

JOSÉ LUIZ NEVES DE AGUIAR

**VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM NOVO
MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA EM FASE
LÍQUIDA DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO
SALICÍLICO EM COMPRIMIDOS**

**MESTRADO PROFISSIONAL
PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2007**

**VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM NOVO MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E
DO ÁCIDO SALICÍLICO EM COMPRIMIDOS**

José Luiz Neves de Aguiar

**Mestrado Profissional
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

Orientador: Prof. Dr. Marcio Labastie.

Rio de Janeiro

2007

**VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE UM NOVO MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO
ÁCIDO SALICÍLICO EM COMPRIMIDOS**

José Luiz Neves de Aguiar

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof. Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Orlando Marino Gadas de Moraes (UNIRIO)

Prof. Dra. Kátia Cristina Leandro Antunes (INCQS/FIOCRUZ)

Orientador Prof. Dr. Marcio Labastie (INCQS/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ

A282 Aguiar, José Luiz Neves de

Validação interlaboratorial de um novo método analítico por cromatografia em fase líquida do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos / José Luiz Neves de Aguiar. – Rio de Janeiro, 2008.
xxii, 90 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Vigilância Sanitária, 2007.
Bibliografia: f. 87-90.

1. *Cromatografia líquida de alta pressão*. 2. *Aspirina*. 3. *Ácido acetilsalicílico*. 4. *Ácido salicílico*. 5. *Estudos de validação*. I. *Título*.

CDD: 615.3137

Título para indexação:

Validation of a novel HPLC method applied to the analytical determination of acetylsalicylic and salicylic acid in tablets

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todas as pessoas que tentam
melhorar a Saúde e a Educação deste País.*

EPÍGRAFE

*"Se eu pudesse deixar algum presente a você,
Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos
seres humanos.*

*A consciência de aprender tudo que foi ensinado
pelo tempo afora.*

*Lembraria os erros que foram cometidos para que não
mais repetissem.*

*A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para
você, se pudesse, o respeito àquilo que é
indispensável.*

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

*o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a
força para encontrar a saída".*

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Direção do INCQS que desde 2001 tornaram o ensino e a pesquisa uma das prioridades institucionais, possibilitando assim o apoio dado ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da FIOCRUZ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Meu Deus, eu te agradeço por ter me guiado e auxiliado em todos os momentos da minha vida e, principalmente, por me dar forças, perseverança e estímulo.

Ao meu orientador professor Dr. Marcio Labastie pela orientação, idéias e incentivo.

À professora Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes e ao colega Fabio Silvestre Bazilio pelas sugestões e presteza em atender as minhas solicitações.

Aos membros da comissão examinadora, por aceitarem participar da banca e pelas sugestões que contribuíram para a qualidade deste trabalho.

Ao farmacêutico Lenilson Alves Neto, chefe do Laboratório de Via-úmida e a química Mariete Ferreira Lemos, chefe de Setor, agradeço pelo apoio.

Ao meu amigo André Luís Mazzei Albert pela orientação e dicas sobre o conhecimento de química, vinculada a análises de medicamentos.

Às amigas Amanda e Elizabeth pela colaboração neste trabalho na avaliação da precisão intermediária como segundo e o terceiro analista.

Aos amigos do grupo de medicamentos, Maria Virgínia, Ozéias, Euclides, Antenor, Solange, Lílian, Ana Lucia, Dolores e André Colonese pelos momentos descontraídos.

Aos amigos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, agradeço o incentivo.

Aos funcionários da biblioteca e das secretarias do INCQS pela atenção.

Em especial a minha esposa Rosângela, pela paciência e compreensão, e aos meus filhos Lucas, Michelly e Alexandre, com muito amor.

RESUMO

Na rotina do Laboratório Oficial, no que concerne ao Controle de Qualidade de medicamentos, não é fato pouco comum à obtenção de resultados de qualidades discutíveis, mesmo seguindo com todo rigor a metodologia descrita em um compêndio tomado como referencial. Alguns métodos de análise que utilizam Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), cujos resultados, por vezes, causam espécie ao analista em termos de adequação do sistema (retenção, número de pratos teóricos, seletividade, resolução e simetria), inviabilizando os resultados finais, comparados ao que consta na monografia os dados referentes à conformidade e adequação do cromatograma.

O trabalho aqui apresentado tem como objetivo mostrar a validação intralaboratorial de um novo método por cromatografia em fase líquida para dosar o ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico em comprimidos que apresentou dados referentes a adequação do sistema melhores do que a metodologia por cromatografia em fase líquida da Farmacopéia Americana (USP 30) e vantagens metodológicas sobre a metodologia volumétrica da Farmacopéia Brasileira (FB 2002).

ABSTRACT

The obtention of doubtful results concerning Quality Control of drug products is not unusual in the routine of a official laboratory, even if a compendia referenced methodology is strictly followed. Some of these analytical methods are based on High Performance Liquid Chromatography (HPLC), which results are frequently disturbed by questions related to system suitability standards (retention, number of theoretical plates, selectivity, resolution and symmetry) set in particular monographs.

The aim of this work is to describe the validation of a novel HPLC method applied to the analytical determination of acetylsalicylic and salicylic acid in tablets, which presented better results of system suitability than USP 30 HPLC method, and it is advantageous in relation to the Farmacopéia Brasileira (FB 2002) titration method, as well.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS - Ácido acetilsalicílico
Anova - análise de variância
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS - Ácido salicílico
ATF - Ácido Trifluoracético
BP - Farmacopéia Inglesa
BPF - Boas Práticas de Fabricação
C₁₈ - coluna de sílica quimicamente ligada a grupos octadecilsilano
CARBON LOAD - Densidade de Carga
CCD - Cromatografia de Camada Delgada
CCF - Cromatografia de Camada Fina
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPRFB - Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira
DAD - Detector (espectrofotométrico) com conjunto de diodos
DPR - Desvio Padrão Relativo
EP - Farmacopéia Européia
FB - Farmacopéia Brasileira
FDA - Food and Drug Administration
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
ICH - International Conference on Harmonization
INCQS - Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde
JP - Farmacopéia Japonesa
LACENS - Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LD - Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
OMS - Organização Mundial da Saúde
SQR - Substância Química de Referência
USP - Farmacopéia Americana
UV/VIS - Ultravioleta/Visível

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Monodrogas e associações de ácido acetilsalicílico | 09 |
| Tabela 2 - Relação entre fator de cauda e o fator de assimetria | 17 |
| Tabela 3 - Limites dos parâmetros para a adequação do sistema | 18 |
| Tabela 4 - Evolução dos métodos farmacopéicos utilizados na determinação do teor de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em comprimidos | 19 |
| Tabela 5 - Exemplos de fatores que devem ser considerados na determinação da robustez | 33 |
| Tabela 6 - Variações nos fatores para a determinação da robustez | 34 |
| Tabela 7 - Matriz dos fatores para determinação da robustez do método | 34 |
| Tabela 8 - Quantitativo de comprimidos usado de cada fabricante neste estudo | 44 |
| Tabela 9 - Soluções usadas na determinação da adequação do sistema | 45 |
| Tabela 10 - Soluções usadas no estudo da cinética de degradação do ácido acetilsalicílico | 46 |
| Tabela 11 - Quadro dos volumes tomados das soluções estoques e as concentração das soluções de trabalho de ácido acetilsalicílico | 48 |
| Tabela 12 - Quadro dos volumes tomados das soluções estoques e as concentração das soluções de trabalho de ácido salicílico | 48 |
| Tabela 13 - Quadro dos volumes (mL) tomados da SE do padrão de ácido acetilsalicílico (AAS) sobre um nível básico da solução do fabricante | 50 |
| Tabela 14 - Quadro dos volumes (mL) tomados da SE do padrão de ácido salicílico (AS) sobre um nível básico da solução do fabricante | 51 |
| Tabela 15 - Peso médio dos lotes que participaram da validação | 53 |
| Tabela 16 - Quadro de analistas, data de análises e cromatógrafos usados na determinação da precisão intermediária da análise do teor de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico | 53 |
| Tabela 17 - Resolução, fator de cauda, fator de retenção, número de pratos teóricos e repetibilidade das áreas dos picos de ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico | 58 |

| | |
|--|----|
| Tabela 18 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de ácido acetilsalicílico | 62 |
| Tabela 19 - Avaliação da linearidade do ácido acetilsalicílico | 64 |
| Tabela 20 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de ácido salicílico | 66 |
| Tabela 21 - Avaliação da linearidade do ácido salicílico | 67 |
| Tabela 22 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de adição padrão de ácido acetilsalicílico | 70 |
| Tabela 23 - Recuperação calculada a partir das curvas de adição padrão de ácido acetilsalicílico | 70 |
| Tabela 24 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de adição padrão de ácido salicílico | 71 |
| Tabela 25 - Recuperação calculada a partir das curvas de adição padrão de ácido salicílico | 71 |
| Tabela 26 - Teste t para comparação das curvas de adição padrão de ácido acetilsalicílico com a curva analítica a cada par | 73 |
| Tabela 27 - Teste t para comparação das curvas de adição padrão de ácido salicílico com a curva analítica a cada par | 74 |
| Tabela 28 - Repetibilidade do método para o ácido acetilsalicílico e salicílico, análises executadas pelo primeiro analista (cromatógrafo Shimadzu 3) | 75 |
| Tabela 29 - Repetibilidade do método para o ácido acetilsalicílico e salicílico, análises executadas pelo segundo analista (cromatógrafo Warters 5) | 75 |
| Tabela 30 - Repetibilidade do método para o ácido acetilsalicílico e salicílico, análises executadas pelo terceiro analista (cromatógrafo Warters 4) | 76 |
| Tabela 31 - Precisão intermediária do método para o ácido acetilsalicílico, análises executadas pelos três analistas (em cromatógrafos e dias diferentes) | 77 |
| Tabela 32 - Precisão intermediária do método para o ácido salicílico, análises executadas pelos três analistas (em cromatógrafos e dias diferentes) | 77 |
| Tabela 33 - Resultados dos parâmetros obtidos após ensaios das oito combinações | 78 |
| Tabela 34 - Comparação dos parâmetros obtidos no início e no final do estudo da validação | 79 |

| | |
|--|----|
| Tabela 35 - Resultados dos efeitos na determinação do ácido acetilsalicílico | 80 |
| Tabela 36 - Resultados dos efeitos na determinação do ácido salicílico | 81 |
| Tabela 37 - Teores de ácido acetilsalicílico encontrados em dez amostras do quarto fabricante | 82 |
| Tabela 38 - Teste “t” - comparações das médias dos teores de ácido acetilsalicílico | 83 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Curva da cinética da formação do ácido salicílico. Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 μ L59
- Gráfico 2** - Curva analítica do ácido acetilsalicílico (Statística 6.0). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 μ L. Valor p do intercepto = 0,107865
- Gráfico 3** - Curva analítica do ácido salicílico (Statística 6.0). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 μ L. Valor p do intercepto = 0,477568
- Gráfico 4** - Determinação gráfica do limite de detecção (0,23 μ g/mL) e do limite de quantificação (0,69 μ g/mL) na curva analítica do ácido salicílico ampliada (Statística 6.0). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 μ L69
- Gráfico 5** - Comparação gráfica entre as curvas de adição padrão do ácido acetilsalicílico (esquerda) e entre as curvas de adição padrão e a curva analítica (direita). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 μ L72
- Gráfico 6** - Comparação gráfica entre as curvas de adição padrão do ácido salicílico (esquerda) e entre as curvas de adição padrão e a curva analítica (direita). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 μ L73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representações estruturais da salicilina, do ácido salicílico e do ácido acetilsalicílico07
- Figura 2** – Esquema de mecanismo reacional do ácido acetilsalicílico08
- Figura 3** - Picos cromatográficos do ácido salicílico (5,5 min) e do ácido acetilsalicílico (6,3 min). Condições: coluna C18 (5µm; 250 x 4,6 mm d.i.), fase móvel composta de 1-heptanosulfonato de sódio, água e acetonitrila (2 g : 850 mL : 150 mL) (pH 3,4), fluxo 2,0 mL/min, detecção 280 nm, temperatura 30 °C, volume 5 µL, concentração igual à 0,0135 mg/mL de ácido salicílico e 0,4518 mg/mL de ácido acetilsalicílico21
- Figura 4** - Picos cromatográficos do ácido acetilsalicílico (2,4 min) e do ácido salicílico (3,6 min). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 µL, concentração igual à 0,3018 mg/mL de ácido acetilsalicílico e 0,00951 mg/mL de ácido salicílico22
- Figura 5** - Cromatógrafo líquido, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível com arranjo de diodos (DAD) completo usado em todos os requisitos da validação40
- Figura 6** - Cromatógrafo líquido, fabricante Waters com detector ultravioleta-visível óptico completo usado na determinação do requisito reprodutibilidade interna40
- Figura 7** - Monitoramento da temperatura do laboratório durante uma das corridas cromatográficas da solução de adequação do sistema (temperatura em C). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 10 µL56
- Figura 8** - Monitoramento da temperatura na coluna durante uma das corridas cromatográficas da solução de adequação do sistema (temperatura em C). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 10 µL57
- Figura 9** - Monitoramento da pressão na coluna durante uma das corridas cromatográficas da solução de adequação do sistema (pressão em Kgf/cm²). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 10 µL57
- Figura 10** - Separação do ácido acetilsalicílico (2,36 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (3,35 min, 0,511 mg/mL). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 10 µL58

Figura 11 - Picos cromatográficos do ácido acetilsalicílico (2,39 min) e do ácido salicílico (3,46 min). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 µL60

Figura 12 - Espectros de varredura no ultravioleta antes do pico (2,26 min) e no pico de ácido acetilsalicílico (2,39 min) . Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 µL61

Figura 13 - Espectros de varredura no ultravioleta antes do pico (3,34 min) e no pico de ácido salicílico (3,46 min). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5 µL61

Figura 14 - Espectros de varredura no ultravioleta do padrão de ácido acetilsalicílico (a esquerda) e do padrão de ácido salicílico (a direita). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 °C, volume 5µL62

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | x |
| LISTAS DE SIGLAS E ABREVEATURAS | xi |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE GRÁFICOS | xv |
| LISTA DE FIGURAS | xvi |
| 1 INTRODUÇÃO | 02 |
| 1.1 O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA | 02 |
| 1.2 COMPETÊNCIAS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE | 03 |
| 1.3 A FARMACOPÉIA BRASILEIRA | 04 |
| 1.4 PERÍCIA ANALÍTICO-LABORATORIAL DE MEDICAMENTOS | 05 |
| 1.5 A ASPIRINA | 06 |
| 1.5.1 Breve Histórico | 06 |
| 1.5.2 Esquema de mecanismo reacional do ácido acetilsalicílico | 08 |
| 1.5.3 Fármacos que contém salicilato em sua composição no mercado nacional | 09 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) | 11 |
| 2.1.1 Definição | 11 |
| 2.1.2 Classificação | 11 |
| 2.2 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO | 13 |
| 2.2.1 Volume interno (Vi) e o volume “morto” referente à coluna (Vo) | 13 |
| 2.2.2 Fator de retenção (K) | 14 |

| | | |
|----------------|--|----|
| 2.2.3 | Eficiência ou numero de pratos teóricos (N) | 15 |
| 2.2.4 | Fator de separação ou fator de seletividade (α) | 15 |
| 2.2.5 | Fator de resolução ou resolução (R) | 16 |
| 2.2.6 | Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria do pico (As) | 16 |
| 2.2.7 | Desvio padrão relativo (DPR) | 17 |
| 2.2.8 | Fatores que afetam no resultado de adequação do sistema | 18 |
| 2.2.9 | Limites dos parâmetros de adequação do sistema | 18 |
| 2.3 | MÉTODOS FARMACOPÉICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO EM COMPRIMIDOS | 19 |
| 2.3.1 | O método da farmacopéia brasileira | 20 |
| 2.3.2 | O método da farmacopéia americana | 20 |
| 2.3.3 | O método desenvolvido | 21 |
| 2.4 | VALIDAÇÃO | 23 |
| 2.4.1 | Definição | 23 |
| 2.4.2 | Especificidade | 23 |
| 2.4.3 | Seletividade | 23 |
| 2.4.4 | Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho | 24 |
| 2.4.5 | Linearidade | 25 |
| 2.4.6 | Efeito matriz | 28 |
| 2.4.7 | Limite de quantificação e limite de detecção | 29 |
| 2.4.8 | Exatidão | 30 |
| 2.4.9 | Precisão | 31 |
| 2.4.9.1 | Precisão intra-dia ou repetitividade | 31 |
| 2.4.9.2 | A precisão intermediária ou reprodutibilidade interna | 32 |
| 2.4.10 | Robustez | 33 |
| 3. | OBJETIVO | 37 |

| | |
|---|----|
| 4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS | 39 |
| 4.1 EQUIPAMENTOS | 39 |
| 4.2 REAGENTES E MATERIAIS | 40 |
| 4.3 PADRÕES | 41 |
| 4.4 PRODUTOS ACABADOS | 41 |
| 5 MÉTODOS | 43 |
| 5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS | 43 |
| 5.2 CUIDADOS E MONITORAMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS | 43 |
| 5.3 COLETA DE AMOSTRAS | 44 |
| 5.4 AMOSTRAGEM | 44 |
| 5.5 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA | 45 |
| 5.6 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA | 45 |
| 5.7 ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO | 45 |
| 5.8 DETERMINAÇÃO DA SELETIVIDADE | 46 |
| 5.9 DETERMINAÇÃO DA FAIXA LINEAR DE TRABALHO | 46 |
| 5.10 DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE | 47 |
| 5.10.1 Delineamento experimental | 47 |
| 5.10.2 Preparo da solução estoque (SE) de ácido acetilsalicílico | 47 |
| 5.10.3 Preparo da solução estoque (SE) de ácido salicílico | 48 |
| 5.10.4 Preparo das soluções de trabalho de ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico | 48 |
| 5.11 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO | 49 |
| 5.12 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO | 49 |
| 5.12.1 Preparo da solução estoque (SE) de ácido acetilsalicílico e de ácido salicílico | 49 |
| 5.12.2 Preparo das três soluções originadas dos produtos de três fabricantes | 50 |
| 5.12.3 Preparo das soluções de trabalho da adição padrão dos ácidos acetilsalicílico e salicílico em soluções originadas dos produtos dos três fabricantes | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 5.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ | 51 |
| 5.14 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO: REPETITIVIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA | 52 |
| 5.14.1 Determinação da Repetitividade | 52 |
| 5.14.1.1 Preparo da solução padrão de ácido acetilsalicílico e de ácido salicílico | 52 |
| 5.14.1.2 Preparo das soluções das amostras originadas dos três fabricantes | 52 |
| 5.14.2 Determinação da Precisão Intermediária | 53 |
| 5.15 DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ | 53 |
| 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 56 |
| 6.1 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA DO LABORATÓRIO, DA TEMPERATURA E PRESSÃO DA COLUNA | 56 |
| 6.2 RESULTADOS DA ADEQUAÇÃO DO SISTEMA | 57 |
| 6.3 RESULTADO DO ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO | 59 |
| 6.4 RESULTADO DA VALIDAÇÃO | 60 |
| 6.4.1 Resultados da seletividade para o ácido acetilsalicílico e para o ácido salicílico | 60 |
| 6.4.2 Resultado da curva analítica do ácido acetilsalicílico | 62 |
| 6.4.2.1 Avaliação de Linearidade da curva analítica do ácido acetilsalicílico | 63 |
| 6.4.2.2 Avaliação da condição necessária para que a linha da regressão do ácido acetilsalicílico passe pela origem | 65 |
| 6.4.3 Resultado da curva analítica do ácido salicílico | 65 |
| 6.4.3.1 Avaliação de Linearidade da curva analítica do ácido salicílico | 66 |
| 6.4.3.2 Avaliação da condição necessária para que a linha da regressão do ácido salicílico passe pela origem | 68 |
| 6.4.4 Determinação dos limites de detecção e quantificação do ácido salicílico | 68 |
| 6.4.5 Determinação da exatidão do ácido acetilsalicílico | 69 |
| 6.4.6 Determinação da exatidão do ácido salicílico | 70 |
| 6.4.7 Verificação do efeito matriz | 72 |

| | |
|--|-----------|
| 6.4.7.1 Avaliação do efeito matriz nas curvas de adição padrão do ácido acetilsalicílico | 72 |
| 6.4.7.2 Avaliação do efeito matriz nas curvas de adição padrão do ácido salicílico | 73 |
| 6.4.8 Determinação da precisão: repetitividade e precisão intermediária | 74 |
| 6.4.8.1 Repetitividade | 74 |
| 6.4.8.2 Determinação da Precisão Intermediária | 76 |
| 6.4.9 Determinação da robustez | 78 |
| 6.4.10 Comparação dos resultados | 82 |
| 7 CONCLUSÃO | 85 |
| 8 REFERÊNCIAS.BIBLIOGRÁFICAS..... | 87 |

ANEXOS:

ANEXO A – Tabela da avaliação da linearidade da curva analítica de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO B – Tabela da avaliação da linearidade da primeira curva de adição padrão de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO C – Tabela da avaliação da linearidade da segunda curva de adição padrão de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO D – Tabela da avaliação da linearidade da terceira curva de adição padrão de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO E – Tabela da avaliação da linearidade da curva analítica de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO F – Tabela da avaliação da linearidade da primeira curva de adição padrão de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO G – Tabela da avaliação da linearidade da segunda curva de adição padrão de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO H – Tabela da avaliação da linearidade da terceira curva de adição padrão de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz

ANEXO I – Cromatogramas das oito combinações ensaiadas usadas na avaliação da robustez do método

1 INTRODUÇÃO

1.1 O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA

O novo salto na concepção nacional de Vigilância Sanitária pode ser mais bem entendido através da definição constante na Lei nº. 8.080 de 1990, que regulamenta o SUS. “Entende-se por Vigilância Sanitária como um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens de serviços de interesse da saúde...” (SILVA, 2000).

