

Validação de Método Analítico em Análises Físico-Química.

Elizangela Abreu DUTRA¹; Helena Miyoco YANO²

¹ Blanver Farmoquímica Ltda

² Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz Central

Todas as substâncias que são testadas em ensaios clínicos ou que são aprovadas para uso no mercado, necessitam de métodos analíticos para o controle de sua identidade, pureza, qualidade e potência, bem como para determinação das características de sua estabilidade. Uma vez determinado o objetivo do método em estudo e tenha-se a intenção de incluí-lo em uma documentação regulatória, é de fundamental importância que esse método seja considerado válido, ou seja, que ele forneça informações confiáveis e que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos e para isso é necessário que se faça uma validação.

Validação de um método é o processo através do qual estudos de laboratório são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas, fornecendo uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer ^{1,2,3}.

A Farmacopéia Americana (USP)³ possui uma série de parâmetros cuja determinação permite o julgamento da confiabilidade do método em estudo. Estes parâmetros estão descritos no Capítulo 1225 de Testes Gerais e são conhecidos como parâmetros de performance analítica, os quais são: exatidão, precisão, especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Parâmetros de Performance Analítica

EXATIDÃO - expressa o grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência. Deve ser estabelecida em toda faixa especificada do procedimento analítico. Quanto mais próximo for o valor obtido do valor teórico, mais exato é considerado o método. Os procedimentos sugeridos para avaliar a exatidão de um método analítico incluem ^{1,2,3}:

- avaliação de amostras de concentração conhecida comparando o valor medido com um valor tido como verdadeiro;
- comparação dos resultados do novo método com os resultados de um método já validado;
- recuperação de uma concentração conhecida adicionada na amostra.

Este último procedimento é o mais utilizado, e consiste na adição de uma quantidade conhecida do padrão, acima e abaixo dos níveis normais esperados na amostra. Recomenda-se que as concentrações sejam de 50 – 150% em relação ao valor teórico. Neste caso a exatidão é expressa em percentual de recuperação, que pode ser calculado da seguinte forma:

$$R = \frac{C \text{ amostra adicionada de padrão} - C \text{ amostra sem adição de padrão}}{C \text{ de padrão que foi adicionada na amostra}} \times 100$$

onde: % R – percentual de recuperação
C - concentração

A International Conference on Harmonization (ICH)^{1,2} recomenda que a exatidão deve ser avaliada usando um mínimo de 9 determinações em 3 níveis de concentrações, cobrindo a faixa especificada (por exemplo, 3 concentrações/3 réplicas cada).

PRECISÃO - expressa o grau de concordância entre os resultados das análises individuais quando o procedimento é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea em idênticas condições de testes. Quanto mais próximos estiverem os valores obtidos entre si, mais preciso é considerado o método ³.

A precisão de um método analítico pode ser medida em três diferentes níveis ³:

- 1-Repetitividade - consiste em aplicar o método diversas vezes em uma mesma amostra homogênea em idênticas condições de teste no mesmo dia, mesmo laboratório, mesmo equipamento e mesmo analista.
- 2-Precisão intermediária (também conhecida como resistência) - consiste em aplicar o método diversas vezes em uma mesma amostra homogênea em idênticas condições de teste no mesmo laboratório, porém em dias diferentes, diferentes analistas, se possível equipamentos diferentes.
- 3-Reprodutibilidade - consiste em uma colaboração de vários laboratórios. O método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea em idênticas condições de teste em dias, laboratórios, analistas diferentes.

Em todos estes níveis a precisão é expressa pelo desvio padrão relativo (DPR).

Os documentos do ICH ¹ recomenda que a precisão deve ser avaliada usando no mínimo 9 determinações cobrindo a faixa especificada para o procedimento (exemplo, 3 concentrações /3 réplicas cada ou um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração teste). Para métodos qualitativos a precisão não pode ser expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo.

ESPECIFICIDADE - é a capacidade que um método tem de avaliar de forma inequívoca a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir com a sua

determinação numa mistura complexa (impurezas, degradantes e matrizes)³. Pode ser determinada através da análise de uma amostra na ausência de interferentes (exemplo: uma amostra contendo apenas a substância ativa) e uma amostra na presença de interferentes. A interferência na dosagem poderá ser avaliada comparando os resultados obtidos através do cálculo do percentual de concordância com a amostra na presença e ausência de excipientes.

