



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE
RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Profa. Cristiane Masetto de Gaitani (crisgai@fcfrp.usp.br)



CONCEITO

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA)

“A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer” (USP)



- **2 Tipos**



- **No Brasil – IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas)**



LEGISLAÇÃO

➤ Brasil

ANVISA ⇒ Resolução ANVISA RDC nº 27, de 17/05/2012 (métodos bioanalíticos)

ANVISA ⇒ Resolução ANVISA RDC nº 166, de 24/07/2017 (métodos analíticos)

➤ FDA

Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001

Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000

➤ ICH

Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995

Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995

➤ European Medicines Agency

Guideline on bioanalytical method validation

EMA/CHMP/EWP/192217/2009, 21 July 2011

Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)



PROCESSO DE VALIDAÇÃO

- estudos de validação sejam representativos
- variação da faixa de concentração adequada
- tipos de amostras adequados

**OS PARÂMETROS ANALÍTICOS DEVEM SER BASEADOS
NA INTENÇÃO DO USO DO MÉTODO**

- Tipo de análise
- Frequência uso



**Parâmetros a serem
analisados**



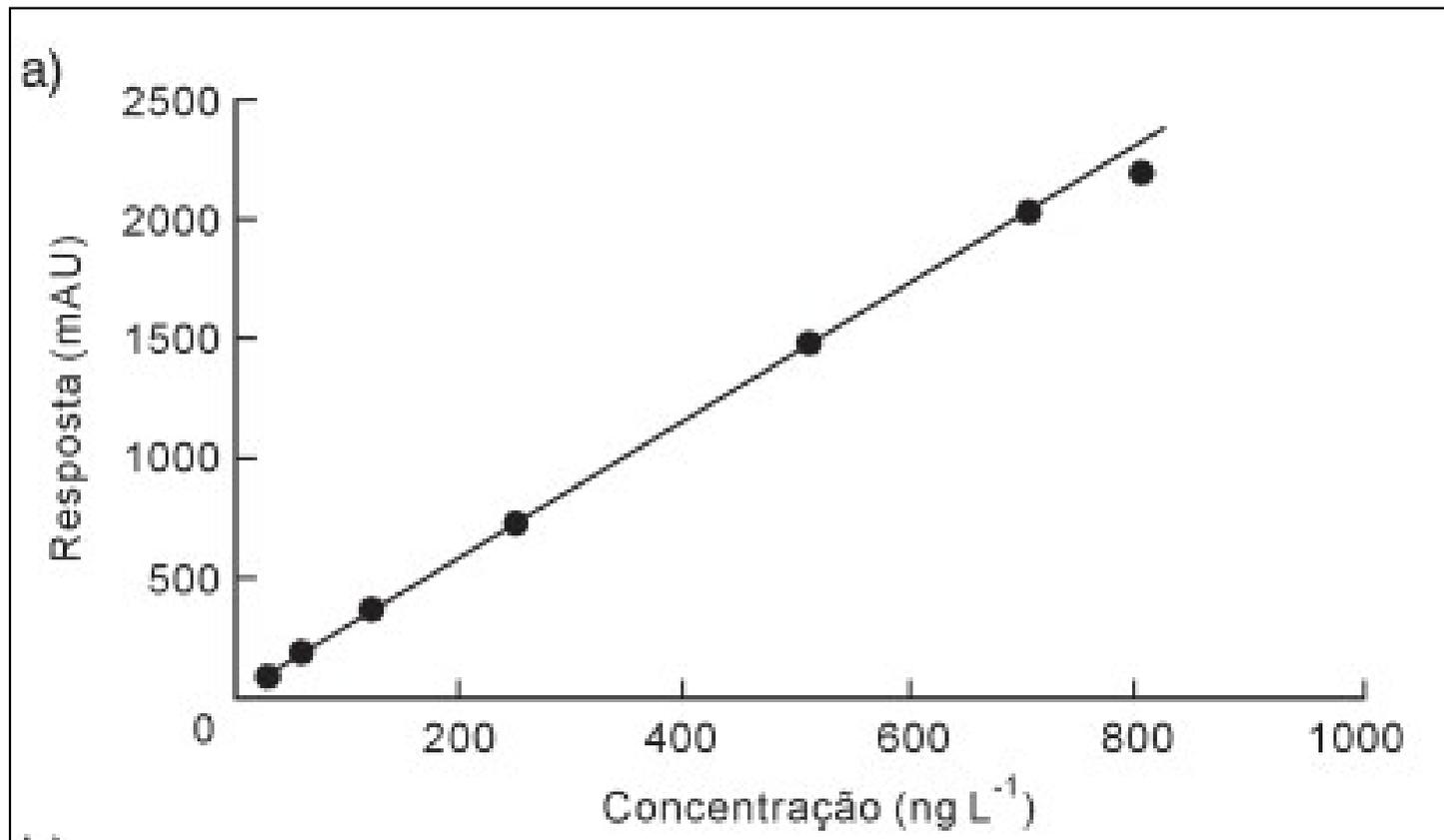
ESTABILIDADE DOS PADRÕES E AMOSTRAS

- Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável
- Esta estabilidade é importante em termos de temperatura e tempo
- Embora a estabilidade de dias ou meses seja mais desejável, em alguns casos as soluções precisam ser preparadas antes de cada análise



LINEARIDADE

Corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.



