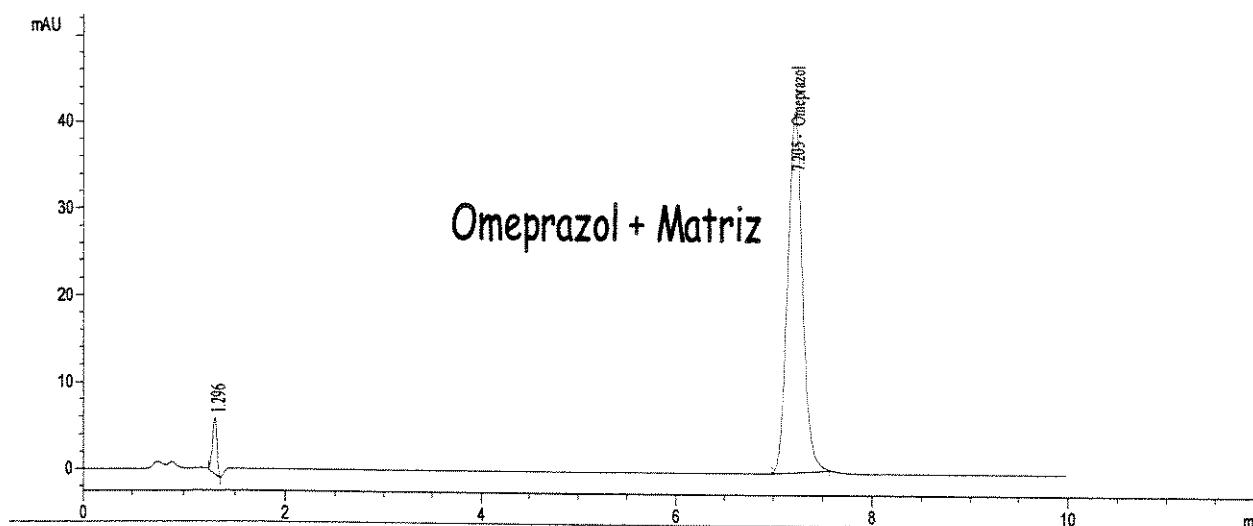


Figura 12: Cromatograma do Omeprazol com adição da matriz.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

Conforme o cromatograma da matriz (pó) simulada em laboratório, figura 14, não ocorre eluição de nenhum interferente nos tempos de retenção dos padrões de Omeprazol, 5-hidroxi-omeprazol e omeprazol sulfona. Também não foram observadas diferenças nos cromatogramas obtidos para o Omeprazol adicionado da matriz (pó), figura 12, e Omeprazol na amostra comercial, figura 15.

Observou-se, pelos tempos de retenção de cada componente, que nenhum composto coeluiu com o Omeprazol.

Assim as impurezas, Omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol, não interferem na quantificação do Omeprazol, bem como os compostos contidos na matriz (pó).

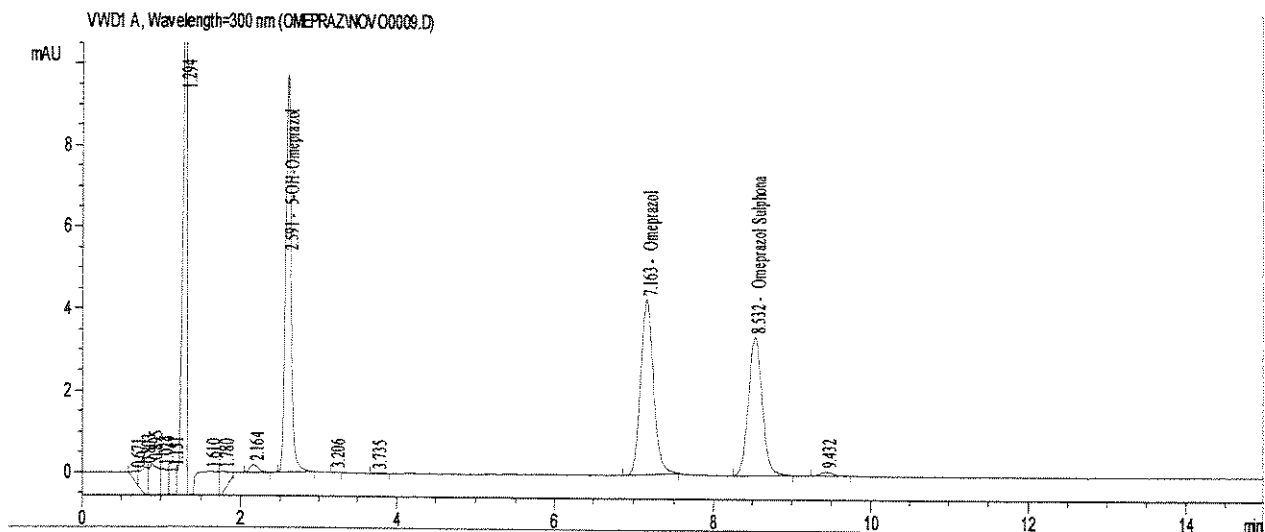


Figura 13: Cromatograma do Omeprazol com adição da matriz (pó) e impurezas.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

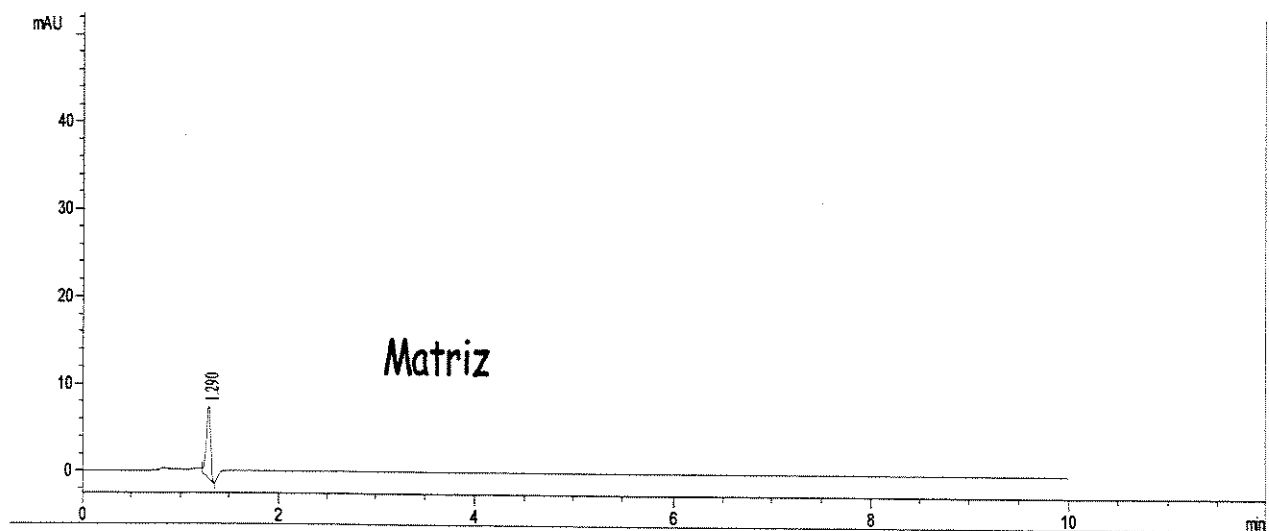


Figura 14: Cromatograma da matriz (pó) na fase móvel.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

