



Minicursos 2010

Validação e protocolos em análises químicas

Ministrante: Leonardo César Amstalden
Laboratório T&Analítica - Campinas/SP
Contatos: leonardo@teanalitica.com.br

Apoio



Ribeirão Preto, 22 de maio de 2010



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

VALIDAÇÃO E PROTOCOLOS EM ANÁLISES QUÍMICAS

Leonardo César Amstalden

Gerente da Qualidade - Laboratório T&E Analítica – Campinas – SP



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Métodos Químicos: São procedimentos empregados para IDENTIFICAR (Análise Qualitativa) e/ou QUANTIFICAR (Análise Quantitativa) compostos químicos:

Análise qualitativa

A análise qualitativa é empregada quando se pretende determinar ou identificar as espécies ou elementos químicos presentes numa amostra, podendo ser eles atômicos ou moleculares.

Análise quantitativa

A análise quantitativa é empregada para se determinar a quantidade de uma espécie ou elemento químico numa amostra. Sendo utilizada para a determinação de concentrações, volumes ou massa exata da substância, através de técnicas de: gravimetria, volumetria, instrumentais, entre outras é expressa por resultados numéricos dos componentes da amostra.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

- Métodos Instrumentais em química analítica foram desenvolvidos a partir do início do século XX, baseados em propriedades como condutividade elétrica, emissão ou absorção de luz dos analitos presentes em um composto.
- Técnicas de separação, determinação e quantificação das espécies químicas passaram a ser conhecidas como MÉTODOS DE ANÁLISE INSTRUMENTAL e foram favorecidas pelos dispositivos tecnológicos eletrônicos e capacidade de processamento dos computadores.
- A maioria dos equipamentos analíticos modernos possuem ou estão conectados a um ou mais dispositivos eletrônicos sofisticados capazes de detectar e registrar dados relativos aos analitos



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Um método quantitativo é baseado na resposta do sistema de detecção do instrumento ao sinal gerado pela espécie química de interesse presente na amostra em estudo, comparado com aquele gerado por um produto que tem esta mesma espécie química de interesse presente em uma concentração conhecida de declarada (Padrão Analítico).

A resposta geralmente é um sinal eletrônico que gera um pico de intensidade, cuja área é calculada através de um software de aquisição de dados do instrumento, fornecendo um valor numérico aos sinais que representam a espécie.

Assim são quantificados os sinais gerados pelas técnicas de HPLC, CFG, AA, ICPlasma, dentre outras.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Até as décadas de 80 e 90, um laboratório desenvolvia um método analítico baseando-se principalmente na resposta linear do detector a diferentes concentrações do analito em uma faixa de interesse. Se fosse razoável, o método era aceito sem maiores questionamentos, muitas vezes descrito apenas como uma receita de bolo. Porém algumas questões começaram a ser levantadas, em especial duas:

- Como assegurar que o resultado obtido é verdadeiro?
- Se outro laboratório for utilizar meu método, será que conseguirá reproduzir os resultados que obtive?

Para responder essas questões preciso VALIDAR meu método



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Definição: Validar um método é testar o seu desempenho, de acordo com critérios estabelecidos, tendo como objetivo confirmar se ele é apropriado para o uso pretendido.

O laboratório deve validar:

- Métodos não normalizados
- Métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório
- Métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram criados
- Ampliações ou modificações em métodos normalizados



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

- Deve haver um procedimento que descreva o processo de validação e cada estudo deve ser planejado através de um Plano ou Protocolo de estudo.
- O laboratório deve utilizar equipamentos adequados e calibrados ou qualificados, quando aplicável.
- O responsável pelo estudo deve ser competente na área, sendo capaz de tomar decisões apropriadas durante a realização do estudo.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Documentos de referência:

- INMETRO DOQ-CGCRE-008 R03 - Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, fev/2010
- ANVISA: RE 899 de 29 de maio de 2003 - GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Como validar?

Os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir, quando aplicável:

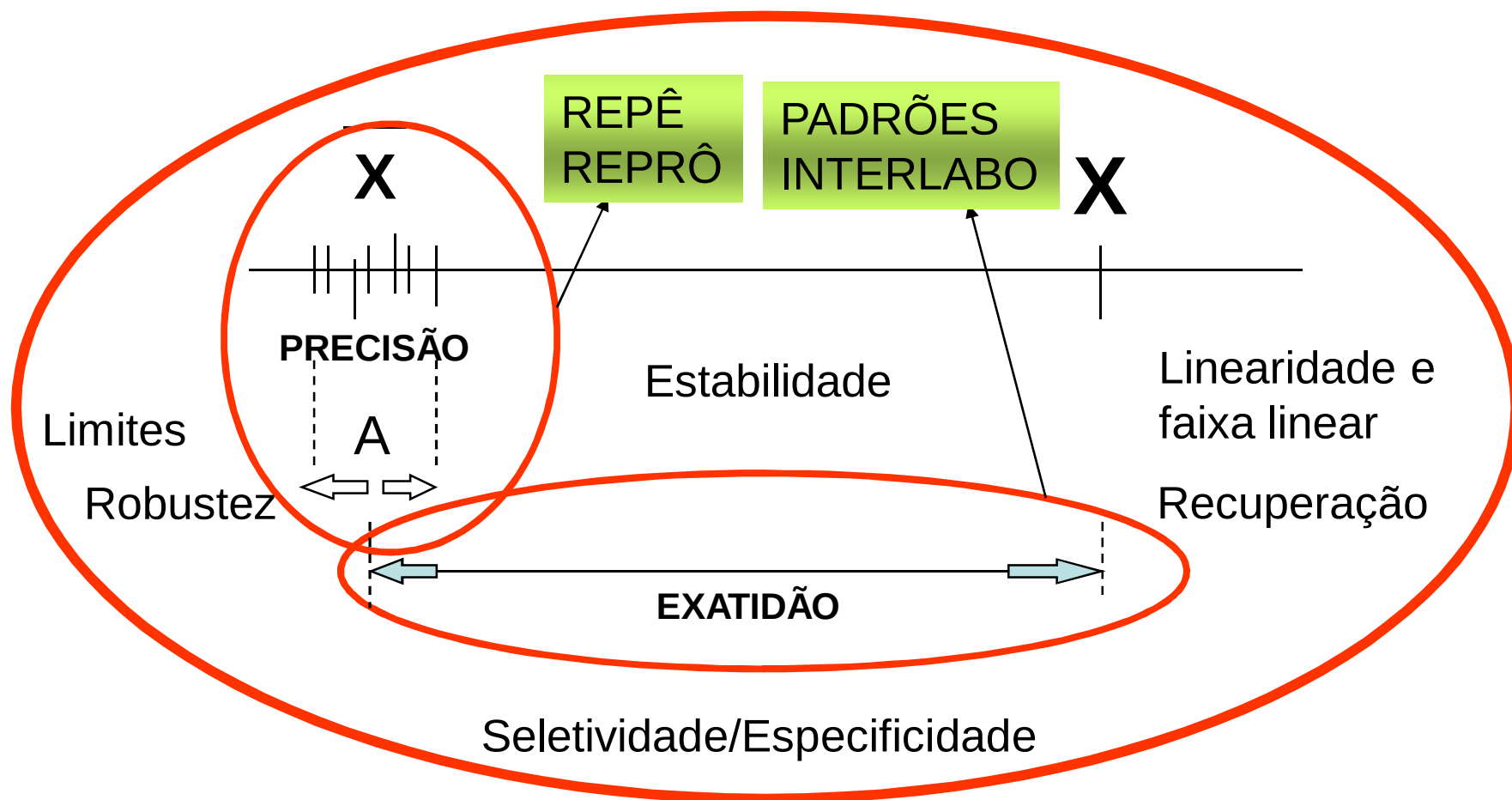
- Seletividade/Especificidade
- Linearidade
- Faixa de trabalho e Faixa linear
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Tendência/recuperação
- Precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade)
- Robustez



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

ELEMENTOS DE UM ESTUDO DE VALIDAÇÃO





Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Figura 1 – Parâmetros de validação conforme o tipo de ensaio

Parâmetros	Tipo de ensaio			
	Qualitativo	Determinação do componente (ou analito) em maior teor(1)	Análise de elementos menores e Traços (2)	Propriedades Físicas
Precisão		√	√	√
Seletividade	√	√	√	√
Tendência / recuperação		√	√	√
Robustez	√	√	√	√
Sensibilidade / linearidade / faixa de trabalho		√	√	√
Limite de detecção	√		√	
Limite de quantificação			√	

Fonte: In-House Method Validation - A guide for Chemical Laboratories LGC / VAM, 2003



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

- (1) Dependendo da faixa de concentração do analito pode não ser necessária a determinação dos limites de detecção e de quantificação, como por exemplo: determinação de sacarose em balas e determinação do teor de gordura em carnes, por exemplo, componentes maiores com concentração entre 1 a 100%.

- (2) São considerados como de menor teor, concentrações entre 0,01 e 1% e como “traços”, os elementos em concentração abaixo de 0,01%



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração.

Assim, verifica-se se o método é seletivo ou específico para o analito de interesse, ou seja, se a resposta do instrumento ao se aplicar o método não sofre interferência de outros componentes da matriz.

Como avaliar a seletividade?

- 1) Analisar um branco de reagentes, analisar o padrão, analisar a amostra com e sem o analito de interesse (placebo). Caso o placebo não seja disponível fazer acréscimo controlado de padrão sobre a amostra.
- 2) Avaliar a amostra na presença de interferentes, ou seja, introduzir elementos que provoquem “stress”



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Avaliação de Seletividade

Procedimento	Demonstrar	Comentários
a) Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados.	Habilidade do método em estudo de identificar e dosar o analito na presença de interferentes.	Evidências necessárias para dar suporte e gerar confiabilidade suficiente.
b) Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse.	Efeito de interferentes - a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse.	Se alteram resultados, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Agente	Condições
Luz	Ex: Exposição da embalagem primária a Luz Fluorescente comum e Exposição à Luz UV B-Fluorescente banda larga por um período de tempo definido
Temperatura	Ex: 60°C na embalagem primária por um período de tempo definido
Umidade	30°C / 75% UR na embalagem primária por um período de tempo definido
Agente Alcalino	Adição solução alcalina NaOH 0,1M por um período de tempo definido
Agente Ácido	Adição solução ácida HCl 0,1M por um período de tempo definido
Agente Oxidante	Adição de solução de H ₂ O ₂ 5% v/v por um período de tempo definido.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

SELETIVIDADE

- Um método é seletivo quando existe probabilidade acima 80% de ser a espécie pesquisada

ESPECIFICIDADE

- Um método é específico quanto ele consegue definir uma função química específica ou ainda uma única espécie distinta em um único sinal.
- Um método é específico quando há uma boa (>95%) probabilidade de ser a espécie pesquisada



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

1- Teor de ÁLCOOIS = Seletivo

2- Teor de BUTEN-2-OL-2 = Específico
Teor de ÁLCOOIS = Seletivo

3- Teor de Trans- BUTEN-2-OL-2 = Específico
Teor de BUTEN-2-OL-2 = Seletivo
Teor de ÁLCOOIS = Seletivo