$$\text{Concordância} = \frac{T_{\text{presença de interferentes}}}{T_{\text{ausência de interferentes}}} \times 100$$

onde: T- sinal obtido

Para percentual de concordância maior que 100% implica presença de interferência e para percentual de concordância menor que 100% implica ausência de interferência. Para análises qualitativas (testes de identificação), a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos com um material de referência. Em caso de procedimentos analíticos para impurezas, a especificidade pode ser demonstrada adicionando à amostra com níveis de impurezas, demonstrando que estas impurezas são determinadas com precisão e exatidão adequadas. Caso as impurezas ou produto de degradação não sejam disponíveis, a especificidade pode ser demonstrada pela comparação dos resultados das impurezas ou produto de degradação contidos na amostra com um método bem estabelecido (exemplo, método farmacopeico ou método validado). Caso necessário, as amostras podem ser submetidas a condições de estresse, por exemplo, luz, calor, umidade, ácido/hidrólise de base e oxidação^{1,2,3}.

LIMITE DE DETECÇÃO - é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade, mas não necessariamente quantificado como um valor exato. O limite de detecção é uma característica de ensaios limite. Apenas sinaliza se a quantidade do analito está abaixo ou acima de um certo nível^{1,2,3}. Para procedimentos não instrumentais, o limite de detecção é geralmente determinado pela análise de amostras com concentração conhecida de analito e pelo estabelecimento do nível mínimo no qual o analito pode ser detectado de forma segura. Para procedimentos instrumentais, pode ser determinado da mesma maneira de um procedimento não instrumental. No caso de procedimentos submetidos para um compêndio oficial, não é necessário determinar o limite de detecção atual. Porém o limite de detecção deve ser suficientemente baixo para análises de amostras com concentrações de analito acima e abaixo do nível de detecção. Por exemplo, quando o método estabelece detectar uma impureza no nível de 0,1%, deve ser demonstrado que o procedimento detecta com segurança a impureza naquele nível especificado^{1,2,3}.

No caso de procedimentos analíticos instrumentais que exibem ruídos na linha de base, deve ser feita uma comparação de medidas de amostras contendo o analito em baixa concentração conhecida e um branco (amostra isenta de analito). É estabelecida a concentração mínima no qual o analito possa

ser detectado com segurança. A relação sinal-ruído aceita pode ser de 2:1 ou 3:1. Outras determinações do limite de detecção dependem da determinação da inclinação "slope" da curva analítica e o desvio padrão da resposta (erro padrão da estimativa). O limite de detecção é geralmente expresso em unidade de concentração (exemplo, porcentagem, partes por bilhão, µg/mL) na amostra^{1,2,3}.

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO - é a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. É exigido apenas para métodos de determinações de impurezas e/ou produtos de degradação^{1,2,3}.

Para procedimentos não instrumentais, o limite de quantificação é geralmente determinado pela análise de amostras com concentração conhecida de analito e pelo estabelecimento do nível mínimo no qual o analito pode ser determinado com precisão e exatidão aceitável. Para procedimentos instrumentais, pode ser determinado da mesma maneira de procedimentos não instrumentais. No caso de procedimentos submetidos para um compêndio oficial, não é necessário determinar o limite de quantificação atual. Porém o limite de quantificação deve ser suficientemente baixo para análises de amostras com concentrações de analito acima e abaixo do nível de quantificação. Por exemplo, quando o método estabelece quantificar um analito no nível de 0,1 mg/comprimido, deve ser demonstrado que o procedimento quantifica com segurança o analito naquele nível especificado^{1,2,3}.

No caso de procedimentos analíticos instrumentais que exibem ruídos na linha de base, deve ser feita uma comparação de medidas de amostras contendo o analito em baixa concentração conhecida e um branco (amostra isenta de analito). A concentração mínima no qual o analito possa ser quantificado é estabelecida com segurança. A relação sinal-ruído aceita pode ser de 10:1^{1,2,3}. Outras convenções assumem o limite como sendo 5,6 ou 10 desvios-padrão da medição do branco⁴. Outras determinações do limite de quantificação dependem da determinação da inclinação "slope" da curva analítica e o desvio padrão da resposta (erro padrão da estimativa). O limite de quantificação é geralmente expresso em unidade de concentração (exemplo, porcentagem, partes por bilhão, µg/mL) na amostra^{1,2,3}.

LINEARIDADE E FAIXA DE APLICAÇÃO - é a capacidade que um método tem de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame dentro de uma faixa de variação. A faixa de aplicação é o intervalo entre os níveis de concentração superior e inferior do analito (incluído estes níveis) que demonstrem ser determinados com precisão, exatidão e linearidade. É geralmente expressa em unidades de concentração (ex. porcentagem, partes por bilhão, µg/mL)^{1,2,3}.