No bojo das conquistas sociais advindas da promulgação da nova Constituição Federal, surgiu o Código de Defesa do Consumidor (Lei nº. 8.079, de 1990), que, entre outras determinações, busca a proteção da saúde do indivíduo contra os riscos do consumo de produtos considerados perigosos ou nocivos. O Código de Defesa do Consumidor externa o entendimento social de serem a qualidade e o risco responsabilidades do fabricante (SILVA, 2000).

A ação da Vigilância Sanitária deve ocorrer quando verificada a existência de riscos ou situações prováveis de ocorrências de riscos, de modo que, encontradas as causas, atue-se para evitar a reincidência desses fatores. Assim, o princípio da precaução é, por natureza, o mais típico dos atuais princípios relacionados à Vigilância Sanitária, porque é em função dele que os profissionais atuam. É para a existência (ou probabilidade de existência) de risco que se dirigem as ações da ANVISA (ZILDA, 1998).

No dia 27 de janeiro de 1999 o Congresso Nacional promulgou a lei 9782 que dispõe sobre o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Segundo esta lei, ficou definida que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) teria por finalidade “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e fronteiras”(PIOVESAN, 2002).

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) assumiu um papel de acompanhar todas as alterações no cenário da vigilância sanitária. O Instituto teve suas atribuições ampliadas e suas ações acabaram por se tornar mais efetivas no âmbito da referência nacional e das ações científicas e tecnológicas, relacionadas ao controle de qualidade de produtos de interesse da saúde. Conforme a legislação vigente no período, o INCQS tornou-se subordinado tecnicamente a Anvisa e, administrativamente, à Fiocruz (PIOVESAN, 2002).

1.2 COMPETÊNCIAS DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde acumula diversas atribuições conforme consta no artigo número 32, do Decreto nº 4725 de 09 de junho de 2003, referentes ao Estatuto da Fiocruz. Dentre as diversas funções do Instituto consta aquela relacionada ao controle de qualidade de produtos para o consumo humano, em especial os medicamentos (INCQS, 2004).

O INCQS atua em todo o território nacional atendendo ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. Entre os parceiros do INCQS pode-se citar a ANVISA, os Laboratórios Centrais e Centros de Vigilância Sanitária das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde (INCQS, 2004).

As atribuições do INCQS resumem-se a atividades exclusivas de Estado. Suas missões mais destacadas são: perícia analítico-laboratorial no contexto legal da vigilância sanitária e desenvolvimento e transferência de tecnologia e cooperação técnica com organismos nacionais e internacionais. Desta forma, o INCQS acaba por desempenhar papel de principal órgão nacional para questões tecnológicas e normativas, relativas ao controle de qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços no contexto do SUS. Este conjunto de atribuições torna a atuação do INCQS estratégica para a vigilância sanitária e mais ainda para a ANVISA (INCQS, 2004).

O INCQS tem como Missão – “Contribuir para a promoção e recuperação da saúde e a prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária” (INCQS, 2004).

O INCQS tem como Visão – “Ser reconhecido como órgão de alta competência para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária” (INCQS, 2004).

1.3 A FARMACOPÉIA BRASILEIRA

As farmacopéias são os Códigos Oficiais Farmacêuticos de um determinado país que tem por objetivo estabelecer a qualidade dos medicamentos em uso. Hoje em dia os objetivos das entidades que elaboram as farmacopéias (a Farmacopéia Brasileira é elaborada pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia - CPRFB - que é uma comissão oficial, nomeada pelo Diretor-Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária) são mais amplos. Estão focadas na formação e aperfeiçoamento de recursos humanos na área de controle de qualidade e apoio à pesquisa, visando aumentar a segurança e eficácia dos fármacos em uso.

No caso brasileiro, a escolha dos medicamentos a serem incluídos no compêndio oficial não é aleatória. Em primeiro lugar, são escolhidos os medicamentos que constam da Relação Nacional dos Medicamentos Essenciais (RENAME) ou da lista da Organização Mundial de Saúde. São, também, elaboradas em caráter de prioridade, as monografias dos medicamentos a serem utilizados pelos programas especiais de saúde e dos novos produtos de maior interesses terapêutico (DEF, 2004).

A Farmacopéia Brasileira elabora textos técnicos. Como por exemplo: testes ou métodos de análise e monografias para a matéria-prima (ingrediente ativo do medicamento na sua forma básica) e especialidades farmacêuticas (comprimidos, cápsulas, cremes, pomadas, injetáveis, etc.) (DEF, 2004).

Para elaborar as monografias para a Farmacopéia Brasileira (FB), primeiramente, a subcomissão pertinente é um membro da CPRFB com sua equipe ou um órgão oficial de controle de qualidade no Brasil (cuja referência é o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS - na Fundação Oswaldo Cruz, articulado aos demais laboratórios centrais dos estados – LACEN) ou uma indústria farmacêutica, que poderá propor a monografia de um fármaco (DEF, 2004).

A monografia deverá ser submetida a uma série de avaliações que comprovem tratar-se de um método analítico, perfeitamente validado. Se a monografia for julgada adequada pela CPRFB, ela é remetida para os outros colaboradores da FB, nos três segmentos que a compõem: INCQS e órgãos oficiais de controle de qualidade, indústria farmacêutica e universidades, com o objetivo de certificação, ou seja, verificar se a metodologia funciona e fornece os mesmos resultados em diferentes laboratórios (DEF, 2004).

Com base nos resultados obtidos a monografia é reavaliada pela CPRFB e, sendo aprovada, é colocada em Consulta Pública durante três meses, para apreciação da comunidade científica. Caso não ocorram manifestações contrárias, que serão analisadas, a monografia é enviada à apreciação e oficialização da ANVISA (DEF, 2004).

1.4 PERÍCIA ANALÍTICO-LABORATORIAL DE MEDICAMENTOS

Existem fatores que determinam a aceitação ou rejeição de medicamentos dentro dos critérios de qualidade. Para avaliar se o medicamento atuará do modo previsto, vários ensaios são especificados compreendendo um conjunto de normas selecionadas junto aos métodos de análise correspondente. Estes ensaios ou métodos de análise estão descritos na monografia de cada produto na farmacopéia oficial. Uma vez que ela é o código oficial, que estabelece os padrões a que determinada substância deve satisfazer para ser utilizada como medicamento (KOROLKOVAS A, 1984).

Devido ao fato do Laboratório Oficial não dispor exatamente das mesmas condições instrumentais nas quais o método Farmacopéico foi validado, faz-se necessário a realização de estudos que visem a adequação do método analítico às condições do laboratório no qual ele será usado. Como exemplo, podemos citar tamanho e forma da partícula da fase estacionária e percentagem de recobrimento da fase ligada (densidade de carbono) que geralmente não são citadas no método e que afetam diretamente um cromatograma, em termos de retenção (K), seletividade (α), número de pratos teóricos (N) e simetria (às vezes vários parâmetros simultaneamente). Compromete a resolução (R), inviabilizando os resultados finais em relação às especificações contidas na monografia referentes à conformidade e adequação do cromatograma.

O INCQS, o responsável pela rede compostas por todos os Laboratórios Centrais (LACENS), recebe continuamente uma grande quantidade de amostras diversificadas de medicamentos provenientes de diversos estados. Em vista disto o Instituto deve estar capacitado a realizar diversos métodos de análise que sejam de execução fácil e que produzam resultados confiáveis. Estas características são também importante uma vez que são os resultados das análises que permitirão a ANVISA tomar decisões estratégicas que minimizem o risco sanitário para a população.

1.5 A ASPIRINA

1.5.1 Breve Histórico

Em 1999 a aspirina completou 100 anos de sucesso absoluto. Registrada sob a patente n. 36433 de Berlim, em 1899, a aspirina superou gerações e continua sendo a droga mais utilizada no combate a dor. Além disso a cada ano surgem mais indicações terapêuticas para este fármaco (MINATTI, 2005).

Hoje, a aspirina - ácido acetilsalicílico - é o fármaco mais popular em todo o mundo. A cada ano, 50.000 comprimidos de aspirina são vendidos mundialmente - isto sem contar as outras formas de apresentação do ácido acetilsalicílico encontradas no mercado, quer seja em outras marcas da aspirina ou, ainda, associadas a outros analgésicos, tais como cafeína ou vitamina C (MINATTI, 2005).

Embora sintetizada como análogo de uma substância presente no salgueiro branco (*Salix alba*), a aspirina não é uma substância de ocorrência natural e não fazia parte da lista original de fármacos antiinflamatórios não esteroidais. O reconhecimento das atividades biológicas era atribuído à salicina (glicosídeo do álcool salicílico), originalmente isolada das cascas do salgueiro (*Salix sp.*) pelo farmacêutico francês H. Leroux em 1829. A primeira referência moderna do uso das cascas do salgueiro no tratamento de condições febris é de 1763, contudo sabe-se que tanto Hipócrates como Paracelso já conheciam as propriedades curativas desta planta. Após o seu isolamento, a salicina foi identificada como sendo, na realidade, um pró-fármaco que era convertido no princípio ativo, o ácido salicílico, no trato intestinal e fígado (ROCHA, 1999).

O ácido salicílico teve suas atividades comprovadas como um excelente antiinflamatório, analgésico e antipirético, mas mesmo seu sal sódico provou ser de difícil consumo por períodos mais prolongados devido às irritações e danos causados na boca, esôfago, e particularmente no estômago. Em torno de 1899, um químico chamado Felix Hoffman, empregado da Bayer Co. pegou de sua bancada um frasco contendo ácido acetilsalicílico e administrou uma certa quantidade a seu pai que sofria de dores reumáticas mas que não podia mais consumir o salicilato de sódio devido a seus efeitos colaterais. Desta experiência resultou a comprovação que o éster do ácido salicílico era bem tolerado pelo organismo e efetivo. Desta maneira a aspirina foi introduzida na medicina terapêutica (ROCHA, 1999).

O ácido salicílico (ácido *o*-hidroxibenzoico) é uma molécula bifuncional, podendo sofrer dois tipos de esterificação. Na presença de anidrido acético forma-se a aspirina, enquanto que na presença de um excesso de metanol o produto obtido é o salicilato de metila (Óleo de Wintergreen) (ROCHA, 1999).

A presença dos grupos carboxila e fenólico leva à formação de polímeros. O ácido acetilsalicílico reage com o bicarbonato de sódio formando um sal sódico solúvel, já o polímero é insolúvel na solução de bicarbonato. Esta diferença de solubilidade é empregada na purificação do produto (ROCHA, 1999).

A Figura 1 mostra as representações estruturais da salicilina, do ácido salicílico e do ácido acetilsalicílico.

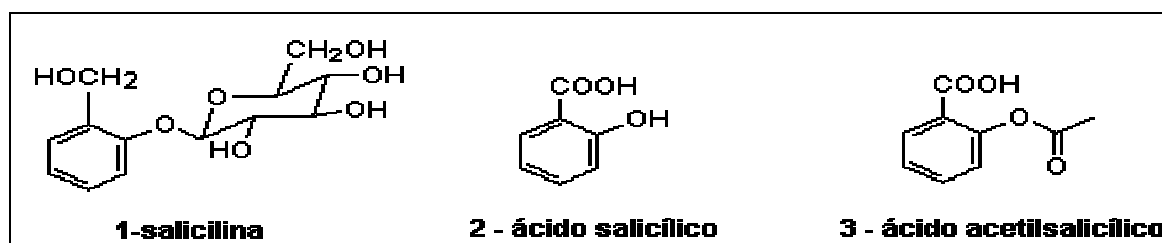


Figura 1 - Representações estruturais da salicilina, do ácido salicílico e do ácido acetilsalicílico

1.5.2 Esquema de mecanismo reacional do ácido acetilsalicílico

A Figura 2 mostra o esquema de mecanismo reacional da esterificação do ácido salicílico na presença de anidrido acético.

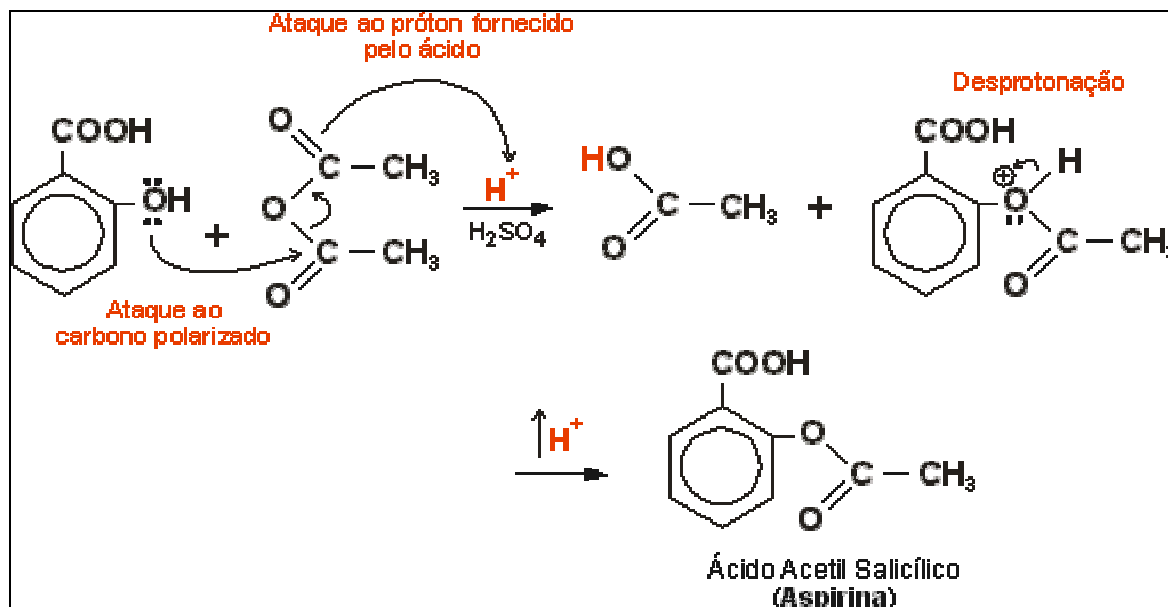


Figura 2 – Esquema de mecanismo reacional do ácido acetilsalicílico

Fonte: Rocha W. X., 1999

1.5.3 Fármacos que contém salicilato em sua composição no mercado nacional

A seguir são enumerados conforme a Tabela 1 os medicamentos que contém salicilato em sua composição:

Tabela 1- Monodrogas e associações de ácido acetilsalicílico

| Ácido Acetil Salicílico | | Ácido Acetil Salicílico (associado) | | Salicilamida (associada) |
|--------------------------------|-------------------|--|------------|---------------------------------|
| AAS | Alidor | Alka-Setzer | Doribe | Benegrip |
| AAS Adulto | CAAS | Aspi-C | Doril | Fielon com Vitamina C |
| AAS Infantil | Endosalil | Aspirina "C" | Engov | Gripionex |
| Aceticil | Intra Acetil | Aspirina | Melhoral | Neo-Sativan |
| Ácido Acetil Salicílico | Melhoral Infantil | Atagripe | Melhoral C | Resprax |
| Aspirina | Ronal | Besaprin | Migral | Termogripe |
| Aspirina infantil | Somalgin Cardio | Buferin | Migrane | |
| Aspisin | | Cefurix | Piralgina | |
| | | Cheracap | | |
| | | Corisona D | | |

Fonte: DEF 97/98. Publicação do Jornal Brasileiro de Medicina(c)

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

2.1.1 Definição

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica físico-química de separação onde os analitos se distribuem por duas fases que se encontram em íntimo contato, a fase estacionária (fe) e a fase móvel líquida (fm). Na prática, a fase estacionária é o “suporte” contido no interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

Os componentes da amostra são retidos, seletivamente, na fase estacionária, resultando em migrações diferenciais, devido ao fato de terem maior ou menor afinidade com a fase móvel. O grau de migração é determinado pela magnitude das interações da fase estacionária e da amostra com a fase móvel (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

As separações por CLAE são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição em fase reversa (CASS *et al.*, 2001; USP 30, 2007).