LINEARIDADE

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático

A linearidade deve ser demonstrada pela inclinação da reta (estatisticamente diferente de zero e reprodutível), o intercepto (não estatisticamente diferente de zero) e o coeficiente de correlação (não estatisticamente diferente de 1) ;

ANVISA: r acima de 0,990



LINEARIDADE

Como os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do **cálculo dos resíduos** entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão

A dispersão das medidas (valores de y) deve ser independente da concentração do padrão de calibração, seguindo uma distribuição normal, propriedade conhecida como homoscedasticidade

Homocedasticidade: igual (homo) dispersão (cedasticidade), isto é, igual variância

Heteroscedasticidade: forte dispersão dos dados em torno de uma reta

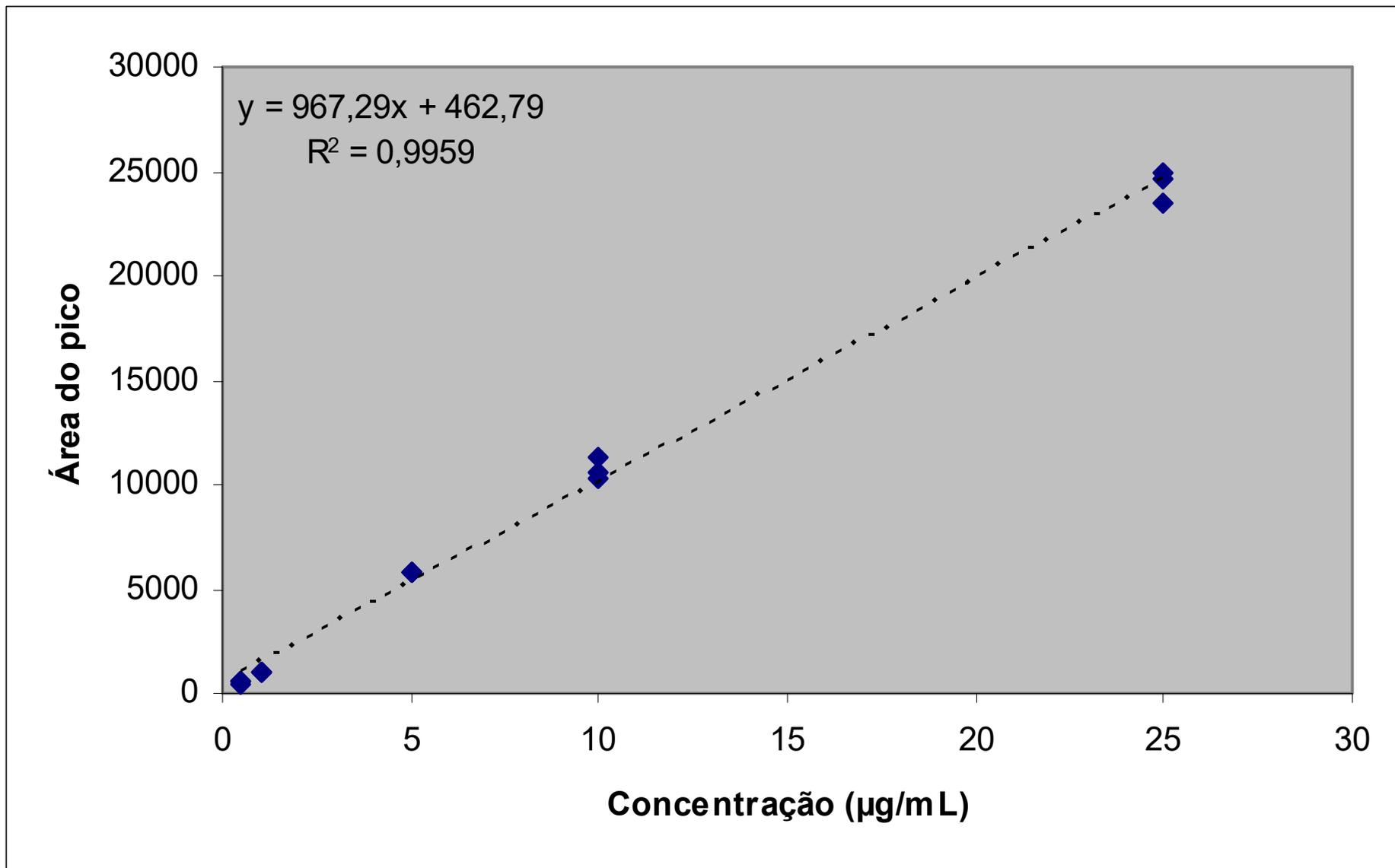


Padronização externa

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Área do pico
0,5	484
0,5	552
0,5	565
1	1072
1	1046
1	1068
5	5828
5	5845
5	5789
10	10536
10	10341
10	11234
25	24987
25	23456
25	24567



Padronização externa



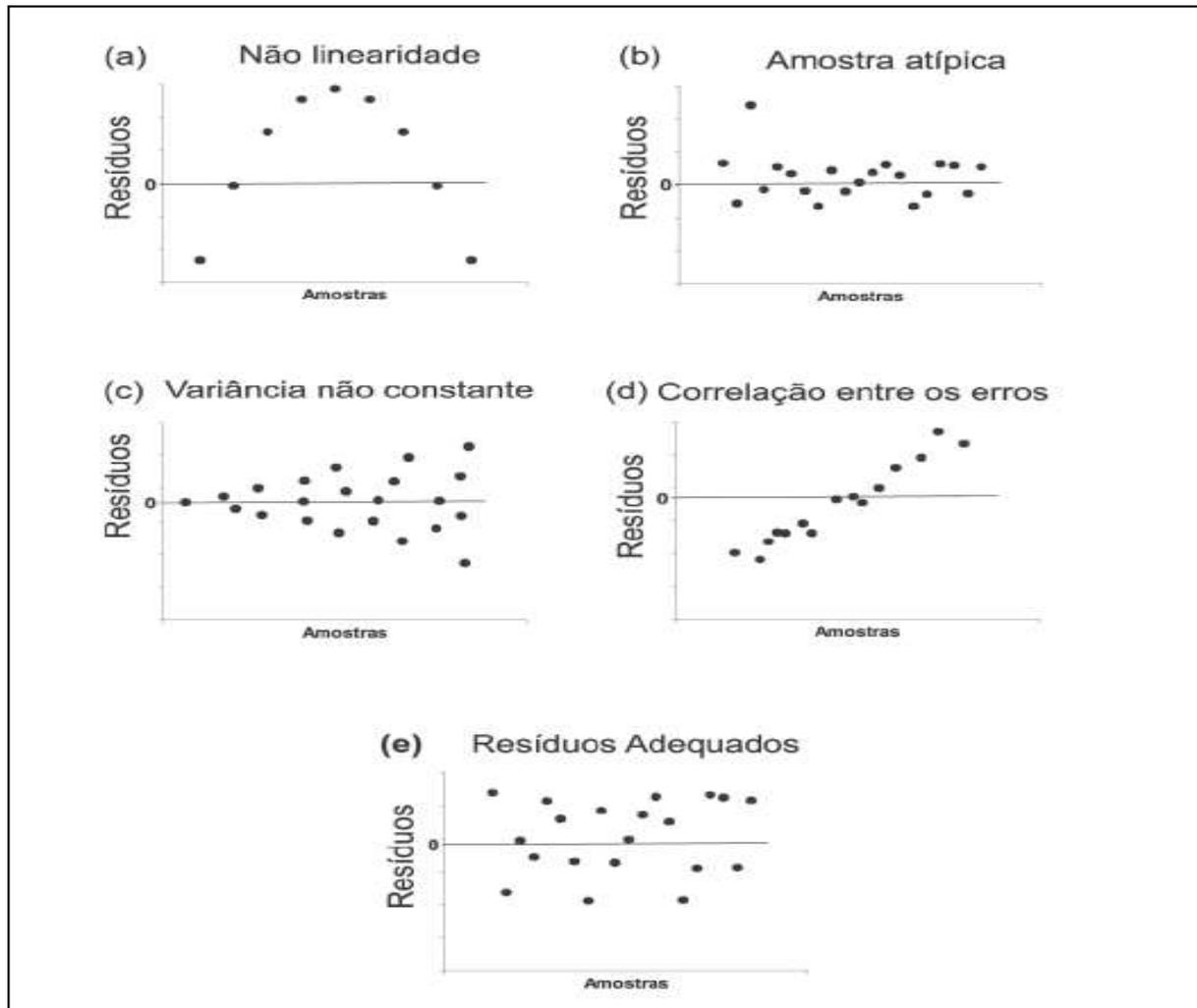
Padronização externa

Concentração teórica (µg/mL)	Área do pico	Concentração obtida (µg/mL)	Erro Relativo (%)
0,5	484	0,02	-95,61
0,5	552	0,09	-81,55
0,5	565	0,11	-78,87
1	1072	0,63	-37,02
1	1046	0,60	-39,71
1	1068	0,63	-37,43
5	5828	5,55	10,93
5	5845	5,56	11,28
5	5789	5,51	10,13
10	10536	10,41	4,14
10	10341	10,21	2,12
10	11234	11,14	11,35
25	24987	25,35	1,41
25	23456	23,77	-4,92
25	24567	24,92	-0,32



