

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

FARMANGUINHOS

FABIANE RANGEL DE WECK LISBOA

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO
ASCÓRBICO EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES**

RIO DE JANEIRO

2013

FABIANE RANGEL DE WECK LISBOA

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DO
TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM BAIXAS
CONCENTRAÇÕES**

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* como requisito para obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas. Sob a orientação da Msc, Maria Lúcia de Brito Morley.

RIO DE JANEIRO

FEVEREIRO DE 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de
Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

L769v

Lisboa, Fabiane Rangel de Weck

Validação do método de determinação do teor de Ácido Ascórbico em baixas concentrações. / Fabiane Rangel de Weck Lisboa. Rio de Janeiro, 2013.

XV,96 f. ; 30 cm.

Orientador: Msc, Maria Lúcia de Brito Morley

Monografia (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Tecnologia Industriais Farmacêuticas, 2013.

Bibliografia: f. 92-96

1. Validação. 2. Método Analítico. 3. CLAE. 4. Ácido Ascórbico.

I. Título

CDD 615.1

FABIANE RANGEL DE WECK LISBOA

Monografia apresentada junto ao Curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* do Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos/FIOCRUZ, como requisito final à obtenção do título de Especialista em Tecnologias Industriais Farmacêuticas.

Orientadora: Msc, Maria Lúcia de Brito Morley

Gerente do Laboratório de Controle de Qualidade
Farmanguinhos/FIOCRUZ

BANCA EXAMINADORA

Msc, Maria Lúcia de Brito Morley

Msc, Shyrley Trajano

Msc, Marcelo Henrique Chaves

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi demonstrar que o método analítico em questão é apropriado para a determinação do teor do ácido ascórbico em baixas concentrações. A metodologia pode ser aplicada para analisar resíduos no fármaco em equipamentos de produção (validação de limpeza) e/ou análises em que o fármaco esteja presente como excipiente ou em baixas concentrações. A validação foi realizada seguindo os parâmetros preconizados pela RE nº899/03, da ANVISA tais como: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, intervalo e robustez. O estudo de validação é importante porque evidencia que um método é adequado e confiável para o uso pretendido. O método analítico empregou-se a técnica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com o uso de uma coluna de fase reversa Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 5µm) em uma temperatura de 30° C, com um fluxo de 1,0 mL/min em um comprimento de onda 260 nm com um volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida de 30 minutos. A fase utilizada foi composta de uma solução de fosfato de potássio monobásico 6,8 g/L: Acetonitrila (250:750). A solução de tiosulfato de sódio foi utilizada como diluente para propiciar maior estabilidade das soluções analíticas. De acordo com os resultados dos parâmetros avaliados, todos os critérios de aceitação foram atendidos e deste modo à metodologia se mostrou apropriada para quantificar o ácido ascórbico no intervalo de 0,08 µg/mL (limite de quantificação) a 3,2 µg/mL de ácido ascórbico.

Palavras chaves: Validação, método analítico, CLAE, ácido ascórbico.

ABSTRACT

This study aimed to demonstrate that the proposed analytical method is suitable to quantify ascorbic acid in low concentrations. The main application of this methodology is drug residues analyses in manufacturing equipment (cleaning validation) whether it is the active pharmaceutical ingredient or just an excipient. Validation was performed according to parameters (RE n° 899/03 of ANVISA) such as: selectivity, linearity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit, interval and robustness since the validation study is important because showed that the method is suitable and reliable. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used and employed a Hypersil a C18 reverse-phase column (250 x 4,6 mm, 5 µm), 30°C temperature, 1,0 mL/min flow, 260 nm wavelength, 20 µL injection volume, and 30 minutes stop time. The Mobil phase used was 6.8 g/L of monopotassium phosphate : acetonitrile (250:750). Sodium thiosulfate was employed to maintain solution stability. Results show that the assessed tests meet all acceptance criteria in the concentration range between 0.08 µg/mL (quantification limit) and 3.2 µg/mL of ascorbic acid.

Keywords: Validation, analytical method, HPLC, ascorbic acid.

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química do ácido ascórbico.(A.FORNARO & N.COICHEW,1997).	16
Figura 2: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo a fase móvel, placebo, diluente, padrão e amostra (de baixo para cima).	47
Figura 3: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo placebo submetido à termólise, fotólise, umidade e placebo sem degradação (de baixo para cima).	49
Figura 4: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo a amostra submetida à termólise, fotólise, umidade e a amostra sem degradação (de baixo para cima).....	50
Figura 5: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo o padrão submetido à fotólise, umidade, termólise e o padrão degradação (de baixo para cima).	50
Figura 6: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo o diluente submetido à degradação básica, ácida, oxidação e a solução diluente que não sofreu degradação (de baixo para cima).....	55
Figura 7: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo o padrão submetido à degradação básica, degradação ácida, oxidação e solução padrão que não sofreu degradação (de baixo para cima).....	56
Figura 8: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo a amostra submetida à degradação por oxidação, ácida, básica e amostra que não sofreu degradação (de baixo para cima).....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003a).	20
Tabela 2: Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo a finalidade de cada teste (BRASIL, 2003a).	21
Tabela 3: Massas das soluções padrão, amostra e placebo.	29
Tabela 4: Massas das amostras, padrões e placebos submetidos à umidade, termólise e fotólise.	31
Tabela 5: Massas da amostra, padrão e placebo submetidos à degradação ácida, básica e oxidação.	32
Tabela 6: Dados das soluções da curva de linearidade.	37
Tabela 7: Dados das amostras da precisão intracorridas (limite de quantificação).	39
Tabela 8: Dados das amostras da precisão intracorridas (concentração 3,2 µg/mL).	40
Tabela 9: Concentração da solução amostra contendo do ácido ascórbico.	47
Tabela 10: Resultados das soluções padrão, placebo e amostra contendo do ácido ascórbico.	49
Tabela 11: Concentração das soluções padrão e amostra contendo do ácido ascórbico.	54
Tabela 12: Dados para o cálculo do LD e LQ teóricos.	61
Tabela 13: Resultados da curva 1.	64
Tabela 14: Resultados da curva 2.	65
Tabela 15: Resultados da curva 3.	66
Tabela 16: Correlação entre as três curvas.	67
Tabela 17: Resultados da curva da linearidade.	68
Tabela 18: Estatística de regressão.	70

Tabela 19: Similaridade entre as soluções do padrão (limite de quantificação).	71
Tabela 20: Resultados das amostras da precisão intracorridas (limite de quantificação).	72
Tabela 21: Dados das soluções do padrão (3,2 µg/ mL).....	73
Tabela 22: Resultados das amostras da precisão intracorridas (3,2 µg/mL)....	73
Tabela 23: Tabela contendo o critério de aceitação e resultados da precisão intracorridasdo ácido ascórbico.....	74
Tabela 24: Dados das soluções do padrão (limite de quantificação) – Analista 2	75
Tabela 25: Resultados das amostras da precisão – Analista 2 (limite de quantificação).	76
Tabela 26: Resultados da precisão intercorridas (intermediária) no limite de quantificação.	77
Tabela 27: Dados das soluções do padrão (no intervalo) – Analista 2.....	78
Tabela 28: Resultados das amostras da precisão - Analista 2 (3,2 µg/mL).	79
Tabela 29: Resultados da precisão intercorridas na concentração de 3,2 µg/mL.	80
Tabela 30: Resultados da precisão intercorrida no limite de quantificação.....	81
Tabela 31: Resultados da precisão intercorridas na concentração de 3,2 µg/mL.	82
Tabela 32: Resultados da estabilidade da solução padrão.	84
Tabela 33: Resultados da estabilidade da solução amostra.	85
Tabela 34: Fator de similaridade – variação da temperatura do forno.	86
Tabela 35: Resultados das amostras com a temperatura do forno em 30°C – Condição normal.	86
Tabela 36: Resultados das amostras com a temperatura do forno em 28°C. ...	87

Tabela 37: Resultados das amostras com a temperatura do forno em 32°C. ...	87
Tabela 38: Resultados das amostras.	87
Tabela 39: Fator de similaridade – variação do fluxo da fase móvel.	88
Tabela 40: Dados e resultados das amostras com o fluxo 1,0 ml/min – Condição normal.	88
Tabela 41: Dados e resultados das amostras com o fluxo de 0,8 mL/min.	89
Tabela 42: Dados e resultados das amostras com o fluxo de 1,2 mL/min.	89
Tabela 43: Resultados das amostras para a variação do fluxo.	89
Tabela 44: Fator de similaridade – variação do fluxo na composição da fase móvel.	90
Tabela 45: Resultados das amostras com a fase móvel do método – Condição normal.	90
Tabela 46: Resultados das amostras com a fase móvel composta por acetonitrila 70%.	90
Tabela 47: Resultados das amostras para variação da fase móvel.	90

Lista de Gráficos

Gráfico 1: – Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão.	48
Gráfico 2: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra.	48
Gráfico 3: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão termólise.....	51
Gráfico 4: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão fotólise.....	51
Gráfico 5: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão umidade.	52
Gráfico 6: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra umidade.....	52
Gráfico 7: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra termólise.....	53
Gráfico 8: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra fotólise.....	53
Gráfico 9: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão submetida à degradação básica.....	57
Gráfico 10: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão submetida à oxidação.....	58
Gráfico 11: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão submetida à degradação ácida.....	58
Gráfico 12: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra submetida à degradação básica.....	59
Gráfico 13: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra submetida à oxidação.....	59

Gráfico 14: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra submetida à degradação ácida.	60
Gráfico 15: Curva padrão.	69
Gráfico 16: Gráfico dos resíduos.....	71

Sumário

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTADE TABELAS.....	VIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. ÁCIDO ASCÓRBICO	16
1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	16
1.3. VALIDAÇÃO	19
1.3.1. DEFINIÇÃO DOS PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO	20
1.3.1.1. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE.....	21
1.3.1.2. LIMITE DE DETECÇÃO (LD).....	21
1.3.1.3. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	21
1.3.1.4. LINEARIDADE.....	22
1.3.1.5. INTERVALO.....	22
1.3.1.6. PRECISÃO.....	22
1.3.1.7. EXATIDÃO	23
1.3.1.8. ROBUSTEZ	23
1.4. VALIDAÇÃO DE LIMPEZA	23
1.5. OBJETIVO	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1. CATEGORIAS E OS PARÂMETROS A SEREM AVALIADOS NO ESTUDO	25
2.2. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DO ÁCIDO ASCÓRBICO	26
2.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	26
2.4. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	28
2.5. SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE DO MÉTODO PARA ÁCIDO ASCÓRBICO	28
2.6. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO TEÓRICO DO ÁCIDO ASCÓRBICO	34

2.7. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO EXPERIMENTAL	35
2.8. LINEARIDADE	37
2.9. PRECISÃO INTRACORRIDA (REPETITIVIDADE)	38
2.10. PRECISÃO INTERCORRIDAS (PRECISÃO INTERMEDIÁRIA)	41
2.11. EXATIDÃO	42
2.12. INTERVALO	42
2.13. ROBUSTEZ	43
2.13.1. ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES	43
2.13.2. TEMPERATURA DO FORNO - 28°C E 32°C	44
2.13.3. FLUXO DA FASE MÓVEL – 0,8 ML/MIN E 1,2 ML/MIN	45
2.13.4. VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL – VARIAÇÃO DE ±5% DE ACETONITRILA NA FASE MÓVEL	45

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....46

3.1. SELETIVIDADE / ESPECIFICIDADE DO ÁCIDO ASCÓRBICO	47
3.1.2. SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE DAS SOLUÇÕES SUBMETIDAS ÀS CONDIÇÕES DE FOTÓLISE, TERMÓLISE E UMIDADE	48
3.1.3. SELETIVIDADE / ESPECIFICIDADE DAS SOLUÇÕES SUBMETIDAS ÀS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO ÁCIDA, BÁSICA E OXIDAÇÃO.	53
3.2. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) TEÓRICO	60
3.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) EXPERIMENTAL	62
3.4. LINEARIDADE DO ÁCIDO ASCÓRBICO	68
3.5. PRECISÃO INTRACORRIDAS (REPETITIVIDADE) DO ÁCIDO ASCÓRBICO	71
3.5.1. PRECISÃO INTRACORRIDAS (REPETITIVIDADE) NO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	71
3.5.1.1. SIMILARIDADE ENTRE OS PADRÕES NA SOLUÇÃO PADRÃO (NO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO).	71
3.5.1.2. CÁLCULOS DAS RECUPERAÇÕES DAS SOLUÇÕES AMOSTRAS (NO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO).....	72
3.5.2. PRECISÃO INTRACORRIDAS (REPETITIVIDADE) NA CONCENTRAÇÃO 3,2 µG/ML.....	72

3.5.2.1. SIMILARIDADE ENTRE OS PADRÕES NA SOLUÇÃO PADRÃO NA CONCENTRAÇÃO DE 3,2 µG/ML.	73
3.5.2.2. RESULTADOS DAS RECUPERAÇÕES DAS SOLUÇÕES AMOSTRAS (3,2 µG/ML).....	73
3.6. PRECISÃO INTERCORRIDA (INTERMEDIÁRIA) DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	74
3.6.1. PRECISÃO NO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO - ANALISTA 2.....	74
3.6.1.1. SIMILARIDADE ENTRE OS PADRÕES NA SOLUÇÃO PADRÃO (NO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO) - ANALISTA 2.....	75
3.6.1.B. RECUPERAÇÕES DAS SOLUÇÕES AMOSTRAS (NO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO) – ANALISTA 2.....	76
3.6.2 PRECISÃO INTERCORRIDAS (INTEMEDIÁRIA) NA CONCENTRAÇÃO DE 3,2 µG/ML.....	77
3.6.2.1. SIMILARIDADE ENTRE OS PADRÕES NA SOLUÇÃO PADRÃO (3,2 µG/ML) – ANALISTA 2.....	78
3.6.2.2. <i>Resultados recuperações das soluções amostras (3,2 µg/mL) – Analista 2.....</i>	79
3.7. EXATIDÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	80
3.8. INTERVALO.....	82
3.9. ROBUSTEZ.....	83
3.9.1. ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES.....	83
3.9.1.1. RESULTADOS ESTABILIDADE SOLUÇÃO PADRÃO.....	84
3.9.1.2. RESULTADOS DA SOLUÇÃO AMOSTRA.....	85
3.9.2. TEMPERATURA DO FORNO – 28°C E 32°C.....	86
3.9.3. FLUXO DE FASE MÓVEL – 0,8 E 1,2 ML/MIN.....	88
3.9.4. VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL – 5% DE ACETONITRILA NA FASE MÓVEL.....	89
4. CONCLUSÃO	91
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1. ÁCIDO ASCÓRBICO

Ácido ascórbico (vitamina C) é um antioxidante natural presente em frutas e legumes. Também é bem conhecido por seu importante papel nos processos bioquímicos, como a formação de colágeno, absorção de ferro e seu envolvimento na neurotransmissão e na resposta imune (MARTÍNEZ, 1998).

Altos níveis de ácido ascórbico no corpo humano podem causar efeitos adversos e por isso, a determinação deste antioxidante é de grande importância. Embora várias técnicas tenham sido utilizadas para a análise de ácido ascórbico, tais como os métodos espectrofotômetros, potenciométricos, de fluorescência, os métodos cromatográficos são preferidos devido as suas vantagens, pode-se citar a simplicidade, análise em curto tempo e sensibilidade (TAI & GOHDA, 2007).

O ácido ascórbico é uma vitamina solúvel em água, altamente sensível ao calor, oxigênio, álcalis e luz. A degradação do ácido, em soluções aquosas é, um fator importante e deve ser considerado durante a análise em laboratório. Daí a importância da utilização de um anti-oxidante durante o preparo das amostras em laboratório (ROSA *et al*, 2007). A figura 1 apresenta a estrutura química do ácido ascórbico.