2.1.2 Classificação

Existem vários tipos de cromatografia. São elas:

Cromatografia de Adsorção ou Líquido-Sólido. A separação entre os analitos presente se dá devido às forças de interação com o adsorvente sólido, que podem ser fortes, como as ligações de hidrogênio, ou fracas como as forças de Van der Waals (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

Cromatografia de Partição ou Líquido-Líquido. A separação entre os analitos ocorrerá em função do coeficiente de partição do analito entre as duas fases líquidas, sendo que uma se encontra imobilizada . (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

Cromatografia por Exclusão ou Permeação em Gel ou Filtração em Gel. A separação dos analitos se dá em função de seus volumes moleculares solvatados que são “filtrados” ou “peneirados” em colunas empacotadas com partículas de poros precisamente controlados (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

Cromatografia por Troca Iônica. A separação dos analitos se baseia na troca seletiva dos íons da amostra em sítios aniônicos ou catiônicos da fase estacionária, que consiste, geralmente, de um material polimérico ou sílica, contendo grupamentos funcionais com carga elétrica (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

Cromatografia por Afinidade. A separação dos analitos é devido ao fato que a fase estacionária contém reagentes bioquímicos imobilizados, acoplados com ligantes específicos que têm afinidade específica pelo analito de interesse, retendo-o (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

Cromatografia em Fase Normal. Em princípio este método baseia-se no fenômeno de adsorção, e depende da polaridade da fase móvel e da fase estacionária. A fase estacionária polar é composta de sílica ou de sílica ligada a grupamentos polares (por exemplo, NH₂ e CN), e a fase móvel é apolar (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

Cromatografia em Fase Reversa. Este tipo de cromatografia, e a cromatografia em fase normal, são os mais usados para à análises de medicamentos (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001). A cromatografia em fase reversa pode ser dividida em três tipos:

a) Método clássico: neste tipo a separação baseia-se em sucessivas etapas de adsorção-desorção dos analitos entre a fase móvel, que é polar (geralmente água mais solventes orgânicos) e a fase estacionária, que é apolar, geralmente formada por sílica covalentemente ligada a compostos hidrofóbicos, formando, por exemplo, cadeias n-alkílicas (Si-O-C₈ ou Si-

O-C₁₈). Esta maneira clássica de trabalho nem sempre dá resultados satisfatórios no que diz respeito à adequação do sistema (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

b) Cromatografia por Supressão Iônica: este tipo é aplicado na separação de compostos do tipo ácidos fracos e bases fracas. Esta separação se obtém pela redução de sua ionização em solução através do controle de pH. O objetivo é afastar o pH do pKa ou pKb. Quando os compostos forem ácidos, usa-se ácido acético ou ácido fosfórico para reprimir a ionização abaixando o pH. Quando os compostos forem bases, deverá ser usado hidróxido de amônio, trietilamina (0,1%), dibutilamina ou fosfatos alcalinos (para ajustar o pH entre 7 e 8) (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

c) Pareamento Iônico (Derivatização): este tipo aplica-se à separação de compostos iônicos de ácidos fortes e bases fortes que estão completamente ionizados na faixa de pH entre 2 e 8. A separação dos analitos se torna possível, pela adição de determinados contra-íons que formam, com os íons já existentes na solução, derivados com radical alquil de maior afinidade com a fase estacionária que é por natureza apolar (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

2.2 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

A adequação do sistema é formado por um conjunto de testes aplicados a métodos cromatográficos. Para verificar se os sistemas cromatográficos estão adequados quanto à resolução e a reprodutibilidade são usados vários parâmetros (fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de seletividade, resolução, fator de cauda e desvio padrão relativo entre as replicatas). Estes testes são baseados no conceito de que equipamentos, as operações analíticas e as amostras para análise constituem um sistema integral que devem ser avaliados como um todo (USP 30, 2007).

2.2.1 Volume interno (Vi) e o volume “morto” referente à coluna (Vo)

Para determinar os parâmetros anteriormente mencionados faz-se necessário calcular o volume “morto”(Vo) referente à coluna, que é o volume compreendido entre o injetor e o detector incluindo a coluna. O Vo da coluna representa cerca de 95% do Vo total. O fato de que o Vo

dos injetores, das células de fluxo e dos detectores sejam minimizados pelos fabricantes faz com que o volume de solvente contido nestas partes seja relativamente pequeno (representa cerca de 5% do V_o total). O volume referente à coluna (V_o) poderá ser determinado experimentalmente ou calculado levando-se em conta as dimensões da coluna e o tamanho da partícula. As expressões abaixo correlacionam o volume interno da coluna vazia (V_i) com o V_o da coluna e o diâmetro da partícula de seu preenchimento (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

$$V_i = \pi R^2 C$$

$$V_o = (0,5 \text{ ou } 0,7) \times V_i$$

Sendo:

$\pi = 3,14159\dots$

R = raio interno da coluna

C = comprimento da coluna

0,5 e 0,7 são fatores matemáticos para tamanho de partícula igual a cinco μm e dez μm , respectivamente.

2.2.2 Fator de retenção (K)

O fator de retenção ou fator de capacidade (K) é a razão entre o tempo que um componente permanece imobilizado na fase estacionária e o tempo em que ele migra no seio da fase móvel. A retenção (K) indica o grau de afinidade que a coluna e a fase móvel possuem em relação ao componente (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

O fator de retenção (K) é um parâmetro que permite comparar o tempo ou volume de retenção de um componente da amostra com o “volume morto” (V_o). Em outras palavras revela em quanto tempo em relação ao valor de V_o o analito eluí (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

Devem-se evitar valores de retenção (K) próximos ao V_o , pois neste caso ocorrerá pouca interação do composto analisado com a fase estacionária podendo ocorrer a coeluição com um outro componente da amostra. Da mesma forma não se deve trabalhar com valores excessivamente altos de retenção, porque isto fará com que ocorra o alargamento dos picos.

Idealmente, o valor de (K) deveria variar entre um e vinte. A expressão a seguir correlaciona o fator de retenção (K) de um soluto com o seu volume de retenção (Vr) e o volume “morto” (Vo) referente à coluna (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

$$K = \frac{V_r - V_o}{V_o}$$

2.2.3 Eficiência ou número de pratos teóricos (N)

A eficiência ou número de pratos teóricos (N) é uma medida de quanto o sistema incluindo injetor, tubulações, conexões, coluna, fase móvel, fase estacionária e detector está diluindo a banda do componente analisado durante a corrida cromatográfica. A eficiência (N) é uma medida do alargamento que o sinal sofre durante a passagem do analito pelo sistema. As expressões abaixo são usadas para o cálculo do número de pratos teóricos (N). Os cálculos que usam a largura à meia altura do pico são mais confiáveis, já que o erro na medida da largura do pico na meia altura é menor que a medida da largura do pico na linha de base (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

$$N = 16(V_n/W)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54(V_n/W_{1/2})^2$$

Sendo:

V_n = Volume de eluição do pico

W = Largura do pico na linha de base

W_{1/2} = Largura do pico na meia altura

2.2.4 Fator de separação ou fator de seletividade (α)

O fator de separação ou fator de seletividade (α) compara a retenção de um componente (K1) com a do outro componente (K2) mais retido. A seletividade indica até que grau o sistema químico (depende da natureza química da coluna e da fase móvel) está resolvendo (separando) os componentes. Indica o quanto a fase estacionária ou a fase móvel interage com uma substância em comparação com outra. Valores de fator de separação maior que um indica que

o sistema químico esta resolvendo (separando) os componentes (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

2.2.5 Fator de resolução ou resolução (R)

A resolução (Rs) mede o grau e a qualidade da separação entre dois picos em um determinado sistema. Pode ser calculada a partir das larguras dos picos e seus respectivos tempo de retenção, pela expressão abaixo (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

$$R = \frac{(t_2 - t_1)}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)}$$

Sendo:

t_2 e t_1 = tempo de retenção de dois picos

W_2 e W_1 = Largura dos picos na meia altura

A resolução é afetada pela retenção (K), pela seletividade (α) e pela eficiência (N) de forma diferente conforme a equação da resolução abaixo (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

$$R = 1/4 \left(\left(\alpha - 1 \right) / \alpha \right) \left(\sqrt{N} \right) \left(K_2 / \left(1 + K_2 \right) \right)$$

Uma resolução entre picos de 1.0, significa 2,3 % de sobreposição, para resolução igual 1.5, somente 0,1 % e nenhuma sobreposição a partir de resolução superior a 1,8 (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

2.2.6 Fator de cauda (FC) ou fator de assimetria do pico (As)

O fator de cauda (FC) determina o formato do pico. Geralmente os picos não são simétricos. A Farmacopéia Americana adota o fator de cauda, que é calculado a 5 % da altura do pico (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001; USP 30 2007).

$$FC = W_{0,05} / 2f$$

Sendo:

$W_{0,05}$ = Largura do pico a cinco por cento da altura

f = Distância da linha vertical do sinal máximo até a linha vertical e perpendicular à linha de base que intercepta o traço a cinco por cento da altura.

Outro modo de caracterizar o formato do pico é determinando o fator de assimetria (As), que é calculado a 10 % da altura do pico. A tabela a seguir mostra os valores correspondentes aos dois fatores (SNYDER *et al.*, 1997).

Tabela 2 - Relação entre fator de cauda e o fator de assimetria

| <i>Fator de cauda (a 5 %)</i> | <i>Fator de assimetria (a 10 %)</i> |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| 1,0 | 1,0 |
| 1,2 | 1,3 |
| 1,4 | 1,6 |
| 1,6 | 1,9 |
| 1,8 | 2,2 |
| 2,0 | 2,5 |

Fonte – Snyder *et al.*, 1997

2.2.7 Desvio padrão relativo (DPR)

O desvio padrão relativo das replicatas (DPR) é o parâmetro da adequação do sistema que mede a repetitividade do método analítico entre as injeções da mesma amostra contida no mesmo frasco.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Sendo:

DPR = desvio padrão relativo ou coeficiente de variação

DP = desvio padrão das replicatas

CMD = concentração média determinada

2.2.8 Fatores que afetam no resultado de adequação do sistema

Vários fatores afetam a retenção (K), a seletividade (α) e a eficiência (N) e conseqüentemente alteram a resolução do sistema. A retenção (K) além de ser afetada pela polaridade da fase móvel, também é afetada pela polaridade da fase estacionária, pela área superficial do suporte, pela percentagem de recobrimento da fase estacionária (densidade de carga), tamanho do poro e temperatura da coluna (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

A Seletividade (α) além de ser controlada pelas características químicas da fase móvel, também é afetada pelo pH da fase móvel e pelas características químicas da fase estacionária (CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

A eficiência (N) é determinada pelo tamanho médio das partículas da fase estacionária e pela forma destas partículas (esférica ou irregular), uniformidade do leito da fase estacionária, temperatura da coluna, viscosidade da fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção, carga (massa) de amostra injetada, tempo de retenção do pico usado para o cálculo de N, fórmula usada para o cálculo de N, comprimento e diâmetro da coluna, polaridade (força de eluição) do solvente que contém a amostra e efeitos extracoluna (como conexões, tubulações, célula, injetor e etc.)(CASS *et al.*, 2001; FERRAZ, 2001).

2.2.9 Limites dos parâmetros de adequação do sistema

Os parâmetros a serem medidos e seus limites recomendados para garantir a adequação do sistema de acordo com a US-FDA e da USP são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Limites dos parâmetros para a adequação do sistema

| <i>Parâmetros</i> | <i>(US-FDA, 2000)</i> | <i>(USP 30, 2007)</i> |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Fator de retenção (K)</i> | K > 2 | K > 2 |
| <i>Nº. de pratos teóricos (N)</i> | Em geral N > 2000 | Em geral N > 2000 |
| <i>Resolução (R)</i> | R > 2 | R > 2,0 |
| <i>Fator de cauda (TF)</i> | TF < 2 | TF < 2 |
| <i>Repetitividade (DPR)</i> | DPR < 1%, para n > 5 | DPR < 2% |

2.3 MÉTODOS FARMACOPÉICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO E DO ÁCIDO SALICÍLICO EM COMPRIMIDOS

A Tabela 4 mostra a evolução dos métodos farmacopéicos. Observa-se que no método atual da Farmacopéia Brasileira quarta edição (FB, 2002) utilizam-se as mesmas técnicas descritas no método da Farmacopéia Americana décima sexta edição (USP, 1960) na quantificação do teor de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em comprimidos.

Tabela 4 - Evolução dos métodos farmacopéicos utilizados na determinação do teor de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em comprimidos

| <i>Farmacopéia</i> | <i>Teor de ácido acetilsalicílico</i> | <i>Teor de ácido salicílico</i> |
|-------------------------------|--|--|
| <i>USP 16 ed., 1960</i> | Volumetria, titulação por retorno do hidróxido de sódio com ácido sulfúrico. | Reação colorimétrica com sulfato ferroso amoniacal, comparação visual. Limite: < 0,15 %. |
| <i>USP 17 ed., 1965</i> | a) Eluir com clorofórmio em coluna de sílica. b) Espectrofotometria a 280 nm. | a) Eluir com clorofórmio em coluna de sílica. b) adicionar reagente. c) Espectrofotometria a 306 nm. Limite: < 0,15 % revestido e < 0,75 % sem revestimento. |
| <i>USP 20 ed., 1980</i> | a) Eluir com clorofórmio em coluna de sílica. b) Espectrofotometria a 280 nm. | a) Eluir com clorofórmio em coluna de sílica. b) adicionar reagente. c) Espectrofotometria a 306 nm. Limite: < 0,3 % revestido e < 3,0 % sem revestimento. |
| <i>USP 21 ed., 1985</i> | Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). | Cromatografia a líquido de alta eficiência. Limite: < 0,3 % revestido e < 3,0 % sem revestimento |
| <i>USP 30 ed., 2007</i> | Cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE). | Cromatografia a líquido de alta eficiência. Limite: < 0,3 % revestido e < 3,0 % sem revestimento |
| <i>Brasileira 4 ed., 2002</i> | Volumetria, titulação por retorno do hidróxido de sódio com ácido clorídrico. | Reação colorimétrica com sulfato ferroso amoniacal, comparação visual com a cor desenvolvida pelo padrão (0,01 % m/v). |

2.3.1 O método da farmacopéia brasileira (FB)

O método de dosagem do teor de ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos definido na Farmacopéia Brasileira é por volumetria ácido-base pela titulação por retorno.(e seu limite é de 95,0 a 105,0 % do declarado pelo fabricante). Na Aspirina, conforme a FB 2002, devemos também quantificar a impureza do ácido acetilsalicílico que é o ácido salicílico. Este é avaliado através do ensaio de pureza realizado por uma reação colorimétrica com uma solução de sulfato ferroso amoniacal que da origem a uma substância de cor violeta a qual é comparada a olho nu com a cor obtida aplicando-se o mesmo tratamento a um padrão, cuja concentração é de 0,01 % (m/v). A cor gerada na amostra não poderá ser mais intensa que a obtida para o padrão (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

2.3.2 O método da farmacopéia americana (USP)

O método preconizado na Farmacopéia Americana para doseamento ao mesmo tempo do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico em comprimidos utiliza a CLAE (sendo o limite de 90,0 a 110,0% do declarado pelo fabricante para o ácido acetilsalicílico e teor menor que 3,0 % para ácido salicílico em comprimidos sem revestimento e 0,3 % em comprimidos com revestimentos) (USP 30, 2007).

A avaliação experimental do método preconizado pela Farmacopéia Americana mostrou que os parâmetros referentes à adequação do sistema (principalmente resolução e fator de cauda) não produziam os efeitos desejados à realização de uma análise confiável. Conforme a Figura 3, este sistema cromatográfico apresentou, também, uma relação sinal/ruído muito baixa, o que não é desejável em qualquer método cromatográfico. Apesar de terem sido feitos vários ajustes na proporção da fase móvel e de terem sido usadas várias colunas de diferentes dimensões e formato e diâmetro da partícula, não houve melhora nos resultados obtidos.

Algumas incoerências do método preconizado pela Farmacopéia Americana chamam a atenção. Uma delas é o uso de 1-heptanosulfonato de sódio (PIC 7) em meio ácido para derivatizar analitos do tipo ácido fraco (pK_a AAS = 3,5 e pK_a AS = 3,0). Esse tipo de derivatizante é apropriado para reagir com bases fortes que se encontram fortemente ionizadas

no intervalo operacional de pH utilizado na CLAE em fase reversa, $2,0 < \text{pH} < 7,5$. Além disso, o pH da fase móvel deve ser tal que favoreça a ionização do analito para que a derivatização possa ter um rendimento apreciável.

A derivatização de ambos os analitos teria maior rendimento utilizando-se reagentes básicos do tipo sal de amônio quaternário, mantendo-se o pH da fase móvel bem acima dos valores do pKa dos ácidos e respeitando-se o limite superior da faixa operacional de pH no sentido de evitar que ocorra dissolução da sílica com conseqüente dano da coluna.

A Figura 3 mostra o perfil cromatográfico e os parâmetros obtidos para a adequação do sistema.

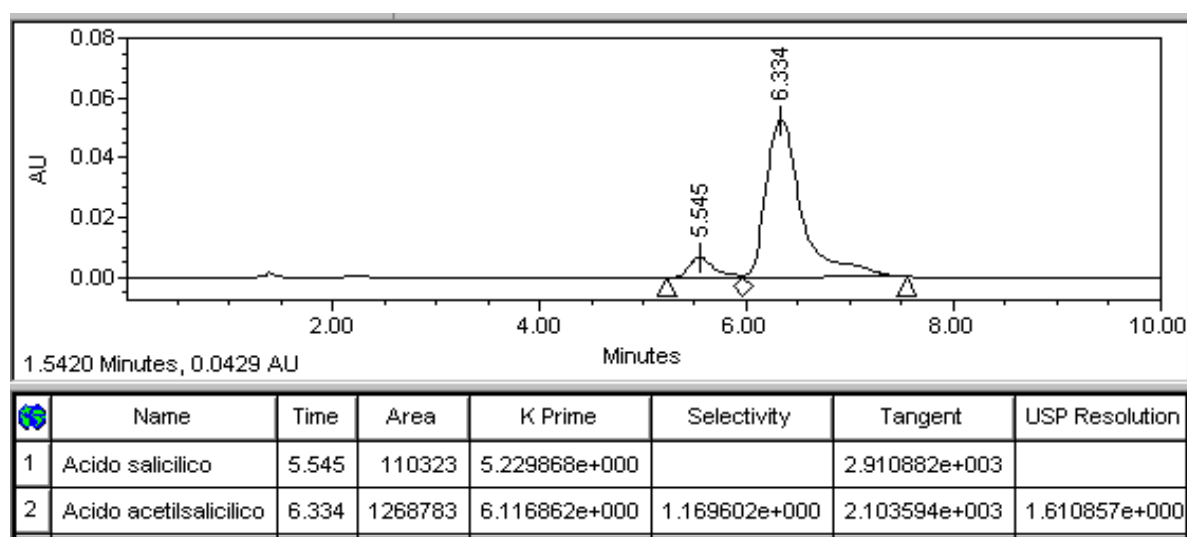


Figura 3 – Picos cromatograficos do ácido salicílico (5,5 min) e do ácido acetilsalicílico (6,3 min). Condições: coluna C18 (5 μ m; 250 x 4,6 mm d.i.), fase móvel composta de 1-heptanosulfonato de sódio, água e acetonitrila (2 g : 850 mL : 150 mL) (pH 3,4), fluxo 2,0 mL/min, detecção 280 nm, temperatura 30 °C, volume 5 μ L, concentração igual à 0,0135 mg/mL de ácido salicílico e 0,4518 mg/mL de ácido acetilsalicílico

2.3.3 O método desenvolvido

Em trabalho anterior (AGUIAR, 2005) foi desenvolvido no laboratório de medicamentos do Departamento de Química do INCQS na Fiocruz um método por CLAE para dosagem do ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico em comprimidos, que apresentou dados referentes à adequação do sistema e uma relação sinal/ruído melhor do que o método da Farmacopéia

Americana (USP 30, 2007) e vantagens metodológicas sobre o método volumétrico da Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

Tendo-se em vista que os ácidos acetilsalicílico e o salicílico são ácidos fracos, cujos valores da constante de ionização (pKa) são 3,5 e 3,0, respectivamente, a metodologia em fase reversa mais indicada para analisar estes ácidos é aquela baseada na supressão iônica das espécies. Este tipo de cromatografia em fase reversa é aplicado aos ácidos fracos e as bases fracas, suprimindo-se as formas ionizadas em solução, através do controle de pH.