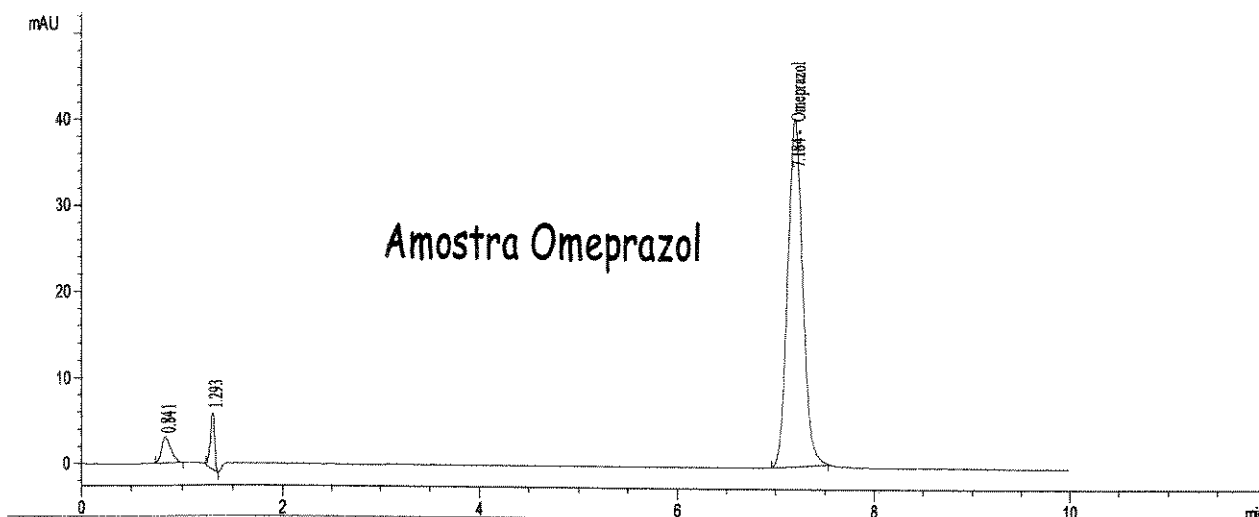


Figura 15: Cromatograma de uma amostra de cápsula de Omeprazol comercial. **Condições cromatográficas:** Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

Os valores da resolução, assimetria e eficiência da separação cromatográfica para o Omeprazol, 5-hidroxi-omeprazol, omeprazol sulfona e a matriz, estão apresentados na tabela 6.

Para todos os componentes, os resultados da resolução, assimetria e eficiência calculados, caracterizam uma boa separação cromatográfica.

Tabela 6: Fatores para verificar a separação entre os compostos (conforme figura 13).

Composto	Resolução* (Rs)	Fator cauda (TF)	Eficiência (N)	t _R
Matriz	-	0,68	1890	1,29
5-hidroxi-omeprazol	2,69	0,78	7020	2,59
Omeprazol	13,7	0,85	10600	7,16
Omeprazol sulfona	4,58	0,91	11400	8,53

* entre o composto anterior e o composto citado.

V.2.3 – CURVA ANALÍTICA COM ADIÇÃO DE PADRÃO

Pelo resultado da curva analítica do Omeprazol, adicionada de analito e não, observa-se, conforme figura 16, que os coeficientes angulares são praticamente iguais (52,746 e 51,365), o que indica que se tratam de retas paralelas.

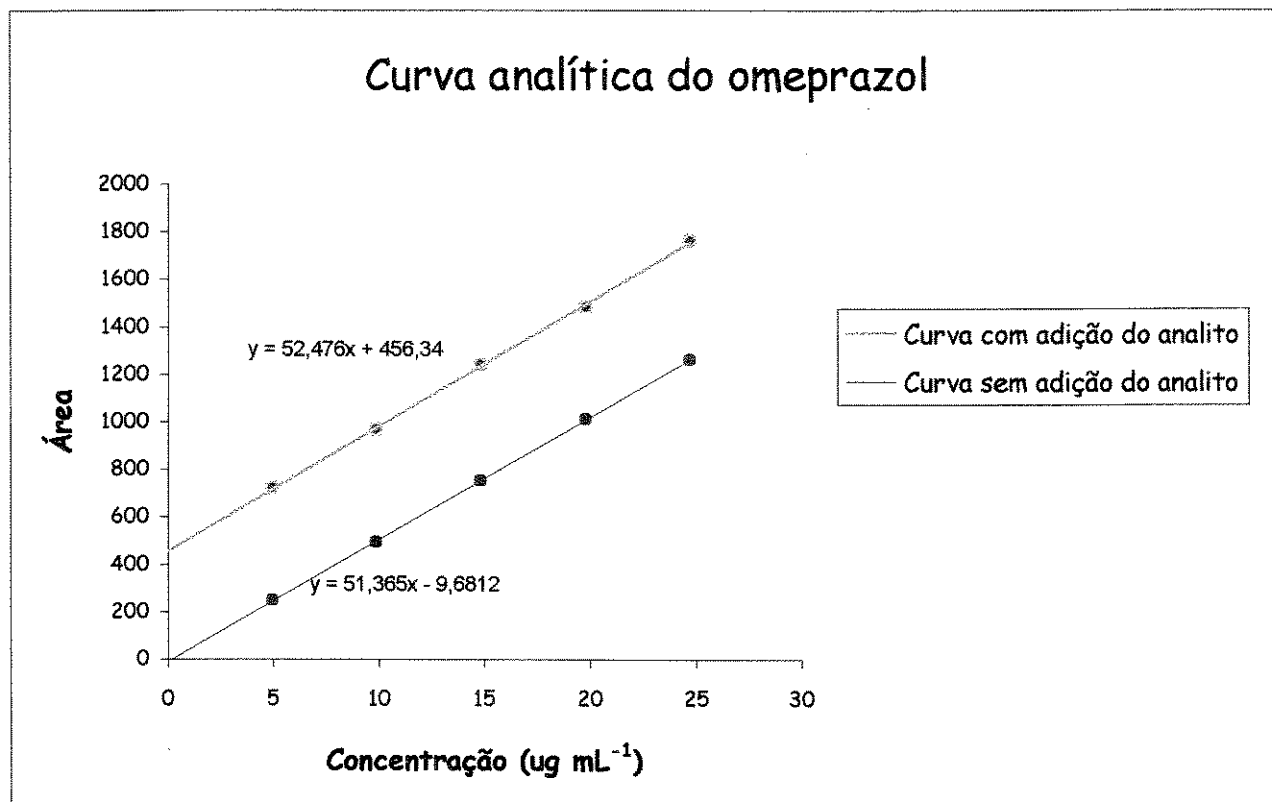


Figura 16: Curva analítica do Omeprazol com adição do analito e sem adição da analito e as equações das retas.

Segundo o INMETRO¹², quando a curva analítica com adição de analito resulta em linha paralela a curva analítica, não há interferência da matriz na quantificação do componente. Assim pode-se assumir como a curva analítica do

Omeprazol com a matriz (pó), sem adição de amostra, para a quantificação do composto.

Com base nos dados obtidos nos itens V.2.1; V.2.2; V.2.3, pode-se afirmar que o método é seletivo para determinação de Omeprazol e suas impurezas, pois os compostos formados com a degradação e os constituintes da matriz não coeluem no tempo de retenção do Omeprazol.

V.3 – LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO

V.3.1 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO DO OMEPRAZOL

Conforme a figura 17, a curva analítica do Omeprazol apresentou um coeficiente de correlação de 0,9998. As altas concentrações de Omeprazol utilizadas (100-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), na construção da curva analítica, foram necessárias para permitir uma possível detecção e quantificação das impurezas no produto comercial. Foram construídas três curvas analíticas e colocados os desvios em cada ponto da curva analítica.

A linearidade na faixa de aplicação estudada foi confirmada pelos resultados do gráfico, relacionando área/concentração e a concentração correspondente em escala logarítmica, como pode ser observado na figura 18. Os pontos que ficaram dentro do intervalo de 95 e 105 % da linha central média das relações, estão dentro da faixa linear dinâmica, o que comprova a linearidade neste intervalo. Assim a faixa de concentração estudada foi assumida como a faixa de aplicação para a quantificação do Omeprazol.