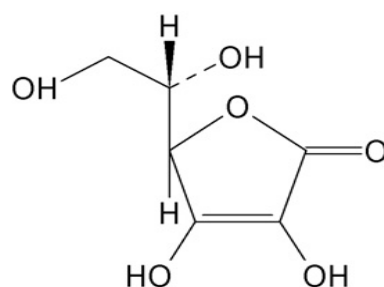


Figura 1: Estrutura química do ácido ascórbico.(A.FORNARO & N.COICHEW,1997).

1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia é uma técnica relatada cientificamente há pouco mais de cem anos e baseia-se na migração de componentes de uma mistura entre duas fases: a fase estacionária que retém elementos e a fase móvel que conduz a

mistura por meio de um soluto através da fase estacionária. É uma técnica que pode ser utilizada para purificação de substâncias, na detecção de substâncias ou auxiliar a separação de substâncias indesejáveis (ETTRE, 2000).

As técnicas cromatográficas podem ser divididas principalmente em cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), e mais atualmente a cromatografia líquida de ultra-eficiência. Os métodos cromatográficos podem ser utilizados separadamente ou em conjunto dependendo dos componentes a serem separados ou identificados (COLLINS, 2006)

Devido à alta precisão e confiabilidade dessas técnicas, elas são muito utilizadas na detecção ou separação de substâncias que estão em pequenas quantidades em uma mistura. Assim, na área médica a cromatografia tem grande utilização na toxicologia, seja para monitorar o uso de medicamento ou para o seu uso na ciência forense, dosando drogas de abuso e auxiliando a elucidar crimes (NOGUEIRA, 2006).

Mais recentemente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e utilizada nos laboratórios de análises químicas e farmacêuticas. Desta forma, nos últimos 40 anos muitos avanços em relação a esta técnica foram alcançados, impulsionados pelo desenvolvimento contínuo de novas partículas de fase estacionária, capazes de gerar colunas mais seletivas, eficientes e química e mecanicamente estáveis (MALDANER & JARDIM, 2009).

A expansão da CLAE tem sido direcionada ao desenvolvimento de análises mais rápidas, sem o comprometimento do desempenho cromatográfico. Assim com a redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas, com partículas menores que 2 μm , surgiu a cromatografia líquida de ultra eficiência, sendo esta uma das mais recentes evoluções da técnica cromatográfica (MALDANER & JARDIM, 2009).

A cromatografia em papel é uma técnica de partição líquido-líquido, estando um deles fixado a um suporte sólido. Baseia-se na diferença de solubilidade das substâncias entre duas fases imiscíveis (DEGANI *et al*, 1998; ETTRE, 2000). A cromatografia em papel é uma das técnicas mais simples e que requer menos instrumentos para sua realização, sendo muito útil para a separação de compostos polares (PERES, 2002).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, na qual a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária (DEGANI *et al*, 1998). A cromatografia de CCD está embasada na separação de substâncias por meio das suas diferentes velocidades de migração em razão da afinidade relativa com solventes, fixando-se numa fase sólida (XAVIER *et al*, 2007). A CCD é um método simples, rápido e econômico, sendo a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas (DEGANI *et al*, 1998).

A técnica de cromatografia gasosa (CG) é baseada na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida ou sólida, que propiciam a separação da mistura por meio de processos físicos e químicos (DEGANI *et al*, 1998; PERES, 2002). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou termicamente estável (PERES, 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica responsável por grandes avanços na área cromatográfica. A CLAE utiliza suporte com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, sendo um método adequado para separação (resolução) de espécies iônicas e macromoléculas (DEGANI *et al*, 1998). Devido à utilização de colunas com grande capacidade de separação a realização da CLAE requer a utilização de equipamentos específicos, com o uso de bombas e colunas que suportem altas pressões necessárias para eluição da fase móvel. Assim a realização da CLAE necessita da utilização de um cromatógrafo composto de bomba, coluna cromatográfica, detector e registrador. Os detectores mais utilizados são os que possuem lâmpadas apropriadas para a detecção de compostos que

absorvem nas faixas dos comprimentos de onda ultra-violeta/visível. O detector de arranjo de diodo é capaz de quantificar o analito em um ou mais comprimento de onda. Deste modo é possível avaliar a pureza do sinal correspondente ao analito (DEGANI *et al*, 1998; PERES, 2002).

Antes de iniciar a análise é necessário garantir a adequabilidade do sistema cromatográfico e para tal é preciso avaliar alguns parâmetros, dentre eles o número de pratos teóricos (N), o fator de capacidade (K) e a resolução (Rs). Estes parâmetros são calculados de acordo com as equações $N=16(t/W)^2$ ou $N=5,54 (t/W)$ onde, N é o número de pratos teóricos, T é o tempo de retenção do analito e W é a largura a meia altura dos picos. $K= (t/T_s)-1$, onde K é o fator de capacidade, t é o tempo de retenção do solvante e W e W_1 representam as larguras dos picos do ativo e solvante, respectivamente (NUNES *et al*, 2005)

Recentemente a evolução das colunas e da fase estacionária permitiu o uso de partículas muito pequenas, desenvolvendo assim a cromatografia líquida de ultra eficiência que é um método cromatográfico com análises mais rápidas, consumo menor de solventes e com eficiência muito mais elevada que a CLAE. No entanto, apesar de todas as vantagens da cromatografia líquida de ultra eficiência, o custo do equipamento e a manutenção requerida devido à utilização de condições extremas de pressão requer ainda maior desenvolvimento da técnica (MALDANER & JARDIM, 2009).

1.3. VALIDAÇÃO

A necessidade de se demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (PASCHOAL *et al*, 2008; BRASIL, 2003b).

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. Para registro de novos produtos, todos os

órgãos reguladores do Brasil exigem a validação da metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (RIBANI *et al*, 2004).

Um processo de validação bem definido e documentado através de seu protocolo e relatório de validação oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003b).

1.3.1. Definição dos parâmetros da validação

A definição dos parâmetros de validação para o estudo foi baseada no guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, documento publicado pela agência nacional de vigilância sanitária (BRASIL, 2003a). A tabela 1 mostra a classificação dos testes de acordo com a sua finalidade, onde para cada categoria será exigido um conjunto de testes relacionados na tabela 2.

Tabela 1: Classificação dos testes, segundo sua finalidade (BRASIL, 2003a).

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Tabela 2: Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo a finalidade de cada teste (BRASIL, 2003a).

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV	
		Quantitativo	Ensaio limite			
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim	
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não	
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não	
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não	
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não	
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não	
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não	

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária à comprovação da Precisão Intermediária.

1.3.1.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (GOUVEIA *et al*, 2009).

1.3.1.2. Limite de detecção (LD)

É a menor concentração da substância que pode ser detectada, em uma amostra, mas não necessariamente quantificada sob determinadas condições experimentais. Existem muitos critérios para a definição do limite de detecção. Para os métodos analíticos experimentais é utilizado a relação sinal/ruído é de 3:1 (BARROS, 2002; ICH, 2006).

1.3.1.3. Limite de quantificação (LQ)

É a menor concentração da substância que pode ser quantificada com precisão e exatidão, aceitáveis, sob determinadas condições experimentais. O

limite de quantificação é calculado a partir da concentração do analito para o qual a relação sinal/ruído é de 10:1 (BARROS, 2002; ICH, 2006).

Existe uma outra opção utilizada para calcular o limite de detecção e quantificação que é através do uso do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva de calibração (b) construída em níveis próximos dos limites. As equações são $LD = 3,3 s / b$ e $LQ = 10s/b$. O desvio padrão da resposta deve ser baseado no desvio padrão do branco, no desvio padrão residual da linha de regressão ou no desvio padrão da intersecção da reta no eixo y (ICH Q 2B, 1996).

1.3.1.4. Linearidade

A metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (VALENTINI *et al*, 2007).

1.3.1.5. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequada quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (OLIVEIRA *et al*, 2010).

1.3.1.6. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis (BRASIL, 2003a).

- Repetibilidade (precisão intracorrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3

(três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003a).

- Precisão intermediária (precisão intercorridas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003a).

- Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro (BRASIL, 2003a).

1.3.1.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (OLIVEIRA *et al*, 2010).

1.3.1.8. 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 às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (PASCHOAL *et al*, 2008).

1.4. VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

A avaliação do resíduo do fármaco nos equipamentos de produção é feita após a limpeza destes e é importante porque garante que não haja contaminação cruzada do medicamento previamente formulado com o medicamento fabricado posteriormente, ambos no mesmo equipamento de

produção. Para tanto, um estudo é realizado para definir o menor nível de concentração aceitável do fármaco previamente formulado, no equipamento de produção. Esta concentração é considerada como resíduo do fármaco por se tratar de concentrações muito baixas (WHO, 1992).

É necessário salientar a diferença e importância de um método de determinação do resíduo em relação ao método de teor deste ativo, propriamente dito, pois para avaliação do resíduo, um método deve demonstrar, além de sua funcionalidade analítica, a sua sensibilidade em conseguir valores quantitativos na quantidade que atenda a concentração previamente estabelecida em um estudo, que tende a ser baixa (NAKASHIMA, 2005).

É fundamental que todos os métodos utilizados para avaliar e/ou quantificar fármacos em baixas concentrações, sejam validados de forma representativa e conduzidos de modo que o intervalo de concentração utilizado seja adequado, visto que, um método para um composto de alta concentração sugere um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços e/ou impurezas (HORWITZ, 1980; ICH, 2006).

Algumas técnicas analíticas são utilizadas nos laboratórios de análise instrumental, com o objetivo de avaliar e quantificar possíveis resíduos existentes no fármaco, como por exemplo, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (ICH, 2006). Esta técnica consiste na separação de fármacos e vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras, farmacêuticas, biológicas e em alimentos (RUELA *et al*, 2009).

Durante a validação da metodologia aplicada para análise de resíduo, o intervalo de concentração adotado é definido levando-se em consideração o limite de quantificação do fármaco no método e no critério de aceitação estabelecido na validação de limpeza (WESTMAN & KARISSON, 2000).

1.5. OBJETIVO

O presente trabalho objetivou validar a metodologia analítica utilizada para determinação do ácido ascórbico em baixas concentrações. A metodologia pode ser aplicada para analisar resíduos do fármaco em equipamentos de produção (validação de limpeza) e/ou análises em que o fármaco esteja presente como excipiente ou em baixas concentrações. A validação ocorreu na faixa compreendida a partir do limite de quantificação do método (0,08 µg/mL) até a concentração máxima de 3,2 µg/mL do ácido ascórbico. A concentração máxima correspondeu a 200% do critério de aceitação definido na validação de limpeza (1,6 µg/mL).

A validação do método para a determinação do teor de ácido ascórbico foi baseada na resolução 899 de 2003 da agência nacional de vigilância sanitária, que é o guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos que especifica quais os parâmetros a serem avaliados de acordo com a categoria de cada estudo e seus respectivos critérios de aceitação (categoria I).

Inclusão do parâmetro limite de detecção e quantificação do método (categoria II, da Re 899) foi necessária por se tratar de um método para análise de traços do fármaco ácido ascórbico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. CATEGORIAS E OS PARÂMETROS A SEREM AVALIADOS NO ESTUDO

De acordo com a finalidade a que se destina o método analítico a ser validado, este é classificado como pertencente à categoria I, “testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas”, e tendo em vista que o método será utilizado para análise de baixas concentrações do ácido ascórbico serão avaliados os seguintes parâmetros: Seletividade/especificidade, limite de quantificação / detecção, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez (BRASIL, 2003a).

2.2. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE DO ÁCIDO ASCÓRBICO

A metodologia utilizada é fundamentada na técnica de CLAE. Emprega-se a coluna APS-2 hypersil5 μ m de 250 x 4,6 mm do fabricante Thermo; temperatura do forno de 30°C marca Hitachi modelo 7450; fluxo de 1,0 mL/min na bomba de marca Hitachi modelo 7455 ; volume de injeção de 20 μ L no injetor automático de marca Hitachi modelo 7451; comprimento de onda de 260 nm no detector de arranjo de iodo de marca Hitachi modelo 7452; tempo de corrida de 20 a 30 minutos. Emprega-se como fase móvel uma mistura de solução de fosfato de potássio monobásico 6,8 g/L : acetonitrila de grau CLAE na proporção de (250:750). Todos os reagentes utilizados são da marca Merck.

2.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Para o preparo da solução diluente, homogeneizar 100 mg tiosulfato de sódio pentaidratado da marca Merck em 1 L de água purificada por osmose reversa do tipo Milli-Q, fabricante Millipore e 0,5 mL de ácido ortofosfórico da marca Merck.

Para o preparo da fase móvel pesar cerca de 6,8 g de dihidrogenofosfato de potássio e transferir para balão volumétrico de 1 L. Adicionar cerca de 800 mL de água purificada por osmose reversa do tipo Milli-Q e agitar até dissolver. Completar o volume com água purificada por osmose reversa do tipo Milli-Q e homogeneizar. Filtrar, a vácuo, através de membrana de celulose regenerada de 0,45 μ m.

Para o preparo da solução padrão pesar, em balança analítica marca Metler Toledo modelo AG-245, cerca de 16,0 mg de ácido ascórbico, substância referência da Farmacopéia Americana teor de 100 %, para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Avolumar com a solução diluente e levar ao ultrassom, marca Branson modelo 5210, por cerca de 5 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente retirar uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico

âmbar de 100 mL, avolumar e homogeneizar com o diluente. Filtrar parte da solução através de filtro com membrana de celulose regenerada de 0,45 µm da marca Whatman, descartando os primeiros 2 mL e injetar. (Concentração final: 1,6 µg/mL).

Para o preparo da solução amostra, a partir de uma formulação líquida, pesar em balança analítica marca Metler Toledo modelo AG-245, o correspondente a 16,0 mg de ácido ascórbico (cerca de 1,2 gramas da formulação em estudo) para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Avolumar com a solução diluente e homogeneizar. Retirar uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico âmbar de 100 mL, avolumar e homogeneizar com o diluente. Filtrar parte da solução através de filtro com membrana de celulose regenerada de 0,45 µm da marca Whatman, descartando os primeiros 2 mL e injetar. (Concentração final: 1,6 µg/mL).

Para o preparo da solução placebo, a partir de uma formulação líquida, pesar em balança analítica marca Metler Toledo modelo AG-245, cerca de 1,2 gramas da formulação em estudo para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Avolumar com a solução diluente e homogeneizar. Retirar uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico âmbar de 100 mL, avolumar e homogeneizar com o diluente. Filtrar parte da solução através de filtro com membrana de celulose regenerada de 0,45 µm da marca Whatman, descartando os primeiros 2 mL e injetar.

Para o preparo da solução de sensibilidade do equipamento, retirar uma alíquota de 10,0 mL da solução padrão para balão volumétrico âmbar de 100 mL, avolumar com o diluente e homogeneizar. Filtrar a solução através de filtro de seringa de celulose regenerada 0,45µm, descartando os 3 primeiros mL, e injetar. (Concentração final.: 0,16 µg/mL). (USP, 2004).

Injetar a solução diluente para a avaliação do branco.

Injetar 1 µL de dimetilsulfóxido uma vez e avaliar o tempo de retenção da inflexão do pico, este valor foi considerado como V_0 .

Avaliar cromatograma da solução de sensibilidade se a razão sinal / ruído (2H/h), para o pico referente ao ativo, apresentou um valor igual ou maior que 10. (USP, 2004).

Onde:

H = Altura do pico

h = Altura máxima do ruído obtido ao longo de uma distância de 20 vezes a largura a meia altura, situada igualmente do tempo de retenção do ativo de interesse.

A partir dos cromatogramas da solução padrão considerar como adequação do sistema os seguintes parâmetros: Número de pratos teóricos \geq 2000 para o pico de ácido ascórbico, tempo de retenção entre 6 – 9 minutos para o pico de ácido ascórbico, fator de capacidade \geq 1 para o pico de ácido ascórbico, assimetria entre 0,8 a 2 para o pico de ácido ascórbico e resolução \geq 14,0 entre o ácido ascórbico e o tiosulfato de sódio, presente na solução diluente.