A Figura 4 mostra o perfil cromatográfico e os parâmetros obtidos para a adequação do sistema do método desenvolvido.

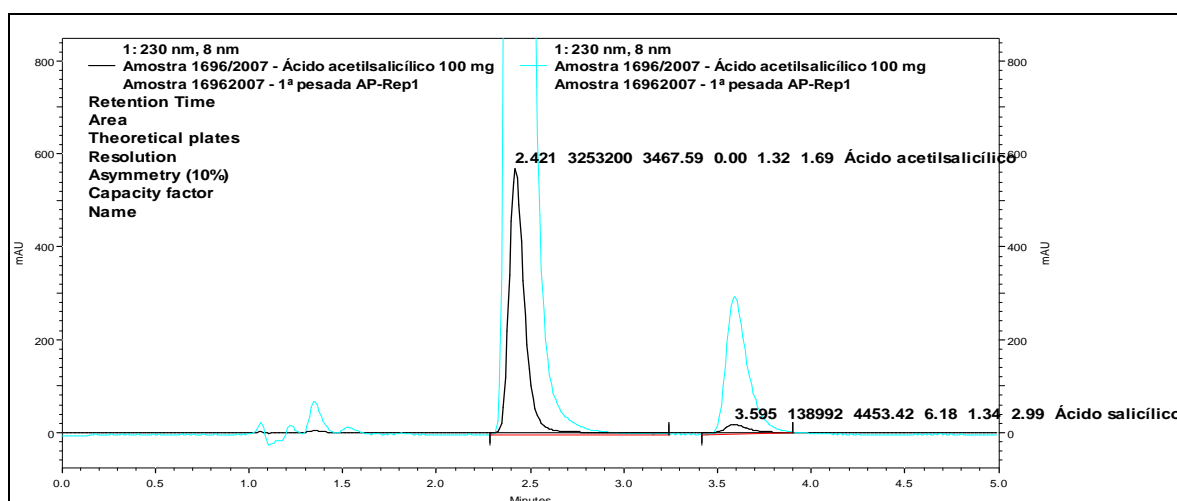


Figura 4 - Picos cromatográficos do ácido acetilsalicílico (2,4 min) e do ácido salicílico (3,6 min). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 5 µL, concentração igual à 0,3018 mg/mL de ácido acetilsalicílico e 0,00951 mg/mL de ácido salicílico

2.4 VALIDAÇÃO

2.4.1 Definição

Validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou usos específicos pretendidos foram atendidos (ABNT NBR ISO/IEC 9000).

A validação é o processo pelo qual demonstra-se, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas as quais ele se destina, assegurando a confiabilidade dos resultados (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). Estabilidade, seletividade, linearidade e intervalo, exatidão, precisão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez são os parâmetros analíticos de desempenho avaliados na validação, quando pertinente.

2.4.2 Especificidade

Os testes de especificidade segundo o DQO 008 (INMETRO, 2007) necessitam de uma pesquisa cuidadosa do conhecimento disponível na área de aplicação, para que se encontrem todos os componentes que precisam ser testados. Às vezes se faz necessário expor todos os componentes e a matriz a condições extremas (calor, ácido, álcali, oxidação, radiação UV/Visível e luz fluorescente) para determinar possíveis produtos de degradação.

Porém segundo Vessman J.(1996) especificidade e seletividade são dois graus de um mesmo parâmetro, um método altamente seletivo é também específico. Conseqüentemente é necessário fazer uma ressalva na afirmação acima (INMETRO, 2007) que nada tem haver com especificidade, mas sim com a estabilidade da substância testada.

2.4.3 Seletividade

A seletividade de um método analítico representa a sua habilidade em determinar, de forma inequívoca, o analito na presença de componentes da amostra que poderiam interferir com a sua determinação.

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição pelo detector selecionado, sem causar um sinal visível. Os componentes podem aumentar ou reduzir o sinal devido ao analito sendo que a magnitude do efeito também pode depender da concentração (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A seletividade é obtida geralmente de duas maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada desta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se o resultado como uma indicação da presença do composto puro (HUBER L., 1998; JENKE D.R., 1998; VESSMAN J., 2001).

- Outra ressalva é necessária ser feita quando se trata de determinar a seletividade por uma das formas apresentadas no DQO 008 (INMETRO, 2007, página 09), quando a matriz sem o analito não estiver disponível, a avaliação da seletividade se confunde com a avaliação do efeito matriz (item 2.4.6), por comparação das inclinações das curvas de adição padrão com a curva analítica.

2.4.4 A Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores de propriedades no qual o método pode ser aplicado. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com a concentração do analito ou valor de propriedade (INMETRO, 2007).

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Depende da aplicação pretendida pelo método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando

aplicados a amostras contendo quantidades de analito dentro do intervalo especificado. Os limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para os ensaios de teor, uniformidade de conteúdo e determinações de impurezas (produto de degradação) em matérias-primas ou em forma farmacêuticas deverá ser de 70% a 130% da concentração teórica do teste (ANVISA, 2003).

2.4.5 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A linearidade pode ser observada por meio da curva analítica, e é avaliada por intermédio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

O método utilizado para análise de dados é o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). O ajuste de uma equação de calibração pelo MMQO se baseia em várias premissas relativas aos resíduos da regressão e ao modelo: i) os resíduos são variáveis aleatórias com média zero e variância constante e desconhecida; ii) os resíduos são variáveis normalmente distribuídas; iii) os resíduos são homocedásticos, com distribuição constante ao longo dos valores de X; iv) o resíduo de uma observação não é correlacionado com o resíduo em outra observação. Os resíduos não são apenas não correlacionados, mas independentes; e v) a relação entre X_i e Y_i é linear (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Apesar das excelentes características do MMQO, este método tem o inconveniente de ser muito sensível à presença de pontos de influência como valores extremos (outliers) ou pontos de alavanca (leverages). Valores extremos são definidos como observações de uma amostra tão separados dos demais que sugerem que possam pertencer a uma população diferente ou serem resultado de erros na medição (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

O teste de Jack-Knife é usado para avaliação de valores extremos. O cálculo do resíduo padronizado Jackknife J emprega uma estimativa da variância dos resíduos da regressão independente do ponto sob suspeita. Estes resíduos são facilmente computados para todas as observações sem necessidade de ajustar várias regressões separadamente, para cada ponto

excluído. Os resíduos padronizados Jackknife J , calculados para cada ponto da curva de calibração seguem a distribuição de Student t . Valores de J maiores que o valor do t crítico são considerados valores extremos (BELSLEY, KUH & WELSCH, 1980; WEISBERG, 1985) e são removidos, exceto quando a porcentagem de dados tratados for superior a 22,2 % do número original de dados (HORWITZ, 1995) ou quando o ponto for a terceira e última replicata de um nível de concentração estudado. Para cada exclusão o MMQO é novamente aplicado aos dados (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Para realizar o teste da significância da regressão e do desvio da linearidade, a variabilidade total das respostas é decomposta na soma dos quadrados dos resíduos da regressão (em torno da regressão) e na soma dos quadrados devido à regressão. A soma dos quadrados dos resíduos da regressão é então separada em soma dos quadrados do desvio da linearidade (falta de ajuste ao modelo) e soma dos quadrados do erro puro. A soma dos quadrados dos resíduos pode ser obtida pela diferença entre a soma dos quadrados total e a soma dos quadrados devida à regressão. A soma dos quadrados do erro puro é obtida pela diferença entre a soma do quadrado total e a soma dos quadrados entre níveis. A estatística deste teste é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição F com os graus de liberdade correspondentes (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Para avaliação da significância da regressão, é testada a hipótese nula de que a regressão linear não é significativa contra a hipótese alternativa de que a regressão linear é significativa. A hipótese nula é rejeitada quando a estatística F estimada for maior que o valor crítico F . Para a avaliação da significância do desvio da linearidade, a hipótese nula de que o modelo linear simples é correto (não há desvios da linearidade) é confrontada com a hipótese alternativa de que o modelo linear não é correto (há desvio da linearidade). A hipótese nula é rejeitada quando a estatística F estimada for maior que o valor crítico F (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Um desvio da linearidade significativo indica que o modelo é inadequado. Atenção deve então ser dedicada à descobrir onde e como esta inadequação ocorre. Desvio da linearidade não significativo indica que não existem razões para duvidar da adequação do modelo e que ambos, soma dos quadrados do erro puro e do desvio da linearidade, podem ser utilizados como estimativas de σ^2 (DRAPER & SMITH, 1998).

O teste de Ryan-Joiner (RYAN & JOINER, 1976) verifica a normalidade dos resíduos da regressão, ele testa a hipótese nula de que os resíduos seguem a distribuição normal (os desvios da normalidade não são significativos) contra a hipótese alternativa de que os resíduos seguem outra distribuição de probabilidade (os desvios da normalidade são significativos). A estatística deste teste baseia-se no coeficiente de correlação do gráfico de probabilidade normal ou coeficiente de correlação de Ryan-Joiner R . A hipótese nula é rejeitada quando os coeficientes de correlação calculados são menores do que os valores críticos estabelecidos para estes coeficientes (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

O teste de Durbin-Watson (DURBIN & WATSON, 1951) é usado para verificar a autocorrelação dos resíduos da regressão, que confronta a hipótese nula de que não há autocorrelação entre os resíduos (os resíduos são independentes) com a hipótese alternativa de que há autocorrelação entre os resíduos (os resíduos não são independentes). A estatística deste teste baseia-se na estatística de Durbin-Watson d . Para cada conjunto de dados, há dois limites críticos d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Se o valor de d estiver entre os limites, o teste é inconclusivo. Valores de $d < d_L$ indicam autocorrelação e rejeição da hipótese nula a um nível de significância de 2α , enquanto valores de $d > d_U$ indicam independência dos resíduos e não rejeição da hipótese nula (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

O teste de Levene (LEVENE, 1960) modificado por BROWN & FORSYTHE (1974) é utilizado para avaliar homocedasticidade, confrontando a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si (há homoscedasticidade) contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heterocedasticidade). A estatística deste teste baseia-se no F de Levene F_L , mas no caso específico de dois grupos, ou seja, para um grau de liberdade de tratamentos, em que $t = \sqrt{F}$, pode ser usada a estatística t de Levene t_L . A hipótese nula é rejeitada quando a estatística t_L calculada for maior que o t crítico (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; INMETRO, 2007).

SNEDECOR & COCHRAN (1989) sustentam a necessidade de testar a hipótese nula de que a curva é uma linha reta que passa pela origem. A condição necessária para que a linha passe pela origem é que a intercessão com o eixo dos y não seja significativamente diferente de zero. O método pode ser considerado como livre de tendências se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (INMETRO, 2007).

2.4.6 Efeito matriz

Efeitos de matriz não significativos simplificam enormemente o processo de calibração, visto que os padrões podem ser preparados como soluções simples do analito em solventes adequados (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002). Todavia, utilizar soluções padrão simples para preparo da curva analítica, sem a realização prévia dos testes de efeitos de matriz, significa supor que estes efeitos não existem. Em diversas áreas, esta premissa é freqüentemente inválida (MILLER & MILLER, 1993).

Testes de efeito de matriz consiste no preparo de curvas analítica simples (curvas de analito em solventes) e curvas de materiais de referência ou de adição do analito em amostras brancas ou não (curvas de analito em matriz) (INMAN, 1987; NATA, 1997; BRUCE, MINKKINEN & RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998; THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002, INMETRO, 2007).

As curvas de analito em matriz são preparadas por adição do analito a soluções teste, obtidas de amostras ensaiadas nas mesmas condições dos procedimentos normais (THOMPSON, ELLISON & WOOD, 2002).

No caso de disponibilidade de um conjunto de amostras de referência ou de amostras brancas verdadeiras, o teste t é recomendado para comparação entre as médias obtidas nos ensaios com e sem matriz, para cada nível de concentração estudado (BRUCE, MINKKINEM & RIEKKOLA, 1998; INMETRO 2007). Este teste supõe que os dados seguem a distribuição normal (ARMITAGE & BERRY, 1994)

No entanto, quando não houver material de referência, as inclinações das curvas com e sem matriz são comparadas (BRUCE, MINKKINEM & RIEKKOLA, 1998; EURACHEM, 1998; THOMPSON, ELLISON & WOD, 2002; INMETRO, 2007). O teste preconizado para comparação das inclinações e interseções das curvas é o teste de t (ARMITAGE & BERRY, 1994). Entretanto, além da premissa de normalidade, a premissa de ajuste ao modo linear

também deve ser considerada (EURACHEM, 1998; THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

2.4.7 Limite de quantificação e limite de detecção

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de detecção (LD) é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, mas não necessariamente quantificada (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. O limite de quantificação (LQ) é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra. O limite de quantificação é estabelecido por meio de análise de soluções contendo concentrações decrescentes até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Existem diferentes abordagens para a determinação do LQ e LD. A avaliação visual pode ser usada em métodos instrumentais e não instrumentais. A avaliação pela relação sinal/ruído é aplicável aos métodos instrumentais que apresentam ruído de linha de base. A relação é determinada pelas comparações dos sinais da amostra, em concentrações baixa do analito, com os sinais em branco. A relação sinal/ruído típica é 10/1 pra o LQ e de 3/1 para o LD (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007). As expressões a seguir são indicadas para os cálculos de LQ e LD.

$$LQ = \frac{10\sigma}{s} \qquad LD = \frac{3\sigma}{s}$$

Sendo:

σ = desvio-padrão da resposta

s = inclinação da curva analítica

O desvio padrão da resposta (σ) pode ser obtido por duas maneiras, pelo cálculo de desvio padrão da resposta da amostra em branco ou pelo cálculo do desvio padrão da interseção y da linha de regressão (ou desvio desvio padrão residual da linha de regressão) (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

O LQ e o LD podem também serem calculados graficamente (THIER P., KIRCHHOFF J., 1992) a partir da curva analítica usando um programa adequado (por exemplo, o Statistica).

2.4.8 Exatidão

Exatidão do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão pode ser expressa como a percentagem de recuperação do analito. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: (1) comparação com uma substância química de referência; (2) comparações interlaboratoriais; (3) recuperação do analito adicionado a matriz que já contém o analito (método de adição padrão) (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Em (3) se a matriz sem o analito não estiver disponível, devem ser preparadas três tipos de soluções: soluções amostra adicionadas de substância padrão, soluções amostra não adicionadas de substância padrão e solução padrão. A percentagem de recuperação (% R) pode ser calculada pela expressão abaixo.

$$\% R = \frac{(C1 - C2)}{C3} \times 100$$

Sendo:

C1 = concentração de analito na amostra adicionada de padrão

C2 = concentração de analito na amostra não adicionada de padrão

C3 = concentração de analito na solução padrão

2.4.9 Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Ambas repetitividade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (% CV) pode ser mais útil neste caso, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja muito grande (INMETRO, 2007).

2.4.9.1 Precisão intra-dia ou repetitividade

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição (condições de repetitividade), com o mesmo procedimento; mesmo observador; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2007).

A repetitividade pode ser determinada por meio de análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Sugere-se sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão de repetitividade (DPRr). A expressão a seguir é usada para o cálculo do DPRr (INMETRO, 2007).

$$\text{DPRr} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Sendo:

DP = desvio-padrão

CMD = concentração média determinada

2.4.9.2 A precisão intermediária ou reprodutibilidade interna

A reprodutibilidade interna refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável a usar (INMETRO, 2007).

Para determinar a precisão intermediária ou reprodutibilidade interna de um método, efetua-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a mesma amostra, nas condições pré-definidas. Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da reprodutibilidade interna, existem vários métodos para a determinação e controle desse parâmetro de qualidade, um destes métodos é usando a expressão abaixo (INMETRO, 2007).

$$S_i(j,k) = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \cdot \sum_{j=1}^t \cdot \sum_{k=1}^n (Y_{jk} - \bar{Y}_j)^2}$$

Sendo:

$S_i(\)$ = desvio-padrão de reprodutibilidade interna (onde os símbolos relativos as condições intermediárias de precisão podem aparecer entre parênteses)

t = total de amostras ensaiadas

n = total de ensaios efetuados por amostra

j = número da amostra, j = 1, t

k = número do ensaio da amostra j, k = 1, n

Y_{jk} = valor do resultado k para amostra j

Y_j = representa a media aritmética dos resultados da amostra j

Neste método, a determinação da precisão é feita por meio de t valores de n ensaios de amostras ou padrões. A precisão intermediária baseia-se na dispersão entre os ensaios. É recomendado que o valor “t(n-1)”, seja, pelo menos, igual a quinze (INMETRO, 2007).

2.4.10 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica a confiabilidade do método durante o uso normal. Durante o desenvolvimento do método, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Tabela 5 apresenta exemplos típicos de variação (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

Tabela 5 - Exemplos de fatores que devem ser considerados na determinação da robustez

| | |
|------------------------------|--|
| <i>Preparo das Amostras</i> | <i>•Estabilidade das soluções analíticas •Tempo de extração</i> |
| <i>Espectrofotometria</i> | <i>•Variação do pH da solução •Temperatura •Diferentes fabricantes de solventes</i> |
| <i>Cromatografia Líquida</i> | <i>•Variação do pH da fase móvel •Variação na composição da fase móvel •Diferentes lotes ou fabricantes de colunas •Temperatura •Fluxo da fase móvel</i> |
| <i>Cromatografia Gasosa</i> | <i>•Diferentes lotes ou fabricantes de colunas •Temperatura •Velocidade do gás de arraste</i> |

Fonte – ANVISA, 2003

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações, as quais o método é submetido, nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações (INMETRO, 2007).

Para determinação da robustez, denomina-se os fatores nominais por letras maiúsculas, de **A** a **G** e a variação, por letra minúsculas. Nesse método são realizados oito ensaios, separados para determinar os efeitos da variação dos sete diferentes fatores, no procedimento analítico. As oito medições podem ser realizadas numa ordem aleatória (INMETRO, 2007).

A Tabela 6 mostra os efeitos das variações nos fatores escolhidos (com base na Tabela 5 para o preparo de amostra e para a cromatografia líquida) a serem determinados. O grau da variação para os fatores do método em estudo foi baseado no trabalho de Furman et al. (1998) e no segundo suplemento da USP 30 (2007) sobre ajustes em métodos por cromatografia a líquido.

Tabela 6: Variações nos fatores para a determinação da robustez

| <i>Fatores</i> | <i>Nominal</i> | <i>Letra</i> | <i>Variação</i> | <i>Letra</i> |
|--|----------------|--------------|-----------------|--------------|
| 1. Variação do pH da fase móvel | 2,3 | A | 2,6 | a |
| 2. Variação da composição da fase móvel | 30 % orgânico | B | 20 % orgânico | b |
| 3. Variação da temperatura da coluna | 30 °C | C | 25 °C | c |
| 4. Variação do fluxo da fase móvel | 1,0 mL/minuto | D | 1,2 mL/minuto | d |
| 5. Diferente fabricante de coluna | Waters | E | Merck | e |
| 6. Estabilidade das soluções | 1 dia preparo | F | 2 dias preparo | f |
| 7. Tempo de extração no ultrassom | 5 minutos | G | 10 minutos | g |

Prepara-se uma tabela formada pela matriz dos fatores para a determinação da robustez do método. A Tabela 7 a seguir representa esta matriz (INMETRO, 2007).