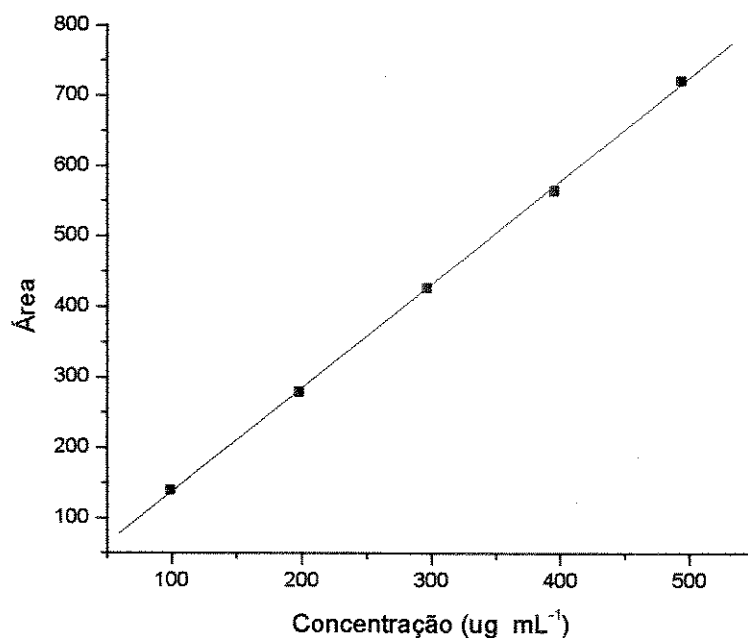


Figura 17: Curva analítica do Omeprazol (100 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para $n=3$.

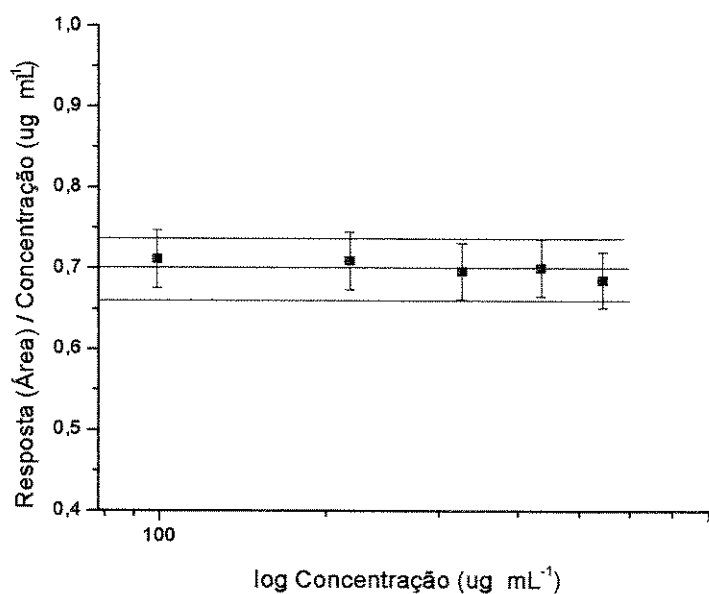


Figura 18: Relação da área/concentração e concentração correspondente em escala log, para o Omeprazol.

V.3.2 - LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Conforme as figuras 19 e 20, as curvas analíticas do omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol apresentaram coeficientes de correlação de 0,9988 e 0,9997, para os intervalos de concentração de 10,3 - 1033,8 ng mL⁻¹ e 11,1 - 990,0 ng mL⁻¹, respectivamente.

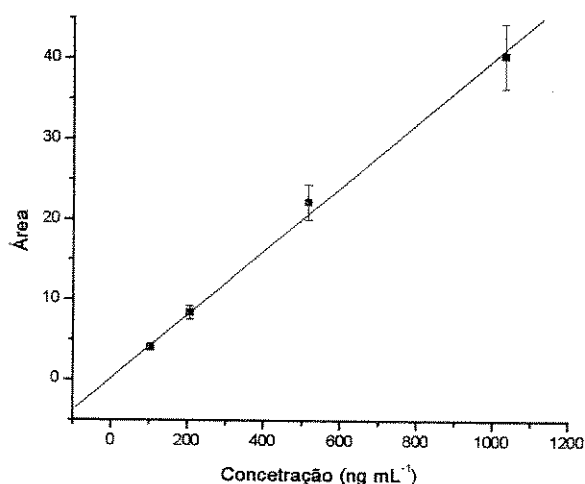


Figura 19: Curva analítica do omeprazol sulfona (10,3 – 1033,8 ng mL⁻¹).

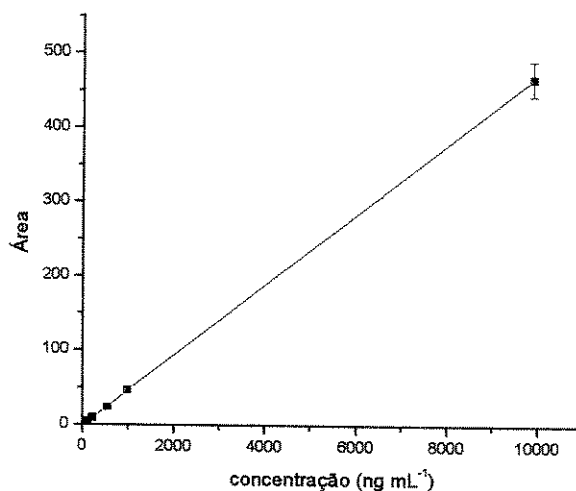


Figura 20: Curva analítica do 5-hidroxi-omeprazol (11,1 - 990,0 ng mL⁻¹).

A linearidade na faixa de aplicação estudada pode ser observada pelos resultados do gráfico relacionando área/concentração e a concentração correspondente em escala logarítmica, conforme figuras 21 e 22, respectivamente, para o omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol.

Os pontos que ficaram dentro do intervalo de 95 a 105 % da linha central média das relações, estão dentro da faixa linear dinâmica. Assim as faixas de concentração de 103,38 – 1033,8 ng mL⁻¹ e 99,0 – 990,0 ng mL⁻¹, foram assumidas como a faixa de aplicação para quantificação respectivamente para o omeprazol sulfona e o 5-hidroxi-omeprazol.

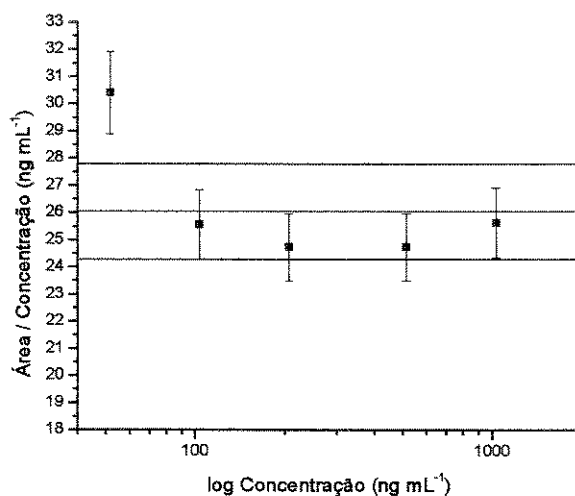


Figura 21: Relação da área/concentração e concentração correspondente em escala log do Omeprazol sulfona.

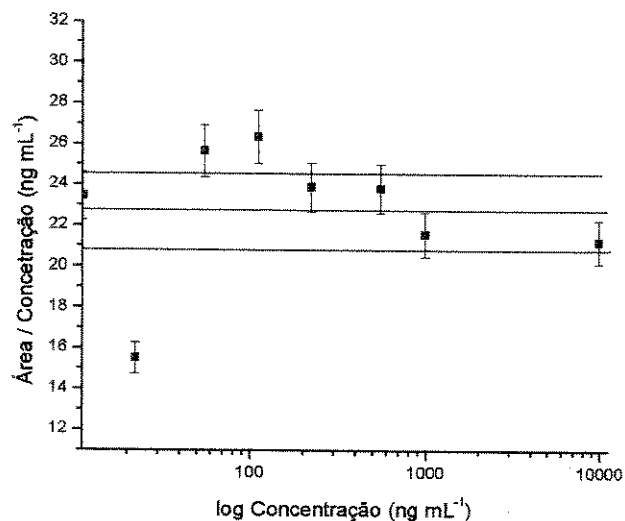


Figura 22: Relação da área/concentração e concentração correspondente em escala log do 5-hidroxi-omeprazol.

V.4 - EXATIDÃO E PRECISÃO

A média dos oito valores de recuperação do Omeprazol (99,71%) em percentagem está expresso na tabela 7, sendo assumido como a exatidão do método.

Tabela 7: Valores obtidos de recuperação em percentagem.