Gráfico de resíduos

Análise dos Resíduos: conjunto de técnicas utilizadas para investigar a adequabilidade de um modelo de regressão com base nos resíduos.



Resíduo: Valor obtido –
valor teórico *versus*
concentração



SELETIVIDADE

Capacidade de avaliar, de forma inequívoca, a substância de interesse na presença de componentes que possam interferir na análise, como impurezas, diluentes e componentes da matriz

- ➔ **Uso de detectores que comparam o pico obtido na separação com o de um padrão (arranjo de diodos, espectrômetro de massas)**
- ➔ **Para demonstrar ausência de interferência de produtos de degradação, é necessário expor a amostra a condições de degradação em ampla faixa de pH, de oxidação, de calor e de luz**

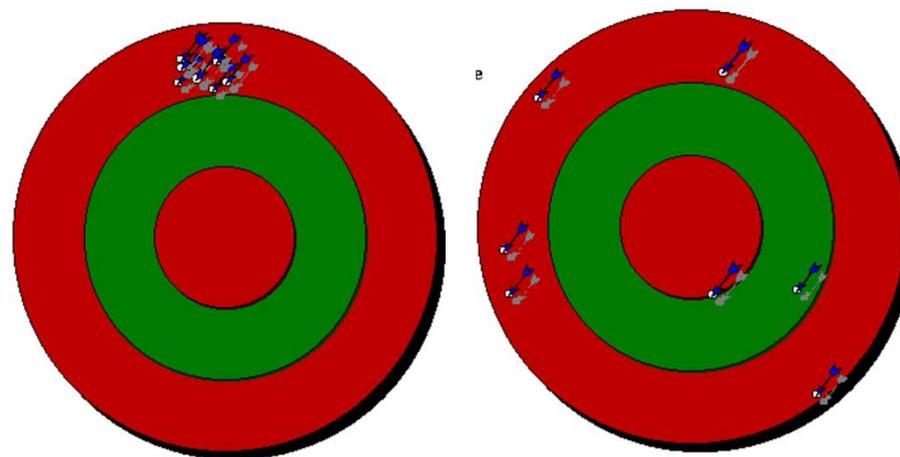


PRECISÃO

A precisão de um método analítico está relacionada com a dispersão das medidas ao redor do seu valor médio.

- desvio padrão absoluto (σ), $n > 20$
- n geralmente é pequeno, e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s).

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



estimativa do desvio padrão
relativo ou coeficiente de variação

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



EXATIDÃO

grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio (valor experimental) e um valor de referência aceito como verdadeiro (concentração teórica)

Ensaio de recuperação

- $$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$
-

Exatidão (erro relativo)

- $$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{conc. média exp.} - \text{conc. teórica}}{\text{conc. teórica}} \times 100$$
-



PRECISÃO e EXATIDÃO

Repetibilidade (precisão intra-corrida)

concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição (analista, instrumento e condições, local, curto intervalo de tempo)

Precisão intermediária (precisão inter-corridas)

indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores

Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)

grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuada sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.)

LIMITE DE DETECÇÃO

menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental

- **Método baseado em parâmetros da curva analítica**

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação

S = coeficiente angular da curva de calibração analítica (*slope*)



LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental

- Método baseado em parâmetros da curva analítica

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação

S = coeficiente angular da curva analítica (*slope*)



ROBUSTEZ

Mede a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações

As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transportado para outros laboratórios, analistas ou equipamentos

Método cromatográfico: proporção solvente orgânico, pH e força iônica, temperatura,



REVALIDAÇÃO

É a reavaliação de um método analítico validado em resposta a uma mudança em algum aspecto do método

Situações:

- Alterações de reagentes e equipamentos, por mudança de fornecedor, troca de componentes ou desgaste do equipamento pelo uso constante
- Alteração na proposta e/ou nível de qualidade desejados
- Uso apenas após um certo período de tempo

Pequenas variações - **ROBUSTEZ**



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, v. 27, p.771-780, 2004.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 31th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

Cassiano, N. M.; Barreiro, J. C.; Martins, L. R. R.; Oliveira, R. V.; Cass, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química nova*, 32, 1021-1030, 2009.