Tabela 7: Matriz dos fatores para determinação da robustez do método

| <i>Fator</i> | <i>Combinação ensaiada</i> | | | | | | | |
|------------------|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A ou a | A | A | A | A | a | a | a | a |
| B ou b | B | B | b | b | B | B | b | b |
| C ou c | C | c | C | c | C | c | C | c |
| D ou d | D | D | d | d | d | d | D | D |
| E ou e | E | e | E | e | e | E | e | E |
| F ou f | F | f | f | F | F | f | f | F |
| G ou g | G | g | g | G | g | G | G | g |
| Resultado | s | t | u | v | w | x | y | z |

Fonte: APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater, 21st Edition, 2005

Se a combinação **1** for ensaiada, o resultado será **s**. Se a combinação **2** for ensaiada o resultado será **t** e assim sucessivamente até que todas as oito combinações tenham sido ensaiadas. Para determinar a variação de um fator, deve-se encontrar os quatro valores correspondentes às letras maiúsculas e as quatro minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de C para c (conforme a Tabela 6, refere-se ao fator 3, o efeito (E3) da variação da temperatura de acondicionamento da coluna de 30 °C para 25 °C).

$$R(C) = \frac{s + u + w + y}{4} \quad \text{e} \quad R(c) = \frac{t + v + x + z}{4}$$

Sendo:

R(C) = alteração para C (media)

R(c) = alteração para c (media)

s,u,w,y = resultados quando são feitos os ensaios conforme as combinações 1,3,5 e 7 respectivamente

t,v,x,z = resultados quando são feitos os ensaios conforme as combinações 2,4,6 e 8 respectivamente

O cálculo do efeito da variação do fator C para c é dado pela expressão abaixo

$$E3(C/c) = R(C) - R(c)$$

Sendo:

E3(C) = efeito três (E3) no resultado da variação de C para c

Calcular todos os setes pares para obter as sete diferenças (efeitos de E1 a E7), que podem ser ordenados para revelar aqueles, com efeito, significativo no resultado. Após crítica dos resultados obtidos, fazer um controle mais rigoroso dos fatores de maior influência. (INMETRO, 2007).

3 OBJETIVO

3 OBJETIVO

Este estudo tem como objetivo a validação intralaboratorial do método analítico desenvolvido por cromatografia em fase líquida para dosar o ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico em comprimidos.

4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

4.1 EQUIPAMENTOS

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos SPD-M10A, forno CTO-20A, bomba LC-10AD e injetor automático SIL-20A. Programa usado para aquisição de dados Class-vp. (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, número 3)

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Waters com detector ultravioleta-visível óptico modelo 2487, forno e bomba modelo 600 e injetor automático modelo 717 plus (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, número 4)

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Waters com detector ultravioleta-visível óptico modelo 2487, forno ULSTD 3101-1, bomba modelo 515 e injetor automático modelo 717 plus (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz, número 5)

- Aparelho de ultra-som, fabricante Branson modelo 3210 (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz)

- Balança analítica com resolução de 0,01 mg, fabricante Mettler Toledo AX 205 (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz)

- Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Milipore modelo A-10 (Departamento de Química do INCQS-Fiocruz)

A Figura 5 mostra o cromatógrafo (Shimadzu) utilizado em todos os itens da validação.



Figura 5 - Cromatógrafo líquido, fabricante Shimadzu com detector ultravioleta-visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos (DAD) completo usado em todos os requisitos da validação

A Figura 6 representa o cromatógrafo (Waters) utilizado na determinação do requisito reprodutibilidade interna.



Figura 6 - Cromatógrafo líquido, fabricante Waters com detector ultravioleta-visível óptico completo usado na determinação do requisito reprodutibilidade interna

4.2 REAGENTES E MATERIAIS

- Água grau CLAE ($0,22 \mu\text{m}$) purificada por meio do sistema de purificação Milli-Q-Millipore
- Acetonitrila grau CLAE – Merck

- Ácido trifluoracético grau pró-análise – Merck
- Coluna Novapack® de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C18) de partícula 4µm de tamanho e dimensões de 3,9 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento, fabricante Waters lote W13311
- Coluna Lichrospher® de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C18) de partícula 5µm de tamanho e dimensões de 4 mm de diâmetro interno e 125 mm de comprimento, fabricante Merck lote L 448333
- Vidrarias de uso comum no laboratório

4.3 PADRÕES

- Ácido acetilsalicílico - Substância Química de Referência da Farmacopéia Brasileira
lote 1027 - Teor: 100,0 %
- Ácido salicílico - Substância Química de Referência da Farmacopéia Americana
lote J3C400. – Teor: 99,4 %

4.4 PRODUTOS ACABADOS

- Comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg - Salicin® (Greenpharma Q. F.) Lote: 884 -
Validade: julho 2008 (adquiridos do Programa da Farmácia Popular)
- Comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg (Furp)
Lote: 2681 - Validade: agosto 2008 (adquiridos do Programa da Farmácia Popular)
- Comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg - Aspirina® (Bayer)
Lote: 510531 - Validade: agosto 2007 (medicamento referência comprado no comércio local)
- Comprimidos de ácido acetilsalicílico 100 mg - Dormec® (IMEC)
Lote: 0651189 a 0651198 - Validade: abril 2009 (adquiridos do Programa da Farmácia Popular)

5 MÉTODOS

5 MÉTODOS

5.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas para o doseamento do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico nos comprimidos foram as indicadas a seguir:

- Coluna cromatográfica Waters Novapack® C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.)
- Detector de absorção molecular na região do ultravioleta-visível com arranjo de diodos
- Comprimento de onda 230 nm
- Fase móvel – mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila
- Fluxo - 1,0 mL/minuto
- Volume de injeção - 5 µL
- Diluente - fase móvel
- Concentração de trabalho - 0,3 mg/mL (ácido acetilsalicílico) e 9,0 µg/mL (ácido salicílico)

5.2 CUIDADOS E MONITORAMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Durante todo o estudo realizado foram tomados alguns cuidados para que os picos estudados não fossem perturbados, são eles:

- A coluna usada na validação (fabricante Waters) e a coluna usada na determinação da robustez (fabricante Merck) eram novas e estavam dentro da validade.
- A água usada era deionizada com grau CLAE (0,22 µm); a acetonitrila usada era grau CLAE (fabricante Merck); os padrões usados apresentavam certificados da USP (ácido salicílico) e SRQ FB (ácido acetilsalicílico) e os cromatógrafos com procedimento de verificação de desempenho de equipamento realizado anualmente e estavam dentro da validade.
- A pureza dos picos durante a validação foram acompanhadas com auxílio de um detector de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos (DAD) o que permitiu verificar através da varredura se existia alguma absorção estranha nesta região do espectro.

- A temperatura ambiente do laboratório, a temperatura de acondicionamento da coluna (30 °C) e a pressão na coluna foram monitoradas durante todo o estudo.

5.3 COLETA DE AMOSTRAS

Quatro fabricantes do medicamento ácido acetilsalicílico 100 mg (uso infantil) participaram deste estudo. As amostras provenientes de três fabricantes foram recolhidas pela Vigilância Sanitária e fazem parte do Programa da Farmácia Popular do Governo Federal no período de novembro de 2006 a julho de 2007. As amostras providas do outro fabricante foram compradas no comércio local constituindo o medicamento de referência.

5.4 AMOSTRAGEM

Para validação do método, selecionou-se das amostras do Programa da Farmácia Popular dois lotes de amostras de fabricantes diferentes do medicamento que continham 100 mg de ácido acetilsalicílico por comprimido (uso infantil) e uma amostra de um terceiro fabricante que foi comprado no comércio local, perfazendo um total de três produtos diferentes.

Dez lotes de um quarto fabricante (quarto produto) do medicamento que continham 100 mg de ácido acetilsalicílico por comprimido (uso infantil) proveniente do Programa da Farmácia Popular foram analisados pelo método validado. Foram feitas comparações do teor de ácido acetilsalicílico determinado pelo fabricante (por volumetria) e o teor de ácido acetilsalicílico determinado no ensaio de dissolução (por espectrofotometria) com o teor de ácido acetilsalicílico analisado pelo método validado (por CLAE). A Tabela 8 mostra a quantidade dos comprimidos e os fabricantes que participaram deste estudo.

Tabela 8 - Quantitativo de comprimidos usado de cada fabricante neste estudo.

| <i>Fabricante</i> | <i>Coleta</i> | <i>Data</i> | <i>Lote</i> | <i>Nº comprimidos</i> | <i>Estudo</i> |
|------------------------|---------------|-------------|-----------------|-----------------------|---------------|
| <i>1º</i> | ANVISA | 11/2006 | 884 | 20 | Validação |
| <i>2º</i> | ANVISA | 11/2006 | 2681 | 20 | Validação |
| <i>3º (Referência)</i> | Comprado | 11/2006 | 510531 | 20 | Validação |
| <i>4º</i> | ANVISA | 06/2007 | 651189 - 651198 | 200 | Comparação |

5.5 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Tomaram-se vinte comprimidos de cada lote e seus pesos foram determinados individualmente em balança analítica, após a pesagens foram triturados e pulverizados com auxílio de gral e pistilo e colocados em frascos âmbar devidamente lacrados com parafilme e guardados em dessecador. Foi determinado o peso médio de cada lote.

5.6 ADEQUAÇÃO DO SISTEMA

Para a determinação dos parâmetros de adequação do sistema, as soluções descritas na Tabela 9 foram injetadas no cromatógrafo, fabricante Shimadzu com detector de absorção molecular na região do ultravioleta-visível com arranjo de diodos.

Tabela 9 - Soluções usadas na determinação da adequação do sistema

| <i>Solução</i> | <i>Concentração</i> |
|---|-----------------------|
| <i>Diluyente</i> | fase móvel |
| <i>SQR FB ácido acetilsalicílico (AAS)</i> | 1,010 mg/mL |
| <i>Padrão USP ácido salicílico (AS)</i> | 1,022 mg/mL |
| <i>Solução de adequação do sistema (AAS e AS)</i> | (0,505 e 0,511) mg/mL |

5.7 ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

A cinética de degradação do ácido acetilsalicílico foi acompanhada pela reação de desacetilação e conseqüentemente formação de ácido salicílico.

Foi feita uma solução de ácido acetilsalicílico (padrão), esta solução recém preparada (tempo médio de preparo de 25 minutos) foi injetada 30 vezes consecutivamente e o teor de ácido salicílico foi determinado em cada corrida cromatográfica. Na Tabela 10 estão especificadas as soluções que participaram deste estudo.

Tabela 10 - Soluções usadas no estudo da cinética de degradação do ácido acetilsalicílico

| <i>Solução</i> | <i>Concentração</i> |
|--|---------------------|
| <i>Diluyente</i> | fase móvel |
| <i>SQR FB ácido acetilsalicílico (AAS)</i> | 0,302 mg/mL |
| <i>Padrão USP ácido salicílico (AS)</i> | 9,0613 µg/mL |

5.8 DETERMINAÇÃO DA SELETIVIDADE

Foram traçados os espectros de absorção molecular utilizando-se radiação ultravioleta dos picos cromatográficos do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico, em sete níveis diferentes da curva de adição padrão. Foram feitas comparações dos espectros antes, durante e depois do tempo de retenção característico da substância.

5.9 DETERMINAÇÃO DA FAIXA LINEAR DE TRABALHO

A faixa linear de trabalho foi definida conforme o estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Guia de Validação de Métodos Analíticos (ANVISA, 2003).

Para a determinação quantitativa do ácido acetilsalicílico foi escolhida a faixa de 70 % (0,21 mg/mL) a 130 % (0,39 mg/mL) da concentração teórica do teste (0,30 mg/mL), faixa que engloba tanto a faixa para o ensaio de teor (80 % a 120 %) quanto o ensaio de uniformidade de conteúdo (70 % a 130 %) descrito na legislação.

Para a determinação quantitativa do ácido salicílico (impureza) foi escolhida também a faixa de 70 % (6,3 µg/mL) a 130 % (11,7 µg/mL) do limite máximo especificado que é 3 % em relação a massa de ácido acetilsalicílico (9,0 µg/mL), esta faixa engloba a faixa especificada na legislação que é do nível de impureza esperado até 120 % do limite máximo especificado.

5.10 DETERMINAÇÃO DA LINEARIDADE

5.10.1 Delineamento experimental

A primeira etapa do procedimento para avaliação da linearidade, para o ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico, foi o delineamento experimental a seguir: i) determinação da faixa de concentração de interesse, considerando a aplicação do método e que as concentrações esperadas nas amostras devam estar próximas do centro desta faixa; ii) preparo de uma curva analítica com soluções padrão com sete níveis de concentração, igualmente espaçados, preparados independentemente, com três replicatas independentes de cada nível; e iii) injeções das soluções em ordem aleatória (SOUZA, 2007).

A segunda etapa da avaliação da linearidade consistiu na aplicação do MMQO, incluindo estimativa dos parâmetros da regressão e tratamento dos valores extremos: i) aquisição dos dados experimentais (cromatogramas); ii) estimativa da inclinação, interseção, resíduos da regressão, respectivas variâncias e R^2 ; iii) inspeção visual dos dados; iv) construção e inspeção visual do gráfico x-y das respostas versus a concentração do analito; v) investigação e exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados por Jackknife (SOUZA, 2007).

A terceira etapa consistiu na validação do uso do MMQO por meio da verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear: i) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; ii) independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson; iii) homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe; e iv) verificação da significância da regressão e do ajuste ao modelo linear por análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2007). Foi também testado a condição necessária para que a linha passe pela origem (a intercessão não seja significativamente diferente de zero).

5.10.2 Preparo da solução estoque (SE) de ácido acetilsalicílico

Pesou-se três massas de SQR FB Ácido acetilsalicílico, estas massas foram diluídas e transferidas com diluente para balão volumétrico de 20 mL. Considerando a pureza do ácido acetilsalicílico 100 %, o procedimento resultou em três soluções com concentrações de:

1ª Pesada = 60,03 mg ----- 20 mL → Concentração 1ª SE = 3,0015 mg/mL
 2ª Pesada = 60,00 mg ----- 20 mL → Concentração 2ª SE = 3,0000 mg/mL
 3ª Pesada = 60,04 mg ----- 20 mL → Concentração 3ª SE = 3,0020 mg/mL

5.10.3 Preparo da solução estoque (SE) de ácido salicílico

Pesaram-se três massas de SQR USP Ácido salicílico, estas massas foram diluídas e transferidas com diluente para balão volumétrico de 50 mL. Considerando a pureza do ácido salicílico 99,4 %, o procedimento resultou em três soluções com concentrações de:

1ª Pesada = 4,55 mg ----- 50 mL → Concentração 1ª SE = 90,4540 ug/mL
 2ª Pesada = 4,52 mg ----- 50 mL → Concentração 2ª SE = 89,8576 ug/mL
 3ª Pesada = 4,56 mg ----- 50 mL → Concentração 3ª SE = 90,6528 ug/mL

5.10.4 Preparo das soluções de trabalho de ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico

Foram tomadas alíquotas das soluções estoques para o preparo das soluções de trabalho, conforme a Tabela 11 e a Tabela 12. Todas as alíquotas foram retiradas com pipetas Eppendorf e transferidas para balão volumétrico de 20 mL, os quais foram, em seguida, completados com diluente e agitados para homogeneizar seus conteúdos. As soluções preparadas foram injetadas no cromatografo em fase líquida.

Tabela 11 - Quadro dos volumes tomados das soluções estoques e as concentração das soluções de trabalho de ácido acetilsalicílico

| Alíquota (mL) | 1,400 | 1,600 | 1,800 | 2,000 | 2,200 | 2,400 | 2,600 |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1ª Conc. (mg/mL) | 0,210105 | 0,240120 | 0,270135 | 0,300150 | 0,330165 | 0,360180 | 0,390195 |
| 2ª Conc. (mg/mL) | 0,210000 | 0,240000 | 0,270000 | 0,300000 | 0,300000 | 0,360000 | 0,390000 |
| 3ª Conc. (mg/mL) | 0,210140 | 0,240160 | 0,270180 | 0,300200 | 0,330220 | 0,360240 | 0,390260 |

Tabela 12 - Quadro dos volumes tomados das soluções estoques e as concentração das soluções de trabalho de ácido salicílico

| Alíquota (mL) | 1,400 | 1,600 | 1,800 | 2,000 | 2,200 | 2,400 | 2,600 |
|------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| 1ª Conc. (µg/mL) | 6,331780 | 7,236320 | 8,140860 | 9,045400 | 9,949940 | 10,854480 | 11,759020 |
| 2ª Conc. (µg/mL) | 6,290032 | 7,188608 | 8,087184 | 8,985760 | 9,884336 | 10,782912 | 11,681488 |
| 3ª Conc. (µg/mL) | 6,345696 | 7,252224 | 8,158752 | 9,065280 | 9,971808 | 10,878336 | 11,784864 |

5.11 DETERMINAÇÃO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) para o ácido salicílico foi determinado graficamente. O LD é obtido traçando-se uma paralela ao eixo de x a partir da intercessão com o limite superior do intervalo de confiança da curva. A intercessão desta paralela com a linha indicará um valor de x que corresponde ao limite de detecção (LD). Para achar o limite de quantificação (LQ) deve-se primeiro determinar a intercessão do prolongamento horizontal da reta que passa pelo LD com o limite inferior do intervalo da regressão, em seguida traçar a partir deste ponto uma reta vertical até a intercessão com o limite superior do intervalo da regressão. A intercessão da reta (paralela ao eixo da concentração) com a reta de regressão indicará o valor do LQ (THIER P., KIRCHHOFF J., 1992).

5.12 DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO

Foram feitas três curvas analíticas (sete níveis) com adição-padrão em soluções originadas de três fabricantes diferentes cuja os teores de ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico foram previamente determinados. A Exatidão foi comprovada pelo o cálculo da recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão.

5.12.1 Preparo da solução estoque (SE) de ácido acetilsalicílico e de ácido salicílico

Pesou-se três massas de SQR FB Ácido acetilsalicílico transferindo-se para balão volumétrico de 50 mL e diluindo-se com o solvente. Considerando a pureza do ácido acetilsalicílico 100 %, o procedimento resultou em três soluções com concentrações de:

| |
|---|
| 1 ^a Pesada = 150,05 mg ----- 50 mL → Concentração SE1 = 3,0010 mg/mL |
| 2 ^a Pesada = 150,03 mg ----- 50 mL → Concentração SE2 = 3,0006 mg/mL |
| 3 ^a Pesada = 150,02 mg ----- 50 mL → Concentração SE3 = 3,0004 mg/mL |

Pesou-se três massas de SQR USP Ácido salicílico transferindo-se para balão volumétrico de 50 mL e diluindo-se com solvente. Considerando a pureza do ácido salicílico 99.4 %, o procedimento resultou em três soluções com concentrações de:

1ª Pesada = 4,55 mg ----- 50 mL → Concentração SE1 = 90,4540 ug/mL

2ª Pesada = 4,52 mg ----- 50 mL → Concentração SE2 = 89,8576 ug/mL

3ª Pesada = 4,56 mg ----- 50 mL → Concentração SE3 = 90,6528 ug/mL

5.12.2 Preparo das três soluções originadas dos produtos de três fabricantes

Pesou-se três massas dos três produtos (fabricantes) que participaram da validação conforme descritos nos itens 5.4 (amostragem) e 5.5 (preparação da amostra) transferindo-se para balão volumétrico de 20 mL e diluindo-se com o solvente. O procedimento resultou em três soluções com concentrações de:

1º Fab. = 94,64 mg Pó = 60,0774 mg AAS --- 20 mL → Conc.1º F = 3,00387 mg/mL

2º Fab. = 78,56 mg Pó = 60,1186 mg AAS --- 20 mL → Conc.2º F = 3,00593 mg/mL

3º Fab. = 73,02 mg Pó = 59,9852 mg AAS --- 20 mL → Conc.3º F = 2,99926 mg/mL

5.12.3 Preparo das soluções de trabalho para a adição padrão dos ácidos acetilsalicílico e salicílico às soluções originadas dos produtos dos três fabricantes

Foram feitas três curvas de adição padrão para o ácido acetilsalicílico. Tomou-se alíquotas das soluções estoques (SE) de ácido acetilsalicílico e adicionou-se estas alíquotas às soluções das amostras dos três diferentes fabricantes para preparo das soluções de trabalho, conforme a Tabela 13. As alíquotas foram retiradas com pipetas Eppendorf, transferidas para balão volumétrico de 20 mL e diluídas com o solvente. Após homogeneização as soluções foram injetadas no cromatógrafo.