Concentração teórica de Omeprazol em $\mu\text{g mL}^{-1}$	Concentração obtida de Omeprazol em $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recuperação do Omeprazol em (%)
300,0	306,0	102,0
307,0	313,0	101,9
314,0	313,0	99,68
314,0	314,0	100,0
303,0	297,6	98,22
302,0	300,0	99,34
303,0	295,0	97,36
300,0	297,6	99,20
Média R (%)		99,71
RSD(%)		1,62

A precisão (repetitividade) foi calculada conforme equação 4, utilizando a estimativa do desvio padrão relativo (RSD %), expressa na tabela 7.

O limite da repetitividade (r') foi de 4,5% e será utilizado após a validação para verificar se a amplitude entre os resultados em duplicatas possui ou não uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança.

V.5 –LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL

V.5.1 – LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL OBTIDO PELO MÉTODO VISUAL

Conforme pode ser observado nas figuras 23 e 24, as menores quantidades que foram detectadas pelo método visual foram 10 ng mL^{-1} e 11 ng mL^{-1} para omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol, respectivamente.

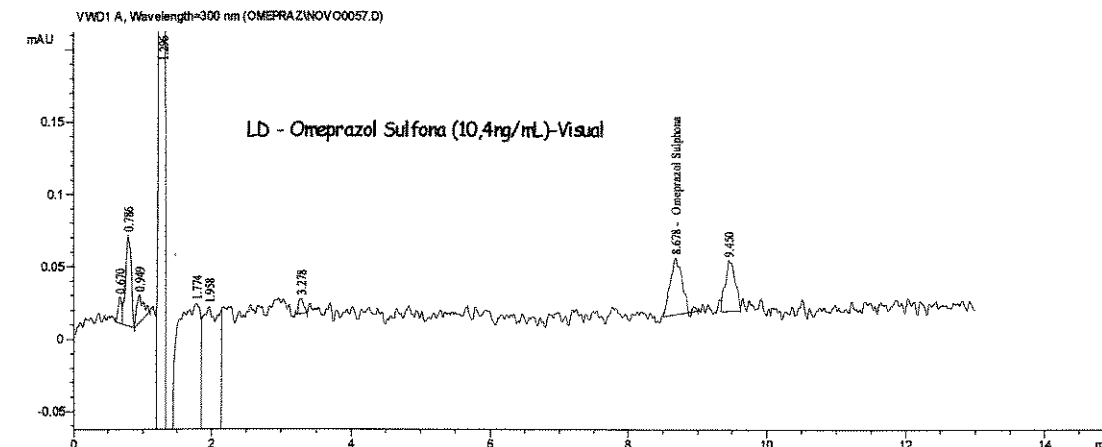


Figura 23: LD do omeprazol sulfona pelo método visual.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min^{-1} , volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

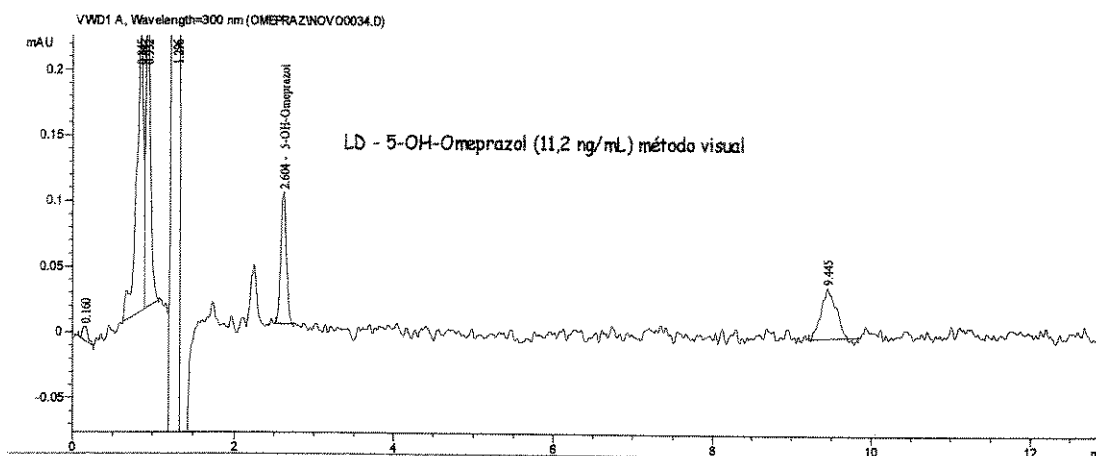


Figura 24: LD do 5-hidroxi-omeprazol pelo método visual.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

V.5.2 – LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL OBTIDAS PELO MÉTODO DA RELAÇÃO SINAL-RUÍDO

As figuras 25 e 26, mostram os cromatogramas com as menores quantidades que foram detectadas pelo método da relação sinal-ruído, 21 ng mL⁻¹ e 11 ng mL⁻¹ para omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol, respectivamente.

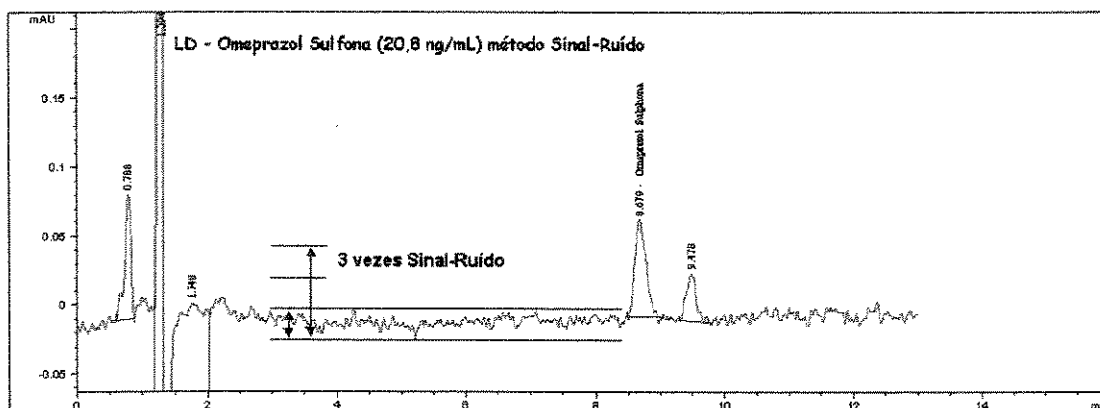


Figura 25: LD do omeprazol sulfona pelo método da relação sinal-ruído.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

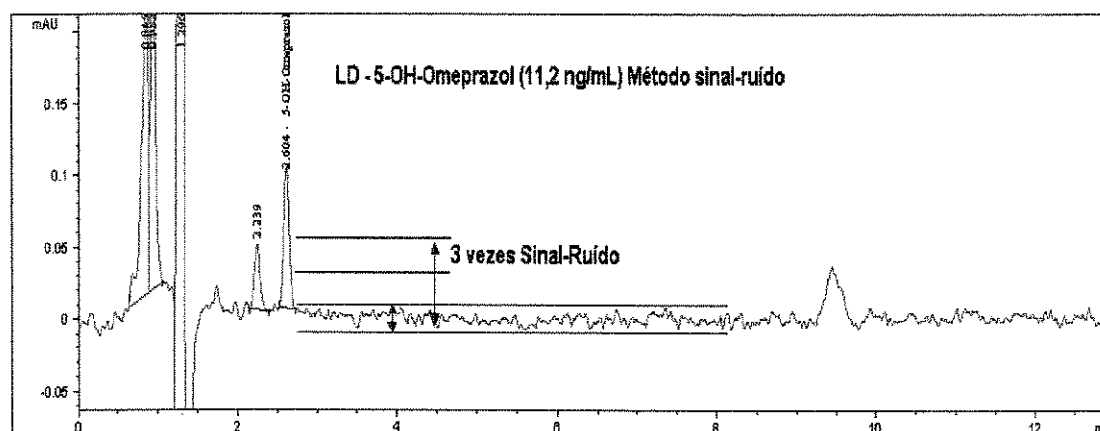


Figura 26: Determinação do LD do 5-hidroxi-omeprazol pelo método da relação sinal-ruído.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

V.5.3 – LD DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL OBTIDAS PELO MÉTODO BASEADO NOS PARÂMETROS DA CURVA ANALÍTICA

As figuras 27 e 28, apresentam os cromatogramas com as menores quantidades que foram calculadas pelo método baseado nos parâmetros da curva

analítica, 52 ng mL⁻¹ e 56 ng mL⁻¹ para omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol, respectivamente.