2.4. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$) = $(A_{am}/A_{pd}) \times (M_{pd}/100) \times (1/100) \times (T_{pd}/100) \times 1000$, Onde: A_{am} é a área do pico do ácido ascórbico na solução amostra; A_{pd} é a área do pico do ácido ascórbico na solução padrão; M_{pd} é a massa do padrão de ácido ascórbico; T_{pd} é o teor do padrão (%).

2.5. SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE DO MÉTODO PARA ÁCIDO ASCÓRBICO

A solução diluente diluente foi injetada em duplicata.

Foi preparada a solução do placebo pesando-se 1166,8 gramas do placebo da formulação em estudo para balão volumétrico de 100 mL. Avolumou-se com a solução diluente homogeneizou-se. Foi retirada uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico âmbar de 100 mL, avolumou-se com o diluente e homogeneizou-se. Filtrou-se parte da solução através do filtro de celulose regenerada de 0,45 μm , descartando os primeiros 2 mL .

Foi preparada uma solução da amostra, na concentração correspondente a 1,6 µg/ mL do ácido ascórbico. Foi utilizada a solução diluente como solvente (solução amostra sem degradação). A massa pesada está descrita na tabela 3.

Preparou-se uma solução padrão. Pesou-se 16,99 mg do ácido ascórbico para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Avolumou-se com a solução diluente e levou-se ao ultrassom por 5 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente retirou-se uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico de âmbar de 100 mL e avolumou-se com a solução diluente e homogeneizou-se. Filtrou-se parte da solução através do filtro de celulose regenerada de 0,45 µm, descartando os primeiros 2 mL (solução padrão sem degradação).

Tabela 3: Massas das soluções padrão, amostra e placebo.

Solução	Massa (mg)
Padrão	15,99
Amostra	1166,8
Placebo	1159,0

As soluções foram injetadas conforme o procedimento descrito no item 2.2 e quantificadas conforme a fórmula a seguir:

Teor (%)

$$(A_{am}/A_{pd}) \times (M_{pd}/100) \times (1/100) \times (T_{pd}/100) \times (250/M_{am}) \times (100/1) \times (25/5) \times 1,33 \times 100/200$$

Onde:

A_{am} = Área do pico de ácido ascórbico na solução amostra

A_{pd} = Área do pico de ácido ascórbico na solução padrão

M_{am} = Massa da amostra (g)

M_{pd} = Massa do padrão de ácido ascórbico (mg)

Tpd = Teor do padrão de ácido ascórbico (100 %)

1,33 = Densidade média teórica (g/mL)

200 = Teor declarado (mg/mL)

Além disso, o padrão, amostra e placebo foram submetidas às seguintes condições de estresse:

Fótólise

Foi separado 10,0 mL de placebo, 2000 mg da amostra e 16,0 mg do padrão. Estes foram submetidos à luz da câmara de fotoestabilidade por um período cuja exposição alcançou 3.600.000 lux (12 dias). Após este período de exposição à luz, preparou-se as soluções conforme item 2.3. As massas estão descritas na tabela 4.

Termólise

Foi separado 10,0 mL de placebo, 2000 mg da amostra e 16,0 mg do padrão. Estes foram submetidos à temperatura de 40°C por 6 horas. Após este período de exposição à temperatura, prepararam-se as soluções conforme item 2.3. As massas estão descritas na tabela 4.

Umidade

Foi separado 10,0 mL de placebo, 2000 mg da amostra e 16,0 mg do padrão. Estes foram submetidos à câmara climática com 75% de umidade relativa e temperatura de 30°C por 7 dias. Após este período de exposição à umidade, prepararam-se as soluções conforme item 2.3. As massas estão descritas na tabela 4.

As soluções descritas na tabela 4 foram injetadas conforme o procedimento descrito no item 2.2 e quantificadas conforme a fórmula a seguir:

Tabela 4: Massas das amostras, padrões e placebos submetidos à umidade, termólise e fotólise.

Solução	Condição	Massa (mg)
Padrão	Não aplicavel	15,99
Padrão	Termólise	16,20
Padrão	Fotólise	17,03
Padrão	Umidade	16,47
Amostra	Não aplicável	1166,8
Amostra	Termólise	1586,5
Amostra	Fotólise	1081,7
Amostra	Umidade	1286,5
Placebo	Não aplicavel	1086,5
Placebo	Fotólise	1092,5
Placebo	Termólise	1056,1
Placebo	Umidade	1067,5

Degradação ácida

Pesou-se 24,5 mg do padrão, adicionou-se 5,0 mL do ácido clorídrico 1 M e levou-se ao ultrassom por 30 minutos a 45°C. Seguiu-se o mesmo procedimento para a quantidade pesada de placebo e amostra. Após este período de exposição ao ácido, prepararam-se as soluções conforme item 2.3. As massas estão descritas na tabela 5.

Degradação básica

Pesou-se 21,3 mg do padrão e adicionou-se 1,0 mL do hidróxido de sódio 1 M e levou-se ao ultrassom por 3 minutos. Seguiu-se o mesmo procedimento para a quantidade pesada de placebo e amostra. Após este período de exposição à base, prepararam-se as soluções conforme descrito no item 2.3. As massas estão descritas na tabela 5.

Oxidação

Pesou-se 22,5 mg do padrão, adicionou-se 1,0 mL do peróxido de hidrogênio solução 0,03% levou-se ao ultrassom por 3 minutos. Seguiu-se o mesmo procedimento para a quantidade pesada de placebo e amostra. Após este período de exposição ao peróxido de hidrogênio, prepararam-se as soluções conforme descrito no item 2.3. As massas estão descritas na tabela 5.

Tabela 5: Massas da amostra, padrão e placebo submetidos à degradação ácida, básica e oxidação.

Solução	Condição	Massa (mg)
Padrão	Não Aplicável	21,3
Padrão	Oxidação	22,5
Padrão	Ácido	24,5
Padrão	Base	21,3
Amostra	Não Aplicável	1504,3
Amostra	Ácido	1464,3
Amostra	Base	1328,7
Amostra	Oxidação	1593,7
Placebo	Não Aplicável	1006,5
Placebo	Ácido	1009,2
Placebo	Base	1006,1
Placebo	Oxidação	1005,7

As soluções foram injetadas conforme o procedimento descrito no item 2.2 e quantificadas conforme a fórmula a seguir:

Onde:

Teor para a solução padrão (%)

$$(Apdd/Apd) \times (Mpd/100) \times (1/100) \times (Tpd/100) \times (100/Ppd) \times (100/1) \times 100$$

Onde:

Apdd = Área do pico de ácido ascórbico na solução padrão degradada

Apd. = Área do pico de ácido ascórbico na solução padrão

Mpd = Massa do padrão de ácido ascórbico (mg)

Tpd = Teor do padrão de ácido ascórbico (100,0 %)

Ppd = Massa do padrão de ácido ascórbico na solução degradada

Teor para a solução amostra(%)

$$(A_{am}/A_{pd}) \times (M_{pd}/100) \times (1/100) \times (T_{pd}/100) \times (200/M_{am}) \times (100/0,160) \times 1,33 \times 100/200$$

Onde:

Aam = Área do pico de ácido ascórbico na solução amostra

Apd. = Área do pico de ácido ascórbico na solução padrão

Mpd = Massa do padrão de ácido ascórbico (mg)

Mam = Massa da amostra (g)

Tpd = Teor do padrão de ácido ascórbico (100,0 %)

1,33 = Densidade média teórica (g/mL)

200 = Teor declarado (mg/mL)

Para ser considerado seletivo/específico foi verificado se o método atendeu aos critérios de aceitação de: não haver picos interferentes das soluções do diluente, placebo e produtos de degradação sob o tempo de retenção do ácido ascórbico e a resolução entre picos adjacentes ao ácido ascórbico ser maior que 2,5.

A ANVISA não estabelece valor de referência para o critério de aceitação para este item. Sendo assim, o critério de aceitação foi estabelecido a partir do conceito de seletividade/ especificidade de um método analítico que é caracterizado como sendo o item que se verifica se a metodologia foi capaz de distinguir o sinal emitido pelo princípio ativo de interesse, em presença de

possíveis interferentes tais como: placebo, impurezas e produtos de degradação (CASSIANO *et al*, 2009). No caso da técnica analítica empregada na metodologia, foi considerado como sinal emitido, o valor de área e para o cálculo de resolução entre os sinais utilizou-se a fórmula de resolução estabelecida pela Farmacopéia Americana e calculada automaticamente pelo “software” de cromatografia (NUNES, 2005).

2.6. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO TEÓRICO DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Foi determinado o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) teórico para o ácido ascórbico a partir da solução placebo e da solução padrão.

A solução placebo foi preparada pesando-se 1000,0 mg do mesmo para balão volumétrico âmbar de 100 mL. Avolumou-se com a solução diluente e levou-se ao ultrassom por cerca de 5 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente retirou-se uma alíquota de 1,0 mL para balão volumétrico âmbar de 100 mL, avolumou-se e homogeneizou-se com o diluente. Filtrou-se parte da solução através de filtro com membrana de celulose regenerada de 0,45 µm da marca Whatman, descartando os primeiros 2 mL e injetou-se.

A solução do padrão foi preparada utilizando-se o diluente descrito no item 2.3. A concentração utilizada foi de 20,0 mg/mL para minimizar o desvio entre as medições. A solução do placebo foi injetada 5 vezes, intercalando com a solução do ácido ascórbico.

Inicialmente, calculou-se a média dos valores de ruído das injeções do placebo e a concentração nominal da solução do padrão em µg/mL. A partir da altura média dos sinais adquiridos nas injeções da solução contendo o ativo, de sua respectiva concentração nominal e a média do valor de ruído, foi calculado a concentração correspondente ao ácido ascórbico. Então, foi determinado o LD teórico do ácido ascórbico, multiplicando a concentração encontrada por três e o LQ teórico por dez, conforme as fórmulas abaixo:

→ Concentração em relação ao valor médio do ruído =

Média do valor do ruído x conc. Da solução do fármaco (µg/mL)

Média da altura do fármaco

- Limite de detecção teórico = Concentração em relação ao valor do ruído x 3

- Limite de quantificação teórico = Concentração em relação ao valor do ruído x 10

A realização deste teste foi fundamental para a definição da menor concentração detectável e quantificável, aproximada (teórica), do fármaco em questão.

A ANVISA orienta que o LD e LQ teóricos sejam determinados a partir de injeções de concentrações diluídas do analito a ser investigado ao ponto de não mais haver sinal correspondente a este. Porém, qualquer outra forma de definição da menor concentração e detecção do analito pode ser utilizada mediante a uma justificativa. Além disso, pelo fato dos valores encontrados serem um resultado teórico, a ANVISA não estabelece qualquer tipo de critério de aceitação, apenas trata-se da concentração aproximada do analito que será utilizada para o ensaio do LQ e LD experimental (BRASIL, 2003a).

2.7. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO EXPERIMENTAL

Para a determinação do LD e LQ experimental do método foram preparadas três soluções estoque do ácido ascórbico. Para a solubilização foi utilizada a solução diluente e ultrassom. As concentrações foram determinadas a partir dos valores do LQ e LD teórico.

De cada solução estoque correspondente, preparou-se uma curva com 5 pontos, cujas concentrações foram: 1º ponto foi a concentração aproximada ao LQ teórico; o 2º ponto foi a concentração aproximada a 2 vezes o LQ teórico; o 3º ponto foi a concentração aproximada a 3 vezes o LQ teórico; o 4º ponto foi a concentração aproximada a 4 vezes o LQ teórico; o 5º ponto foi a concentração aproximada a 5 vezes o LQ teórico. Utilizou-se a solução diluente descrita no item 2.3 para diluir as soluções.

Foi injetada cada curva em duplicata conforme o procedimento cromatográfico descrito no item 2.2 e foi verificado se o coeficiente de variação entre as injeções de cada duplicata foi igual ou menor a 2 %.

Foi calculada a concentração em ($\mu\text{g/mL}$) de cada ponto de cada curva e cada qual foi correlacionada com os sinais obtidos em suas respectivas injeções, com o objetivo de determinar o LD e LQ experimental a partir da equação da reta, em baixas concentrações ($y = ax + b$). Para tanto, foi construído um gráfico contemplando concentração ($\mu\text{g/mL}$) *versus* área para cada curva onde foi fornecido o coeficiente angular, linear e de correlação.

Foi verificado se o coeficiente de correlação ao quadrado apresentou um valor igual ou maior que 0,99, para então calcular o desvio padrão (DPb) entre os coeficientes lineares de cada uma das três curvas.

Foram correlacionadas as três curvas do ácido ascórbico e construiu-se um gráfico para cada, contemplando concentração ($\mu\text{g/mL}$) *versus* área média de cada ponto, onde foi possível calcular o coeficiente angular, linear e de correlação. Foi verificado se o coeficiente de correlação ao quadrado apresentou um valor igual ou maior que 0,99 para que fosse possível calcular o LD e o LQ experimental para o ácido ascórbico através das equações mencionadas abaixo:

$$\text{LD} = \frac{(3 \times \text{DPb})}{a} \quad \text{e} \quad \text{LQ} = \frac{(10 \times \text{DPb})}{a}$$

Onde, DPb corresponde ao desvio padrão entre os coeficientes lineares (b) das três curvas e a é coeficiente angular obtido na correlação das três curvas.

O teste foi realizado conforme preconizado pela ANVISA que não apresenta critério de aceitação, porque a definição do limite de quantificação é importante para que seja estabelecida a menor concentração do analito que será possível de ser quantificado na cromatografia (BRASIL, 2003a; ICH, 2006).

A definição deste parâmetro foi necessária no estudo da validação porque definiu qual é a menor concentração do fármaco que poderá ser quantificada com exatidão e precisão (CASSIANO *et al*, 2003).

2.8. LINEARIDADE

Para demonstrar a linearidade do método ácido ascórbico foi preparada uma solução estoque do padrão de ácido ascórbico. Para a solubilização foi utilizada a solução diluente, descrita no item 2.3, e o ultrassom por 5 minutos. A partir da solução estoque, preparou-se uma curva padrão, onde a concentração mínima foi equivalente ao LQ experimental e a concentração máxima de aproximadamente 3,2 µg/mL de ácido ascórbico (200% da concentração estabelecida pela validação de limpeza). Também foi utilizada a solução diluente, descrita no item 2.3, no preparo das soluções. As diluições estão descritas na tabela 6.

Tabela 6: Dados das soluções da curva de linearidade.

Concentração Aprox. (µg/mL)	Massa ácido ascórbico (mg)	Diluição 1 (mL)	Alíquota (mL)	Diluição 2 (mL)	Alíquota Final (mL)	Volume Final (mL)
0,08	32,79	100,0	10,00	100,0	0,50	200,0
0,80	32,79	100,0	N.A	N.A	0,50	200,0
1,60	32,79	100,0	N.A	N.A	1,00	200,0
2,40	32,79	100,0	N.A	N.A	0,75	100,0
3,20	32,79	100,0	N.A	N.A	1,00	100,0

As soluções foram injetadas em duplicata onde foi verificado se o coeficiente de variação entre as injeções de cada duplicata foi igual ou menor a 2 %. Foi calculada a concentração em (µg/mL) de cada ponto de cada curva, através da fórmula descrita abaixo, e construiu-se um gráfico contemplando concentração (µg/mL) *versus* área. Foi determinado o coeficiente de correlação, angular e linear e os resíduos.

Cálculos da concentração de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$) =

Massa de padrão x alíquota x Teor x 1000

100 x diluição x 100

A linearidade do método analítico foi avaliada com base no seguinte critério de aceitação: coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99, os resíduos se apresentarem dentro do intervalo de \pm duas vezes o erro padrão e a razão percentual do coeficiente linear (b) em relação à resposta da concentração da solução padrão na metodologia (nível 100%) for de \pm 5,0%.

Segundo a ANVISA, o método será considerado linear se atender ao critério de aceitação que estabelece que o coeficiente de correlação deve ser igual ou maior que 0,99 e deve-se avaliar os resíduos da curva (BRASIL, 2003a).