Minicursos CRQ-IV - 2010

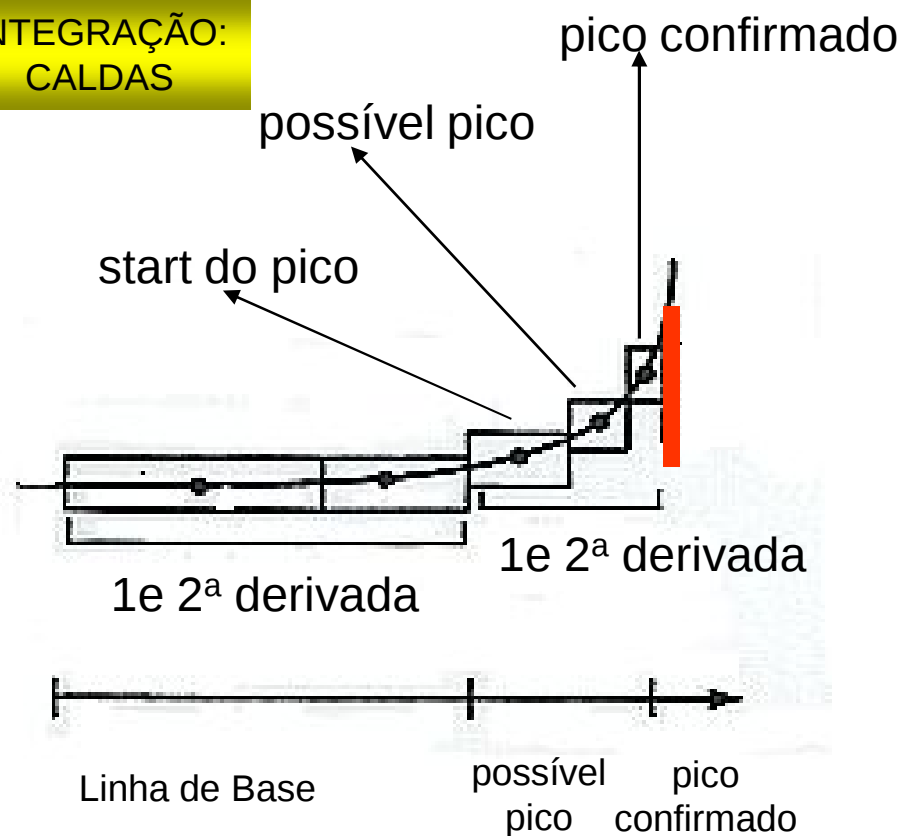
Validação e Protocolos em Análises Químicas

INTERFERÊNCIA

INTEGRAÇÃO
NORMAL



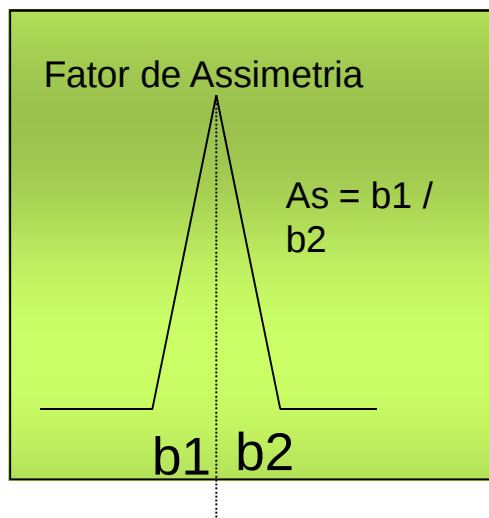
INTEGRAÇÃO:
CALDAS





Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas



O fator de assimetria, T “*tailing factor*”, é uma medida de simetria de pico, sendo que valores de $T=1,0$ referem-se a picos perfeitamente simétricos. O valor de T pode variar aleatoriamente dependendo da assimetria do pico. Com valores de $T < 1,0$ observa-se que o pico apresenta uma assimetria frontal, e com valores de $T > 1,0$ uma assimetria distal. A variação da assimetria influi no reconhecimento instrumental do início e final do sinal cromatográfico (derivada 1º e derivada 2º), responsável pela variabilidade da área integrada.



Minicursos CRQ-IV - 2010

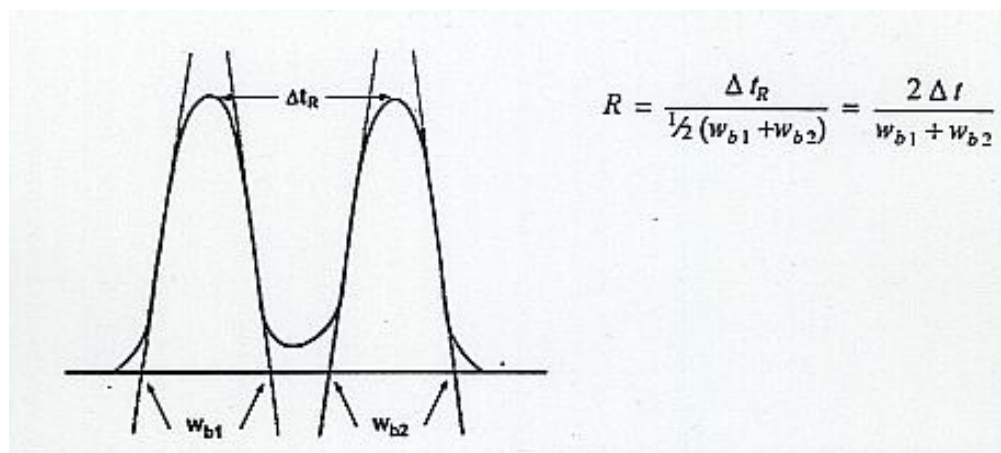
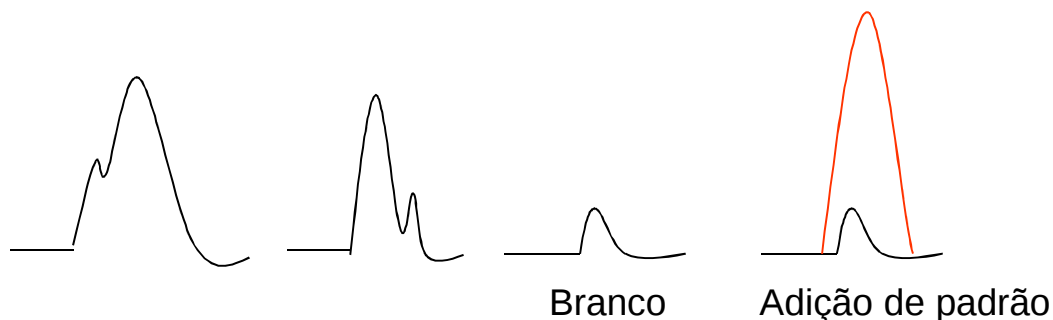
Validação e Protocolos em Análises Químicas

INTERFERÊNCIAS



$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

$W_{0,05}$ = Largura do pico medida à 5% da altura total a partir da linha de base.



$$R = \frac{\Delta t_R}{\frac{1}{2}(W_{b1} + W_{b2})} = \frac{2 \Delta t}{W_{b1} + W_{b2}}$$

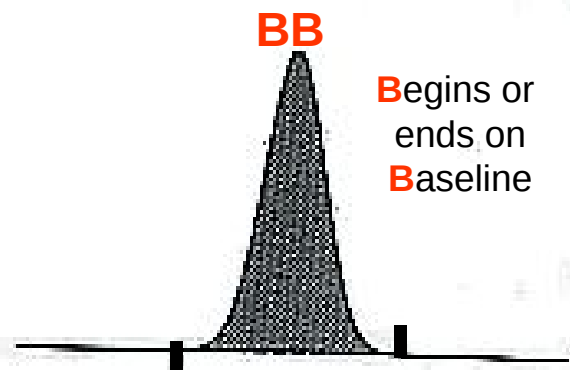
- R = 0** há total coeluição.
- R = 1,0** representa 94% da resolução em linha de base.
- R = 1,5** representa 99,8% da resolução em linha de base.



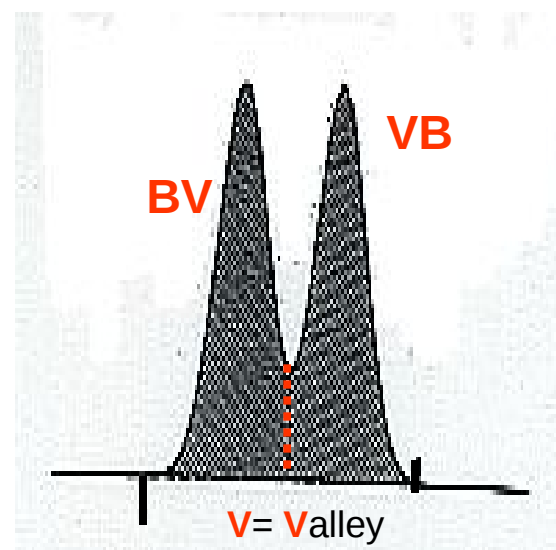
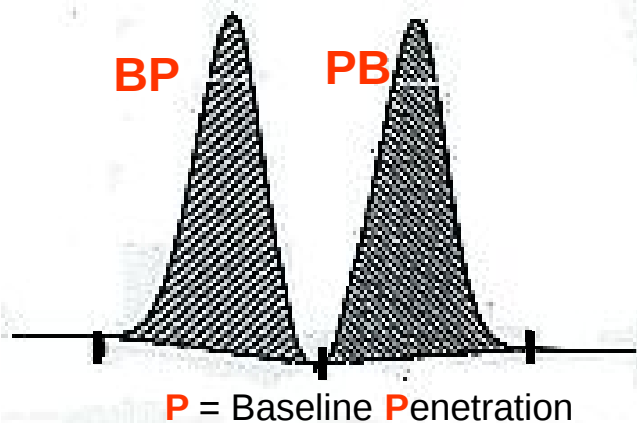
Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

INTEGRAÇÃO DE ÁREA



Mesmo na integração BB que fornece maior precisão haverá variabilidade em função da definição de primeira e segunda derivada





Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

LINEARIDADE - CURVAS

CURVA PADRÃO: sucessão crescente ou decrescente de pontos obtidos da relação entre a concentração da espécie padrão pela sua intensidade de sinal proveniente do sistema de detecção

CURVA DE CALIBRAÇÃO: é utilizada com a finalidade de se obter o ajuste. Neste caso o padrão é definido pelo fabricante ou instituições que zelem pela qualidade.

Na realidade o que se busca é a RESPOSTA do sistema de detecção do sistema à grandeza introduzida do analito.