Tabela 13 - Quadro dos volumes (mL) tomados da SE do padrão de ácido acetilsalicílico (AAS) sobre um nível básico da solução do fabricante

| 1º.Fabricante | 2º.Fabricante | 3º.Fabricante | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 |
|---------------|---------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | <i>e</i> | | | | | | | |
| SE 3 | SE 2 | SE 1 | 0 | 0,200 | 0,400 | 0,600 | 0,800 | 1,000 | 1,200 |

1º Fabricante mais SE3– primeira curva de adição padrão de AAS

2º Fabricante mais SE2 – segunda curva de adição padrão de AAS

3º Fabricante mais SE1– terceira curva de adição padrão de AAS

Foram feitas três curvas de adição padrão para o ácido salicílico. Tomou-se alíquotas das soluções estoques (SE) de ácido salicílico e adicionou-se estas alíquotas às soluções das amostras dos três diferentes fabricantes para preparo das soluções de trabalho, conforme a Tabela 14. As alíquotas foram retiradas com pipetas Eppendorf, transferidas para balão volumétrico de 20 mL e diluídas com o solvente e em seguida após homogeneização das soluções foram injetadas no cromatógrafo.

Tabela 14 - Quadro dos volumes (mL) tomados da SE do padrão de ácido salicílico (AS) sobre um nível básico da solução do fabricante

| <i>1º.Fabricante</i> | <i>2º.Fabricante</i> | <i>3º.Fabricante</i> | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 | 1,400 |
|----------------------|----------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | <i>e</i> | | | | | | | |
| <i>SE 3</i> | <i>SE 2</i> | <i>SE 1</i> | 0 | 0,200 | 0,400 | 0,600 | 0,800 | 1,000 | 1,200 |

1º Fabricante mais SE3– primeira curva de adição padrão de AS

2º Fabricante mais SE2 – segunda curva de adição padrão de AS

3º Fabricante mais SE1– terceira curva de adição padrão de AS

5.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MATRIZ

A primeira etapa do procedimento para avaliação do efeito da matriz, para os analitos ácido acetilsalicílico e o ácido salicílico em três matrizes (produtos) individualmente, foi o planejamento descrito a seguir: i) determinação da faixa de concentração de interesse, considerando a aplicação do método e também que as concentrações esperadas nas amostras devam estar próximas do centro desta faixa; ii) preparo de uma curva analítica em solvente e três curvas de adição do analito em três matrizes diferentes, com soluções padrão com sete níveis de concentração, igualmente espaçados; iii) injeções das soluções em ordem aleatória.

A segunda etapa da avaliação do efeito da matriz incluiu a análise de dados e os testes de premissas conforme o item 5.10.1 (delineamento experimental da linearidade). Após a análise da linearidade, o efeito da matriz foi avaliado pelas comparações das inclinações e interseções determinadas para as três curvas de adição do analito nas três matrizes diferentes com a da curva analítica.

É necessário fazer uma ressalva, a avaliação do efeito matriz neste trabalho se restringe às três matrizes testadas, não podendo ser extrapolada para todas as possíveis matrizes que contenham ácido acetilsalicílico e salicílico na forma de comprimidos.

5.14 DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO: REPETITIVIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

5.14.1 Determinação da Repetitividade

Neste estudo foram utilizados três diferentes analistas que trabalharam, cada um deles, com dez alíquotas das amostras dos três diferentes fabricantes. Determinaram-se o teor de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em cada lote analisado foram determinados o desvio padrão(s) e o desvio padrão relativo percentual de repetitividade (DPR_r) dos teores encontrados e estes foram comparados com os limites estabelecidos em função da concentração de analito.

5.14.1.1 Preparo da solução padrão de ácido acetilsalicílico e de ácido salicílico

Pesou-se 24,41 mg de Ácido acetilsalicílico (SQRFB), transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL e diluiu-se com o solvente. Desta solução retirou-se uma alíquota de 5 mL, transferiu-se para balão volumétrico de 20 mL, completou-se o volume e homogeneizou-se. O procedimento resultou em uma solução com concentração de 0,305125 mg de ácido acetilsalicílico por mililitro.

Pesou-se 22,79 mg de Ácido salicílico (USP), transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL. Desta solução retirou-se uma alíquota de 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume e homogeneizou-se. Considerando a pureza do ácido salicílico 99,4%, o procedimento resultou em uma solução com concentração de 9,0613 µg de ácido salicílico por mililitro.

5.14.1.2 Preparo das soluções das amostras originadas dos três fabricantes

Pesou-se dez massas de cada um dos três fabricantes, as massas diluídas e transferidas com diluente para balão volumétrico de 20 mL. Foi retirada uma alíquota de 5 mL e transferida para balão volumétrico de 20 mL, o volume completado com diluente e homogeneizado. A massa das amostras foi escolhida com base no teor declarado pelo fabricante (100 mg de AAS

por comprimido) e o peso médio determinado para cada um dos lotes destes fabricantes conforme Tabela 15.

Tabela 15 - Peso médio dos lotes que participaram da validação

| <i>1º Fabricante (lote 884)</i> | <i>2º Fabricante (lote 2681)</i> | <i>3º Fabricante (lote 510531)</i> |
|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 157,530 mg/comprimido | 130,675 mg/comprimido | 121,730 mg/comprimido |

5.14.2 Determinação da Precisão Intermediária

Foram feitas determinações analíticas do teor de ácido acetilsalicílico e salicílico em dez amostras pesadas do “pool” dos lotes de cada um dos três fabricantes, seguindo esquema apresentado na Tabela 16, no mesmo laboratório, utilizando o mesmo método e os mesmos procedimentos executados pelo 1º analista, porém em dias e equipamento diferente pelo 2º analista e pelo 3º analista.

Tabela 16 - Quadro de analistas, data de análises e equipamentos usados na determinação da precisão intermediária da análise do teor de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico

| | <i>1º analista</i> | <i>2º analista</i> | <i>3º analista</i> |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Data | 31/03/07 à 01/04/07 | 02/04/07 à 04/04/07 | 09/04/07 à 11/04/07 |
| Cromatógrafo | 3 | 5 | 4 |

Para cada lote analisado determinou-se o desvio-padrão da reprodutibilidade interna (S_i) e o desvio padrão relativo percentual da reprodutibilidade (DPR_R) e estes foram comparados com os limites estabelecidos em função da concentração de analito.

5.15 DETERMINAÇÃO DA ROBUSTEZ

Foram feitas injeções em quadruplicatas da solução de adequação do sistema de ácido acetilsalicílico (0,505 mg/mL) com o ácido salicílico (0,511 mg/mL), no cromatógrafo líquido com detector ultravioleta-visível com arranjo de diodos, sob oito combinações de ensaios diferentes conforme a Tabela 7 do item 2.4.10 (robustez).

Depois de ensaiadas as oito combinações, os resultados obtidos foram analisados de acordo com os parâmetros de adequação do sistema conforme Tabela 3 (resolução, assimetria, resolução e pratos teóricos e repetitividade das áreas).

Foram calculados e ordenados todos os setes efeitos (E1 a E7), de maneira a detectar os que foram significativos sobre o resultado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA DO LABORATÓRIO, DA TEMPERATURA E PRESSÃO DA COLUNA

Durante as corridas cromatográficas monitorou-se a temperatura do laboratório e a temperatura e pressão da coluna

As Figuras 7, 8 e 9 estão representados respectivamente, os monitoramentos da temperatura do laboratório, da temperatura de acondicionamento e da pressão da coluna, durante uma corrida cromatográfica da solução de adequação do sistema.

Pose-se ver através dos gráficos apresentados que ocorreram pouca variação dos parâmetros monitorados, demonstrando uma boa estabilidade do sistema.

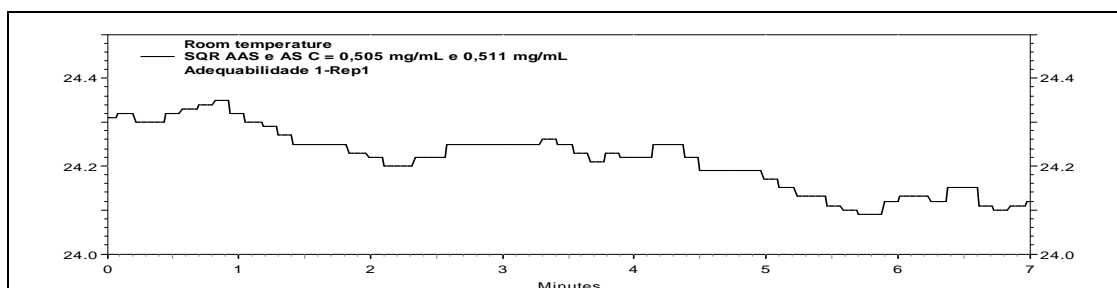


Figura 7 - Monitoramento da temperatura do laboratório durante uma das corridas cromatográficas da solução de adequação do sistema (temperatura em C). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 10 μ L

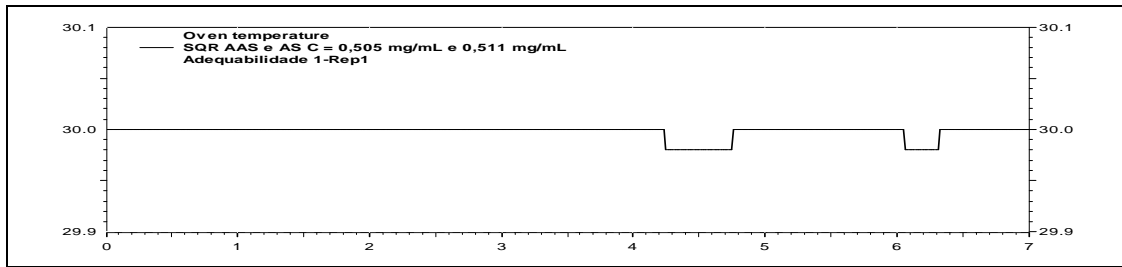


Figura 8 - Monitoramento da temperatura na coluna durante uma das corridas cromatográficas da solução de adequação do sistema (temperatura em C). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 10 μ L

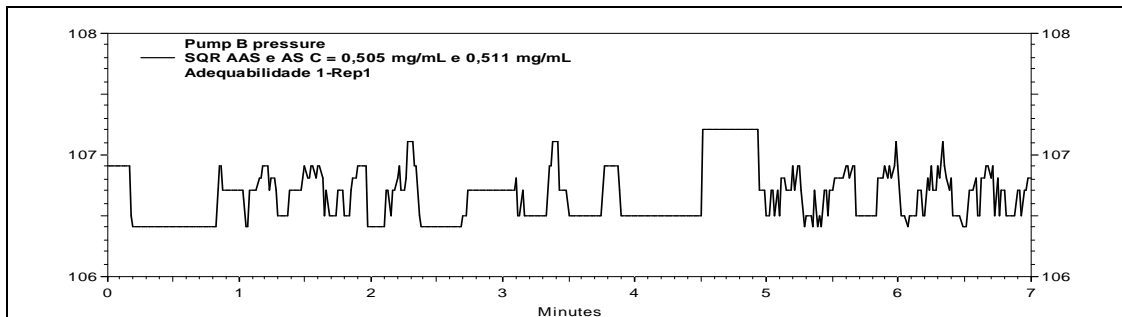


Figura 9 - Monitoramento da pressão na coluna durante uma das corridas cromatográficas da solução de adequação do sistema (pressão em kgf/cm²). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 10 μ L

6.2 RESULTADOS DA ADEQUAÇÃO DO SISTEMA

Os picos cromatográficos do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico apresentaram completa separação. A Figura 10 representa o cromatograma desta separação.

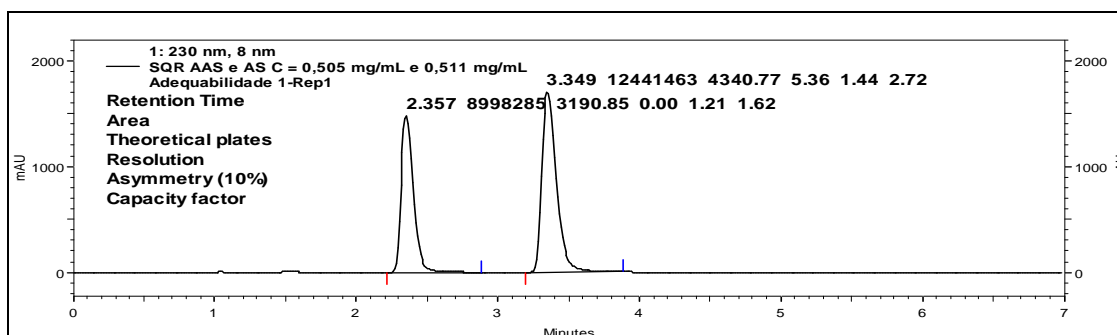


Figura 10 - Separação do ácido acetilsalicílico (2,36 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (3,35 min, 0,511 mg/mL). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 10 μ L

Na Tabela 17 estão indicados os valores médio (com os seus respectivos coeficientes de variação da resolução entre os picos, e os respectivos fatores de cauda e de retenção, o número de pratos teóricos e a repetitividade das áreas. A resolução superior a 2 atesta a qualidade da separação cromatográfica. Os fatores de cauda menores que 2 demonstram a simetria dos picos. Os fatores de retenção encontram-se dentro da faixa de 1 a 10, demonstrando a força eluente adequada da fase móvel. O número de pratos teóricos estão acima do valor recomendado de 2000. A repetitividade está satisfatória, situando-se abaixo do valor preconizado de 2 %.

Tabela 17 – Resolução, fator de cauda, fator de retenção, número de pratos teóricos e repetitividade das áreas dos picos de ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico

| <i>Parâmetro cromatográfico</i> | <i>Ácido acetilsalicílico</i> | <i>Ácido salicílico</i> |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <i>Resolução</i> | - | 5,06 (cv 0,8%) |
| <i>Fator de cauda (*)</i> | 1,20 (cv 1,5%) | 1,26 (cv 2,0%) |
| <i>Fator de retenção</i> | 1,61 (cv 0,2%) | 2,72 (cv 0,4%) |
| <i>Número de pratos teóricos</i> | 2485 (cv 0,5%) | 4177 (cv 1,2%) |
| <i>Repetitividade das áreas</i> | DPR = 0,3% | DPR = 0,2% |

* Fatores de cauda convertidos conforme a Tabela 2 (item 2.2.6)

6.3 RESULTADO DO ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ACETILSALICÍLICO

As soluções recém preparadas foram injetadas e o teor de ácido salicílico no padrão de ácido acetilsalicílico foi determinado. O Gráfico 1 representa a formação de ácido salicílico.

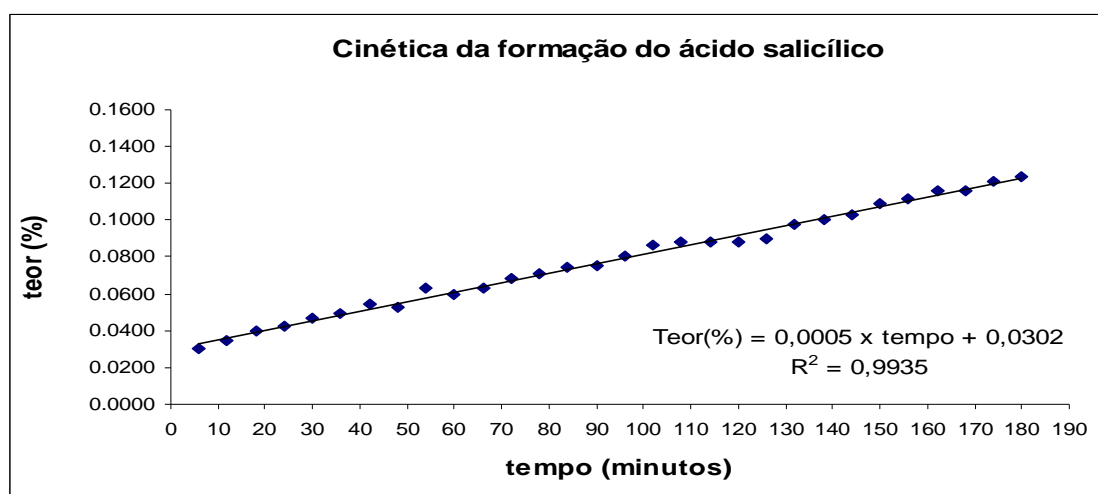


Gráfico 1 – Curva da cinética da formação do ácido salicílico. Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 µL

Verifica-se uma tendência linear da degradação do ácido acetilsalicílico, portanto, para assegurar a confiabilidade dos resultados analíticos, em amostras que estão com o teor de ácido salicílico muito próximo do limite tolerado (3,0 %), deve-se injetar a amostra imediatamente após a sua preparação. Conforme a equação da regressão podemos prever que após vinte e cinco minutos (o tempo de preparo da amostra) haverá um aumento de 0,043 % no teor de ácido salicílico.

6.4 RESULTADO DA VALIDAÇÃO

6.4.1 Resultados da seletividade para o ácido acetilsalicílico e para o ácido salicílico

No monitoramento da pureza dos picos cromatográficos, foram traçados os espectros de absorção molecular no ultravioleta antes, durante e após os picos cromatográficos. Os espectros se sobrepuseram às respectivas substâncias puras (padrão), demonstrando a pureza e a seletividade dos picos.

Na Figura 11 é apresentado um cromatograma obtido após injeção do nível 4 da primeira curva de adição padrão ao primeiro fabricante (item 6.4.5) do produto ácido acetilsalicílico.