2.9. PRECISÃO INTRACORRIDA (REPETITIVIDADE)

Foram preparadas duas soluções padrão na concentração do LQ experimental e duas soluções padrão na concentração de 3,2 $\mu\text{g/mL}$ (concentração correspondente a 200% do critério de aceitação estabelecido pela validação de limpeza). Para solubilização e diluição, procedeu-se conforme descrito no item 2.3. A concentração utilizada foi conhecida a partir do valor do LQ experimental.

As soluções foram injetadas em duplicata e em seguida calculou-se o fator de similaridade entre ambas cujo valor deveria estar entre a faixa de 0,95 e 1,05. O fator de similaridade foi calculado conforme descrito abaixo:

Fator de similaridade =

Área média do padrão 2 x Massa do padrão 1

Área média do padrão 1 x Massa do padrão 2

Foram preparadas seis amostras (placebo fortificado), a partir de uma solução mãe e procedendo as diluições conforme descrito na tabela 7 a fim de se obter a concentração do LQ experimental e seis amostras (placebo fortificado), a partir de uma solução estoque e procedendo as diluições conforme descrito na tabela 8 a fim de se obter a concentração do de 3,2

Tabela 8: Dados das amostras da precisão intracorridas (concentração 3,2 µg/mL).

Concentração aprox (µg/mL)	Massa de ácido ascórbico (estoque) (mg)	Volume (estoque) (mL)	Alíquota Final (mL)	Diluição (mL)	Volume Placebo (mL)
3,20	32,69	100,0	1,00	100,0	0,160
	32,69	100,0	1,00	100,0	0,160
	32,69	100,0	1,00	100,0	0,160
	32,69	100,0	1,00	100,0	0,160
	32,69	100,0	1,00	100,0	0,160
	32,69	100,0	1,00	100,0	0,160

Todas as soluções preparadas foram injetadas em duplicata conforme procedimento cromatográfico descrito no item 2.2 e verificou-se se o coeficiente de variação entre as injeções de cada duplicata foi igual ou menor a 5 %. O estudo foi realizado pelo analista 1 e a coluna utilizada foi a de lote 031322P1.

Foi calculada a concentração teórica (µg/mL) de cada amostra (placebo fortificado) de cada concentração; a área média de cada duplicata de amostra de cada concentração; a concentração real (µg/mL) correspondente a área média de cada amostra (placebo fortificado) de cada concentração da solução padrão calculada; o percentual de recuperação de cada amostra (placebo fortificado) de cada concentração e o coeficiente de variação (CV %) entre as recuperações obtidas para o ácido ascórbico. A elucidação dos cálculos estão descritos a seguir:

Onde:

$$\rightarrow \text{Concentração teórica (µg/mL)} = (\text{Mpd}/100) \times (10/100) \times (0,5/200) \times (\text{Tp}/100) \times 1000$$

→ Concentração real ($\mu\text{g/mL}$) = $(A_{am}/A_{pd}) \times (M_{pd}1/100) \times (10/100) \times (0,5/200) \times (T_{pd}/100) \times 1000$

→ Recuperação (%) = $\frac{\text{Concentração real } (\mu\text{g/mL}) \times 100}{\text{Concentração teórica } (\mu\text{g/mL})}$

M_{pd} = Massa de ácido ascórbico (mg)

T_{pd} = Teor do padrão de ácido ascórbico (%)

A_{am} = Área media do pico referente ao ácido ascórbico na solução amostra

A_{pd} = Área media do pico referente ao ácido ascórbico na solução padrão

M_{pd} = Massa do padrão (mg)

T_{pd} = Teor do padrão (%)

Foi avaliada a precisão do método analítico com base no critério de aceitação adotado onde o coeficiente de variação (CV %) entre as recuperações obtidas deve ser menor que 5,0 % (BRASIL, 2003a).

A precisão intracorrída é um teste importante na validação por avaliar a concordância entre resultados obtidos em uma série de medidas por um único analista em determinado dia (ALENCAR, 2004).

2.10. PRECISÃO INTERCORRIDAS (PRECISÃO INTERMEDIÁRIA)

Foi seguido o mesmo procedimento descrito no item da precisão intracorrídas, no mesmo equipamento, porém, em dia diferente, com outro analista e lote de coluna diferente. Foi realizado pelo analista 2, coluna nos lotes 0115176B e 0117124K4.

A massa da solução estoque de ácido ascórbico preparada para realizar o estudo na concentração do limite de quantificação foi de 32,46 mg. O procedimento de diluição foi o mesmo descrito no item 2.9 (limite de quantificação).

A massa da solução estoque de ácido ascórbico preparada para realizar o estudo na concentração de 3,2 µg / mL foi de 32,46 mg. O procedimento de diluição foi o mesmo descrito no item 2.9 (concentração 3,2 µg/mL).

Foi avaliado se o método analítico era preciso com base no critério de aceitação adotado onde o coeficiente de variação (CV %) entre as recuperações obtidas na precisão intracorrida e intercorridas devem ser menor que 5,0 %. Este critério de aceitação foi baseado pela ANVISA que determina que o desvio padrão relativo da medição das amostras na precisão deve ser menor que 5,0% (BRASIL, 2003a).

Por definição, o teste de precisão intercorridas é importante na validação do método por avaliar a concordância de resultados do mesmo laboratório, mas, obtidos em dias diferentes com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003a).

2.11. EXATIDÃO

Foi avaliado se o método analítico é considerado exato se atender o critério de aceitação definido onde, o percentual de recuperação do ácido ascórbico de cada amostra da precisão intermediária estiver dentro do intervalo de 90 – 110 %.

A ANVISA não determina qual deverá ser a faixa aceitável para o critério de aceitação, usualmente utiliza-se a faixa de recuperação de 98-102% para compostos cuja concentração nas soluções amostras é alta (BRASIL, 2003a). Porém, por se tratar de análise de traços, foi necessário aumentar a faixa de recuperação pelo fato das concentrações das soluções amostra serem baixas e conseqüentemente suas áreas também. Desta forma, foi estabelecida como critério de aceitação a faixa de 90-110% (ICH, 2006).

2.12. INTERVALO

Foi verificado se o método apresentava exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicado à amostra (placebo fortificado) contendo quantidade de ácido ascórbico no intervalo entre o respectivo LQ e a concentração máxima de 3,2 µg/mL do ácido ascórbico.

A concentração máxima corresponde a 200% do critério de aceitação estabelecido pela validação de limpeza.

2.13. ROBUSTEZ

2.13.1. Estabilidade das Soluções

Foi preparada uma solução padrão do ácido ascórbico e uma solução amostra (placebo fortificado) na concentração do LQ experimental (0,08 µg/mL), utilizando a solução diluente na solubilização. As massas foram 16,21 mg do ácido ascórbico e 320 µL do placebo.

Todas as soluções foram injetadas, em duplicata, logo após o seu preparo e nos tempos de 10, 18, 30, 32, 34, 40, 42, 44, 46 e 48 horas. Verificou-se se o coeficiente de variação entre as injeções de cada duplicata foi igual ou menor a 5 %.

Foi calculada a área média de cada duplicata de injeção e a variação (%) da área média do ácido ascórbico de cada solução no instante testado em relação à área média no tempo zero.

Foi verificada a estabilidade das soluções baseando-se no critério de aceitação onde: As soluções do padrão e da amostra (placebo fortificado) serão estáveis, até o tempo em que a variação (%) da área média no instante testado em relação à área média no tempo zero, for de ± 5 %. Caso ocorra em determinado tempo uma variação maior que ± 5 %, considerar as soluções estáveis até o tempo anterior à variação maior que ± 5 %.

O teste de robustez é importante no estudo de validação porque avalia a capacidade do método a ser validado, em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (ALENCAR, 2004).

A estabilidade das soluções amostra e padrão é um dos critérios que deverá ser avaliado em uma metodologia analítica. Para uma análise cromatográfica, a avaliação do comportamento cromatográfico das soluções

testadas, quando houver variação do fluxo, temperatura da coluna, por exemplo, poderão ser adotados para verificar a robustez do método (BRASIL, 2003á).

2.13.2. Temperatura do Forno - 28°C e 32°C

Foram preparadas duas soluções padrão do ácido ascórbico conforme descrito no item 2.3. A massa do padrão 1 foi 32,16 mg e a massa do padrão 2 foi de 32,06 mg.

Também se preparou duas soluções do placebo fortificado na concentração de 1,6 µg/mL (concentração correspondente ao critério de aceitação definido pela validação de limpeza) solubilizando-se conforme descrito no item 2.3. A massa da amostra 1 foi de 32,16 mg e a massa da amostra 2 foi de 32,06 mg. O volume do placebo foi de 0,320 mL.

Todas as soluções foram injetadas em duplicata seguindo o procedimento descrito no item 2.2, variando-se a temperatura do forno de 28, 30 e 32°C. Foi verificado se o coeficiente de variação entre as injeções de cada duplicata foi igual ou menor a 5 %. Foi calculado o fator de similaridade entre as soluções padrão que deveria estar na faixa de 0,95 a 1,05.

Calculou-se a área média de cada duplicata de injeção e a variação (%) da área média do ácido ascórbico. Em seguida, as soluções foram quantificadas contra a concentração da solução padrão 1.

Foi verificada a robustez das soluções nas temperaturas do forno de 28 e 32°C baseando-se no critério de aceitação onde: as soluções amostra (placebo fortificado) serão robustas se a variação percentual (%) das concentrações ácido ascórbico (µg/mL) encontradas nas amostras, variarem em $\pm 5\%$ em relação às concentrações de ácido ascórbico (µg/mL) encontradas nas amostras, utilizando a temperatura estabelecida na metodologia em estudo (30°C).

2.13.3. Fluxo da Fase Móvel – 0,8 mL/min e 1,2 mL/min

Foram preparadas duas soluções padrão do ácido ascórbico conforme descrito no item 2.3. A massa do padrão 1 foi 32,16 mg e a massa do padrão 2 foi de 32,06 mg.

Também preparou-se duas soluções do placebo fortificado na concentração de 1,6 µg/mL (concentração correspondente ao critério de aceitação definido pela validação de limpeza) solubilizando-se conforme descrito no item 2.3. A massa da amostra 1 foi de 32,16 mg e a massa da amostra 2 foi de 32,06 mg. O volume do placebo foi de 0,320 mL.

Todas as soluções foram injetadas em duplicata seguindo o procedimento descrito no item 2.2, variando-se o fluxo para 0,8, 1,0 e 1,2 mL/min. Foi verificado se o coeficiente de variação entre as injeções de cada duplicata foi igual ou menor a 5 %. Foi calculado o fator de similaridade entre as soluções padrão que deveria estar na faixa de 0,95 a 1,05.

Para as soluções amostras foi calculada a área média de cada duplicata de injeção e a variação (%) da área média do ácido ascórbico. Em seguida, as soluções foram quantificadas contra a concentração de uma solução padrão 1. Foi verificada a robustez das soluções nos fluxos de 0,8 e 1,2 mL/min baseando-se no critério de aceitação onde: as soluções amostra (placebo fortificado) serão robustas se a variação percentual (%) das concentrações do ácido ascórbico (µg/mL) encontradas nas amostras, variarem em $\pm 5\%$ em relação às concentrações de ácido ascórbico (µg/mL) encontradas nas amostras, utilizando o fluxo estabelecido na metodologia em estudo (1,0 mL/min).

2.13.4. Variação da composição da Fase Móvel – Variação de $\pm 5\%$ de acetonitrila na fase móvel

Foram preparadas duas soluções padrão do ácido ascórbico conforme descrito no item 2.3. A massa do padrão 1 foi 32,16 mg e a massa do padrão 2 foi de 32,06 mg.

Também se preparou duas soluções do placebo fortificado na concentração de 1,6 µg/mL (concentração correspondente ao critério de aceitação definido pela validação de limpeza) solubilizando-se conforme descrito no item 2.3. A massa da amostra 1 foi de 32,16 mg e a massa da amostra 2 foi de 32,06 mg. O volume do placebo foi de 0,320 mL.

Todas as soluções foram injetadas em duplicata seguindo o procedimento descrito no item 2.2 e com a fase móvel com modificação de $\pm 5\%$ de acetonitrila em relação à condição descrita na metodologia. Foi verificado se o coeficiente de variação entre as injeções de cada duplicata foi igual ou menor a 5 %. Foi calculado o fator de similaridade entre as soluções padrão que deveria estar na faixa de 0,95 a 1,05.

Para as soluções amostras foi calculada a área média de cada duplicata de injeção e a variação (%) da área média do ácido ascórbico. Em seguida, as soluções foram quantificadas contra a concentração da solução padrão 1. Foi verificada a robustez das soluções na fase móvel com variação de $\pm 5\%$ da composição da acetonitrila baseando-se no critério de aceitação onde: as soluções amostra (placebo fortificado) serão robustas se a variação percentual (%) das concentrações do ácido ascórbico (µg/mL) encontradas nas amostras, variarem em $\pm 5\%$ em relação às concentrações de ácido ascórbico (µg/mL) encontradas nas amostras, utilizando a fase móvel estabelecida na metodologia em estudo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas avaliações para os testes desenvolvidos de acordo com os parâmetros e seus respectivos critérios de aceitação para verificar se a metodologia analítica proposta atenderia aos requisitos estabelecidos.

Tais requisitos foram definidos, mediante a avaliação da metodologia analítica a ser validada e com baseado no guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos publicado pela ANVISA (BRASIL, 2003a).

3.1. SELETIVIDADE / ESPECIFICIDADE DO ÁCIDO ASCÓRBICO

A solução amostra que não sofreu degradação forçada foi quantificada contra uma solução padrão e os resultados de teor foi 106,1%, conforme demonstrado na tabela 9.

Tabela 9: Concentração da solução amostra contendo do ácido ascórbico.

Solução	Massa (mg)	Área média	Teor (%)
Padrão	15,99	377869	N.A
Amostra	1166,8	351945	106,1
Placebo	1159,0	N.A	N.A

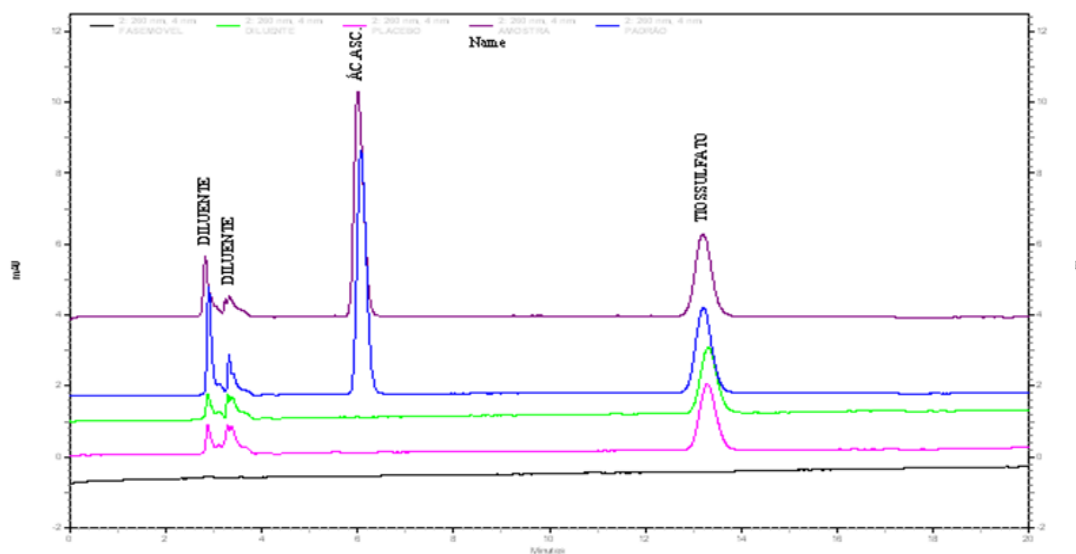


Figura 2: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo a fase móvel, placebo, diluente, padrão e amostra (de baixo para cima).