A linearidade pode ser determinada pela construção de uma curva analítica para determinação da concentração

Características de Performance Analítica	Categoria I Conteúdo/potência	Categoria II quantitativo	Teste limite	categoria III Performance	Categoria IV Identificação
Exatidão	sim	sim	.	.	não
Precisão	sim	sim	não	sim	não
Especificidade	sim	sim	sim	.	sim
Limite de detecção	não	não	sim	.	não
Limite de quantificação	não	sim	não	.	não
Linearidade	sim	sim	sim	.	não
Faixa de aplicação	sim	sim	.	.	não

desconhecida de uma substância. Esta curva consiste na plotagem do sinal obtido pelo método (Y) versus a faixa de concentração utilizada (X). A relação entre X e Y pode ser obtida pela análise de regressão linear sobre estes valores, que é expressa pela equação $Y = a + bX$, onde a e b podem ser determinados por métodos estatísticos como métodos dos mínimos quadrados. Então quando uma amostra de concentração desconhecida é analisada, um valor de X pode ser determinado. Os dados da própria regressão linear podem ser úteis para fornecer estimativas matemáticas do grau de linearidade. O coeficiente de correlação, -y-intercepção, inclinação da regressão linear e a soma residual dos quadrados devem ser avaliados³. A ICH^{1,2} recomenda um mínimo de 5 concentrações para estabelecer a linearidade. As seguintes variações mínimas especificadas devem ser consideradas:

Ensaio de Teor de uma substância ou de um produto acabado: de 80% a 120% da concentração do teste.

Determinação de uma impureza: de 50% a 120% do critério de aceitação.

Uniformidade do conteúdo: mínimo de 70% a 130% da concentração do teste, a menos que possa ser justificada uma faixa mais ampla e adequada baseada na forma da dosagem (por exemplo, inaladores de dosagem medida).

Teste de dissolução: +/-20% sobre a faixa especificada. Por exemplo, se as especificações de um produto controlado liberado cobre uma região de 20%, depois de uma hora, até 90%, depois de 24 horas, a faixa validada seria de 0-110% do declarado no rótulo.

ROBUSTEZ - é a capacidade de o método não ser afetado por modificações pequenas e deliberadas em seus parâmetros^{1,2,3}. A determinação da robustez deve ser durante o desenvolvimento do método. Avaliando-se as variações dos resultados quando alguns parâmetros, como pH, temperatura, composição de fase móvel ou vazão, são alterados. Caso haja alguma variação muito significativa nos resultados obtidos, é necessário que as condições analíticas sejam controladas ou precauções devem ser incluídas no procedimento^{1,2,3}. A literatura deixa claro que alguns parâmetros da validação são usados em quase todos os métodos analíticos, por exemplo linearidade, exatidão e precisão. Enquanto outros como limite de detecção e de quantificação são poucos utilizados. Tanto a USP³ quanto a

ICH^{1,2} reconhecem que não há necessidade de avaliar todos os parâmetros. O tipo de método e seu objetivo é quem vai determinar quais parâmetros devem ser usados. A USP³ divide os métodos analíticos em quatro categorias:

- I- Métodos para quantificação de componentes majoritários e matérias primas ou princípios ativos (incluindo preservativos) de produtos farmacêuticos acabados.
- II- Métodos para determinação de impurezas em matérias primas ou produtos de degradação em produtos farmacêuticos acabados. Inclui ensaios quantitativos e testes limite.
- III- Métodos para determinação de características de performance (exemplo, dissolução, liberação de drogas).
- IV- Testes de identificação.

Fazer validação de um método analítico não quer dizer que este estará isento de erros e que pode ser utilizado indiscriminadamente, mas permitirá obter informações estatisticamente confiáveis, confirmando que o método está adequado para o uso proposto. Fazer validação total de método pode ser tedioso, mas não fazê-lo seria uma temeridade pois, não há como garantir suas características de desempenho e que tal método seja cientificamente coerente nas condições de aplicação.

REFERÊNCIAS

1. ICH – INTERNATIONAL Conference on Harmonization, Topic Q2a. Text on validation of analytical procedures: definitions and terminology, US FDA Federal Register, v.60, 1995, (CPMP/ICH/381/95). Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/ichq2a.pdf> (Acesso em: 22 de outubro de 2007);
2. ICH – INTERNATIONAL Conference on Harmonization, Topic Q2b. Validation of analytical procedures: methodology, US FDA Federal Register, v.62, 1997, (CPMP/ICH/381/95).
3. UNITED States Pharmacopeia, 30ª ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p 680-683, 2007.
4. ANVISA- Laboratório- Guia para Qualidade em Química Analítica- Uma Assistência à Habilitação- Séries Temáticas- série: Habilitação 1, 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/laboratorios.pdf> (Acesso 01 de fevereiro de 2008).