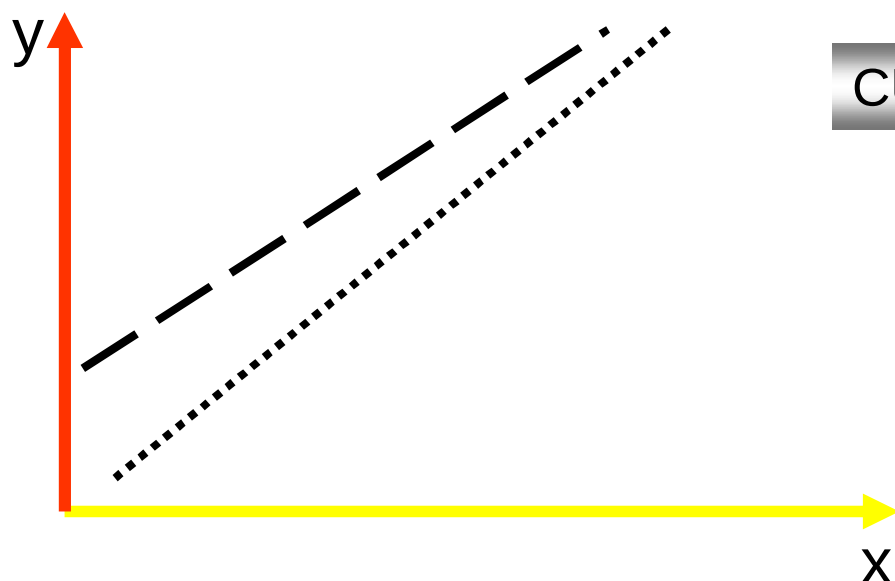
CURVA DE RESPOSTA: é utilizada com a finalidade de se obter comparação analítica para a quantificação. Busca linearidade dinâmica. Aplica-se na curva de resposta a relação sinal/concentração a fim de verificar a linearidade (relação direta ou regressão linear)



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

LINEARIDADE



CURVA DE RESPOSTA

$$y = ax + b$$

Coeficiente Angular : *expressa a inclinação da curva aos eixos*

Coeficiente Linear: *expressa a intersecção da curva aos eixos*

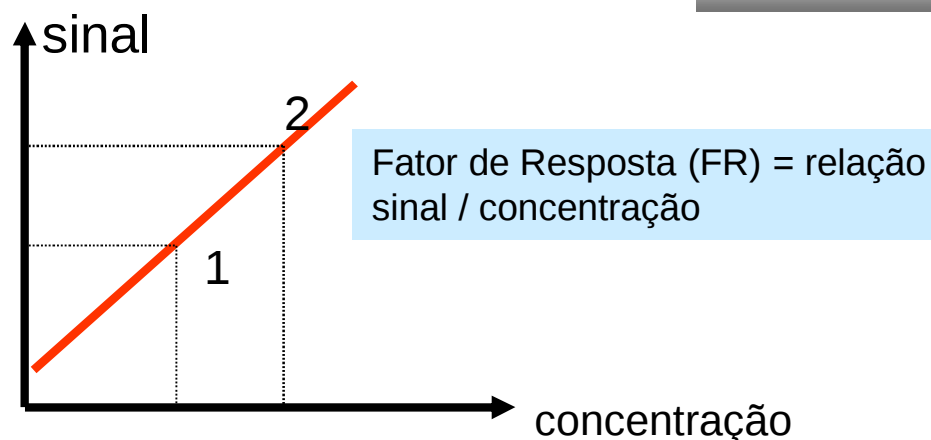
Coeficiente de Correlação: *expressa a relação de x a y*



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

LINEARIDADE



Variabilidade dos FR = Fator de Linearidade

Fator de Linearidade $\leq$ a 2% , pode-se considerar a relação como sendo linear.

Fator de Linearidade $>$ que 2% , neste caso deve-se utilizar da regressão linear

Coeficiente de Correlação (r): Pode-se estabelecer o nível da relação entre duas variáveis através do coeficiente de correlação o qual denotamos por " r ", que varia de -1 a 1.

Coeficiente de Determinação (r^2): Obtido elevando-se " r " ao quadrado e varia de 0 a 1.

Assim se uma relação possui coeficiente de correlação 0,80 então $(0,80)^2 = 0,64$ que multiplicado por 100% = (64%) indica que a variação dos y_s são explicadas em 64% pela relação com x .

Se $r = 0,40$ $r^2 = 0,16$ ou 16%, ou seja, a variação dos y_s é explicada em 16% pela variação de x .

Quanto mais próximo de 1 for o valor de r^2 , melhor será a reta descrita pela regressão linear dos pontos. Normalmente procuram-se obter retas com $r \geq 0,99$



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

LINEARIDADE

A maioria dos equipamentos de medição existentes estabelece a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta.

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b$$

sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando $x = 0$.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

O método é mais **sensível** quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (a).

Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, **no mínimo cinco**, para construir a curva analítica. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório.

A verificação da ausência de valores discrepantes pode ser feita pelo teste de *Grubbs* (ISO 5725-3,1994 e ISO 5725-2, 1994) ou de resíduo *Jackknife* (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) e a **homocedasticidade**, isto é, **homogeneidade da variância dos resíduos pelo teste de Cochran** (ISO 5725-3:1994) ou teste de *Levene* (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) ou o teste de *Brown-Forsythe* (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função que modela a concentração do analito na amostra.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

CURVA DE RESPOSTA - PREPARO

1- Por diluição da “solução -mãe”

- definir a concentração estimada ou esperada.
- preparar a “solução-mãe” com o dobro da concentração estimada ou esperada.
- por diluição obter os pontos de acordo com a tabela que se segue:

ponto (eixo x)	concentração
5	solução mãe
4	80% da solução mãe
3	50% da solução mãe
2	30% da solução mãe
1	10% da solução mãe

2- Por preparação de cada ponto

Cada ponto da curva é preparado individualmente. Neste caso evita-se o erro de obtenção da “solução-mãe”. Os valores podem ter como base a tabela acima.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

AVALIANDO A CURVA DE RESPOSTA

A - BRANCO

Sempre que possível a amostra ou o branco desta amostra deve ser a base para os valores de uma curva, tanto para a adição como para a diluição. Obtido os pontos da curva de resposta, podem-se definir regras de qualidade para a curva.

B - A CURVA

- 1) A curva deve ter no mínimo 5 pontos, incluindo o menor valor (menor valor mensurável ou o menor valor de interesse para a quantificação) e o maior valor.
- 2) Podem-se excluir pontos da curva, mas deve-se manter 5 pontos. O menor e o maior devem permanecer.
- 3) Deve-se evitar excluir dois pontos sequenciais.

Nota: nesta situação para se ter 5 pontos, deve-se elaborar a curva com no mínimo 6 pontos, supondo-se a possibilidade de rejeitar um deles.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

AVALIANDO A CURVA DE RESPOSTA

C) EXCLUSÃO DE PONTOS

Um ponto da curva pode ser excluído dependendo do estudo e caso seja previsto em protocolo (lembrando que o ponto excluído pode ser o valor mais próximo do valor verdadeiro). Um dos motivos da exclusão ou não exclusão do ponto é a sua influência sobre a concentração a ser analisada. Algumas instituições definem valores numéricos para a exclusão, por exemplo: Variações acima de 15% entre o valor da concentração obtida para a concentração de preparação (conc.=massa/volume do balão volumétrico) seria um motivo de exclusão. Exemplo:

Pto.	Conc. Teórica (mg/L)	Conc. Real (mg/L)	Replicata 1 (mg/L)	Variação R1 (%)	Replicata 2 (mg/L)	Variação R2 (%)
1	0,50	0,52	0,75	144,2	0,44	84,6
2	1,00	0,98	1,02	104,1	0,97	98,9
3	1,50	1,53	1,48	96,7	1,55	101,3
4	2,00	2,10	2,30	109,5	1,77	84,2
5	2,50	2,45	2,38	97,1	2,65	108,1
6	3,00	3,20	2,70	84,3	3,05	95,3
7	3,50	3,60	3,50	97,2	3,68	102,2

Concentração Teórica: é a ideal planejada

Concentração Real: é a obtida pela relação massa pesada do padrão/volume do balão volumétrico

Variação: medida da relação entre o valor da replicata/concentração real



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

TESTE DE GRUBBS

Rejeita valores em relação à estimativa do desvio-padrão. Este teste observa valores dispersos anômalos maiores ou menores que aparecem no grupo de medidas.

Para aplicação do teste de Grubbs, utiliza-se a amplitude em relação à média:

1. Colocar os valores obtidos em ordem crescente
2. Determinar a média aritmética
3. Determinar a amplitude do maior (maior valor - média)
4. Testar o maior valor do conjunto segundo a equação:

$$G = \frac{(x_{maior} - \bar{x})}{S}$$

S = desvio padrão



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

5. Testar o menor valor do conjunto segundo a equação:

$$G = \frac{(\bar{x} - x_{menor})}{s}$$

6. Comparar os valores de G com os valores críticos a 95% de confiança

Número de resultados (n)	G (95%)
3	1,155
4	1,481
5	1,715
6	1,887
7	2,020
8	2,126
9	2,215
10	2,290



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

7. Se $G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}}$ o maior valor é rejeitado e, se $G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}}$ o maior valor é, por enquanto, aprovado.
8. Se o maior valor for rejeitado, determinar a nova amplitude e testar o menor valor da série. Se o maior valor não for rejeitado testar o menor valor da série.
9. Repetir o processo até que o maior e o menor valores sejam aceitos

<http://www.graphpad.com/quickcalcs/GrubbsHowTo.cfm>



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

A	A(crescente)	A	B	B(crescente)	B
7,08	7,07	Med:7,13	8,16	7,89	Med:8,18
7,19	7,08	S=0,05	8,08	8,01	S=0,306
7,12	7,09		8,29	8,03	
7,09	7,11		9,00	8,08	
7,16	7,12		8,03	8,10	
7,14	7,14		8,01	8,13	
7,07	7,14		8,13	8,13	
7,14	7,16		7,89	8,16	
7,23	7,19		8,13	8,29	
7,11	7,23		8,10	9,00	



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Produto A

Analisando o maior:

$$G = (7,23 - 7,13) / (0,05) = 0,1 / 0,05 = 2,0 \quad G_{\text{tabelado } 95} = 2,290$$

Maior aprovado

Analisando o menor:

$$G = (7,13 - 7,07) / (0,05) = 0,06 / 0,05 = 1,2 \quad G_{\text{tabelado } 95} = 2,290$$

Maior aprovado

Exercício: Fazer o mesmo para o produto B



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Faixa de Trabalho e Faixa Linear

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado.

Todo experimento de determinação da faixa de trabalho é iniciado pela escolha de uma faixa preliminar. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho.