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

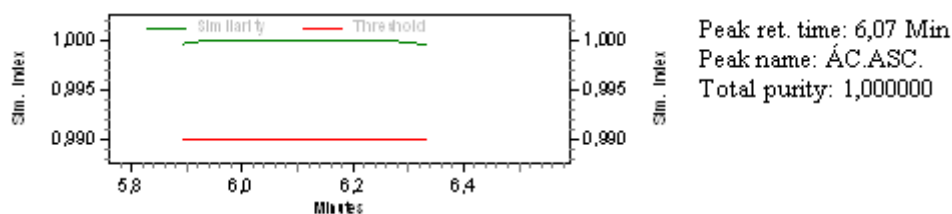


Gráfico 1: – Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

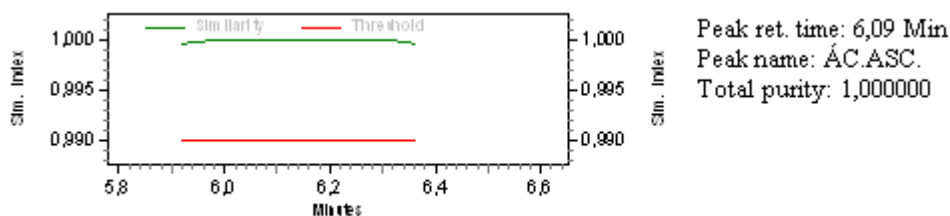


Gráfico 2: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra.

Obs: As avaliações das purezas cromatográficas foram realizadas com ruído de 0,99, ruído de absorvância de 5,0% e compensação do zero.

3.1.2. Seletividade/Especificidade das soluções submetidas às condições de fotólise, termólise e umidade.

As soluções padrão degradado e amostra degradada, que foi preparada a partir de uma formulação, foram quantificadas contra uma solução padrão e os resultados encontrados estão descritos na tabela 10.

Tabela 10: Resultados das soluções padrão, placebo e amostra contendo do ácido ascórbico.

Solução	Condição	Massa (mg)	Área média	Teor (%)
Padrão	Não aplicavel	15,99	377869	N.A
Padrão	Termólise	16,20	399873	100,1
Padrão	Fotólise	17,03	397819	98,9
Padrão	Umidade	16,47	391610	100,6
Amostra	Não aplicavel	1166,8	351945	106,1
Amostra	Termólise	1586,5	468134	103,8
Amostra	Fotólise	1081,7	320850	104,3
Amostra	Umidade	1286,5	377972	103,3
Placebo	Não aplicavel	1086,5	N.A	N.A
Placebo	Fotólise	1092,5	N.A	N.A
Placebo	Termólise	1056,1	N.A	N.A
Placebo	Umidade	1067,5	N.A	N.A

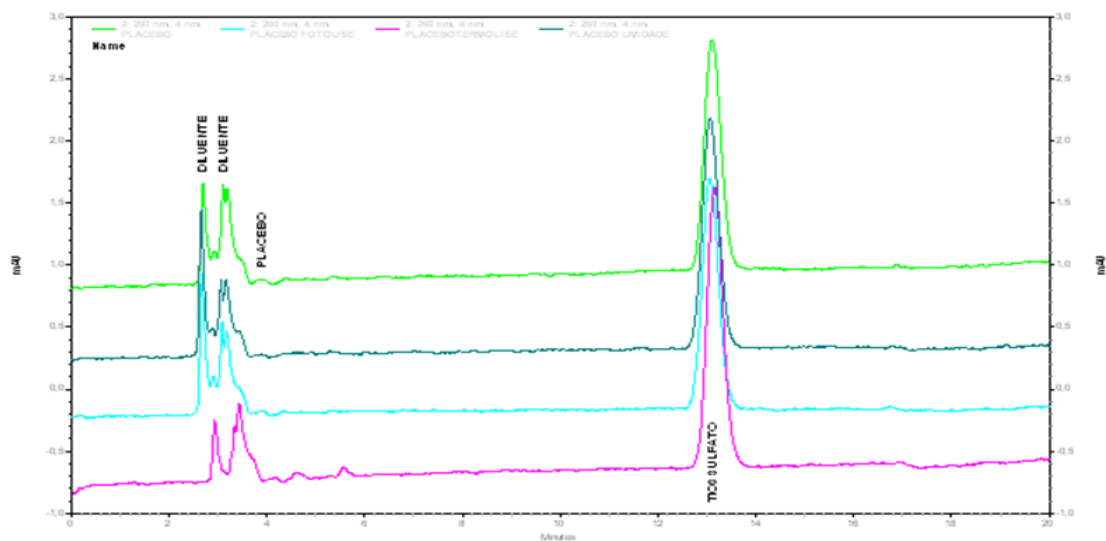


Figura 3: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo placebo submetido à termólise, fotólise, umidade e placebo sem degradação (de baixo para cima).

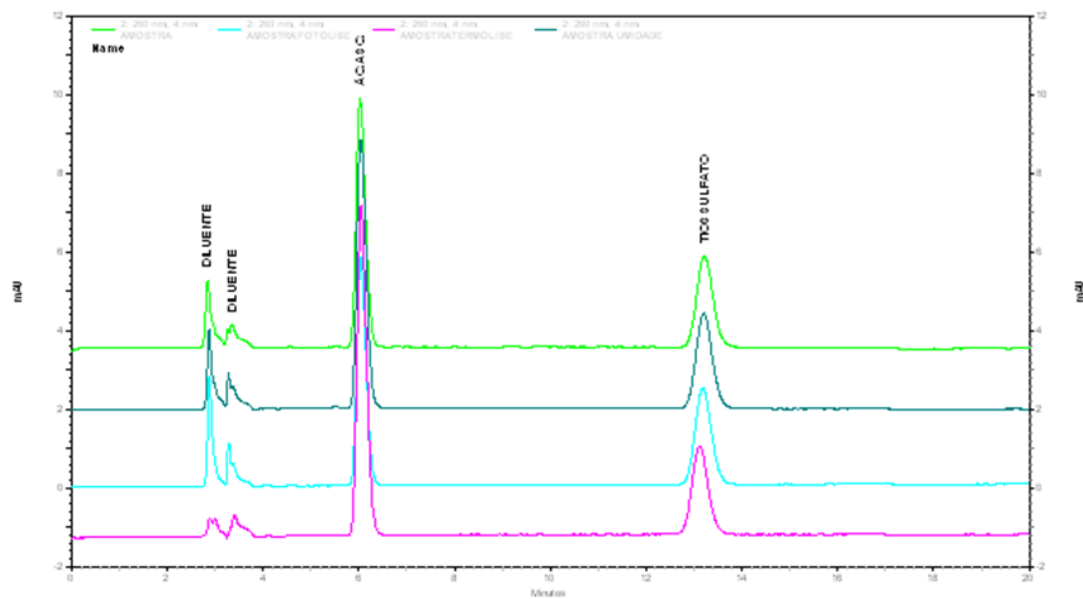


Figura 4: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo a amostra submetida à termólise, fotólise, umidade e a amostra sem degradação (de baixo para cima).

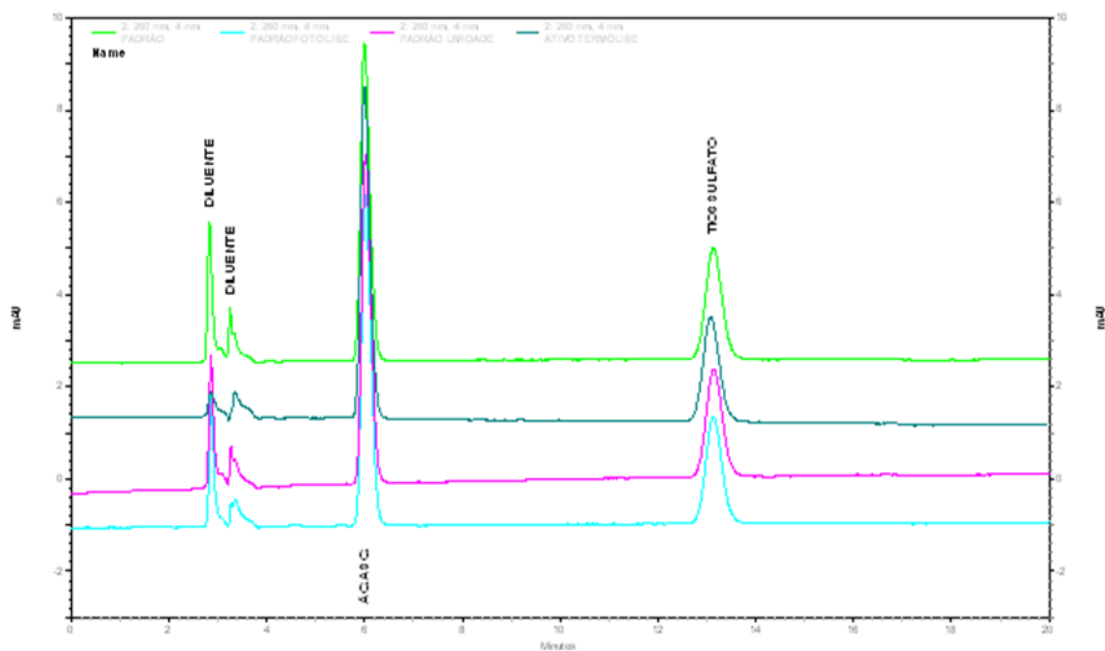


Figura 5: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo o padrão submetido à fotólise, umidade, termólise e o padrão degradação (de baixo para cima).

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

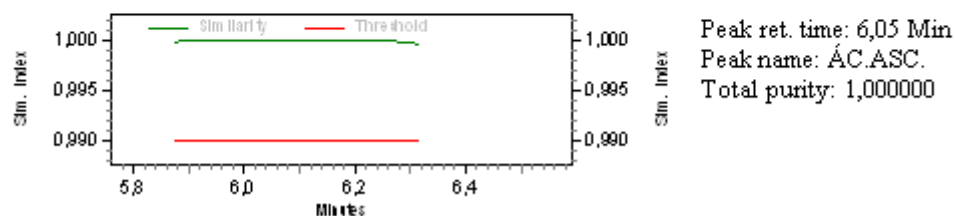


Gráfico 3: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão termólise.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

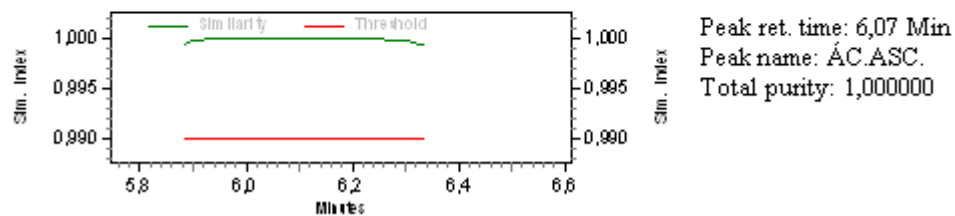


Gráfico 4: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão fotólise.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

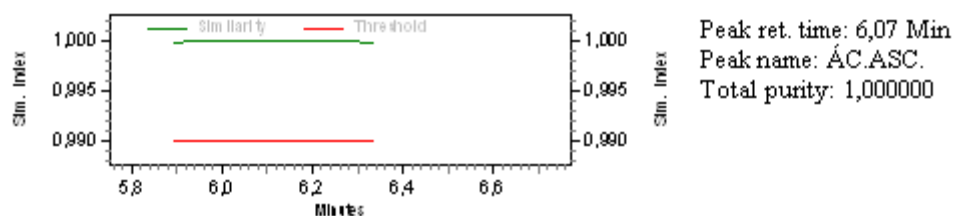


Gráfico 5: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão umidade.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

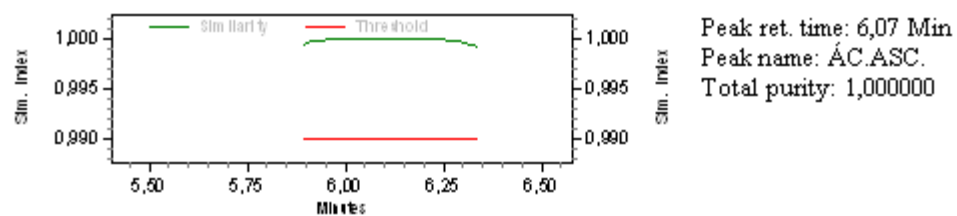


Gráfico 6: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra umidade.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

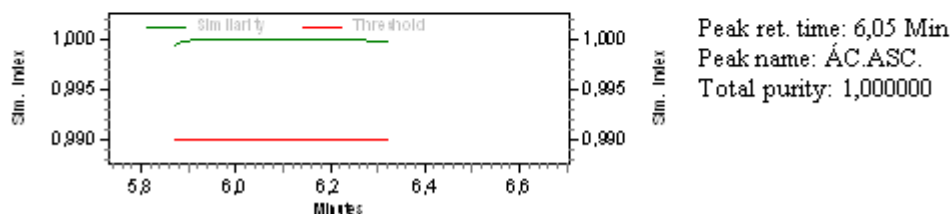


Gráfico 7: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra termólise.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

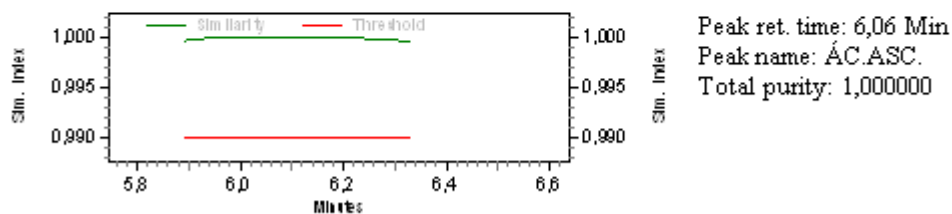


Gráfico 8: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra fotólise.

Obs: As avaliações das purezas cromatográficas foram realizadas com ruído de 0,99, ruído de absorvância de 5,0% e compensação do zero.

3.1.3. Seletividade / Especificidade das soluções submetidas às condições de degradação ácida, básica e oxidação.

Não foi observado pico oriundo de degradação nos cromatogramas das soluções que foram submetidas às condições de estresse.

Também não foram observados os picos de interferência do branco e placebo sob o tempo de retenção do ácido ascórbico.

A pureza cromatográfica do ácido ascórbico foi de 1,00, indicando os interferentes das soluções degradadas não coeluíram com o pico do ativo. A resolução entre os picos adjacentes ao pico de ácido ascórbico foram cerca de 7 e 14.

Tabela 11: Concentração das soluções padrão e amostra contendo do ácido ascórbico.

Solução	Condição	Massa (mg)	Área média	Teor (%)
Padrão	Não Aplicável	21,3	496750	N.A
Padrão	Oxidação	22,5	419546	80,0
Padrão	Ácido	24,5	543107	95,1
Padrão	Base	21,3	459009	92,4
Amostra	Não Aplicável	1504,3	427258	101,3
Amostra	Ácido	1464,3	392210	95,5
Amostra	Base	1328,7	292300	78,4
Amostra	Oxidação	1593,7	432108	96,6
Placebo	Não Aplicável	1006,5	N.A	N.A
Placebo	Ácido	1009,2	N.A	N.A
Placebo	Base	1006,1	N.A	N.A
Placebo	Oxidação	1005,7	N.A	N.A

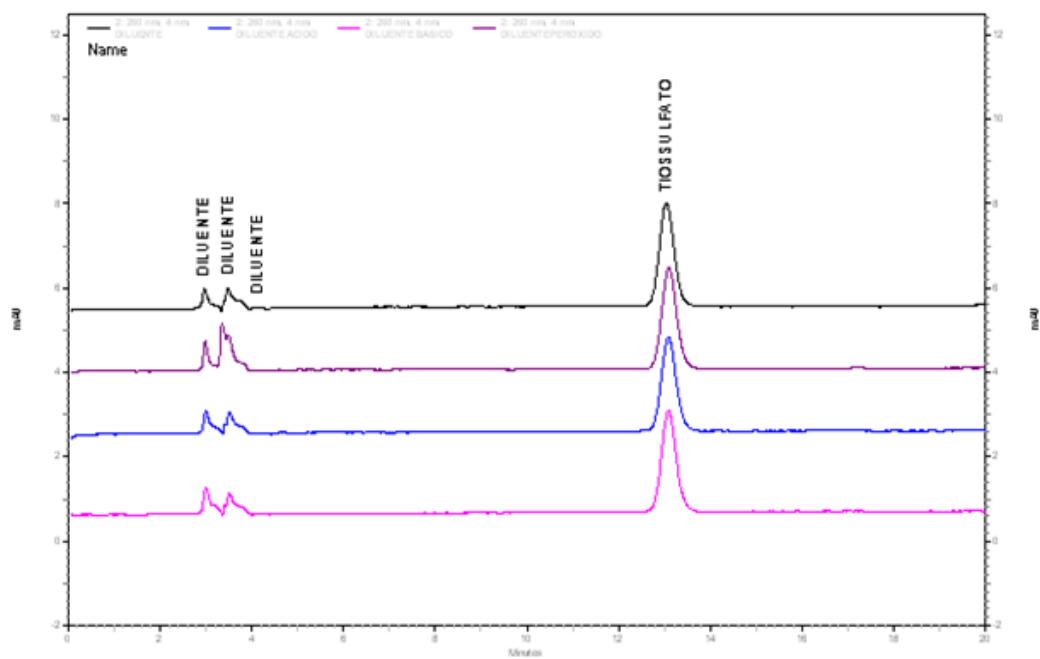


Figura 6: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo o diluente submetido à degradação básica, ácida, oxidação e a solução diluente que não sofreu degradação (de baixo para cima).