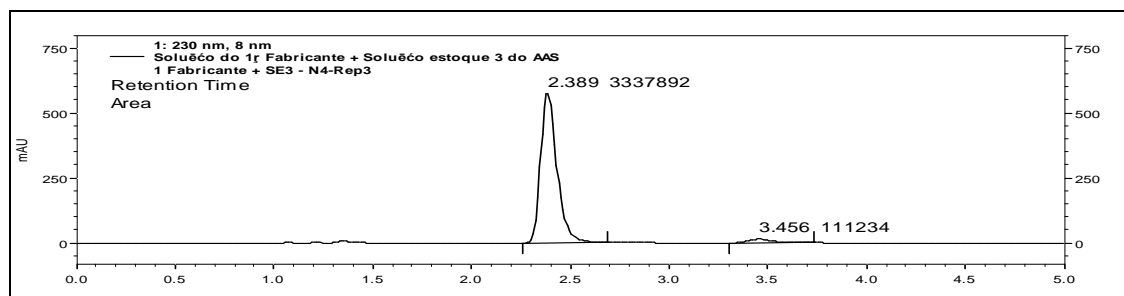


Figura 11 – Picos cromatográficos do ácido acetilsalicílico (2,39 min) e do ácido salicílico (3,46 min). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 5 μ L

Na Figura 12 é apresentado o monitoramento da pureza do pico do ácido acetilsalicílico. Antes do pico em 2,26 min (à esquerda), há somente o ruído de linha de base e em 2,39 min (à direita), o espectro de varredura de absorção molecular no ultravioleta da substância.

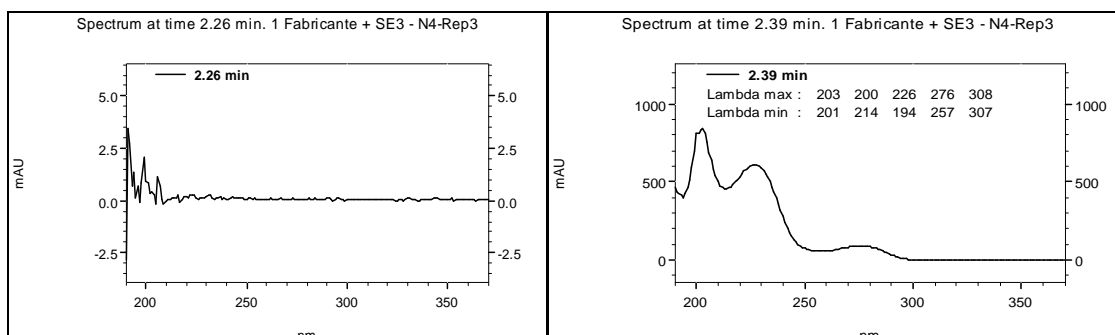


Figura 12 – Espectros de varredura no ultravioleta antes do pico (2,26 min) e no pico de ácido acetilsalicílico (2,39 min) . Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 μ L

A Figura 13 representa o monitoramento da pureza do pico do ácido salicílico. Antes do pico em 3,34 min (a esquerda), há somente o ruído de linha de base e em 3,46 min (a direita), o espectro de varredura de absorção molecular no ultravioleta da substância.

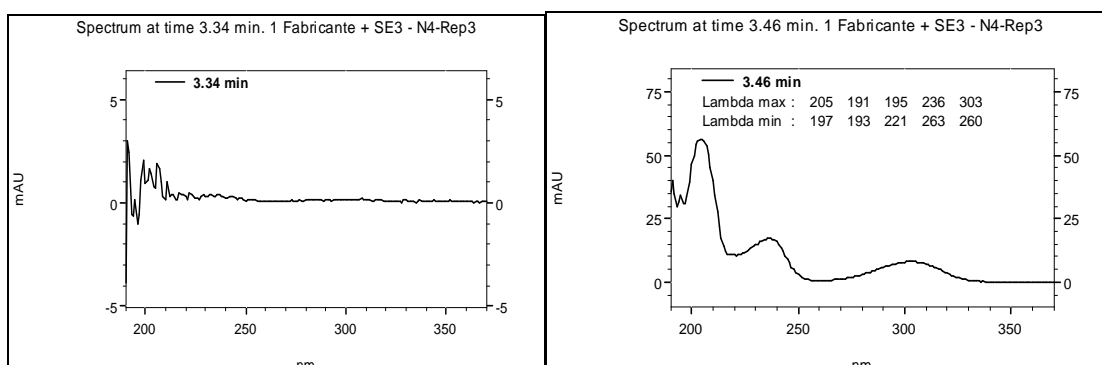


Figura 13 – Espectros de varredura no ultravioleta antes do pico (3,34 min) e no pico de ácido salicílico (3,46 min). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 μ L

A Figura 14 mostra os espectros de varredura de absorção molecular no ultravioleta dos padrões de ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico.

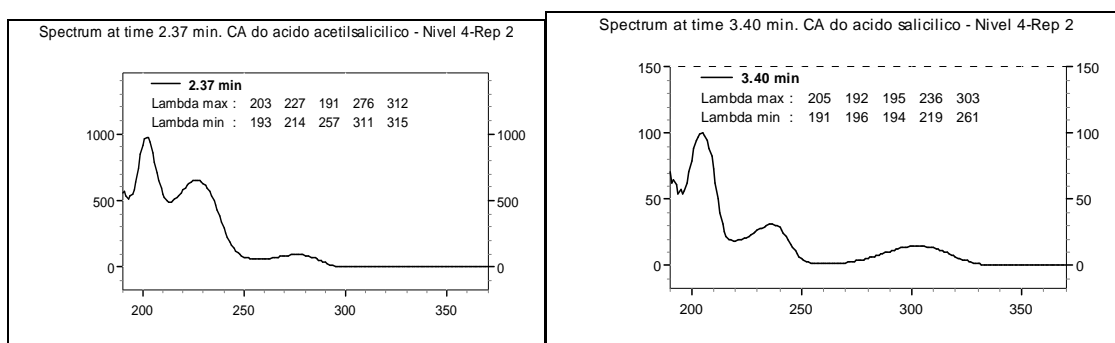


Figura 14 – Espectros de varredura no ultravioleta do padrão de ácido acetilsalicílico (a esquerda) e do padrão de ácido salicílico (a direita). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 μ L

6.4.2 Resultado da curva analítica do ácido acetilsalicílico

Através das injeções das soluções de trabalho usadas na construção da curva analítica de ácido acetilsalicílico, obteve-se as áreas do pico de interesse, as quais são apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de ácido acetilsalicílico



| | <i>Solução estoque 1 (SE1)</i> | | | <i>Solução estoque 2 (SE2)</i> | | | <i>Solução estoque 3 (SE3)</i> | | |
|----------------|--------------------------------|-------------|---------------|--------------------------------|-------------|---------------|--------------------------------|-------------|---------------|
| | <i>mg/mL</i> | <i>area</i> | <i>cv (%)</i> | <i>mg/mL</i> | <i>area</i> | <i>cv (%)</i> | <i>mg/mL</i> | <i>area</i> | <i>cv (%)</i> |
| Nível 1 | 0,210105 | 2520435 | 1,6 | 0,210000 | 2548924 | 1,7 | 0,210140 | 2504273 | 2,1 |
| Nível 2 | 0,240120 | 2902197 | 1,4 | 0,240000 | 2931692 | 2,2 | 0,240160 | 2914637 | 1,1 |
| Nível 3 | 0,270135 | 3249765 | 1,2 | 0,270000 | 3216590 | 1,2 | 0,270180 | 3246173 | 1,0 |
| Nível 4 | 0,300150 | 3672943 | 1,3 | 0,300000 | 3603644 | 1,9 | 0,300200 | 3592707 | 1,8 |
| Nível 5 | 0,330165 | 4056495 | 0,3 | 0,330000 | 4007924 | 1,3 | 0,330220 | 4006274 | 1,1 |
| Nível 6 | 0,360180 | 4389719 | 0,1 | 0,360000 | 4432233 | 0,8 | 0,360240 | 4411293 | 0,7 |
| Nível 7 | 0,390195 | 4726585 | 0,9 | 0,390000 | 4735188 | 1,3 | 0,390260 | 4724429 | 0,8 |

6.4.2.1 Avaliação de Linearidade da curva analítica do ácido acetilsalicílico

A linearidade da curva analítica do ácido acetilsalicílico na faixa de concentração estudada foi confirmada. Foram confirmados e retirados três valores extremos pelo teste Jackknife (em vermelho na Tabela 19). A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homoscedasticidade, a estatística t de Levene não foi significativa ($p > 0,05$). A independência dos resíduos da regressão foi evidenciado pelo teste de Durbin-Watson. Os resultados permitem concluir que a significância da regressão foi alta ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$). O método está livre de tendência (valor p da interceção $> 0,05$).

A Tabela 19 representa o resumo das premissas para a curva analítica do ácido acetilsalicílico

Tabela 19 – Avaliação da linearidade do ácido acetilsalicílico

|  | Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |  | |
|---|---|---|---------------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | |
| Análise: | Acido acetilsalicilico - replicatas independentes - 1, 2 e 3 | | |
| Data de Confeção da Curva: | 22/01/2007 | Curva N ^o : replic. Independente | |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N ^o de Níveis (n): 7 | |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu | Responsável: Jose Luiz | |
| Tabela de dados originais | | | |
| Nível (k) | i | Conc. mg/mL | Resposta area |
| 1 | 01 | 2.10E-01 | 2.52E+06 |
| | 02 | 2.10E-01 | 2.55E+06 |
| | 03 | 2.10E-01 | 2.50E+06 |
| 2 | 04 | 2.40E-01 | 2.90E+06 |
| | 05 | 2.40E-01 | 2.93E+06 |
| | 06 | 2.40E-01 | 2.91E+06 |
| 3 | 07 | 2.70E-01 | 3.25E+06 |
| | 08 | 2.70E-01 | 3.22E+06 |
| | 09 | 2.70E-01 | 3.25E+06 |
| 4 | 10 | 3.00E-01 | 3.67E+06 |
| | 11 | 3.00E-01 | 3.60E+06 |
| | 12 | 3.00E-01 | 3.59E+06 |
| 5 | 13 | 3.30E-01 | 4.06E+06 |
| | 14 | 3.30E-01 | 4.01E+06 |
| | 15 | 3.30E-01 | 4.01E+06 |
| 6 | 16 | 3.60E-01 | 4.39E+06 |
| | 17 | 3.60E-01 | 4.43E+06 |
| | 18 | 3.60E-01 | 4.41E+06 |
| 7 | 19 | 3.90E-01 | 4.73E+06 |
| | 20 | 3.90E-01 | 4.74E+06 |
| | 21 | 3.90E-01 | 4.72E+06 |

Avaliação de Valores Extremos
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

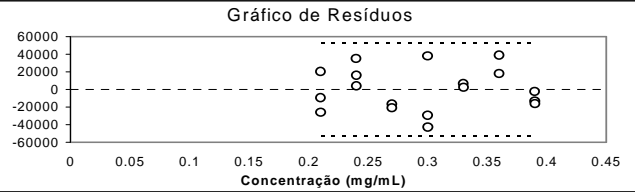
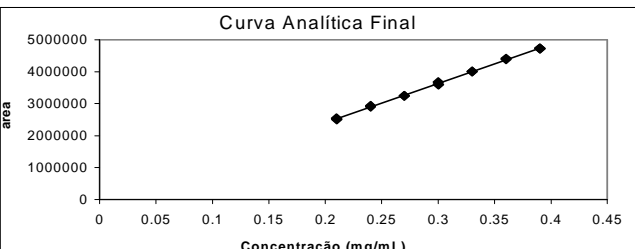


Gráfico de Resíduos



Curva Analítica Final

| | |
|---|------|
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | |
| Req | 0.99 |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.95 |

| | |
|--|------|
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | |
| d (calculado) | 2.10 |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.16 |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.39 |

| | |
|---|----------|
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | |
| Variância Combinada | 6.33E+08 |
| t _L calculado | 7.37E-01 |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.12E+00 |
| p | 4.72E-01 |

| | |
|--|-------------|
| Resumo da Avaliação | |
| Homogeneidade de variância | |
| Há Homocedasticidade | p > 0,05 |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | |
| A regressão é significativa | p < 0,001 |
| Não há desvio de Linearidade | p > 0,05 |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | |
| Não há autocorrelação | d > dU |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | |
| Segue a Normal | Req > Rcrit |

| | | | |
|---|----------|--------------------------|-----------|
| Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bx) | | | |
| <i>Estatísticas da Regressão</i> | | | |
| Coefficiente Angular (b): | 1.23E+07 | Coefficiente Linear (a): | -4.85E+04 |
| r | 0.9995 | R ² | 0.9991 |
| N | 18 | Graus de Liberdade | 16 |

| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
|--|------|----------|----------|----------|----------|
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 1.06E+13 | 1.06E+13 | 1.71E+04 | 1.16E-25 |
| resíduos | 16 | 9.88E+09 | 6.18E+08 | | |
| Ajuste | 4 | 4.33E+09 | 1.08E+09 | 2.34E+00 | 1.14E-01 |
| erro puro | 12 | 5.55E+09 | 4.63E+08 | | |
| total | 17 | 1.06E+13 | | | |

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

| | |
|---|-----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | Pág.: 1/1 |
|---|-----------|

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

6.4.2.2 Avaliação da condição necessária para que a linha da regressão do ácido acetilsalicílico passe pela origem

O Gráfico 2 representa a avaliação de que o intercepto não seja significativamente diferente de zero. O valor determinado de p (0,1078) maior que 0,05 indica que o método está livre de tendência.

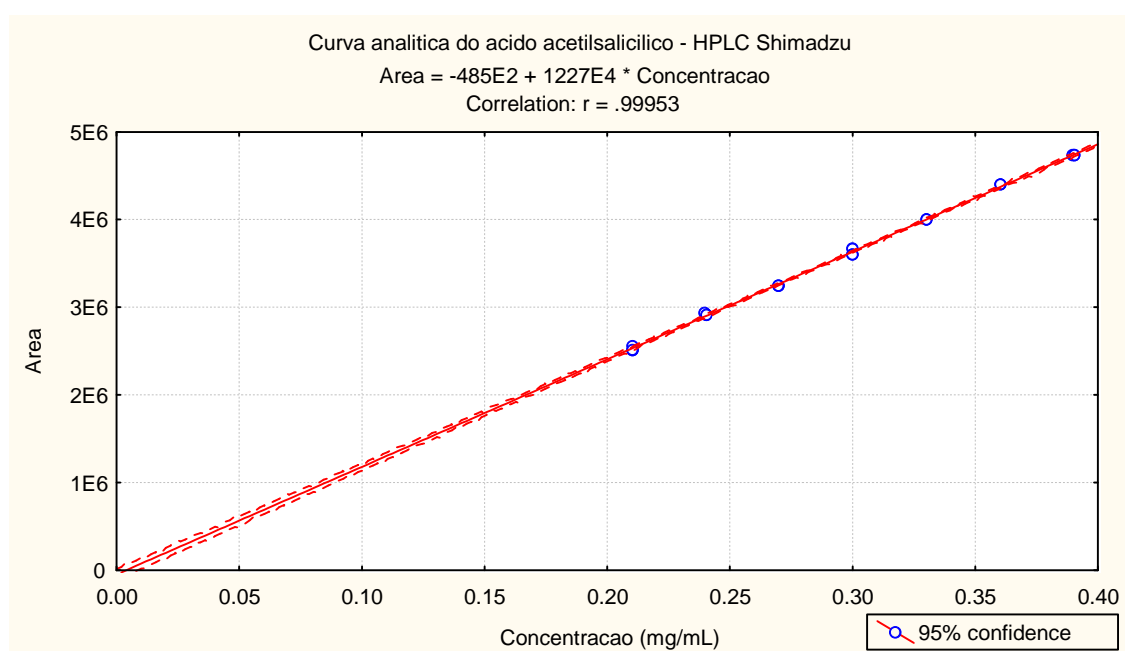


Gráfico 2 – Curva analítica do ácido acetilsalicílico (Statistica 6.0). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 μ L. Valor p do intercepto = 0,1078

6.4.3 Resultado da curva analítica do ácido salicílico

Através das injeções das soluções de trabalho usadas na construção das curvas analíticas de ácido salicílico, obteve-se as áreas do pico correspondente. A Tabela 20 representa as respostas.

Tabela 20 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de ácido salicílico



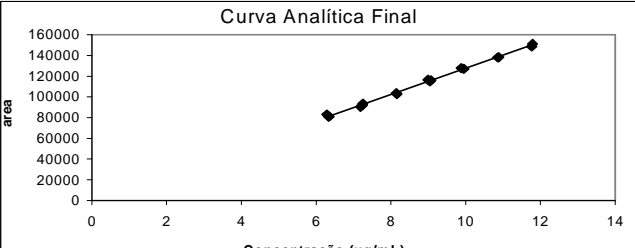
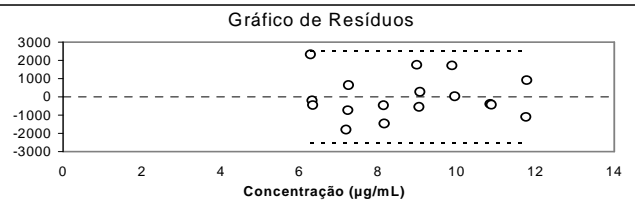
| | <i>Solução estoque 1 (SE1)</i> | | | <i>Solução estoque 2 (SE2)</i> | | | <i>Solução estoque 3 (SE3)</i> | | |
|----------------|--------------------------------|-------------|---------------|--------------------------------|-------------|---------------|--------------------------------|-------------|---------------|
| | <i>µg/mL</i> | <i>area</i> | <i>cv (%)</i> | <i>ug/mL</i> | <i>area</i> | <i>cv (%)</i> | <i>ug/mL</i> | <i>area</i> | <i>cv (%)</i> |
| <i>Nível 1</i> | 6,33178 | 81014 | 0,6 | 6,290032 | 83000 | 0,3 | 6,345696 | 80935 | 0,3 |
| <i>Nível 2</i> | 7,23632 | 91926 | 0,2 | 7,188608 | 90260 | 0,2 | 7,252224 | 93508 | 0,1 |
| <i>Nível 3</i> | 8,14086 | 103656 | 0,3 | 8,087184 | 106595 | 0,8 | 8,158752 | 102885 | 0,3 |
| <i>Nível 4</i> | 9,04540 | 115029 | 0,2 | 8,985760 | 116568 | 0,3 | 9,065280 | 116095 | 0,2 |
| <i>Nível 5</i> | 9,94994 | 127064 | 0,2 | 9,884336 | 127917 | 0,3 | 9,971808 | 123443 | 0,2 |
| <i>Nível 6</i> | 10,85448 | 138088 | 0,3 | 10,782912 | 142709 | 0,1 | 10,878336 | 138349 | 0,2 |
| <i>Nível 7</i> | 11,75902 | 148831 | 0,1 | 11,681488 | 154058 | 0,2 | 11,784864 | 151177 | 0,2 |

6.4.3.1 Avaliação de Linearidade da curva analítica do ácido salicílico

A linearidade da curva analítica do ácido salicílico na faixa de concentração estudada foi confirmada. Foram confirmados e retirados quatro valores extremos pelo teste Jackknife (em vermelho na Tabela 21). A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homocedasticidade, a estatística *t* de Levene não foi significativa ($p > 0,05$). A independência dos resíduos da regressão foi evidenciado pelo teste de Durbin-Watson. Alta significância da regressão ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) foi observado. O método está livre de tendência (valor *p* do intercepto $> 0,05$).