No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

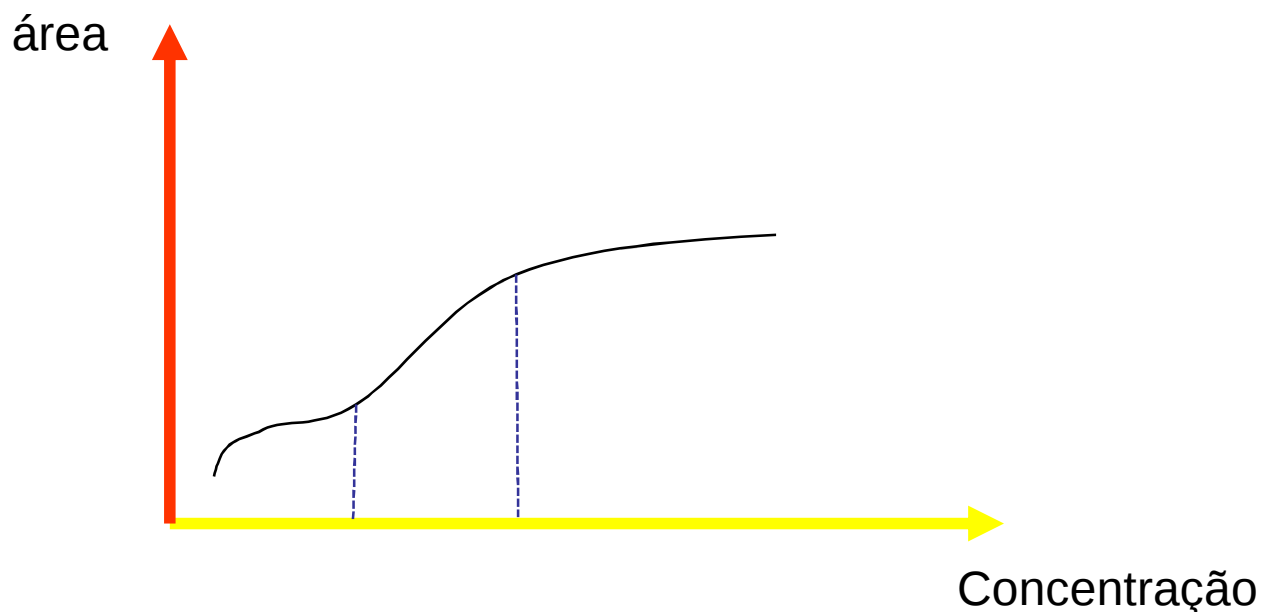


Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Faixa de Trabalho e Faixa Linear

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.





Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Faixa de Trabalho e Faixa Linear

Como definir a faixa de trabalho?

- Depende dos objetivos do método.
- Normalmente o método indica o valor alvo de concentração a ser determinada. Este valor é determinado como 100% (meio da curva) e trabalha-se com as soluções mais concentradas e diluídas para obter os outros pontos.
- Faixas comuns:
 - 90% a 110%
 - 80% a 120%
 - 50% a 150%



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Número de Replicatas	Matriz	Objetivos e Procedimentos
Etapa 1: ≥ 7	• Branco (água reagente) com concentrações variadas do analito ou; • Placebo da amostra com concentrações variadas do analito; • Preparar diferentes concentrações de modo independente e não a partir de uma solução mãe.	Objetivo: <i>Identificar a faixa linear aproximada e os limites superior e inferior da faixa de trabalho.</i> • Graficar colocando no eixo X as concentrações e no eixo y as respostas; • Ir para a etapa 2
Etapa 2: ≥ 7	• Materiais de referência de diferentes concentrações na faixa linear ou; • Placebo da amostra com concentrações variadas do analito na faixa linear	Objetivo: <i>Determinar a faixa de trabalho e confirmar a linearidade;</i> • Graficar colocando no eixo X as concentrações e no eixo y as respostas; • Verificar visualmente a existência de pontos dispersos que possam interferir na regressão; • Calcular o coeficiente de regressão linear; • Calcular e construir o gráfico dos valores de resíduos. A distribuição aleatória em torno da linha reta confirma a linearidade; • Ir para a etapa 3
Etapa 3: ≥ 7	Placebo da amostra com concentrações variada do analito, próximas ao LD	Objetivo: <i>Determinar o LQ (limite de quantificação), que efetivamente forma o limite mais baixo da faixa de trabalho</i> • Expressar o LQ como a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de incerteza.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

DETECTABILIDADE

A **DETECTABILIDADE** normalmente é confundida em análise instrumental com a **SENSIBILIDADE**

DETECTABILIDADE

- 1- É o quanto o sistema de detecção do sistema analítico consegue “enxergar”
- 2- É a quantidade mínima da espécie química em massa que o sistema analítico consegue mensurar
- 3- Um equipamento possui alta detectabilidade, quando consegue “enxergar” uma quantidade mínima da função ou espécie em questão.

A detectabilidade de um equipamento que mede:

<u>A</u>		<u>B</u>
0,1 g	possui menor detectabilidade que	0,01g



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

DETECTABILIDADE

Exemplo de Detectabilidades de Instrumentos
(consideração geral, pois depende da molécula e do meio)

CFG/FID	=	0,5 mg/litro
CFG/ECD	=	0,1 µg/litro
GC/MS/SIM	=	5 µg/litro
LC/MSMS	=	0,1 ng/mL
ICP	=	1 µg/litro
HPLC	=	0,1 mg/litro

Exemplos:

1- Qual a detectabilidade do tolueno quando há detecção na análise de 0,2 microlitros de uma solução aquosa a 0,5 mg/kg.

$0,5\text{mg/kg}=0,5\text{mg/litro}=0,5\mu\text{g/mL}=0,5\text{ng}/\mu\text{L}$. Como a detectabilidade foi para 0,2 µL

$$\begin{array}{lcl} 0,5 \text{ ng} & \rightarrow & 1\mu\text{L} \\ x & \rightarrow & 0,2\mu\text{L} \end{array} \quad x = 0,1 \text{ ng de detectabilidade}$$

2 - Se 0,5 µL de amostra introduzida num GC/MS/SIM a massa detectada é de 2,5 picogramas (pg)
Se o split for 1:50 a massa será 0,05 pg = 50 fentogramas



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Limite de Detecção (LD)

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método.

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção.

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Determinação de Limite de Detecção (LD)

Existem diversas formas de se calcular o limite de detecção. Abaixo são apresentadas algumas destas metodologias.

Matriz	Cálculos	Observações
Branco da amostra	$LD = X + t(n-1) \cdot s$ sendo: X = média dos valores dos brancos da amostra; t é a distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.	A média e o desvio-padrão amostral dos brancos da amostra são dependentes da Matriz. Válido somente quando os valores dos brancos apresentarem um desvio padrão amostral diferente de zero.
Branco da amostra com a menor concentração aceitável de analito	$LD = 0 + t(n-1) \cdot s$ sendo: t = distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.	A “menor concentração aceitável” é aquela tida como a concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado.
Branco da amostra e Branco da amostra com diferentes concentrações de analito	$LD = 3 \times \text{relação sinal/ruído}$	É calculado como sendo correspondente à concentração que produziria um valor do sinal medido 3 vezes maior do que o nível de ruído médio medido com a solução do branco.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

LD PARA A RE 899 - ANVISA

No caso de métodos instrumentais (HPLC, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação,

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

É fundamental que avaliações independentes sejam realizadas em amostras com concentração igual ao limite de detecção determinado.

O número de replicatas muito elevado pode superestimar o limite de detecção, por isto, este número (*n*) deve expressar a rotina do laboratório.

É recomendado um mínimo de 7 replicatas para a determinação do LD.

Por exemplo, no caso de se analisar 7 alíquotas, temos $7-1 = 6$ graus de liberdade de uma matriz de branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Para esses graus de liberdade, o valor de *t* unilateral, para 99% de confiança é 3,143. O LD será igual a 3,143 vezes o desvio padrão amostral.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

DISTRIBUIÇÃO “t” DE STUDENT

Graus de Liberdade (n-1)	Valores de t										
	Níveis de confiança										
	75%	80%	85%	90%	95%	97.5%	99%	99.5%	99.75%	99.9%	99.95%
1	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	127.3	318.3	636.6
2	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	14.09	22.33	31.60
3	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	7.453	10.21	12.92
4	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	5.598	7.173	8.610
5	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	4.773	5.893	6.869
6	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	4.317	5.208	5.959
7	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.029	4.785	5.408
8	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	3.833	4.501	5.041
9	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	3.690	4.297	4.781
10	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	3.581	4.144	4.587



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Limite de Quantificação

Algumas vezes é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias.

Matriz	Determinação
Branco da amostra	$LQ = X + 5s$ ou $LQ = X + 6s$ ou $LQ = X + 10s$ onde: X = média dos valores dos brancos s = desvio-padrão amostral dos brancos
Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD	- Medir, uma vez cada replicata independente, a cada nível de concentração. - Calcular o desvio-padrão amostral “s” do valor do analito, para cada concentração. - Fazer o gráfico “concentração” versus “s”, e atribuir um valor para o LQ, por inspeção.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

LQ PARA A RE 899 - ANVISA

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação:

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

em que: DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

O método analítico deve ser especificado e o LQ para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LQ deve ser identificada.

Para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Tendência/Recuperação

Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros:

- uso de materiais de referência certificados (MRC);
- participação em comparações interlaboratoriais;
- realização de ensaios de recuperação.

A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

A determinação da tendência com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos.

A tendência pode ser expressa como recuperação analítica, definida como:

$$\frac{\text{valor obtido}}{\text{valor esperado}} \times 100\%$$

A exatidão pode ser avaliada numericamente através da recuperação.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

RECUPERAÇÃO

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). *As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta*, da faixa de uso do método.

A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

A recuperação é calculada segundo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100\%$$

Sendo:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada,

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada,

C3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

Exemplo: Sobre uma amostra de bolacha adicionou-se 1000 UI de palmitato de retinol. Após 5 análises (extração e quantificação) por HPLC encontrou-se a média de 800 UI. Qual foi a % de Recuperação?

$$\text{Recuperação} = (800/1000) \times 100\% = 80\%$$

Pode-se utilizar:

- 1- Outra substância para monitorar a extração
- 2- Utilizar a técnica de Padrão Interno (relação de sinais) para minimizar o erro entre analistas ou variações na injeção.