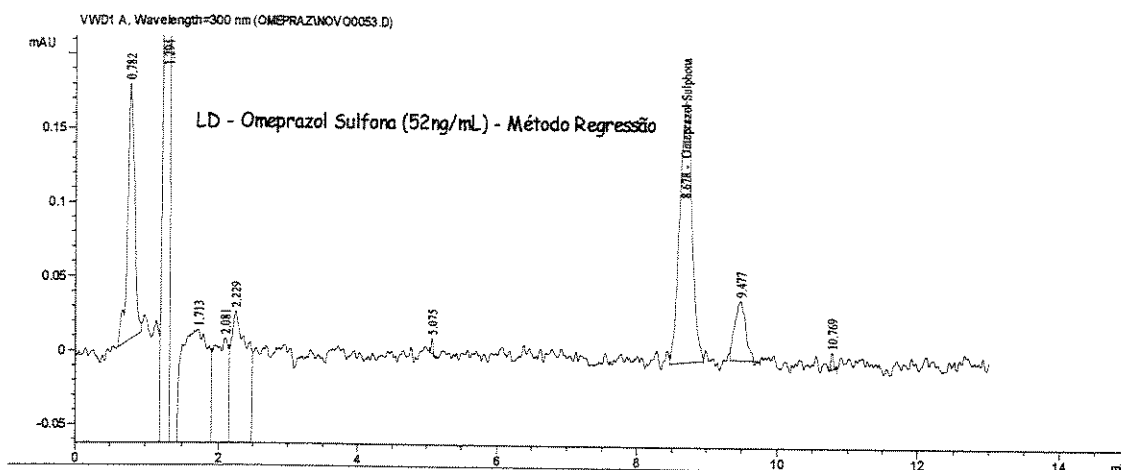


Figura 27: LD do Omeprazol sulfona pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 µm, fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, detecção: UV, 300 nm.

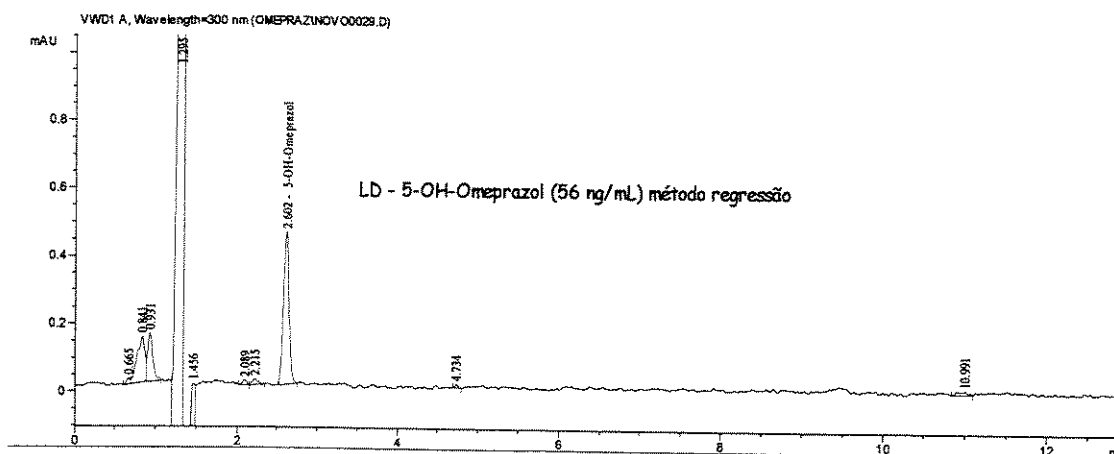


Figura 28: LD do 5-hidroxi-omeprazol pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica.

Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 µm, fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 µL, detecção: UV, 300 nm.

V.6 – LQ DAS IMPUREZAS DO OMEPRAZOL

Os valores para o LQ foram três vezes os valores dos LD obtidos em cada método, conforme pode ser observado na tabela 8:

Tabela 8: Valores de LD e LQ determinados por três métodos diferentes.

Composto	Método	LD (ng mL ⁻¹)	LQ (ng mL ⁻¹)
Omeprazol sulfona	Visual	10	31
Omeprazol sulfona	Sinal-ruído	21	62
Omeprazol sulfona	Regressão	52	156
5-hidroxi-omeprazol	Visual	11	34
5-hidroxi-omeprazol	Sinal-ruído	11	34
5-hidroxi-Omeprazol	Regressão	56	168

Os valores de LQ são os menores valores a serem determinados quantitativamente; abaixo destes valores não se tem valores confiáveis de serem quantificados.

Observa-se que os menores valores de LQ foram obtidos pelo método visual e pelo método da relação sinal-ruído. Estes valores estão sujeitos a uma avaliação subjetiva, sujeita a erros e grandes variações, como pôde ser observado no item V.3.2, por estarem fora da faixa linear dinâmica de concentração do método.

Já os valores obtidos pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, expressam um valor mais realístico do LQ, por serem estatisticamente confiáveis. Além disso, a curva analítica num método cromatográfico é construída com a área. Já nos métodos visual e da relação sinal ruído, considera-se apenas o sinal do detector, isto é a altura do pico e não a sua área.

V.7 –ROBUSTEZ

Os resultados obtidos para a concentração de Omeprazol utilizando a combinação dos parâmetros nominais ou com variação, segundo o teste de Youden, estão na tabela 9, como definido na tabela 4.

Tabela 9: Resultados das concentrações obtidas utilizando o teste de Youden.

Parâmetros	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo de dissolução	+	+	+	+	-	-	-	-
Quantidade de Amostra	+	+	-	-	+	+	-	-
pH solução de dissolução	+	-	+	-	+	-	+	-
Solvente para dissolução	+	+	-	-	-	-	+	+
Exposição à luz	+	-	+	-	-	+	-	+
Agitação	+	-	-	+	+	-	-	+
pH fase móvel	+	-	-	+	-	+	+	-
Resultado	a 101,4%	b 98,8%	c 68,7%	d 69,8%	e 70,2%	f 68,9%	g 98,2%	h 100,2%

Os resultados do cálculo, para o efeito que cada variação causa na metodologia, estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Variação do parâmetro no resultado da robustez da metodologia.

Parâmetro	Variação do parâmetro no resultado (%)
Tempo de dissolução	0,3 %
Quantidade de amostra	0,6 %
pH solução de dissolução	0,2 %
Solvente para dissolução	30 %
Exposição à luz	0,5 %
Agitação	1,7 %
pH fase móvel	0,1 %

Pelo teste de Youden utilizado, verificou-se que apenas a variação no parâmetro solvente para dissolução (fase móvel para água), influenciou na

determinação do Omeprazol. Assim o método não é robusto frente uma variação no solvente de dissolução, mas é robusto para os demais parâmetros.

V.8 - APLICAÇÃO DA METODOLOGIA EM AMOSTRAS COMERCIAIS

Os valores de Omeprazol nas amostras comerciais foram calculados e estão expressos com o intervalo de confiança e são apresentados na tabela 11.

Os valores de Omeprazol declarados no rótulo dos produtos comerciais são de 20 mg por cápsula ou comprimido.

Os cromatogramas das amostras estão representados nas figuras 29 para comprimidos (amostra A) e de 30 a 32 para as amostras cápsulas (amostras B, C e D, respectivamente).

Tabela 11: Teores de Omeprazol em amostras comerciais com a incerteza associada.

Amostras	mg de Omeprazol por amostra	ng de omeprazol sulfona por amostra	ng de 5-hidroxi-omeprazol por amostra
A	20,1 ± 0,1	n/d	n/d
B	19,7 ± 0,2	n/d	n/d
C	19,3 ± 0,1	n/d	n/d
D	19,8 ± 0.1	189	n/d

Todos os valores obtidos nas amostras analisadas, resultaram em pequenas variações nos teores de Omeprazol, sendo muito próximos do declarado no rótulo (20 mg).