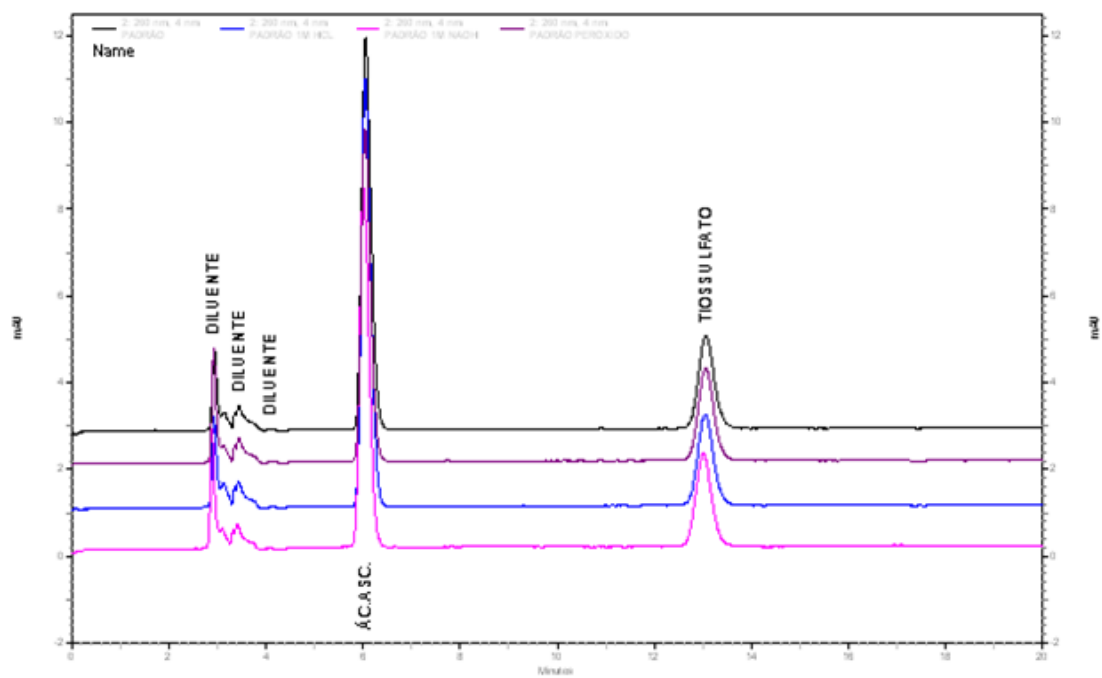


Figura 7: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo o padrão submetido à degradação básica, degradação ácida, oxidação e solução padrão que não sofreu degradação (de baixo para cima).

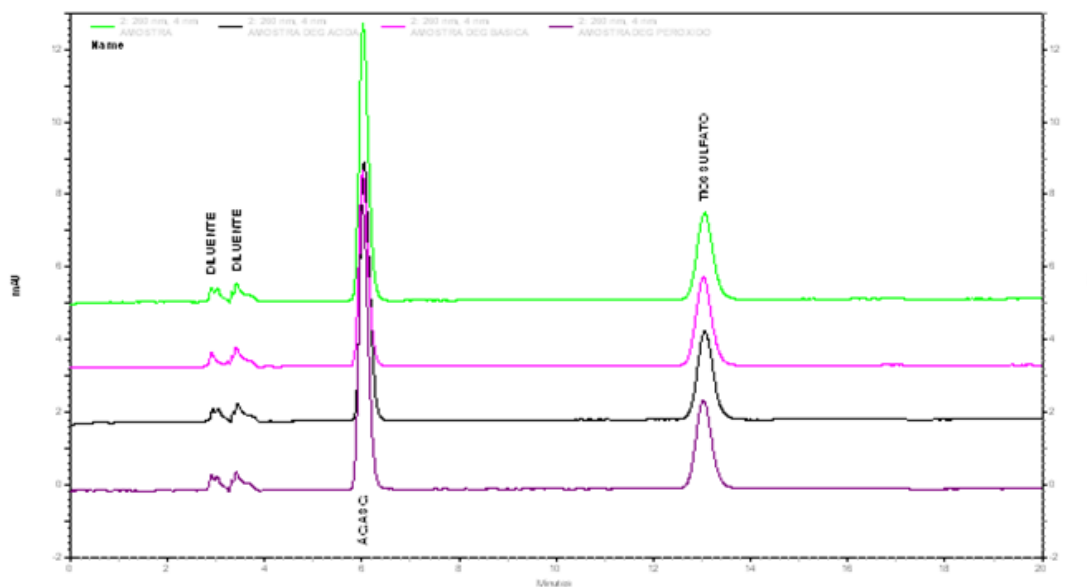


Figura 8: Sobreposição dos cromatogramas das soluções contendo a amostra submetida à degradação por oxidação, ácida, básica e amostra que não sofreu degradação (de baixo para cima).

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

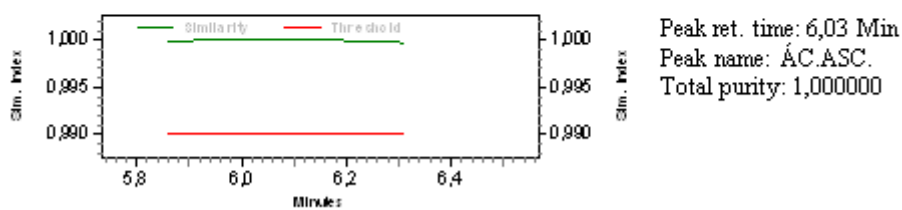


Gráfico 9: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão submetida à degradação básica.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

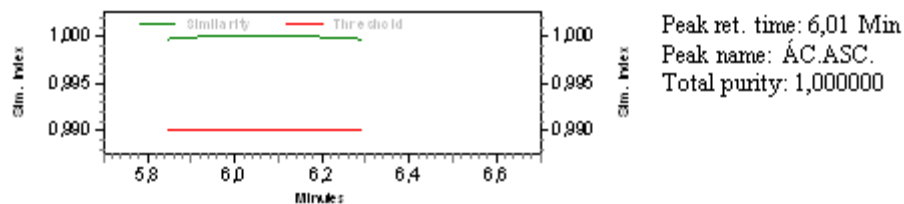


Gráfico 10: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão submetida à oxidação.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

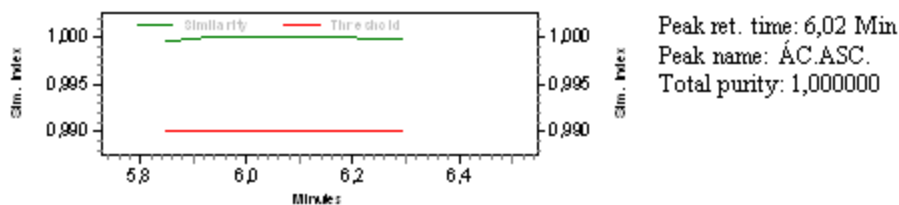


Gráfico 11: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução padrão submetida à degradação ácida.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

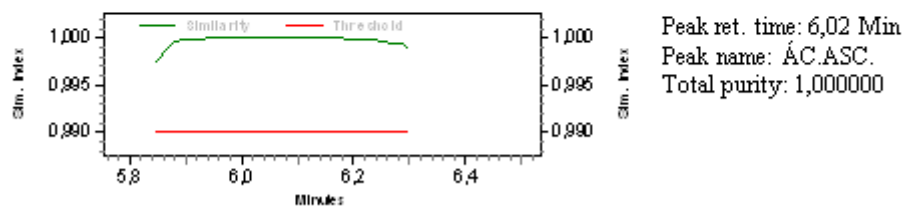


Gráfico 12: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra submetida à degradação básica.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

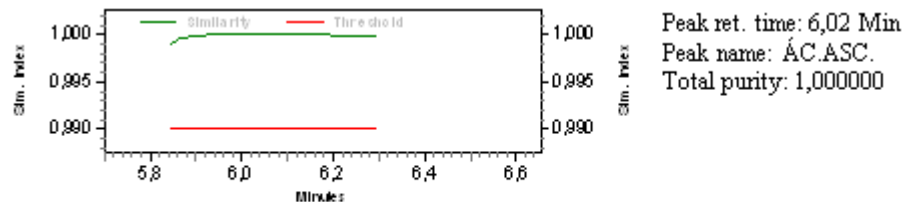


Gráfico 13: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra submetida à oxidação.

Purity Report

All named detected peaks between 6,00 and 6,12 minutes

Multi-Chrom 2 (2: 260 nm, 4 nm)

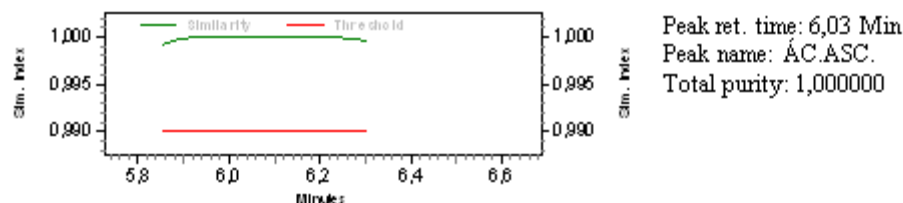


Gráfico 14: Pureza cromatográfica do pico de ácido ascórbico na solução amostra submetida à degradação ácida.

Obs: As avaliações das purezas cromatográficas foram realizadas com ruído de 0,99, ruído de absorvância de 5,0% e compensação do zero.

De acordo com as figuras 3 a 14 pode-se ratificar que o método analisado foi considerado seletivo/ específico porque comprovou que não só foi possível identificar o sinal do fármaco, como também garantir que no tempo de retenção deste, a metodologia analítica permitiu a separação do analito e a certeza de que apenas este poderá ser identificado e quantificado em seu respectivo tempo de retenção, pois o pico oriundo do fármaco apresentou uma pureza espectral acima de 0,999 o que garantiu que não houve presença de picos interferentes sob o do ácido ascórbico.

Para que o ensaio em questão fosse realizado foi fundamental a utilização do detector de arranjo de diodo que permitiu a avaliação espectral do analito e a pureza deste sinal.

3.2.LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) TEÓRICO

O valor encontrado para o limite de detecção teórico foi de 0,0342 µg/mL e para o limite de quantificação foi de 0,1140 µg/mL. Ambos os valores foram calculados de acordo com a fórmula abaixo utilizando como média do valor de ruído 56,279, concentração do fármaco de 19,68 µg/mL e altura média da impureza de 97177, conforme demonstrado a seguir:

Ácido Ascórbico

Massa: 24,6 mg

Volume (mL): 50,0

Diluição 2 (4 mL/100,0 mL)

Concentração final ($\mu\text{g/mL}$): 19,68

Tabela 12: Dados para o cálculo do LD e LQ teóricos.

Injeção nº	Ruído do ativo	Ruído do placebo
1	97116,694	54,197
2	98456,526	55,824
3	96067,503	55,133
4	96199,380	55,534
5	97149,754	58,007
6	98915,416	58,359
7	97448,930	54,852
8	96066,819	54,836
9	96590,096	51,437
10	97757,526	64,615
Média	97177	56,279

→ Conc. ($\mu\text{g/mL}$) =

Média do valor de ruído x Conc. da solução do fármaco ($\mu\text{g/mL}$)

Média da altura do fármaco

19,68 x 56,279 = 0,0114 $\mu\text{g/mL}$

97177

→ Limite de Detecção teórico (LD) = 3 x Conc. ($\mu\text{g/mL}$)

$$0,0114 \times 3 = 0,0342 \mu\text{g/mL}$$

→ Limite de Quantificação teórico (LQ) = 10 x Conc. ($\mu\text{g/mL}$)

$$0,0114 \times 10 = 0,1140 \mu\text{g/mL}$$

O ensaio realizado foi considerado satisfatório por ter correlacionado uma concentração conhecida do fármaco com o ruído existente no cromatógrafo utilizado e este valor foi o ponto de partida para que fosse encontrado o valor real do limite de quantificação e do limite de detecção (ALENCAR *et al*, 2004)¹.

3.3. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ) EXPERIMENTAL

Foram injetadas as três curvas de calibração e a partir da equação da reta de cada curva foi calculado o coeficiente de correlação ao quadrado que foi de 0,9965, 0,9966 e 0,9913 e o desvio padrão entre os coeficientes lineares das curvas (DPb) que foi de 738,3. A partir da equação da reta proveniente da correlação das três curvas, foram encontrados os valores de 0,9951 para o coeficiente de correlação ao quadrado (R^2), -12164,1 para o coeficiente linear e 210541 para o coeficiente angular.

Para calcular o LD e LQ experimental utilizou-se o coeficiente angular da correlação das três curvas e desvio padrão dos coeficientes lineares calculado entre as três curvas.

Os valores encontrados foram 0,01 $\mu\text{g/mL}$ para o LD e 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para o LQ. Porém, a solução contendo 0,04 $\mu\text{g/mL}$ apresentou relação sinal/ruído de 7. Deste modo definiu-se a concentração de 0,08 $\mu\text{g/mL}$ como limite de

¹ O ruído foi um valor encontrado que mensura o sinal da linha de base, sendo assim, cada equipamento apresentará um valor de ruído que será específico para ele em função dos parâmetros fase móvel, comprimento de onda e principalmente o tipo de detector. A energia da lâmpada de deutério presente no detector também é um dos responsáveis pela emissão do sinal relativo ao analito, quanto mais nova a lâmpada, maior será a sua energia e menor o seu ruído. Portanto, uma vez estabelecido o LD e LQ teóricos em um determinado detector, o teste de LD e LQ experimental deverão ser realizados no mesmo sistema cromatográfico para que não haja erros na definição do real valor de limite de detecção e limite de quantificação. (ALENCAR *et al*, 2004).

quantificação experimental. Esta concentração foi definida por ser o dobro da concentração encontrada neste estudo.

Os cálculos estão descritos nas tabelas 13 a 16.

CURVA 1

Solução padrão de ácido ascórbico

Massa do ativo: 11,4 mg

Volume (mL): 100,0 mL

Diluição 2 (1,0 mL/100,0mL)

Tabela 13: Resultados da curva 1.

Ponto	Alíquota (mL)	Diluição (mL)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área
1	2,0	20,0	0,114	13525
				13567
2	4,0	20,0	0,228	33067
				34246
3	6,0	20,0	0,342	56324
				57551
4	8,0	20,0	0,456	84496
				84775
5	10,0	20,0	0,570	108043
				108023
				a=
				210934
				b=
				-13048,5
				r=
				0,9982
				r²=
				0,9965

CURVA 2

Solução padrão de ácido ascórbico

Massa do ativo: 11,4 mg

Volume (mL): 100,0 mL

Diluição 2 (1,0 mL/100,0mL)

Tabela 14: Resultados da curva 2.