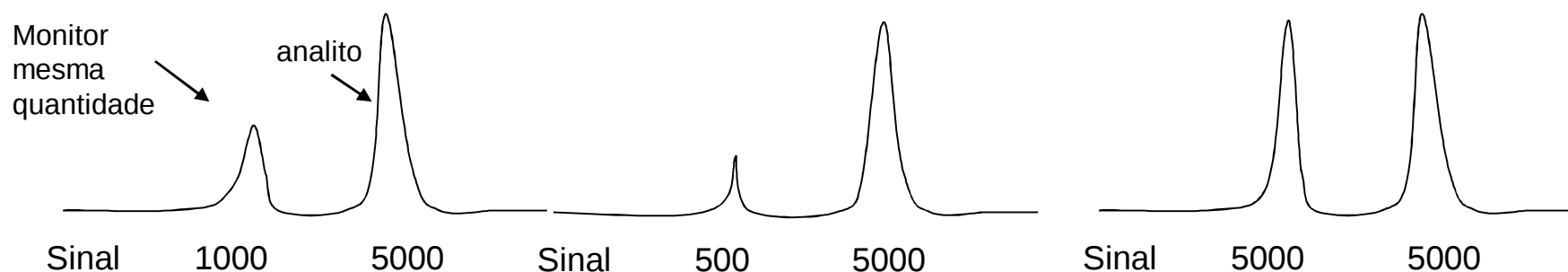
Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

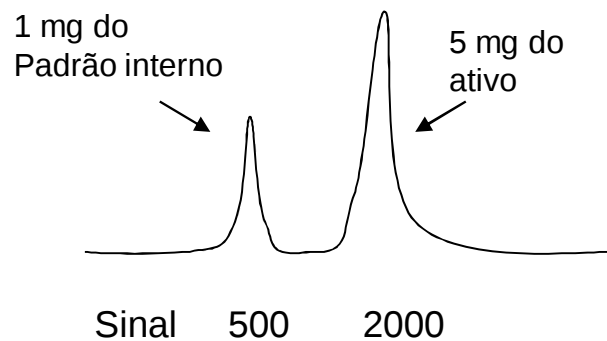
RECUPERAÇÃO

1- Monitor de extração

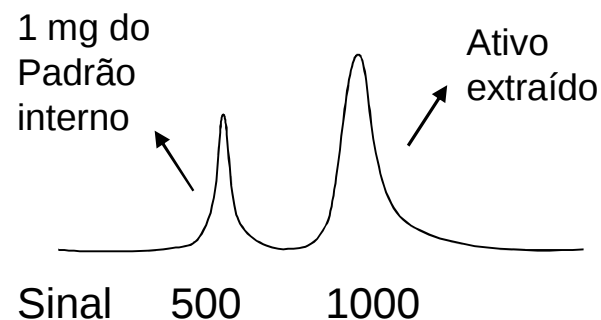
Neste caso introduz-se uma substância externa, com única finalidade de acompanhar a extração



2- Padrão Interno (relação de sinais)



$$\text{Rel} = 2000/500 = 4 = 5 \text{ mg do ativo}$$



$$\text{Rel} = 1000/500 = 2 = 2,5 \text{ mg do ativo}$$



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

PRECISÃO

PRECISÃO : é a proximidade da concordância (grau de espalhamento) entre uma série de medidas obtidas de múltiplas amostragens de uma mesma amostra homogênea dentro de condições determinadas.

Qual a finalidade da Precisão?: garantir que as medidas não foram realizadas ao acaso, que ela possa ser repetida e reproduzida.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

PRECISÃO

A Precisão sempre terá distorções de medida, pois envolverá sempre uma variedade de fatores para gerar erros:

- corrente elétrica
- formação de base do analista na forma de operação e interpretação
- reagentes de lotes ou fabricantes diferentes
- estado emocional do analista
- iluminação do ambiente de trabalho
- variabilidade intrínseca do equipamento (estabilidade ou tempo de estabilização)
- necessidade analítica para obter a destreza do primeiro resultado
- diluições, derivações, alíquotas, temperatura ambiente e de armazenamento
- transportes envolvidos até a realização da amostra
- limpeza do material analítico e de coleta
- contaminações alfa (não reconhecidas pelo uso constante)
- outras



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Precisão

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação.

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$CV(\%) = DPR = \frac{DP}{C_{média}} \times 100$$

Sendo:

DP = desvio-padrão;

$C_{média}$ = concentração média determinada



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Repetitividade

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições no menor espaço de tempo possível.

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Precisão intermediária

A precisão intermediária, de acordo com a ISO 5725-3, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como:

- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos;
- Diferentes tempos.

Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

Na maioria dos casos, o valor de precisão intermediária é função do nível de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados discrepantes. A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificá-los.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermediária, existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro, tais como:

- Por meio de gráfico de controle do desvio padrão, que poderá ser aplicados para replicatas de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo;
- Por meio de expressões matemáticas que apresentem resultados numéricos e critérios de aceitação definidos.

Um método simplificado para estimar a precisão intermediária baseia-se na execução de n medições ($n \geq 15$), em condições pré-definidas, sobre:

- uma mesma amostra;
- amostras supostamente idênticas;
- padrões



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

A estimativa da precisão intermediária $Si ()$, neste caso, é dada por:

$$Si_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

em que $Si (j,k)$ é o desvio padrão de precisão intermediária relativo a esse grupo, onde os símbolos relativos às condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parêntesis (Ex: $Si (T.O)$ significa tempo e operadores diferentes).

Sendo:

$n = n^o$ de ensaios efetuados por amostra ou padrão;

y_k = cada resultado obtido;

y = representa a média aritmética de cada resultado obtido.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

EXATIDÃO

Na prática, a **Exatidão** tem por finalidade, garantir que o valor medido, esteja próximo do valor declarado.

Na **amostragem** é garantir que todo o ativo foi quantificado na extensão desejada.

EXATIDÃO : qualidade que exprime compatibilidade de valor aceito com valor de referência.



ACURÁCIA : é o grau de proximidade de um determinado valor ao valor real ou conhecido nominal em condições determinadas. Pode ser medido em relação ao maior desvio.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

EXATIDÃO

Garantir a Exatidão envolve situações, hoje dispendiosas em tempo de resposta e ou custo financeiro, como:

- PADRÕES ANALÍTICOS DE REFERÊNCIA CONFIÁVEIS
- ENSAIOS INTERLABORATORIAIS DA METODOLOGIA
- COMPARAÇÕES EM ENSAIOS DE PROFICIÊNCIA
- RECONHECIMENTO POR ORGÃOS CONSIDERADOS COMO GUARDIÕES DA CONFIABILIDADE



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Testes de Robustez de Acordo com a RE899 - ANVISA	
Preparo das Amostras	· Estabilidade das soluções analíticas · Tempo de extração
Espectrofotometria	· Variação do pH da solução · Temperatura · Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	· Variação do pH da fase móvel · Variação na composição da fase móvel · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Temperatura · Velocidade do gás de arraste



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Definidos os Parâmetros de Validação é necessário planejar o estudo de Validação de Metodologia Analítica.

Um estudo é dividido em 3 etapas:

1. Plano ou Protocolo de Estudo
2. Etapa Experimental
3. Relatório Final

O conteúdo de um plano de estudo e relatório final depende da finalidade ao qual o estudo se destina.

Ex: Se for parte integrante de um estudo maior com finalidade de registro de um produto agro ao IBAMA, deve obedecer a norma BPL (Boas Práticas de Laboratório). No Brasil regida pela NIT DICLA 035 do INMETRO.

Se for parte de um estudo de Equivalência Farmacêutica para registro de um fármaco junto à ANVISA, deve obedecer às normas e resoluções dessa agência.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

PLANO OU PROTOCOLO DE ESTUDO

Todo estudo deve ser planejado antes de seu início e esse planejamento deve ser descrito em POP (Procedimento Operacional Padrão), contendo todos os itens necessários para a condução da etapa experimental, orientando os analistas, e também para atender os requerimentos dos organismos de avaliação dos registros.

O plano de estudo deve ser aprovado através de assinatura datada do Diretor de Estudo e verificado quanto à conformidade com as BPLs pelo pessoal da Garantia da Qualidade

- a) Emendas ao plano de estudo devem ser justificadas e aprovadas por assinatura datada do Diretor de Estudo e mantida junto com o plano de estudo.
- b) Desvios ao plano de estudo devem ser descritos, explicados, dada ciência e datados prontamente pelo Diretor de Estudo e mantido com os dados brutos do estudo.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

Conteúdo do Plano de Estudo

O plano de estudo deve conter, mas não estar limitado, às seguintes informações:

1. Identificação do Estudo, da Substância Teste e da Substância de Referência

- a) Título descritivo;
- b) Declaração da natureza e do propósito do estudo;
- c) Identificação da substância–teste por código ou nome (IUPAC, número do CAS, etc.);
- d) Substância de referência a ser utilizada.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

2 - Informações referentes ao Patrocinador e à Unidade Operacional

- a) Nome e endereço do patrocinador;
- b) Nome e endereço da(s) instalação(ões) de teste(s) e unidade(s) teste(s)envolvida(s);
- c) Nome e endereço do Diretor de Estudo;

3. Datas

- a) A data de aprovação do plano de estudo por assinatura do Diretor de Estudo. A data de aprovação do plano de estudo por assinatura da gerência da instalação de teste e do patrocinador, se requerido pelo órgão regulador ou fiscalizador no país onde o estudo está sendo conduzido.
- b) As datas propostas para início e término do experimento.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

4. Método

Referência ao método na qual a validação de baseia, se aplicável.

5. Outros aspectos (onde aplicáveis)

Informações detalhadas do desenho experimental, incluindo uma descrição da cronologia do estudo, todos os métodos, materiais e condições, tipo e frequência de análises, medidas, observações e exames a serem realizados e métodos estatísticos a serem utilizados (se houver).

6. Registros

Uma lista dos registros a serem arquivados, incluindo os dados brutos originais.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

ANEXO 1 – MODELO DE PLANO DE ESTUDO



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

ANEXO 2 – MODELO DE RELATÓRIO FINAL



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

PADRÕES

- 1- PADRÃO DE ESPÉCIE MAJORITÁRIA
- 2- PADRÃO POR HISTÓRICO
- 3- PADRÃO RASTREÁVEL (CERTIFICADO OU REFERENCIADO)

VALIDADE DO PADRÃO

Alguns fornecedores indicam a validade.
Em alguns casos é necessário consultar.

PADRÃO PRIMÁRIO

Obtidos a partir do melhor lote de fabricação.
Comercializados por empresas respeitadas ou referenciadas. Rastreabilidade das análises e produtos de origem.

PADRÃO SECUNDÁRIO

Obtidos a partir do padrão primário



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

RASTREABILIDADE

É a capacidade de reconstruir um estudo a qualquer tempo, a partir dos registros analíticos (dados brutos, cálculos), dos certificados de calibração / qualificação dos instrumentos utilizados, dos registros de utilização dos equipamentos, dos registros de treinamento do pessoal envolvido, plano de estudo, relatório final, desvios, emendas, análise crítica, e demais documentos que compõe o trabalho.