Não foram detectadas omeprazol sulfona e 5-hidroxi-omeprazol nas amostras A, B, e C. Na amostra D (cápsula), foi detectado o composto omeprazol sulfona em concentrações acima do limite de quantificação e confirmado com o espectro no ultravioleta.

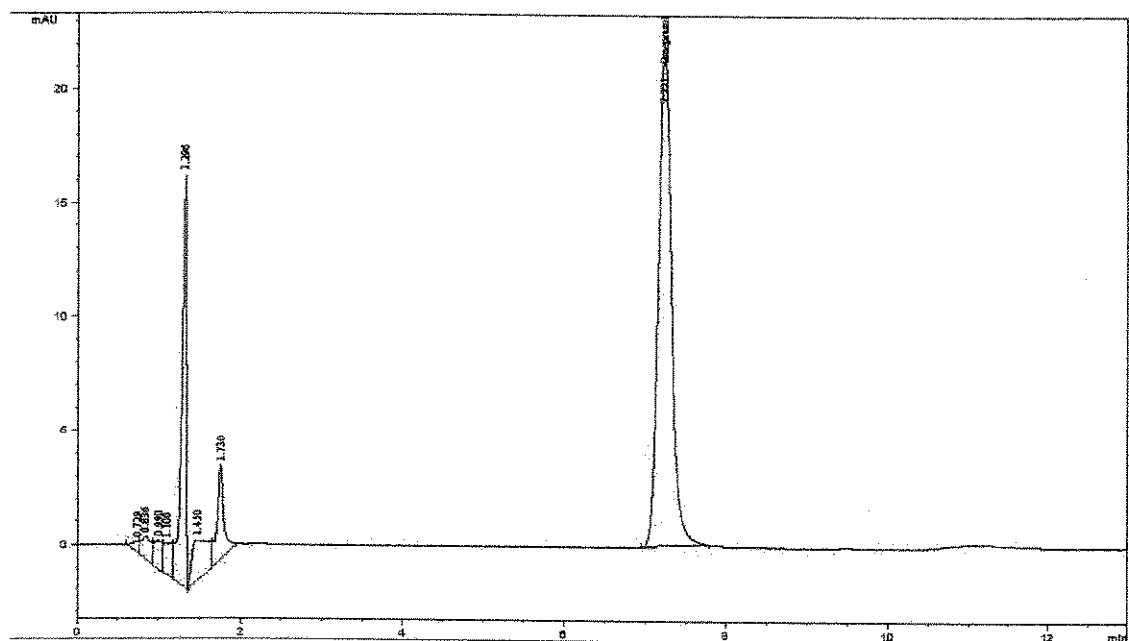


Figura 29: Cromatograma da amostra de omeprazol comprimido comercial A.
Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

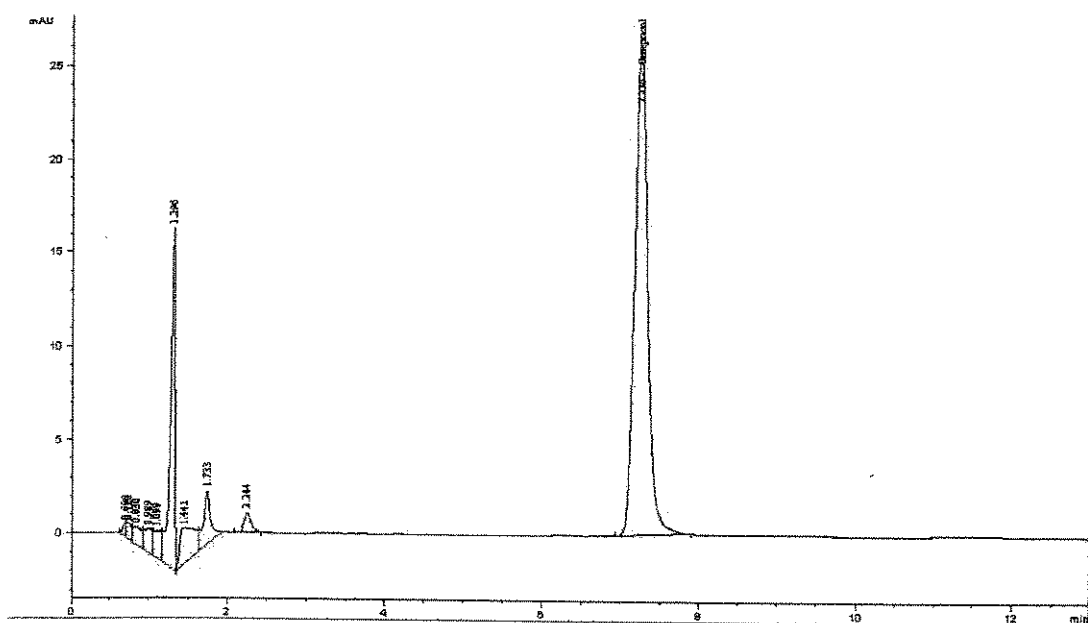


Figura 30: Cromatograma da amostra de omeprazol cápsula comercial B
Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

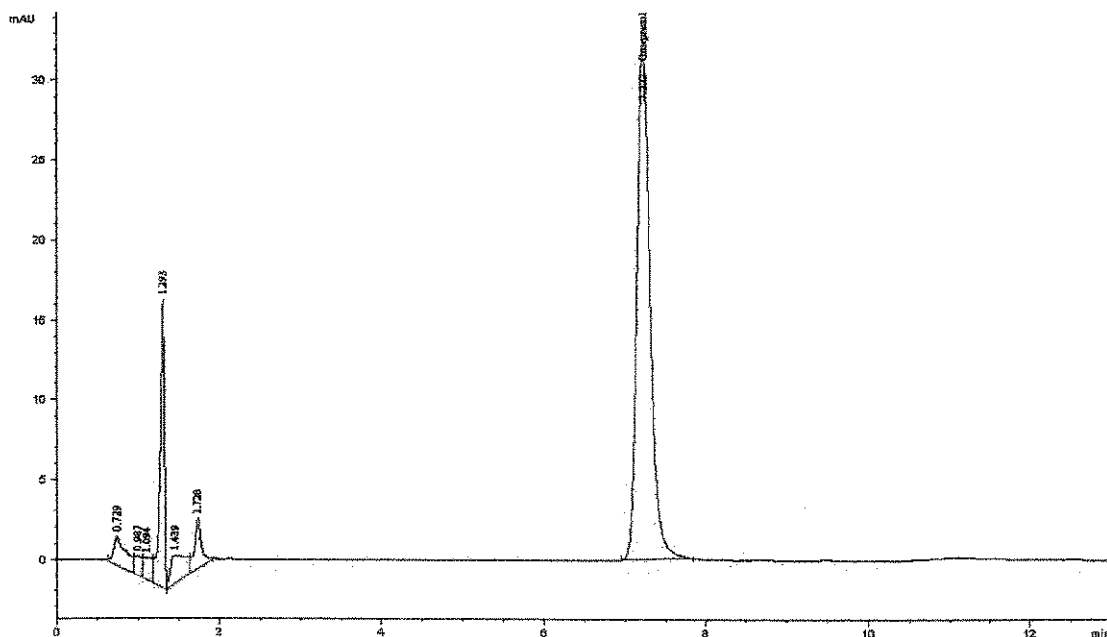


Figura 31: Cromatograma da amostra de omeprazol cápsula comercial C.
Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