Ponto	Alíquota (mL)	Diluição (mL)	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Área
1	2,0	20,0	0,114	13114
				12844
2	4,0	20,0	0,228	39324
				37247
3	6,0	20,0	0,342	58953
				59928
4*	8,0	20,0	0,456	84232
5	10,0	20,0	0,570	112755
				111739
				a=
				214202
				b=
				-11581,4
				r=
				0,9983
				r²=
				0,9966

* Houve a perda de uma medição para esta concentração.

CURVA 3

Solução padrão de ácido ascórbico

Massa do ativo: 11,4 mg

Volume: 100,0 mL

Diluição 2 (1,0 mL/100,0mL)

Tabela 15: Resultados da curva 3.

Ponto	Alíquota (mL)	Diluição (mL)	Concentração (µg/ mL)	Área
1	2,0	20,0	0,114	14224
				14345
2	4,0	20,0	0,228	33060
				32717
3	6,0	20,0	0,342	58194
				58589
4	8,0	20,0	0,456	78185
				79895
5	10,0	20,0	0,570	110472
				107560
a=				208439
b=				-12459,3
r=				0,9957
r²=				0,9913

Tabela 16: Correlação entre as três curvas.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Média das Áreas
0,114	13546
0,114	12979
0,114	14285
0,228	33657
0,228	38286
0,228	32889
0,342	56938
0,342	59441
0,342	58392
0,456	84636
0,456	84232
0,456	79040
0,570	108033
0,570	112247
0,570	109016
a=	210541
b=	-12164,1
r=	0,9976
r²=	0,9951

Coefficientes lineares

- Curva 1 = -13048,5
- Curva 2 = -11581,4
- Curva 3 = -12459,3
- Desvio padrão = 738,3

$$\text{Limite de detecção experimental } (\mu\text{g/mL}) = \frac{3 \times 738,3}{210541} = 0,01$$

$$\text{Limite de quantificação experimental } (\mu\text{g/mL}) = \frac{10 \times 738,3}{210541} = 0,04$$

3.4. LINEARIDADE DO ÁCIDO ASCÓRBICO

Foram encontrados os valores de 0,9998 para o coeficiente de correlação no ensaio de linearidade do fármaco, conforme demonstrado na tabela 17.

Tabela 17: Resultados da curva da linearidade.

Concentração Aprox. (%)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área	CV (%)
0,08	0,08	10707	3,2
0,08	0,08	10051	
0,08	0,08	10294	
0,80	0,82	181863	1,2
0,80	0,82	178498	
0,80	0,82	177878	
1,60	1,64	386380	0,3
1,60	1,64	385295	
1,60	1,64	387470	
2,40	2,46	594643	0,3
2,40	2,46	595297	
2,40	2,46	598509	
3,20	3,28	794534	1,1
3,20	3,28	794850	
3,20	3,28	809955	
	a =	248744	
	b =	-17067	
	r =	0,9998	
	r² =	0,9995	
	y-intercepto (%) =	-4,417	

O gráfico 15 demonstra a curva de calibração onde o coeficiente de correlação ao quadrado encontrado foi 0,9995, demonstrando a linearidade do fármaco na faixa de concentração estabelecida.

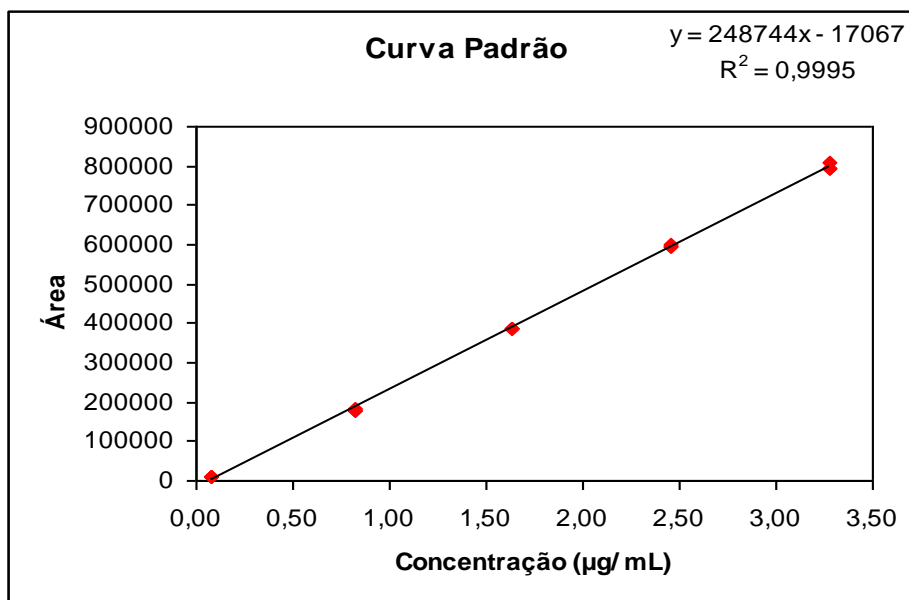


Gráfico 15: Curva padrão.

O gráfico correspondente aos resíduos comprova que os pontos da curva estão dispersos entre si, de acordo com o conceito estatístico da homoscedasticidade, cuja definição é que os resíduos devem estar distribuídos de maneira aleatória no gráfico de concentração x resíduo. Ou seja, para atender a homoscedasticidade, não deve existir uma tendência linear de aumento do resíduo em função do aumento ou da diminuição de concentração das soluções analisadas (MILLER, 1988; LEVINE *et al*, 2005). Todos os valores de resíduos estiveram dentro do intervalo de duas vezes o erro padrão, cujo valor foi, 13055.

Tabela 18: Estatística de regressão.

Estatísticas de Regressão			
R múltiplo		0,9998	
R quadrado		0,9995	
R quadrado ajustado		0,9995	
Erro padrão		6528	
2 x erro padrão		13055	
Observações		15	
Observação	Y previsto	Resíduo	Resíduos padrão
1	3303	7404	1,1770
2	3303	6748	1,0727
3	3303	6991	1,1114
4	186637	-4774	-0,7589
5	186637	-8139	-1,2939
6	186637	-8759	-1,3924
7	390341	-3961	-0,6297
8	390341	-5046	-0,8022
9	390341	-2871	-0,4564
10	594045	598	0,0951
11	594045	1252	0,1991
12	594045	4464	0,7097
13	797749	-3215	-0,5111
14	797749	-2899	-0,4609
15	797749	12206	1,9405

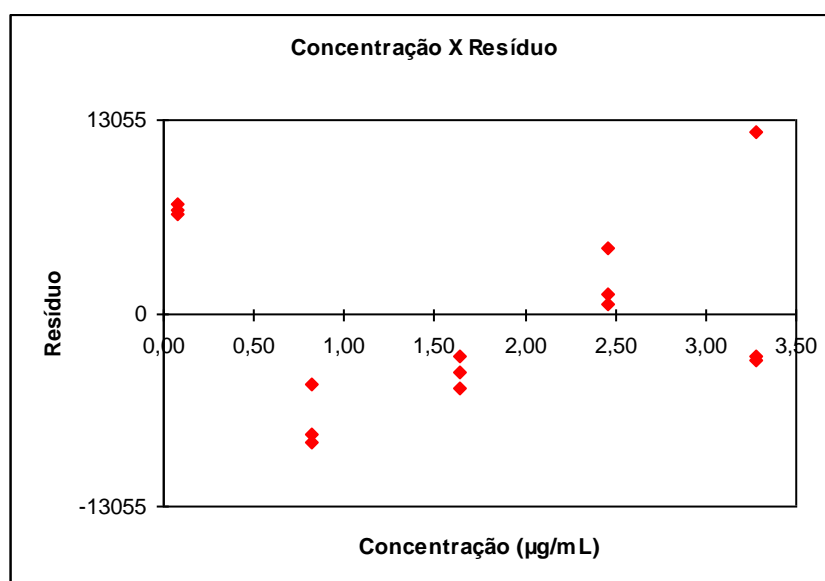


Gráfico 16: Gráfico dos resíduos.

O método analítico foi considerado linear por atender ao critério de aceitação estabelecido para este teste.

3.5. PRECISÃO INTRACORRIDAS (REPETITIVIDADE) DO ÁCIDO ASCÓRBICO

3.5.1. Precisão intracorridas (repetitividade) no limite de Quantificação

O valor do desvio padrão relativo encontrado para as amostras preparadas a partir do placebo fortificado com o fármaco, na concentração do limite de quantificação foi de 0,91. As tabelas 19 e 20 demonstram os resultados encontrados.

3.5.1.1. Similaridade entre os padrões na solução padrão (no limite de quantificação).

Tabela 19: Similaridade entre as soluções do padrão (limite de quantificação).

Padrão nº	Massa de ácido ascórbico (mg)	Área	Área média	Fator de similaridade
1	32,69	10580	10359	1,00
		10138		
2	32,79	10321	10419	
		10517		

3.5.1.2. Cálculos das recuperações das soluções amostras (no limite de quantificação).

Tabela 20: Resultados das amostras da precisão intracorridas (limite de quantificação).

Concentração aprox. (µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)	Área	Área média	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%)	
0,08	0,082	9943	10014	0,079	97	
		10084				
	0,082	10267	10010	0,079	97	
		9752				
	0,082	10121	10049	0,079	97	
		9977				
	0,082	10033	10238	0,081	99	
		10443				
	0,082	10235	9988	0,079	96	
		9740				
	0,082	10027	10081	0,079	97	
		10134				
					Média =	97
					Desvio =	0,89
				CV =	0,91	

3.5.2. Precisão Intracorridas (repetitividade) na concentração 3,2 µg/mL

O valor do desvio padrão relativo encontrado para as amostras preparadas a partir do placebo fortificado com o fármaco na concentração de 3,2 µg/ mL foi de 0,86%. As tabelas 21 e 22 demonstram os resultados encontrados.

3.5.2.1. *Similaridade entre os padrões na solução padrão na concentração de 3,2 µg/mL.*

Tabela 21: Dados das soluções do padrão (3,2 µg/ mL).

Padrão nº	Massa de ácido ascórbico (mg)	Área	Área média	Fator de similaridade
1	32,69	791081	796149	1,00
		801216		
2	32,79	800670	801415	
		802160		

3.5.2.2. *Resultados das recuperações das soluções amostras (3,2 µg/mL).*

Tabela 22: Resultados das amostras da precisão intracorridas (3,2 µg/mL).

Concentração aprox. (µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)	Área	Área média	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%)	
3,20	3,266	798394	805554	3,304	101	
		812714				
	3,266	797218	791249	3,246	99	
		785280				
	3,266	792397	801710	3,289	101	
		811022				
	3,266	803198	803201	3,295	101	
		803203				
	3,266	789344	788850	3,236	99	
		788356				
	3,266	792928	795329	3,262	100	
		797730				
					Média =	100
					Desvio =	0,86
				CV =	0,86	

A tabela 23 apresenta o resumo do resultado encontrado no teste e o respectivo critério de aceitação preconizado pela ANVISA, onde o método será considerado preciso se o desvio padrão relativo entre as amostras da precisão, for menor que 5% (BRASIL, 2003a). Para o parâmetro em questão foi avaliado o desvio padrão relativo das recuperações entre as amostras (placebo fortificado).

Tabela 23: Tabela contendo o critério de aceitação e resultados da precisão intracorrída do ácido ascórbico.

TESTE	CRITÉRIO	RESULTADO
PRECISÃO INTRACORRIDA (Repetitividade)	Desvio Padrão Relativo (RSD) menor que 5,0 %.	Amostra (Placebo + ácido ascórbico) Conc. 0,08 µg/mL = 0,91 % Conc. 3,20 µg/mL = 0,86 %

O método foi considerado preciso por atender ao critério de aceitação. A ANVISA determina que o método é considerado preciso se o valor do RSD entre as amostras não for maior que 5,0 %. Como ambos os testes apresentaram resultados inferiores a 5,0% o método foi considerado preciso da faixa de concentração de 0,08 a 3,2 µg/mL de ácido ascórbico.

3.6. PRECISÃO INTERCORRIDA (INTERMEDIÁRIA) DO ÁCIDO ASCÓRBICO

3.6.1. Precisão no Limite de Quantificação - Analista 2

O valor do desvio padrão relativo encontrado para as amostras preparadas a partir do placebo fortificado com o fármaco, na concentração do limite de quantificação foi de 1,87. As tabelas 24 e 25 demonstram os resultados encontrados.

3.6.1.1. *Similaridade entre os padrões na solução padrão (no limite de quantificação) - Analista 2.*

Tabela 24: Dados das soluções do padrão (limite de quantificação) – Analista 2

Padrão nº	Massa de Ácido ascórbico (mg)	Área	Área média	Fator de similaridade
1	32,46	4790	4781	0,99
		4772		
2	33,02	4731	4812	
		4892		

3.6.1.b. *Recuperações das soluções amostras (no limite de quantificação)*
 – Analista 2.

Tabela 25: Resultados das amostras da precisão – Analista 2 (limite de quantificação).

Concentração aprox. (µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)	Área	Área média	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%)
0,08	0,081	4752	4908	0,083	103
		5064			
	0,081	4800	4764	0,081	100
		4727			
	0,081	4865	4732	0,080	99
		4599			
	0,081	4998	4897	0,083	102
		4795			
	0,081	4782	4747	0,080	99
		4711			
	0,081	4792	4926	0,084	103
		5059			
				Média =	101
				Desvio =	1,89
				CV =	1,87

Foi encontrado o valor de 2,48% de desvio padrão relativo para doze amostras preparadas na concentração do limite de quantificação. As amostras foram preparadas por dois analistas em dias diferentes. A tabela 26 demonstra o resultado encontrado.

Tabela 26: Resultados da precisão intercorridas (intermediária) no limite de quantificação.

	Analista 1	Analista 2
Amostra	Teor de ácido ascórbico (%)	Teor de ácido ascórbico (%)
1	97	103
2	97	100
3	97	99
4	99	102
5	96	99
6	97	103
	Média =	99
	Desvio =	2,46
	CV (%) =	2,48

3.6.2 *Precisão Intercorridas (intermediária) na concentração de 3,2 µg/mL*

O valor do desvio padrão relativo encontrado para as amostras preparadas a partir do placebo fortificado com o fármaco na concentração do intervalo (3,2 µg/ mL) foi de 0,83%. As tabelas 27 e 28 demonstram os resultados encontrados.

3.6.2.1. *Similaridade entre os padrões na solução padrão (3,2 µg/mL) – Analista 2.*

Tabela 27: Dados das soluções do padrão (no intervalo) – Analista 2.

Padrão nº	Massa de ácido ascórbico (mg)	Área	Área média	Fator de similaridade
1	32,96	789454	792805	1,00
		796155		
2	33,78	805298	815796	
		826294		

3.6.2.2. Resultados recuperações das soluções amostras (3,2 µg/mL) – Analista 2.

Tabela 28: Resultados das amostras da precisão - Analista 2 (3,2 µg/mL).

Concentração aprox. (µg/mL)	Concentração teórica (µg/mL)	Área	Área média	Concentração real (µg/mL)	Recuperação (%)
3,20	3,293	792089	797213	3,311	101
		802336			
	3,293	798080	787351	3,270	99
		776621			
	3,293	781006	782866	3,251	99
		784726			
	3,293	790384	789781	3,280	100
		789178			
	3,293	783096	781479	3,246	99
		779861			
	3,293	778942	779613	3,238	98
		780283			
				Média =	99
				Desvio =	0,82
				CV =	0,83

Foi encontrado o valor de 1,01% para as doze amostras preparadas na concentração do intervalo (3,2 µg/mL). As amostras foram preparadas por dois analistas em dias diferentes. A tabela 29 demonstra o resultado encontrado.

Tabela 29: Resultados da precisão intercorridas na concentração de 3,2 µg/mL.

	Analista 1	Analista 2
Amostra	Teor de ácido ascórbico (%)	Teor de ácido ascórbico (%)
1	101	101
2	99	99
3	101	99
4	101	100
5	99	99
6	100	98
	Média =	100
	Desvio =	1,00
	CV (%) =	1,01

O critério de aceitação estabelecido para este teste foi baseado pela ANVISA que determina que o desvio padrão relativo da medição de pelo menos 12 amostras de mesma concentração, deve ser menor que 5,0% (BRASIL, 2003a).