Minicursos CRQ-IV - 2010

Validação e Protocolos em Análises Químicas

ARREDONDAMENTOS E ALGARISMOS SIGNIFICATIVOS

- Arredondamentos manuais
- Uso de planilhas eletrônicas

Pode haver diferenças

Ex: Arredondar para 2 casas decimais:

12,238

12,233

12,235

Exemplo de plano de estudo de validação de metodologia analítica por HPLC/UV em formulado farmacêutico na forma de pó estéril injetável pela técnica de hplc/uv para o ativo dacarbazina

ESTUDO / ATIVO	Dacarbazina
PATROCINADOR	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
RESPONSÁVEL	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
ENDEREÇO	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
CÓDIGO DO ESTUDO	xxxx-R00
REALIZAÇÃO (UNIDADE OPERACIONAL)	Análítica Comércio e Análises Químicas Ltda
ENDEREÇO	Rua José da Silva, 12 – Pinheiros – São Paulo/SP – CEP 05409-011
INÍCIO DO ESTUDO	23/ 04/ 2010
DATAS PREVISTAS	
INÍCIO DOS ENSAIOS	23/ 04/ 2010
TÉRMINO DOS ENSAIOS	24/ 04/ 2010
TÉRMINO DO ESTUDO	26/ 04/ 2010
DIRETOR DE ESTUDO	XXXXXXXXXXXX
ENDEREÇO	Rua José da Silva, 12 – Pinheiros – São Paulo/SP – CEP 05409-011
ANALISTA PRINCIPAL	XXXXXXXXXXXX
GERENTE DA UNIDADE DA GARANTIA DA QUALIDADE	XXXXXXXXXXXX

- 1-Objetivo:** Validação de metodologia analítica para a determinação de teor de “Dacarbazina”, pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção no ultravioleta (UV) em formulado farmacêutico.
- 2-Princípio do Método:** A amostra é diluída e o ativo é quantificado por HPLC em modo fase reversa e detecção na região espectral do ultravioleta (UV).
- 3-Identidade Química:** *Dacarbazina*
Fórmula molecular: $C_6H_{10}N_6O$
Peso molecular: 182,18 g/mol
- 4-Materiais:**
Balança analítica
Pipetador automático 1,0 mL e 5,0 mL
Câmara de Luz
Câmara de Fluxo Laminar
Estufa
pHmetro
Banho ultra-sônico
Membrana de 0,45 micras
Cromatógrafo Líquido
Balões volumétricos 10 mL
Balões volumétricos 25 mL
Balões volumétricos 50 mL
- 5-Reagentes:**
Acetonitrila
Fosfato de Potássio Monobásico
Ácido Fosfórico
- 6-Soluções Preparadas:** Hidróxido de Sódio
Ácido Clorídrico
Tampão – Fosfato de Potássio Monobásico
Peróxido de Hidrogênio

7-Padrão de Referência:

Padrão	Fabricante	Código T&E	Pureza	Lote	Validade (mês/ano)
<i>Dacarbazine</i>	USP	G-3878	100 %	H	Corrente na abertura

8- Amostra

Amostra	Fabricante	Lote	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)
Dacarbazina 200 mg – Pó Estéril Injetável	xxxx	xxxxx	10/2009	10/2011

Receber, identificar e armazenar as substâncias de acordo com os procedimentos TE TC AM 001, TE TC AM 002 e TE TC AM 003.

Manusear as substâncias com segurança. Em caso de dúvida consultar a ficha de MSDS. Solicitar, ao patrocinador, caso esteja indisponível. Manter o frasco sempre bem fechado.

9-Condições Analíticas:

Coluna: CLV – 09 Luna C-18 (2) 100^A (250 X 4,6 mm) – 5 µm

Fase Móvel: A – Tampão pH 3,0 – 60 %
B – Acetonitrila grau HPLC – 40 %

Diluyente: Tampão - Fase Móvel - A

Vazão: 1,0 mL/min.

Volume de injeção: 10 µL

Deteção: Ultravioleta a 323 nm

Temperatura: 30 °C

Tempo de Retenção Aproximadamente 2,6 minutos

Tempo de corrida 10 minutos

Observação Durante o preparo dos padrões e amostras, evitar o contato com a luz.

10-Experimental:

10.1 Preparo da solução estoque

- Pesar aproximadamente 20 mg de padrão de ativo em um balão de 50 mL;
- Adicionar ao balão volumétrico cerca de 20 mL do Diluyente deixando em banho ultra-sônico por dez minutos;
- Completar o volume com o diluyente e homogeneizar.

10.2 Preparo das soluções de trabalho

Aliquotar as soluções de trabalho em balão volumétrico de 10 mL para os pontos correspondentes da curva conforme tabela 01:

Tabela 01: Preparo das soluções de trabalho

Padrão	Alíquota (mL)	Volume Final (mL)	Concentração (mg/mL)
50 %	0,50	10	0,02
75 %	0,75	10	0,03
100 %	1,00	10	0,04
125 %	1,25	10	0,05
150 %	1,50	10	0,06

10.3 Obtenção da Curva de Resposta

- Filtrar e injetar as soluções de trabalho em HPLC nas condições analíticas descritas;
- Plotar a curva de resposta com a concentração (mg/mL) *versus* área do sinal analítico;
- Trabalhar com coeficiente de correlação (r) não inferior a 0,99.

10.4 Preparo da Solução Amostra

- Realizar o peso médio da amostra;
- Pesar aproximadamente 0,24 g da amostra em um balão volumétrico de 25 mL;
- Adicionar cerca de 10 mL de diluente. Deixar em banho ultra-sônico por dez minutos, completar o volume com Diluente e homogeneizar;
- Aliquotar desta solução 0,5 mL e transferir para um balão volumétrico de 50 mL;
- Completar o volume com diluente, homogeneizar, filtrar e injetar.

10.5 Cálculos

10.5.1 – Cálculo da concentração do ativo sobre solução amostra (mg/mL)

A concentração do ativo sobre a solução amostra foi calculada utilizando-se a equação da reta, obtida pela injeção de cinco padrões (tabela 1), de acordo com a seguinte equação:

$$Conc.Ativo = \frac{área - b}{a}$$

Onde:

- Conc. Ativo = concentração do ativo na solução amostra (mg/mL);
 Área = área correspondente ao ativo no cromatograma;
 b = coeficiente linear da curva de calibração;
 a = coeficiente angular da curva de calibração

10.5.2 – Cálculo da concentração final sobre a amostra (mg/Frasco)

A concentração final do ativo sobre a amostra foi calculada utilizando a equação:

$$Conc. Amostra = \frac{Conc. Ativo \times dil \times PM}{Massa}$$

Onde:

Conc. Amostra = concentração do ativo na amostra (mg/Frasco);
Conc. Ativo = concentração do ativo na solução amostra (mg/mL);
dil = Diluição da amostra (mL)
PM = peso médio da amostra (g)
Massa = massa amostra pesada (g)
Frasco = Frasco Ampola

10.5.3 – Cálculo da porcentagem de teor

A porcentagem de teor do ativo foi calculada utilizando-a equação:

$$Teor (\%) = \frac{Conc. Amostra \times 100}{Espec}$$

Onde:

Conc. Amostra = concentração do ativo na amostra (mg/Frasco);
Espec = especificação declarada de ativo na amostra (Pó estéril injetável - mg/Frasco)
Teor (%) = % de ativo

11-Validação:

Os conceitos de validação aqui aplicados expressam os seguintes valores:

- 11.1 Especificidade/ Seletividade
- 11.2 Linearidade
- 11.3 Precisão
 - 11.3.1 *Repetibilidade (intra-corrída)*
 - 11.3.2 *Intermediária (inter-corrída)*
- 11.4 Recuperação
- 11.5 Intervalo
- 11.6 Robustez

11.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade será realizada através da análise do padrão 100 % de cada ativo, da fase móvel, do diluente, da amostra e pela recuperação do ativo em solução composta de padrão e amostra na proporção de 1:1. Esta solução composta será preparada adicionando-se solução padrão do ponto equivalente ao de 100% da curva da linearidade sobre solução amostra. As amostras serão submetidas às condições de estresse para avaliação da especificidade / seletividade e serão apresentados os resultados em forma de tabelas, como o exemplo abaixo:

Tabela - Condições Estresse

Agente	Condições
Hidrólise alcalina	Adição de 0,1 mL de sol. de NaOH 0,1 M/mL de solução de amostra na concentração 100 % da curva de resposta – exposição 24 horas
Hidrólise ácida	Adição de 0,1 mL de solução de HCl 0,1 M/mL de solução de amostra de concentração 100 % da curva de resposta – exposição 24 horas
Oxidante	Adição de 0,1 mL de solução H ₂ O ₂ 0,75 % (v/v)/mL de solução de amostra de concentração 100 % da curva de resposta – exposição 24 horas
Luz	Exposição da embalagem primária à Luz Fluorescente comum/24 horas e Exposição à Luz UV B-Fluorescente banda larga-20W/24 horas (simultaneamente)
Temperatura	Exposição da embalagem primária à 60 °C/24 horas (estufa comum)

A Especificidade/Seletividade será adequada se não apresentar interferências detectáveis de outros compostos no tempo médio de eluição do ativo nas amostras para o branco, placebo e após a aplicação dos agentes de estresse.

11.2 Linearidade

Determinar a linearidade em duplicata pelo coeficiente de correlação linear, entre as áreas do ativo nos padrões e as concentrações correspondentes do composto na curva de resposta.

O critério de aceitação a ser considerado é $r \geq 0,99$.

As faixas de linearidade a serem ensaiadas estão descritas no item 10.

Utilizar a equação da reta do primeiro dia para o cálculo da especificidade / seletividade, da precisão (repetibilidade) e da exatidão.

Para os cálculos da precisão intermediária, robustez e teor, utilizar a equação da reta obtida por um segundo analista, em uma segunda ocasião.

11.3 Precisão

Avaliar a precisão através do coeficiente de variação, determinando a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla (determinação de teor em seis preparações de amostras, na concentração 100 %), em duas ocasiões.

11.3.1 Repetibilidade (intra-corrída)

Obtenção dos resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Este analista prepara e ensaia seis soluções de amostras na concentração de 100 % da curva de calibração e calcular o CV com os seis resultados obtidos. A precisão será considerada adequada para repetibilidade (intra-corrída) da amostra se apresentar coeficiente de variação inferior a 5,0 % segundo RE 899/03 [2].

11.3.2 Intermediária (inter-corrídas)

Concordância entre os resultados obtidos com analistas diferentes para doze determinações a 100 %, em duas diferentes ocasiões. Um segundo analista prepara e ensaia mais seis soluções de amostras na concentração de 100 % da curva de calibração no dia seguinte. Os cálculos para obtenção do CV (%) são realizados com os resultados dos doze ensaios combinados. A precisão

Intermediária (inter-corrida) da amostra será considerada adequada se apresentar coeficiente de variação inferior a 5,0 % segundo RE 899/03 [2].

11.4 Recuperação

Para avaliação deste parâmetro, determinar os valores das recuperações, verificados a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa (ponto inferior da curva), média (100 %) e alta (ponto superior da curva). Preparar soluções em triplicata, a partir de solução estoque da substância referência nas concentrações 50, 100 e 150 % sobre a solução amostra nas mesmas concentrações respectivamente na proporção de 1:1. Para o cálculo utilizar a seguinte equação:

$$RECUPERAÇÃO = \frac{Concentração\ Obtida}{Concentração\ Teórica} \times 100$$

A recuperação será considerada adequada se apresentar valores entre 90 e 110 %.

11.5 Intervalo

O intervalo será definido pela faixa de linearidade determinada pelo método e confirmado pela precisão e exatidão. Caso os parâmetros estejam aceitáveis, reportar a faixa de linearidade como o intervalo estabelecido.

11.6 Robustez

Realizar alterações em dois parâmetros aplicáveis ao método.

Nota: Os resultados de robustez não são avaliados como critérios para estabelecimento da validade de um método analítico. Eles são apenas uma indicação de que o método é susceptível ou não às modificações introduzidas. Para este estudo os parâmetros a serem alterados serão o fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min. para 0,8 mL/min. e a temperatura, de 30°C para 32°C e para que o método seja robusto os resultados de recuperação deverão estar dentro da faixa estabelecida para a exatidão do método.