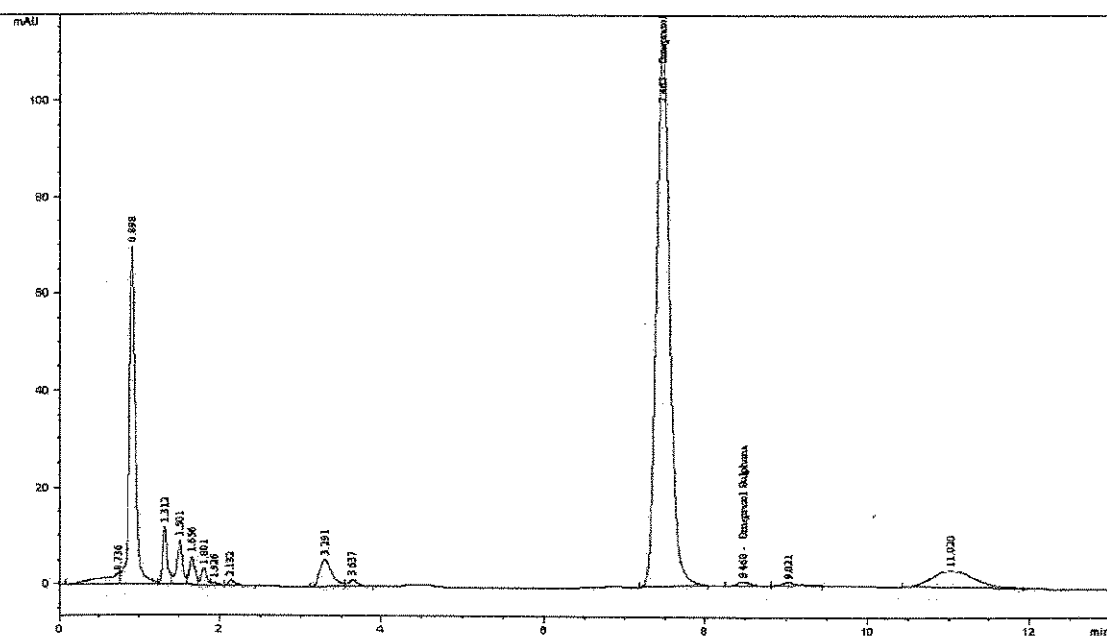


Figura 32: Cromatograma da amostra de omeprazol cápsula comercial D.
Condições cromatográficas: Coluna analítica (150 x 3,9 mm) C18 Novapack, Waters, partículas de 4 μm , fase móvel: água pH 7,0:acetonitrila (75:25 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, volume de injeção: 10 μL , detecção: UV, 300 nm.

CAPÍTULO VI

ROTEIRO PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

VI - ROTEIRO PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS

O estabelecimento de um procedimento unificado para realizar uma validação de métodos analíticos é tarefa difícil, senão impossível, devido às particularidades de cada caso em estudo. Não existem guias oficiais sobre a sequência ótima de experimentos de validação a ser seguida, pois sabe-se que isto depende do método e da amostra. Alguns órgãos, como a USP e ICH, propõem protocolos de validação, nos quais a metodologia é deixada em aberto a fim de que se tenha uma flexibilidade nos procedimentos de validação.

A ICH recomenda 3 diretrizes básicas:

- a seletividade deve ser demonstrada previamente ou ser medida e documentada durante o cumprimento do protocolo de validação;
- o método deve ser desenvolvido e otimizado até o ponto no qual compensa investir tempo e esforço para validá-lo;
- uma vez obtidos os dados, deve ser aplicado um cálculo estatístico válido para sua avaliação e respectiva tomada de decisão, eliminando assim qualquer subjetividade possível com a validação de métodos;

Para facilitar o processo de desenvolvimento e validação de métodos, é proposto, a seguir, um roteiro básico da sequência a ser utilizada em métodos cromatográficos:

1. Estabelecer os parâmetros da literatura ou desenvolvidos no laboratório, para definição do composto. Se a metodologia for cromatografia, também devem ser definidos os parâmetros cromatográficos.
2. Avaliar a estabilidade dos compostos da amostra a serem estudados.
3. Avaliar a seletividade. Esta pode ser avaliada otimizando a separação dos compostos em soluções com todos os compostos contidos na

amostra, nos casos nas quais a metodologia de extração ou preparação da amostra não está otimizada ou, utilizando uma solução contendo a própria matriz, garantindo que o pico de interesse não contenha interferentes da amostra. Se o método não é seletivo, não faz sentido averiguar parâmetros como linearidade ou limite de detecção.

4. Estabelecer os parâmetros relativos à calibração do método, nas quais estão envolvidos os estudos de linearidade, faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, bem como estabelecer o método de quantificação (padronização externa ou interna, superposição de matriz, adição do analito).
5. Se a seletividade foi avaliada anteriormente com padrões, deve-se avaliá-la, neste momento, com a matriz, durante a etapa de desenvolvimento do preparo da amostra.
6. Se forem utilizados métodos de quantificação que incluam a matriz, como superposição de matriz ou adição do analito, deve-se determinar o limite de detecção e quantificação, utilizando o placebo ou o branco da matriz. É conveniente determinar os limites desta maneira após o término do desenvolvimento da metodologia.
7. Avaliar a exatidão e precisão (nível de repetitividade e, se necessário o nível de precisão intermediária) do método.
8. Avaliar a robustez do método. Este parâmetro é um item que tem gerado muita controvérsia. Alguns autores sugerem como o primeiro item a ser avaliado, porém não há um consenso sobre em que etapa avaliar, nem quanto à maneira de conduzi-la. Entretanto, acredita-se que a robustez deve ser avaliada após o término do desenvolvimento da metodologia, a fim de verificar o impacto das mudanças nos resultados da exatidão e precisão do método.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES

VII - CONCLUSÕES

Os conceitos de validação de métodos continuam a evoluir e estão sempre sob consideração. A proposta desta dissertação foi fornecer uma visão geral dos conceitos e procedimentos utilizados em validação de métodos cromatográficos pelos laboratórios industriais, acadêmicos e governamentais. Várias discussões foram inseridas no decorrer do texto, mas alguns pontos devem ser enfatizados para finalizar este tema.

As técnicas de separação cromatográficas são alvos primordiais dos procedimentos de validação, pois envolvem monitoramentos que dizem respeito a aspectos como saúde pública, meio ambiente, comércio exterior e controle de qualidade de produção.

A legislação, no que diz respeito à validação de metodologias, tem várias nuances e diferentes interpretações. Parte desta característica é intencional, pois permite a adaptação para cada tipo de problema. A legislação brasileira tem sido melhor definida no último ano, através de resoluções e recomendações do INMETRO e as resoluções da ANVISA, que são inspiradas em diretrizes da ICH.

É bom salientar que deve haver um consenso entre estas instituições, para que os químicos analíticos possam conversar uma única linguagem e que este termo, “validação de métodos”, seja um procedimento que faça parte de um desenvolvimento analítico.

Para que um estudo de validação seja conduzido com sucesso é necessário que se tenha um amplo conhecimento da legislação referente aos analitos em estudo (pesticidas, fármacos, etc.) e das diretrizes propostas pelas agências reguladoras que atuam na(s) área(s) em questão. O ideal é que se faça uma opção por uma linha a ser seguida e que a utilize durante todo o processo.

Os estudos de validação são importantes para avaliar a incerteza da medição de um composto com um certo grau de confiabilidade, pois expressar um resultado analítico sem sua incerteza associada não é correto.

Observou-se no método validado, que os menores valores de LQ foram obtidos pelo método visual (31 ng mL^{-1} para omeprazol sulfona e 34 ng mL^{-1} para o 5-hidroxi-omeprazol) e pelo método da relação sinal-ruído (62 ng mL^{-1} para omeprazol sulfona e 34 ng mL^{-1} para o 5-hidroxi-omeprazol). Estes valores estão sujeitos a uma avaliação subjetiva, sujeita a erros e grandes variações, por estarem fora da faixa linear dinâmica de concentração do método.

Já os valores obtidos pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, expressam um valor mais verdadeiro do LQ (156 ng mL^{-1} para omeprazol sulfona e 168 ng mL^{-1} para o 5-hidroxi-omeprazol), por serem estatisticamente confiáveis e estarem dentro da faixa linear dinâmica do método. Além disso, a curva analítica num método cromatográfico, é construída com a área. Já nos métodos visual e da relação sinal ruído, considera-se apenas o sinal do detector, isto é a altura do pico e não a sua área.

A exatidão do método pelos estudos de recuperação para o Omeprazol, foi 99,71%, valor aceitável para o estabelecido nas exigências da ANVISA.

A precisão do método no nível de repetitividade para um intervalo de confiança de 95%, foi de 4,5%. Este valor é o limite para verificação da amplitude entre resultados de amostras a serem analisadas em duplicata.

Pelos resultados obtidos na validação, o método para determinação de Omeprazol, pode ser utilizado no controle de qualidade de cápsulas e comprimidos comerciais, no laboratório onde foi feita a validação. Este método também pode ser submetido a estudos interlaboratoriais para verificar sua reprodutibilidade.