Baseando-se nos resultados encontrados, o método foi considerado preciso, nas faixas de concentração do limite de quantificação (0,08 µg/mL) a 3,2 µg/ml do ácido ascórbico, porque atendeu ao critério de aceitação estabelecido.

3.7. Exatidão do ácido ascórbico

As tabelas 30 e 31 apresentam os resultados encontrados no teste de exatidão, onde o método será considerado exato se as recuperações de doze amostras preparadas na concentração do limite de quantificação (0,08 µg/mL) e na concentração de 3,2 µg/mL estiverem entre a faixa de 90 a 110%. Os valores encontrados estavam na faixa de 96 a 103%.

Tabela 30: Resultados da precisão intercorrida no limite de quantificação.

	Analista 1	Analista 2
Amostra	Teor de ácido ascórbico (%)	Teor de ácido ascórbico (%)
1	97	103
2	97	100
3	97	99
4	99	102
5	96	99
6	97	103
	Média =	99
	Desvio =	2,46
	CV (%) =	2,48

Tabela 31: Resultados da precisão intercorridas na concentração de 3,2 µg/mL.

	Analista 1	Analista 2
Amostra	Teor de ácido ascórbico (%)	Teor de ácido ascórbico (%)
1	101	101
2	99	99
3	101	99
4	101	100
5	99	99
6	100	98
	Média =	100
	Desvio =	1,00
	CV (%) =	1,01

Segundo a resolução publicada pela ANVISA, o método analítico deverá ser exato se houver a proximidade de resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro e, por isso, o método foi considerado exato pelo fato das recuperações das soluções amostras estarem dentro da faixa de 90 a 110% da concentração real das soluções (BRASIL, 2003a).

3.8. INTERVALO

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Este parâmetro é derivado dos estudos da linearidade, precisão e exatidão e é considerado satisfatório, se o método apresentar exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicado à amostra (placebo fortificado) contendo quantidade de ácido ascórbico dentro do intervalo do respectivo LQ (0,08 µg/mL) a 3,2 µg/mL (correspondente a 200% da concentração do critério de aceitação estabelecido pela validação de limpeza) (BRASIL, 2003a).

Portanto, baseando-se nos testes realizados, o método analítico foi linear, preciso e exato na faixa de concentração do limite de quantificação (0,08 µg/mL) até 3,2 µg/mL de ácido ascórbico.

3.9. ROBUSTEZ

3.9.1. Estabilidade das soluções

O critério de aceitação para o teste de robustez foi estabelecido a partir da estabilidade das soluções padrão do ácido ascórbico e da amostra (placebo + ácido ascórbico) e foram consideradas estáveis até o tempo em que a variação (%) do sinal médio no instante testado em relação ao sinal médio no tempo zero para o ácido ascórbico, fosse de ± 5 %.

Foi feito o monitoramento das soluções recém-preparadas, do ácido ascórbico (1,6 µg/mL) e do placebo fortificado com o ácido ascórbico (amostra) na concentração do LQ por um período de 46 horas. A solução padrão e a solução amostra apresentaram-se estáveis durante este período, onde a variação média do sinal foi de 4,7% para a solução padrão e 4,1% para a solução amostra. As tabelas 32 e 33 demonstram os resultados encontrados.

3.9.1.1. Resultados estabilidade solução padrão.

Tabela 32: Resultados da estabilidade da solução padrão.

Tempo (h)	PADRÃO		
	Área	Área Média	Varição (%)
0	366403	369936	N.A
	373468		
10	377562	379082	2,5
	380601		
18	375163	375599	1,5
	376034		
30	374828	374863	1,3
	374898		
32	372097	372467	0,7
	372837		
34	370489	370648	0,2
	370807		
40	361740	364230	1,5
	366719		
42	359735	364048	1,6
	368360		
44	356550	354738	4,1
	352925		
46	351005	352627	4,7
	354248		
48	348421	349405	5,5
	350389		

3.9.1.2. Resultados da solução amostra.

Tabela 33: Resultados da estabilidade da solução amostra.

Tempo (h)	AMOSTRA		
	Área	Área Média	Varição (%)
0	78200	78420	N.A
	78639		
10	79624	79517	1,4
	79409		
18	80718	80356	2,5
	79993		
30	79343	78625	0,3
	77906		
32	79159	79047	0,8
	78934		
34	79258	78790	0,5
	78321		
40	78325	78565	0,2
	78805		
42	77597	76186	2,8
	74774		
44	75322	75077	4,3
	74832		
46	76900	75176	4,1
	73452		
48	74489	74300	5,3
	74110		

3.9.2. Temperatura do forno – 28°C e 32°C

O critério de aceitação foi estabelecido das amostras injetadas nas diversas variações de temperatura do forno onde a variação (%) entre as concentrações das amostras nas temperaturas de 28 e 32°C não deveria ser maior que 5% em relação às concentrações das amostras injetadas na temperatura de 30°C. A maior variação foi de 4,7%, conforme demonstrado na tabela 38.

Portanto, tomando como base os resultados encontrados nos testes de robustez, o método foi considerado robusto por atender aos critérios de aceitação estabelecidos.

Tabela 34: Fator de similaridade – variação da temperatura do forno.

Padrão nº	Temperatura = 28°C		Temperatura = 30°C		Temperatura = 32°C	
	Área média	Fator similaridade	Área média	Fator similaridade	Área média	Fator similaridade
1	357037	1,01	370341	0,98	349022	1,00
2	359370		361170		347387	

Tabela 35: Resultados das amostras com a temperatura do forno em 30°C – Condição normal.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
375619	370341	357238	355329	1,54*	350051	350684	1,52*
365062		353420			351317		

* Conc. = Concentração de ácido ascórbico

Tabela 36: Resultados das amostras com a temperatura do forno em 28°C.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
354183	357037	358154	356927	1,61*	355489	354144	1,59*
359890		355699			352798		

*Conc. = Concentração de ácido ascórbico

Tabela 37: Resultados das amostras com a temperatura do forno em 32°C.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
349454	349022	340717	341517	1,57*	344061	346179	1,59*
348590		342316			348297		

*Conc. = Concentração de ácido ascórbico.

Tabela 38: Resultados das amostras.

Condição	Amostra 1 (µg/mL)	Varição (%)	Amostra 2 (µg/mL)	Varição (%)
Normal 30°C	1,54	NA	1,52	NA
Temperatura 28°C	1,61	4,2	1,59	4,7
Temperatura 32°C	1,57	2,0	1,59	4,7

3.9.3. Fluxo de fase móvel – 0,8 e 1,2 mL/min

O critério de aceitação foi estabelecido das amostras injetadas nas diversas variações de fluxo da fase móvel onde a variação (%) entre as concentrações das amostras nos fluxos de 0,8 e 1,2 mL/min não deveria ser maior que 5% em relação às concentrações das amostras injetadas na com o fluxo de 1,0 mL/min. A maior variação foi de 4,3%, conforme demonstrado na tabela 43.

Portanto, tomando como base os resultados encontrados nos testes de robustez, o método foi considerado robusto por atender aos critérios de aceitação estabelecidos.

Tabela 39: Fator de similaridade – variação do fluxo da fase móvel.

Padrão nº	Fluxo = 0,8 mL/min		Fluxo = 1,0 mL/min		Fluxo = 1,2 mL/min	
	Área média	Fator similaridade	Área média	Fator similaridade	Área média	Fator similaridade
1	440683	1,00	370341	0,98	299708	1,00
2	437135		361170		297569	

Tabela 40: Dados e resultados das amostras com o fluxo 1,0 ml/min – Condição normal.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
375619	370341	357238	355329	1,54*	350051	350684	1,52*
365062		353420			351317		

*Conc. = Concentração de ácido ascórbico

Tabela 41: Dados e resultados das amostras com o fluxo de 0,8 mL/min.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
433210	440683	427724	424707	1,55*	429286	429697	1,57*
448156		421689			430098		

*Conc. = Concentração de ácido ascórbico

Tabela 42: Dados e resultados das amostras com o fluxo de 1,2 mL/min.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
298076	299708	294348	295523	1,58*	296768	295953	1,59*
301340		296698			295137		

*Conc. = Concentração de ácido ascórbico

Tabela 43: Resultados das amostras para a variação do fluxo.

Condição	Amostra 1 (µg/mL)	Variação (%)	Amostra 2 (µg/mL)	Variação (%)
Normal -fluxo 1,0 mL/min	1,54	NA	1,52	NA
Fluxo 0,8mL/min	1,55	0,4	1,58	3,0
Fluxo 1,2mL/min	1,58	2,8	1,59	4,3

3.9.4. Variação da composição da fase móvel – 5% de acetonitrila na fase móvel

O critério de aceitação foi estabelecido das amostras injetadas nas diversas variações da concentração de acetonitrila onde a variação (%) entre as concentrações das amostras na fase móvel contendo acetonitrila a 70% não deveria ser maior que 5% em relação às concentrações das amostras injetadas na com a fase móvel descrita na metodologia (acetonitrila a 75%). A maior variação foi de 1,2%, conforme demonstrado na tabela 47.

Portanto, tomando como base os resultados encontrados nos testes de robustez, o método foi considerado robusto por atender aos critérios de aceitação estabelecidos.

Tabela 44: Fator de similaridade – variação do fluxo na composição da fase móvel.

Padrão nº	Fase Móvel - Normal		Acetonitrila 70%	
	Área média	Fator similaridade	Área média	Fator similaridade
1	370341	0,98	369586	0,98
2	361170		362769	

Tabela 45: Resultados das amostras com a fase móvel do método – Condição normal.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
375619	370341	357238	355329	1,54*	350051	350684	1,52*
365062		353420			351317		

*Conc. = Concentração de ácido ascórbico

Tabela 46: Resultados das amostras com a fase móvel composta por acetonitrila 70%.

Padrão		Amostra 1			Amostra 2		
Área	Área média	Área	Área média	Conc. (µg/mL)	Área	Área média	Conc. (µg/mL)
367002	369586	352948	536071	1,53*	354434	354036	1,54*
372169		353194			353638		

*Conc. = Concentração de ácido ascórbico

Tabela 47: Resultados das amostras para variação da fase móvel.

Condição	Amostra 1 (µg/mL)	Variação (%)	Amostra 2 (µg/mL)	Variação (%)
Fase móvel normal	1,54	NA	1,52	NA
Fase móvel – acetonitrila 70%	1,53	-0,4	1,54	1,2

4. CONCLUSÃO

O método, após a validação realizada, apresentou-se seletivo/específico, linear, preciso, exato e robusto perante os critérios de aceitação definidos.

Esta metodologia poderá ser utilizada para a determinação do teor de ácido ascórbico nas concentrações de 0,08 µg/mL a 3,2 µg/mL.

A metodologia apresentou-se adequada para quantificar resíduos de ácido ascórbico, em equipamentos de produção (validação de limpeza) e/ou em análise em que o fármaco esteja presente como excipiente ou em baixas concentrações.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023. São Paulo; 2002.

ALENCAR, João R.B. *et al.* Validação de limpeza de zidovudina: estratégia aplicada ao processo de fabricação de medicamentos anti-retrovirais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.1, p.1-8, 2004.

BARROS, Cleide B. Validação de método analítico. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia de Validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, publicado em 2 de junho 2003a.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RDC nº 210, de 04 de Agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos o comprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das Boas Práticas para fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, publicado em 14 de agosto de 2003b.

CASSIANO, Neila M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1021-1030, 2009.

COLLINS, Carol H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma.

Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 4, p.70 – 76, 2006.

DEGANI, Ana. L; CASE, Queila. L; VIERA, Paulo. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova**, São Paulo, v.14, n. 7, p. 21-25, 1998.

ETTRE, Luis S: *the separation technique of the 20th century*. **Chromatography**, Wiesbaden, v. 51, n. 1, p.130 – 138, 2000.

FORNARO, Adalgiza; Coichew, Nina. Ácido L- ascórbico: Reação de complexação e de oxido-redução com alguns íons metálicos e de transição. **Química Nova**, v.21, n.5, p. 642-650, 1997.

GOUVEIA, Ester R. *et al.* Validação de metodologia para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar, **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

HORWITZ, Willan. *Quality Assurance in the Analysis of foods for Trace Constituents*. **J.Assoc.Off.Anal.Chem**, v.63, n.6, p.1344-1354, 1980.

INTERNATIONAL CONFERENCE HARMONISATION (ICH) - Harmonized Tripartite Guideline: Impurity in new drug products Q3B (RQ3BR – Guideline impurities in new drug products – ICH step 4, publicado em 2006) – Em 2 de junho 2006. Disponível eletronicamente em: WWW.fda.gov acessado em: 02 de Fevereiro 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE HARMONISATION (ICH) - Harmonized Tripartite Guideline: Validation of analytical Procedures: test and methodology, Q2B (RQ2R1 – ICH step 1, publicado em 2005) – Em 6 de novembro de 2005. Disponível eletronicamente em: WWW.fda.gov acessado em: 02 de Fevereiro 2012.

LEVINE, David.M. *et al.* Estatística – Teoria e aplicações usando o Microsoft Excel em Português, 3º Edição. Rio de Janeiro, Editora LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., p.489-492, 2005.

MALDANER, Liane.; JARDIM, Isabel. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MARTÍNEZ, Alfredo J. *Fundamentos teórico-práticos de Nutrición y dietética*, 1º Edição, Espanha. Editora Eunate Ediciones AS, p. 460,1998.

MILLER, Jane. C.; MILLER, James. N. *Statistics for Analytical Chemistry*, 2ª ed., Ellis Horwood: Chichester, p. 268, 1988.

NAKASHIMA, K. *High-performance liquid chromatographic analysis of drugs of abuse in biologic samples*. **Journal of Health Science**, Tokio, v. 51, n. 3, p. 272-277, 2005.

NOGUEIRA, João. M. F; MIKHAIL, Paula S. T: Um legado para a cromatografia moderna. **Química Nova**, Lisboa, v. 100, p. 120 – 124, 2006.

NUNES, Rogéria S. *et al.* Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais *Lippia Sidoides Cham* por CLAE. **Brasil Farma**, v. 86, n.3, p.87-91, 2005.

OLIVEIRA, Marcelo A. *et al.* Análise térmica aplicada à caracterização da simvastatina em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, Belo Horizonte, v.33, n.8, p.1653-1657, 2010.

PASCHOAL, Jonas A.R. *et al.* Validação em Métodos Cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, **Química Nova**, v.31, n. 5, p.1090-1098, 2008.

PERES, Thomas. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229, 2002.

RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004.

ROSA, Jeane S *et al.* Desenvolvimento de um método de análise de vitamina C em um alimento por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc.Tecnol. Aliment.** v.27, n.4,p. 837-846, 2007.

RUELA, Andre L.M; ARAÚJO, Magali B; PEREIRA, Gislaine R. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*, **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 165-168, 2009.

TAI, Andreus; GOHDA, Edgar. *Determination of ascorbic acid and its related compounds in foods and beverages by hydrophilic interaction liquid chromatography.* **Journal of chromatography.** v.30, n.853,p. 210-220, 2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA; *US Pharmacopeia 27, Validation of compendial Methods <1225>*, Rockville, 2004.

VALENTINI, Rosa S *et al.* Validação de métodos analíticos. **Química Nova**, v.11, n. 2, p. 26-31, 2007.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; FLÓRIO, J. C.; SPINOSA, H. S. Cromatografia em camada delgada para o diagnóstico da intoxicação por aldicarb (—chumbinholl) em cães e gatos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1231-1235, 2007.

WESTMAN, Lotta; KARLSSON, Goran. Methods for detecting residues of cleaning agents validation, **Pharmaceutical Science and Technology**, v.54, n.5, p. 365-372, 2000.

WHO. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; *Thirty-second report*, WHO Technical Report Series, Nº 823, Geneva, publicado em 1992. Em 6 de novembro de 2005. Disponível eletronicamente em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_823.pdf acessado em: 02 de Fevereiro 2012.