12-Arquivamento:

Folha de registro de amostras e análises a efetuar;

Cópia do orçamento aprovado;

Documentação de informações do patrocinador;

Dados brutos, inclusive cromatogramas e os registros necessários para que se componha a rastreabilidade do estudo;

Plano de estudo;

Cópia do relatório de estudo;

Outros documentos que o D.E. julgar necessários

13-Substituições:

Nome	Cargo / Função	Substituto
	Analista de Laboratório	
	Farmacêutica Responsável	
	Gerente da Qualidade	

14-Etapas Críticas:

- 1) Preparo dos padrões e amostras;
- 2) Injeções dos padrões e amostras.

Nota:

É necessário que seja monitorada a temperatura do laboratório de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pela equipe responsável e durante o preparo dos padrões e amostras, evitar o contato com a luz, pois estas observações se tratam de etapas críticas no estudo.

15 - Referências Bibliográficas:

- [1] - Leite, Flávio; *Validação em Análise Química* – Editora Átomo – 4ª edição.
- [2] - Resolução – RE 899, de 29 de maio de 2003, ANVISA.
- [3] - Merck Index - 13th Ed., 2001.

16 – Assinaturas

_____/____/____

XXXXXXXXXXXXX
Diretora de Estudo
CRF/SP XXXXXXXX

_____/____/____

XXXXXXXXXXXXX
Analista Principal
CRQ/SP XXXXXXXX

_____/____/____

XXXXXXXXXXXXX
Gerente da Qualidade
CREA/SP XXXXXXXX

**Exemplo de relatório final de validação de metodologia analítica por HPLC/UV em
formulado farmacêutico na forma de pó estéril injetável pela técnica de hplc/uv para o ativo
dacarbazina**

ESTUDO / ATIVO	Dacarbazina
PATROCINADOR	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
RESPONSÁVEL	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
ENDEREÇO	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
CÓDIGO DO ESTUDO	xxxx-R00
REALIZAÇÃO (UNIDADE OPERACIONAL)	Analítica Comércio e Análises Químicas Ltda
ENDEREÇO	Rua José da Silva, 12 – Pinheiros – São Paulo/SP – CEP 05409-011
INÍCIO DO ESTUDO	23/ 04/ 2010
DATAS PREVISTAS	
INÍCIO DOS ENSAIOS	23/ 04/ 2010
TÉRMINO DOS ENSAIOS	27/ 04/ 2010
TÉRMINO DO ESTUDO	28/ 04/ 2010
DIRETOR DE ESTUDO	XXXXXXXXXXXX
ENDEREÇO	Rua José da Silva, 12 – Pinheiros – São Paulo/SP – CEP 05409-011
ANALISTA PRINCIPAL	XXXXXXXXXX
GERENTE DA UNIDADE DA GARANTIA DA QUALIDADE	XXXXXXXXXXXX

1-Objetivo: Validação de metodologia analítica para a determinação de teor de “Dacarbazina”, pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção no ultravioleta (UV) no formulado farmacêutico “Dacarzin 200 mg – Pó Estéril Injetável”.

2-Princípio do Método: A amostra é diluída e o ativo é quantificado por HPLC em modo fase reversa e detecção na região espectral do ultravioleta (UV).

3-Identidade Química: *Dacarbazina*
Fórmula Molecular: $C_6H_{10}N_6O$
Peso Molecular: 182,18 g/mol

4-Materiais:

Material	Fabricante	TAG	Calibração (mês/ano)	Validade (mês/ano)
Balança analítica	Shimadzu	BA-14	11/2009	11/2010
Pipetador automático	Transferpette	PP-VAL-01	06/2009	06/2010
Pipetador automático	Transferpette	PP-VAL-02	08/2009	08/2010
Câmara de Luz	T&E Analítica	CDG-01	03/2010	03/2011
Câmara de Fluxo Laminar	Grupo Veco	FXL – 04	10/2009	04/2010
pHmetro	Digmed	PH – 04	07/2009	07/2010
Estufa	Faber-Primar	ES-8	04/2009	04/2010
Banho ultra-sônico	Sonitech	US-04	N/A	N/A
Membrana de 0,45 micras	Millipore	N/A	N/A	N/A
Cromatógrafo Líquido	Shimadzu	HPLC-23	05/2009	05/2010
Balões volumétricos de 10 mL	Laborglas	F1604	08/12/09	08/12/10
	Laborglas	F1619	07/12/09	07/12/10
	Laborglas	E7520	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7021	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7008	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	E7658	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F9240	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	E7608	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F1568	17/07/09	17/07/10
	Laborglas	G7982	22/05/09	22/05/10
	Laborglas	E7440	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	E7520	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	E7457	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	E0004	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	E0030	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F0645	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F0705	14/12/09	14/12/10

Minicursos CRQ-IV 2010 – Validação e protocolos em análises químicas

Balões volumétricos de 25 mL	Laborglas	F7094	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7195	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	1567	11/12/09	11/12/10
	Laborglas	L2524	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	E6399	08/12/09	08/12/10
	Laborglas	G4446	05/11/09	05/11/10
	Laborglas	D5548	07/12/09	07/12/10
	Laborglas	D8332	04/09/09	04/09/10
	Laborglas	F7216	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F0705	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7216	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7248	14/12/09	14/12/10
	Masterlabor	5269	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7125	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7137	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7094	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7108	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7248	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7195	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	F7171	14/12/09	14/12/10
Balões volumétricos de 50 mL	L. M.	H1268	14/12/09	14/12/10
	Laborglas	H0399	19/05/09	19/05/10
	Laborglas	H0426	28/04/09	28/04/10
	Laborglas	H0376	28/04/09	28/04/10
	Laborglas	H0329	28/04/09	28/04/10
	Laborglas	H0364	28/04/09	28/04/10
	Laborglas	H0535	19/05/09	19/05/10
	Laborglas	H0412	28/04/09	28/04/10
	Laborglas	H0398	19/05/09	19/05/10
	Laborglas	H0410	28/04/09	28/04/10
	Laborglas	H0442	28/04/09	28/04/10
	Laborglas	H1268	21/05/09	21/05/10
	Laborglas	F5664	14/07/09	14/07/10
	Laborglas	H 1460	08/03/10	08/03/11
	Laborglas	H 1667	08/03/10	08/03/11
	Laborglas	H 8093	08/03/10	08/03/11
	Laborglas	F5605	14/07/09	14/07/10
	Laborglas	H1147	19/01/10	19/01/11
	Laborglas	H1241	22/07/09	22/07/10
	Laborglas	H1351	21/08/09	21/08/10
	Laborglas	H1266	21/08/09	21/08/10
	Laborglas	H1401	21/08/09	21/08/10
	Laborglas	H1280	21/08/09	21/08/10
	Laborglas	H1383	21/08/09	21/08/10
	Hexis Científica	62470	14/12/09	14/12/10
	Hexis Científica	62478	02/12/09	02/12/10

N/A = Não se aplica

5-Reagentes:

Reagente	Fabricante	Código T&E	Lote	Validade (mês/ano)
Acetonitrila	Tedia	L – 103	911288R	11/2014
Fosfato de Potássio Monob.	Ecibra	L – 72	18112	07/2012
Ácido Fosfórico	Ecibra	L – 54	18042	05/2012

6-Soluções Preparadas:

Solução	Código T&E	Data de Preparo (mês/ano)	Validade (mês/ano)	Preparado por
Hidróxido de Sódio 0,1 M	EQ -1745	12/2009	08/2010	Patrícia
Ácido Clorídrico 0,1 M	PE-2766	11/2009	05/2010	Priscila
Tampão – Fosf. Pot. Monob. 6,25 mM	V-596	04/2010	05/2010	Vanessa
Peróxido de Hidrogênio 0,75 %	V-566	02/2010	08/2010	Vanessa

7-Padrão de referência:

Padrão	Fabricante	Código T&E	Pureza	Lote	Validade (mês/ano)
<i>Dacarbazine</i>	USP	G-3878	100 %	H	Corrente na abertura

8-Identificação da Amostra:

Amostra	Fabricante	Lote	Fabricação (mês/ano)	Validade (mês/ano)
Dacarbazina 200 mg – Pó Estéril Injetável	xxxx	xxxxxx	10/2009	10/2011

9-Condições Analíticas – Cromatografia Líquida:

Coluna:	CLV – 09 Luna C-18 (2) 100 ^A (250 X 4,6 mm) – 5 µm
Fase Móvel:	A – Tampão pH 3,0 – 60 % B – Acetonitrila grau HPLC – 40 %
Diluyente:	Tampão - Fase Móvel - A
Vazão:	1,0 mL/min.
Volume de injeção:	10 µL
Detecção:	Ultravioleta a 323 nm
Temperatura:	30 °C
Tempo de Retenção	Aproximadamente 2,6 minutos
Tempo de corrida	10 minutos
Observação	Durante o preparo dos padrões e amostras, evitar o contato com a luz.

10-Procedimentos:

10.1 Preparo da solução estoque

- Pesar aproximadamente 20 mg de padrão de ativo em um balão de 50 mL;
- Adicionar ao balão volumétrico cerca de 20 mL do Diluyente deixando em banho ultra-sônico por dez minutos;
- Completar o volume com o diluyente e homogeneizar.

10.2 Preparo das soluções de trabalho

Aliquotar as soluções de trabalho em balão volumétrico de 10 mL para os pontos correspondentes da curva.

Tabela 01: Preparo das soluções de trabalho

Padrão	Alíquota (mL)	Volume Final (mL)	Concentração (mg/mL)
50 %	0,50	10	0,02
75 %	0,75	10	0,03
100 %	1,00	10	0,04
125 %	1,25	10	0,05
150 %	1,50	10	0,06

10.3 Obtenção da Curva de Resposta

- Filtrar e injetar as soluções de trabalho em HPLC nas condições analíticas descritas;
- Plotar a curva de resposta com a concentração (mg/mL) *versus* área do sinal analítico;
- Trabalhar com coeficiente de correlação (r) não inferior a 0,99.

10.4 Preparo da Solução Amostra

- Realizar o peso médio da amostra;
- Pesar aproximadamente 0,24 g da amostra em um balão volumétrico de 25 mL;

- c) Adicionar cerca de 10 mL de diluente. Deixar em banho ultra-sônico por dez minutos, completar o volume com Diluente e homogeneizar;
- d) Aliquotar desta solução 0,5 mL e transferir para um balão volumétrico de 50 mL;
- e) Completar o volume com diluente, homogeneizar, filtrar e injetar.