É importante esclarecer que a validação de métodos deve ser planejada antes de seu desenvolvimento e execução. A estratégia de validação é específica e é influenciada pelo procedimento analítico utilizado, pela natureza e concentração do composto de interesse e pela matriz. Correlacionando-se o desenvolvimento, otimização e validação de métodos de uma maneira lógica e organizada, os laboratórios podem gerar resultados bastante eficientes e produtivos. A validação de métodos pode ser um processo tedioso, mas a qualidade dos resultados gerada está diretamente relacionada com a qualidade deste processo.

Como projeto futuro esta metodologia poderá ser submetida a estudos interlaboratoriais no Brasil para definição da sua reprodutibilidade. Também poderá ser verificada a sua robustez frente a outros tipos de coluna C-18, abrangendo estudos de recuperação.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shabir, G. A.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 987, 57.
2. International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology*, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.
3. International Conference on Harmonization (ICH), *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
4. Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling, *Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes*, CX/MAS 95/3, 1995.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *Resolução RE nº 899 de 29/05/2003*.
6. United States Food and Drug Administration (US-FDA), *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, **2001**.
7. United States Food and Drug Administration (US-FDA), *Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation*, **2000**.
8. United States Food and Drug Administration (US-FDA), *Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods*, **1994**.
9. European Commission, *Guidance Document on Residue Analytical Methods*, SANCO/825/00, **2000**.
10. Eurachem Working Group, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, **1998**.
11. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 835.
12. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.

13. International Standard Organization, *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/IEC 17025, 1999.
14. United States Pharmacopeia (USP) Convention, *US Pharmacopeia 26,NF 19*, Rockville, 2003.
15. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, *Thirty-second report*, WHO Technical Report Series, No.823, Geneva, 1992.
16. Huber, L.; *LC-GC Int.* **1998**, *11*, 96.
17. Cassidy, R.; Janoski, M.; *LC-GC* **1992**, *10*, 692.
18. Jenke, D. R.; *Instrument. Sci. Technol.* **1997**, *25*, 345.
19. Jenke, D. R.; *Instrument. Sci. Technol.* **1998**, *26*, 1.
20. Jenke, D. R.; *Instrument. Sci. Technol.* **1998**, *26*, 19.
21. Bruce, P.; Minkkinen, P.; Riekkola, M. L.; *Mikrochim. Acta* **1998**, *128*, 93.
22. Massart, D. L.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B.; *Analisis* **1994**, *22*, M14.
23. Swartz, M. E.; Krull, I. S.; *Pharm. Technol.* **1998**, *2*, 12.
24. Leite, F.; *Validação em Análise Química*, 4^a ed., Editora Átomo: Campinas, 2002.
25. Hill, A. R. C; Reynolds, S. L.; *Analyst* **1999**, *124*, 953.
26. van der Voet, H.; van Rhijn, J. A. H.; van de Wiel, H. J.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *391*, 159.
27. Horwitz, W.; *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 331.
28. Internacional Standards Organization, *Precision of Test Methods*, ISO 5725, Geneva, 1994.
29. United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Review Guide: Validation of Chromatographic Methods*, Rockville, 1993.

30. United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *General Principles of Validation*, Rockville, 1987.
31. National Association of Testing Authorities (NATA). Technical Note 17. Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods. 1997.
32. Vessman, J.; Stefan, R. I.; Staden, J. F. V.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D. T.; Fajgelj, A.; Müller, H.; *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73, 1381.
33. Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E. M.; Bosque-Sendra, J. M.; *Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 620.
34. Kalivas, J.H.; Lang P.M.; *Chemometri. and Intelli. Lab. Sys.* **1996**, 32, 135.
35. Augusto, F.; Andrade, J.C.; Custódio, R.; *Faixa Linear de uma Curva de Calibração*, <http://www.chemkeys.com>, acessada em Abril 2003.
36. Barros Neto, B.; Pimentel, M. F.; Araújo, M. C. U.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 856.
37. Custodio, R.; de Andrade, J. C.; Augusto, F.; *Quim. Nova* **1997**, 20, 219.
38. Chui, Q. S. H.; Zucchini, R. R.; Lichtig, J.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 374.
39. Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.E.; *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, Editora da Unicamp: Campinas, 2001.
40. Miller, J. N; *Analyst* **1988**, 116, 3.
41. Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP), *Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos* (apostila), 1999.
42. Soares, L.M.V.; *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2001**, 60, 79.
43. Krull, I.; Swartz M.; *LC-GC* **1998**, 16, 1084.
44. Egea-González, F. J.; Torres, M. E. H.; López, E. A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Vidal, J. L. M.; *J. Chromatogr. A* **2002**, 966, 155.
45. Lanças, F.M., *Cromatografia em Fase Gasosa*, Acta: São Carlos, 1993.

46. Cuadros-Rodríguez, L.; Garcia-Campaña, A. M.; Almansa-López, E. M.; Egea-González, F. J.; Cano, M. L. C.; Frenich, A. G.; Martinez-Vidal, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, 478, 281.
47. Berg, R. G.; Murta, A. L. M.; Kugler, W.; *Quim. Nova* **1988**, 11, 288.
48. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), *Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia*, 2ª ed. SENAI/DN, Brasília, **2000**.
49. Green, J.M.; *Anal. Chem.* **1996**, 68, A305.
50. International Standard - ISO 5725-6. *Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results – Use in Practice of Accuracy Values*, International Organization for Standardization, Geneva, **1994**, Part 6.
51. Vial, J.; Jardy, A.; *Chromatographia* **2001**, 53, S-141.
52. Horwitz, W.; Kamps, L. R.; Boyer, K. W.; *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **1980**, 63, 1344.
53. International Standard Organization, *Statistics-Vocabulary and Symbols-Part 1: Probability and General Statistical Terms*, ISO 3534-1, **1993**.
54. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Fajgelj, A.; Willetts, P.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 337.
55. Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 2201.
56. de Andrade, J. C.; *Quim. Nova* **1987**, 10, 159.
57. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; *Practical HPLC Method Development*, 2ª ed., Wiley: New York, 1997, cap. 15.
58. Currie, L.A.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, 391, 127.
59. Heyden, Y. V.; *Analisis* **1994**, 22, M27.
60. Miller, J. C.; Miller, J. N.; *Statistics for Analytical Chemistry*, 2ª ed., Ellis Horwood: Chichester, 1988.
61. Yim D.; Jeong J. E.; Park J. Y.; *J. Chromatogr. B* **2001**, 754, 487.

62. Cheng F. C.; Ho Y. F.; Hung L. C.; Chen C. F.; Tsai T.H.; *J. Chromatogr. A* **2002**, 949, 35.
63. Yuen K. H.; Choy W. P.; Tan H. Y.; Wong J. W.; Yap S. P.; *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **2001**, 24, 715.
64. Cass Q.B.; Lima V.V.; Oliveira R.V.; Cassiano N.M.; Degani A.L.G.; Pedrazzoli Jr. J.; *J.Chromatogr. B* **2003**, 798, 275.
65. Kanazawa H.; Okada A.; Matsushima Y.; Yokota H.; Okubo S.; Mashige F.; Nakahara K.; *J.Chromatogr. A* **2002**, 949, 1.
66. American Society for Testing and Materials - ASTM D 1193 – *Standard Specification for Reagent Water*, 1999.

ANEXO 1

Anexo 1. Valores de t de Student.

G.L.	Nível de confiança (%)	
(v)	95	99
1	12,706	63,657
2	4,303	9,925
3	3,182	5,841
4	2,776	4,604
5	2,571	4,032
6	2,447	3,707
7	2,365	3,499
8	2,306	3,355
9	2,262	3,250
10	2,228	3,169
11	2,201	3,106
12	2,179	3,055
13	2,160	3,012
14	2,143	2,977
15	2,131	2,947
16	2,120	2,921
17	2,110	2,898
18	2,101	2,878
19	2,093	2,861
20	2,086	2,845
25	2,060	2,787
30	2,042	2,750
50	2,009	2,678
80	1,990	2,639
∞	1,960	2,580