10.5 Cálculos

10.5.1 – Cálculo da concentração do ativo sobre solução amostra (mg/mL)

A concentração do ativo sobre a solução amostra foi calculada utilizando-se a equação da reta, obtida pela injeção de cinco padrões (tabela 1), de acordo com a seguinte equação:

$$Conc. Ativo = \frac{\text{área} - b}{a}$$

Onde: Conc. Ativo = concentração do ativo na solução amostra (mg/mL);
área = área correspondente ao ativo no cromatograma;
b = coeficiente linear da curva de calibração;
a = coeficiente angular da curva de calibração

10.5.2 – Cálculo da concentração final sobre a amostra (mg/Frasco)

A concentração final do ativo sobre a amostra foi calculada utilizando a equação:

$$Conc. Amostra = \frac{Conc. Ativo \times dil \times PM}{Massa}$$

Onde: Conc. Amostra = concentração do ativo na amostra (mg/Frasco);
Conc. Ativo = concentração do ativo na solução amostra (mg/mL);
dil = Diluição da amostra (mL)
PM = peso médio da amostra (g)
Massa = massa amostra pesada (g)
Frasco = Frasco Ampola

10.5.3 – Cálculo da porcentagem de teor

A porcentagem de teor do ativo foi calculada utilizando-a equação:

$$Teor (\%) = \frac{Conc. Amostra \times 100}{Espec}$$

Onde:

Conc. Amostra = concentração do ativo na amostra (mg/Frasco);
Espec = especificação declarada de ativo na amostra (Pó estéril injetável - mg/Frasco)
Teor (%) = % de ativo

11-Validação:

Os conceitos de validação aqui aplicados expressam os seguintes valores:

- 11.1 Especificidade/ Seletividade
- 11.2 Linearidade
- 11.3 Precisão
 - 11.3.1 *Repetibilidade (intra-corrida)*

11.3.2 Intermediária (inter-corrida)

11.4 Recuperação

11.5 Intervalo

11.6 Robustez

11.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade foi verificada através da análise do padrão 100% do ativo, da fase móvel, diluente, amostra e pela recuperação do ativo em solução composta de padrão e amostra. Esta solução composta foi preparada na proporção de 1:1, adicionando-se solução padrão do ponto equivalente ao de 100% da curva da linearidade sobre solução amostra. Tal adição resultou em um valor médio de recuperação de 98,3%. Os cromatogramas obtidos pelas injeções da fase móvel e diluente não mostraram sinais analíticos no tempo de retenção referente ao pico do ativo. A amostra foi submetida as condições de estresse para avaliação da especificidade / seletividade e os resultados são apresentados na Tabela 02.

Tabela 02: Resultados obtidos para os ensaios de estresse

Agente	Condições	Diferença de quantificação (%)
Hidrólise alcalina	Adição de 0,1 mL de sol. de NaOH 0,1 M/mL de solução de amostra na concentração 100 % da curva de resposta – exposição 24 horas	-0,6
Hidrólise ácida	Adição de 0,1 mL de solução de HCl 0,1 M/mL de solução de amostra de concentração 100 % da curva de resposta – exposição 24 horas	-1,1
Oxidante	Adição de 0,1 mL de solução H ₂ O ₂ 0,75 % (v/v)/mL de solução de amostra de concentração 100 % da curva de resposta – exposição 24 horas	-1,1
Luz	Exposição da embalagem primária à Luz Fluorescente comum/24 horas e Exposição à Luz UV B-Fluorescente banda larga-20W/24 horas simultaneamente.	-7,5
Temperatura	Exposição da embalagem primária à 60 °C/24 horas (estufa comum)	-10,1

A partir dos resultados para o ativo, conclui-se pela ausência de interferências detectáveis de outros compostos no tempo médio de eluição dos ativos após a aplicação dos agentes de estresse.

O que mais se pode concluir?

11.2 Linearidade

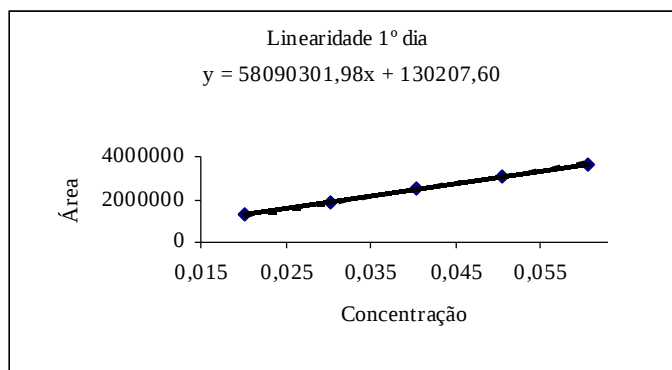
A linearidade foi determinada em duplicata pelo coeficiente de correlação linear, entre as áreas do ativo nos padrões e as concentrações correspondentes do composto na curva de resposta, mostrados na Tabela 03 e na Figura 01. Para a elaboração da curva conjugada foram utilizadas as áreas individuais de injeções em duplicata. O critério de aceitação considerado foi $r \geq 0,99$, segundo RE 899/03 [2].

Tabela 03: Resultados obtidos para linearidade – 1º Analista

Padrão	Conc. (mg/mL)	Área
50 %	0,02	1283116
		1287473
75 %	0,03	1897316
		1897412
100 %	0,04	2496944
		2495128
125 %	0,05	3080158
		3076033

150 %	0,06	3628063
		3628915
Coeficiente de correlação (r)		0,9998
Equação da Reta		$y = 58090301,98x + 130207,60$

Figura 01: Gráfico da curva da Linearidade



O coeficiente de correlação obtido foi considerado adequado por apresentar $R > 0,99$.

A equação da reta apresentada na Tabela 03 foi utilizada para o cálculo da especificidade / seletividade, da precisão (repetibilidade) e da exatidão. Para os cálculos da precisão intermediária, estabilidade e estresse utilizaram-se a equação da reta obtida por um segundo analista, em uma segunda ocasião:

Equação da reta obtida na segunda ocasião: $y = 57832881,19x + 119107,0$

Coeficiente de correlação obtido na segunda ocasião: $(r) = 0,9999$

Conclusão?

11.3 Precisão

A precisão foi avaliada através do coeficiente de variação, determinando-se a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla (determinação de teor em seis preparações de amostras, na concentração 100 %), em duas ocasiões.

11.3.1 Repetibilidade (intra-corrida) - Obtenção dos resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Tabela 04: Resultados obtidos para repetibilidade - 1º Analista

Replicata	Área	Concentração (mg/Frasco)	% Teor	CV (%)
1	2545998	190,89	95,4	2,1
2	2550004	200,88	100,4	
3	2546411	200,75	100,4	
4	2542426	201,21	100,6	
5	2545806	201,55	100,8	
6	2539551	200,21	100,1	

Conclusão?

11.3.2 Intermediária (inter-corridas) - Concordância entre os resultados obtidos com analistas diferentes para doze determinações a 100 %, em duas diferentes ocasiões.

Tabela 05: Resultados obtidos para precisão intermediária

Replicata	Área	Concentração (mg/Frasco)	% Teor	CV (%)
1ª Analista	1	2545998	190,89	2,1
	2	2550004	200,88	
	3	2546411	200,75	
	4	2542426	201,21	
	5	2545806	201,55	
	6	2539551	200,21	
2ª Analista	1	2570259	203,82	
	2	2574695	204,85	
	3	2572018	205,04	
	4	2562369	204,89	
	5	2569479	206,07	
	6	2564940	206,19	

Conclusão?

11.4 Recuperação

Para avaliação deste parâmetro, foram determinados os valores das recuperações, verificados a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa (50 %), média (100 %) e alta (150 %). As recuperações foram preparadas a partir de solução estoque da substância referência nas concentrações 50, 100 e 150 % sobre a solução amostra. Para o cálculo foi utilizada a seguinte equação:

$$RECUPERAÇÃO = \frac{\text{Concentração Obtida}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

Tabela 06: Resultados obtidos para exatidão

Nível de Concentração	Concentração Teórica (mg/mL)	Área	Concentração Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média das Recuperações (%)
Baixa	0,02	1268002	0,02	97,0	97,2
		1269094	0,02	97,1	
		1273525	0,02	97,4	
Média	0,04	2521473	0,04	101,9	101,9
		2523750	0,04	102,0	
		2520053	0,04	101,8	
Alta	0,06	3670360	0,06	100,6	100,6
		3667522	0,06	100,5	
		3672960	0,06	100,6	

Conclusão?

11.5 Intervalo

O intervalo foi estabelecido através da faixa de linearidade determinada pelo método e confirmada pela precisão e recuperação, sendo de 0,02 a 0,06 mg/mL.

11.6 Robustez

Para verificação da robustez, foram realizadas modificações no fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min. para 0,8 mL/min. e na temperatura, de 30°C para 32°C, com avaliação dos resultados obtidos para a amostra e padrão nas concentrações de 100 %. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 07:

Tabela 07: Resultados obtidos para robustez

Alterações	Amostra	Concentração Teórica (mg/Frasco)	Áreas	Concentração Obtida (mg/Frasco)	Recuperação (%)
Fluxo 0,8 mL/min.	1	203,82	3152871	191,48	93,9
	2		3201222	194,42	95,4
Temperatura 32 °C	1	203,82	2556107	193,07	94,7
	2		2559015	193,29	94,8

Após a verificação das modificações realizadas no método analítico, Diminuindo o fluxo da fase móvel de 1,0 mL/min para 0,8 mL/min. e na temperatura, de 30°C para 32°C.

Conclusão?

12-Sumário dos parâmetros de aceitação

Parâmetros	Critérios de Aceitação	Resultados para o Analito
Especificidade	Ausência de interferências detectáveis no tempo de retenção para o analito na análise cromatográfica	Ausência de interferências detectáveis no tempo de retenção para o analito na análise cromatográfica
Linearidade	$r \geq 0,99$	$r = 0,9998$ (1º dia) $r = 0,9999$ (2º dia)
Precisão (Repetibilidade da amostra)	$CV < 5,0 \%$	$CV = 2,1 \%$
Precisão Intermediária	$CV < 5,0 \%$	$CV = 2,1 \%$
Recuperação	Recuperação 90 % a 110 %	Baixa: 97,2 % Média: 101,9 % Alta: 100,6 %

13-Considerações gerais:

Consideram-se os seguintes fatores para validação total ou parcial:

a) Fatores que levam à revalidação total:

- Uso desta condição analítica para outro analito ou outro fármaco de mesmas características com formulação indisponível ou não conhecida.
- Uso desta condição analítica para analisar um novo analito introduzido na formulação.

b) Fatores que levam à revalidação parcial:

- Alterações no sistema analítico

14- Conclusão:

Com os valores para os parâmetros de validação determinados, a metodologia analítica está validada para a análise de teor de “Dacarbazina” na amostra de “Dacarbazina 200 mg – Pó Estéril Injetável”, no intervalo de 0,02 a 0,06 mg/mL para Dacarbazina.

15 - Referências Bibliográficas:

- [1] - Leite, Flávio; *Validação em Análise Química* – Editora Átomo – 4ª edição.
- [2] - Resolução – RE 899, de 29 de maio de 2003, ANVISA.
- [3] - Merck Index - 13th Ed., 2001.

16 - Assinaturas:

_____/____/____
XXXXXXXXXXXXXXXXXX
Diretora de Estudo
CRF/SP XXXXXXXXXXXX

_____/____/____
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Analista Principal
CRQ/SP XXXXXXXXXXXX

_____/____/____
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Gerente da Qualidade
CREA/SP XXXXXXXXXXXXXXXX