A Tabela 21 representa o resumo das premissas para a curva analítica do ácido salicílico

Tabela 21 – Avaliação da linearidade do ácido salicílico

|  Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde | |  INCQS | | | |
|---|--|---|----------------------|-----------------------|----------|
| AValiação de LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | | | |
| Análise: | Acido salicilico - replicatas independente - 1,2 e 3 | | | | |
| Data de Confeção da Curva: | 22/01/07 | Curva N°: | replic. independente | | |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N° de Níveis (n): | 7 | | |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu | Responsável: | Jose Luiz | | |
| Tabela de dados originais | | | | | |
| Nível (k) | i | Conc. µg/mL | Resposta area | | |
| 1 | 01 | 6.33E+00 | 8.10E+04 | | |
| | 02 | 6.29E+00 | 8.30E+04 | | |
| | 03 | 6.35E+00 | 8.09E+04 | | |
| 2 | 04 | 7.24E+00 | 9.19E+04 | | |
| | 05 | 7.19E+00 | 9.03E+04 | | |
| | 06 | 7.25E+00 | 9.35E+04 | | |
| 3 | 07 | 8.14E+00 | 1.04E+05 | | |
| | 08 | 8.09E+00 | 1.07E+05 | | |
| | 09 | 8.16E+00 | 1.03E+05 | | |
| 4 | 10 | 9.05E+00 | 1.15E+05 | | |
| | 11 | 8.99E+00 | 1.17E+05 | | |
| | 12 | 9.07E+00 | 1.16E+05 | | |
| 5 | 13 | 9.95E+00 | 1.27E+05 | | |
| | 14 | 9.88E+00 | 1.28E+05 | | |
| | 15 | 9.97E+00 | 1.23E+05 | | |
| 6 | 16 | 1.09E+01 | 1.38E+05 | | |
| | 17 | 1.08E+01 | 1.43E+05 | | |
| | 18 | 1.09E+01 | 1.38E+05 | | |
| 7 | 19 | 1.18E+01 | 1.49E+05 | | |
| | 20 | 1.17E+01 | 1.54E+05 | | |
| | 21 | 1.18E+01 | 1.51E+05 | | |
| Avaliação de Valores Extremos (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos) | | | | | |
| Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas. | | | | | |
| Curva Analítica Final | | | | | |
|  | | | | | |
| Gráfico de Resíduos | | | | | |
|  | | | | | |
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | | | | | |
| Req | 0.97 | | | | |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.94 | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | | | | | |
| d (calculado) | 2.08 | | | | |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.13 | | | | |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.38 | | | | |
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | | | | | |
| Variância Combinada | 1.54E+06 | | | | |
| t _i calculado | 1.95E-01 | | | | |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.13E+00 | | | | |
| p | 8.48E-01 | | | | |
| Resumo da Avaliação | | | | | |
| Homogeneidade de variância | | | | | |
| Há Homocedasticidade $p > 0,05$ | | | | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | | | |
| A regressão é significativa $p < 0,001$ | | | | | |
| Não há desvio de Linearidade $p > 0,05$ | | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | | | | | |
| Não há autocorrelação $d > dU$ | | | | | |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | | | | | |
| Segue a Normal $Req > Rcrit$ | | | | | |
| Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$) | | | | | |
| Estatísticas da Regressão | | | | | |
| Coefficiente Angular (b): | 1.27E+04 | Coefficiente Linear (a): | 1.03E+03 | | |
| r | 0.9988 | R ² | 0.9977 | | |
| N | 17 | Graus de Liberdade | 15 | | |
| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 8.91E+09 | 8.91E+09 | 6.38E+03 | 3.85E-21 |
| resíduos | 15 | 2.10E+07 | 1.40E+06 | | |
| Ajuste | 4 | 8.25E+06 | 2.06E+06 | 1.79E+00 | 2.02E-01 |
| erro puro | 11 | 1.27E+07 | 1.15E+06 | | |
| total | 16 | 8.93E+09 | | | |
| Observações | | | | | |
| | | | | | |
| Responsável: _____ | | Data: ___/___/___ | | Verificado por: _____ | |
| Data: ___/___/___ | | | | | |
| AValiação de LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | Pág.:1/1 | | |

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

6.4.3.2 Avaliação da condição necessária para que a linha da regressão do ácido salicílico passe pela origem

O Gráfico 3 representa a avaliação de que o intercepto não seja significativamente diferente de zero. O valor determinado de p (0,4775) maior que 0,05 indica que o método esta livre de tendência.

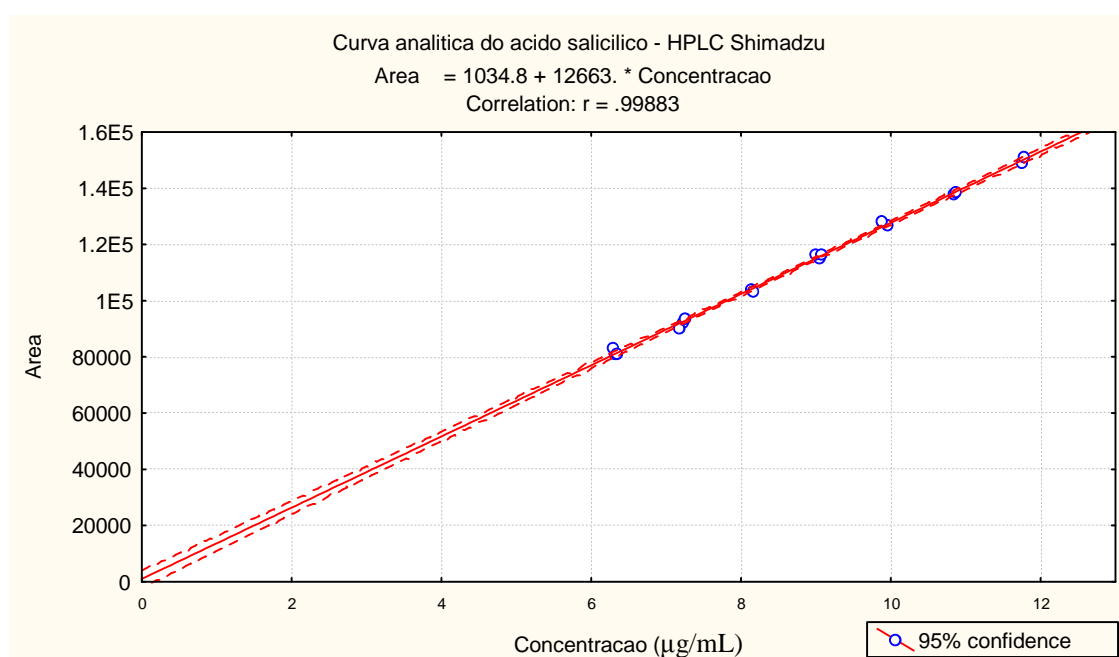


Gráfico 3 – Curva analítica do ácido salicílico (Statistica 6.0). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 µL. Valor p da interceção = 0,4775

6.4.4 Determinação dos limites de detecção e quantificação do ácido salicílico

Os limites de detecção e quantificação foram determinados graficamente a partir da curva analítica do ácido salicílico conforme o Gráfico 4. Os limites deste método são respectivamente 0,23 µg/mL e 0,69 µg/mL.

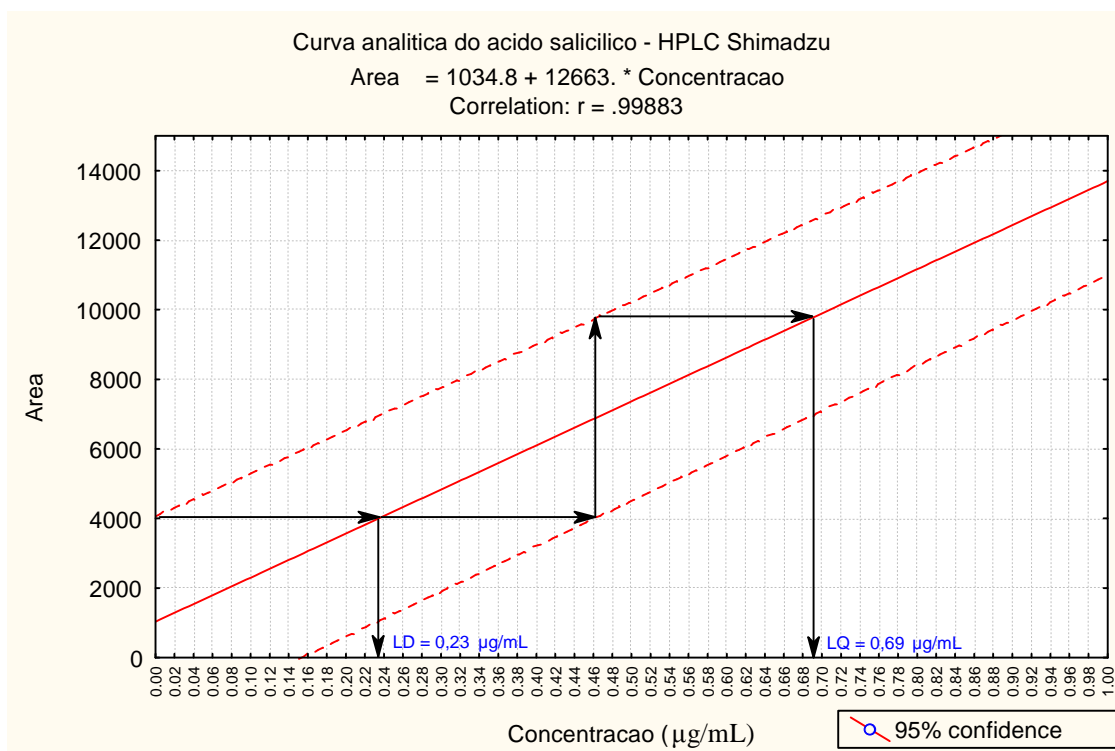


Gráfico 4 - Determinação gráfica do limite de detecção ($0,23 \mu\text{g/mL}$) e do limite de quantificação ($0,69 \mu\text{g/mL}$) na curva analítica do ácido salicílico ampliada (Statistica 6.0). Condições: coluna C18 ($4 \mu\text{m}$, $150 \times 3,9 \text{ mm d.i.}$), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo $1,0 \text{ mL/min}$, detecção 230 nm , temperatura 30°C , volume $5 \mu\text{L}$.

6.4.5 Determinação da exatidão do ácido acetilsalicílico

Através das injeções das soluções de trabalho empregadas na elaboração das curvas de adição padrão de ácido acetilsalicílico, obteve-se as áreas do pico correspondente, apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de adição padrão de ácido acetilsalicílico

| | <i>Primeira curva de adição padrão (1º Fabricante + SE3)</i> | | | <i>Segunda curva de adição padrão (2º Fabricante + SE2)</i> | | | <i>Terceira curva de adição padrão (3º Fabricante + SE1)</i> | | |
|----------------|--|---------|--------|---|---------|--------|--|---------|--------|
| | mg/mL | area | cv (%) | mg/mL | area | cv (%) | mg/mL | area | cv (%) |
| <i>Nível 1</i> | 0,21027 | 2370102 | 2,6 | 0,21042 | 2492225 | 0,2 | 0,20995 | 2427180 | 0,9 |
| <i>Nível 2</i> | 0,24028 | 2745019 | 0,5 | 0,24042 | 2768295 | 0,9 | 0,24020 | 2815191 | 0,8 |
| <i>Nível 3</i> | 0,27028 | 3056527 | 0,5 | 0,27043 | 3098838 | 1,4 | 0,27045 | 3134963 | 1,0 |
| <i>Nível 4</i> | 0,30028 | 3337358 | 0,9 | 0,30043 | 3447588 | 0,8 | 0,30070 | 3478234 | 0,8 |
| <i>Nível 5</i> | 0,33029 | 3686969 | 1,1 | 0,33044 | 3796547 | 0,7 | 0,33095 | 3836709 | 0,7 |
| <i>Nível 6</i> | 0,36029 | 4064287 | 0,4 | 0,36045 | 4060427 | 0,6 | 0,36120 | 4140835 | 0,7 |
| <i>Nível 7</i> | 0,39030 | 4382921 | 1,1 | 0,39045 | 4422030 | 1,5 | 0,39145 | 4501431 | 0,8 |

Verifica-se, conforme a Tabela 23, que a recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão de ácido acetilsalicílico, ficou entre os limites estabelecidos de 90% a 107%, para o nível de concentração de analito do estudo (AOAC,1993; LC/GC,1998), comprovando assim adequada exatidão do método para esta substância.

Tabela 23 – Recuperação calculada a partir das curvas de adição padrão de ácido acetilsalicílico

| | <i>Recuperação na primeira curva de adição padrão (%)</i> | <i>Recuperação na segunda curva de adição padrão (%)</i> | <i>Recuperação na terceira curva de adição padrão (%)</i> |
|----------------|---|--|---|
| <i>Nível 1</i> | - | - | - |
| <i>Nível 2</i> | 101,3 | 97,2 | 101,4 |
| <i>Nível 3</i> | 100,3 | 96,7 | 100,3 |
| <i>Nível 4</i> | 99,6 | 96,9 | 100,1 |
| <i>Nível 5</i> | 99,0 | 97,0 | 100,3 |
| <i>Nível 6</i> | 100,1 | 95,1 | 99,2 |
| <i>Nível 7</i> | 99,6 | 95,6 | 99,5 |

6.4.6 Determinação da exatidão do ácido salicílico

Através das injeções das soluções de trabalho empregadas na elaboração das curvas de adição padrão de ácido salicílico, obteve-se as áreas do pico correspondente, apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24 - Áreas medidas após injeção das soluções de trabalho de adição padrão de ácido salicílico

| | <i>Primeira curva de adição padrão (1º Fabricante + SE3)</i> | | | <i>Segunda curva de adição padrão (2º Fabricante + SE2)</i> | | | <i>Terceira curva de adição padrão (3º Fabricante + SE1)</i> | | |
|----------------|--|--------|--------|---|--------|--------|--|--------|--------|
| | µg/mL | area | cv (%) | µg/mL | area | cv (%) | µg/mL | area | cv (%) |
| Nível 1 | 9,9991 | 114694 | 1,2 | 7,6266 | 95163 | 0,9 | 7,5165 | 106473 | 2,9 |
| Nível 2 | 10,9056 | 128281 | 0,6 | 8,5232 | 106355 | 0,2 | 8,4210 | 123074 | 0,9 |
| Nível 3 | 11,8122 | 138683 | 1,2 | 9,4198 | 118102 | 1,5 | 9,3256 | 133934 | 1,6 |
| Nível 4 | 12,7187 | 150938 | 0,7 | 10,3164 | 128905 | 0,4 | 10,2301 | 144891 | 1,5 |
| Nível 5 | 13,6252 | 161379 | 0,7 | 11,2129 | 139159 | 0,6 | 11,1346 | 160039 | 0,6 |
| Nível 6 | 14,5317 | 172833 | 0,5 | 12,1095 | 151273 | 1,2 | 12,0392 | 172112 | 0,3 |
| Nível 7 | 15,4383 | 183853 | 0,8 | 13,0061 | 163072 | 2,3 | 12,9437 | 183357 | 0,9 |

Verifica-se, conforme a Tabela 25, que a recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão de ácido salicílico, ficou entre os limites estabelecidos de 80% a 110%, para o nível de concentração de analito do estudo (AOAC,1993; LC/GC,1998), comprovando assim adequada exatidão do método para esta substância.

Tabela 25 – Recuperação calculada a partir das curvas de adição padrão de ácido salicílico

| | Recuperação na primeira curva de adição padrão (%) | Recuperação na segunda curva de adição padrão (%) | Recuperação na terceira curva de adição padrão (%) |
|----------------|---|--|---|
| Nível 1 | - | - | - |
| Nível 2 | 102,5 | 100,0 | 103,2 |
| Nível 3 | 102,4 | 100,5 | 101,4 |
| Nível 4 | 103,5 | 100,1 | 100,0 |
| Nível 5 | 103,3 | 99,5 | 101,5 |
| Nível 6 | 103,7 | 100,1 | 100,9 |
| Nível 7 | 103,8 | 100,5 | 100,0 |

6.4.7 Verificação do efeito matriz

A linearidade das curvas de adição padrão do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico na faixa de concentração estudada foi confirmada. A premissa de que os resíduos devem seguir a distribuição normal foi confirmada pelo teste Ryan-Joiner. A variabilidade dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados foi constante, demonstrando homoscedasticidade. A estatística t de Levene não foi significativa ($p > 0,05$). A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson. Uma alta significância da regressão ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) foi observada.

As Tabelas em anexos (A ao D) representa o resumo das premissas para as três curvas de adição padrão do ácido acetilsalicílico. As Tabelas em anexos (E ao H) representam o resumo das premissas para as três curvas de adição padrão do ácido salicílico.

6.4.7.1 Avaliação do efeito matriz nas curvas de adição padrão do ácido acetilsalicílico

O Gráfico 5 representa a comparação entre as curvas de adição padrão (esquerda) e entre estas e a curva analítica de ácido acetilsalicílico (direita).

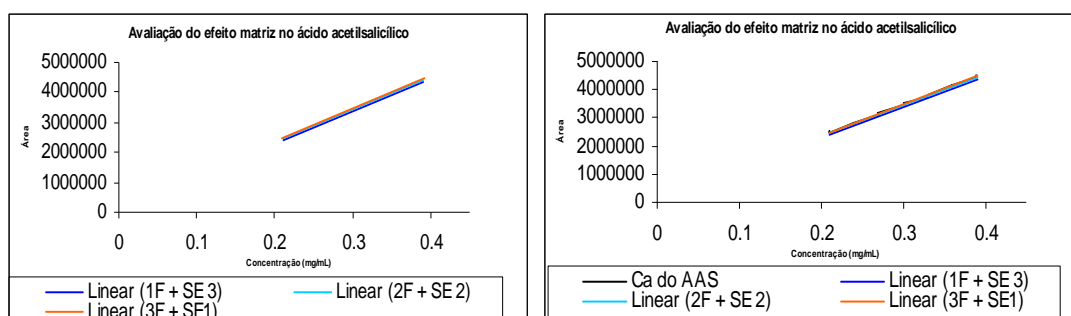


Gráfico 5 – Comparação gráfica entre as curvas de adição padrão do ácido acetilsalicílico (esquerda) e entre as curvas de adição padrão e a curva analítica (direita). Condições: coluna C18 (4 μ m, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 μ L

Os dados apresentados na Tabela 26 indicam que não ocorreu efeito da matriz evidenciado pelas comparações das inclinações e interseções calculadas para as três curvas de adição padrão com a da curva analítica (t cal. < t tab.).

Tabela 26 – Teste t para comparação das curvas de adição padrão de ácido acetilsalicílico com a curva analítica a cada par

| | |
|--|------------------------|
| <i>Equação da curva analítica (Ca)</i> | $y = 1,42E5 + 1,11E7x$ |
| <i>Equação da curva de adição padrão 1 (Cap 1)</i> | $y = 9,43E4 + 1,10E7x$ |
| <i>Equação da curva de adição padrão 2 (Cap 2)</i> | $y = 1,97E5 + 1,08E7x$ |
| <i>Equação da curva de adição padrão 3 (Cap 3)</i> | $y = 7,68E4 + 1,13E7x$ |
| <i>t calculado entre Ca e Cap 1</i> | 0,593 |
| <i>t calculado entre Ca e Cap 2</i> | 0,494 |
| <i>t calculado entre Ca e Cap 3</i> | 0,391 |
| <i>t tabelado</i> <small>10; 0,05</small> | 2,228 |

6.4.7.2 Avaliação do efeito matriz nas curvas de adição padrão do ácido salicílico

O Gráfico 6 representa a comparação efetuada entre as curvas de adição padrão (esquerda) e entre estas e a curva analítica de ácido salicílico (direita).

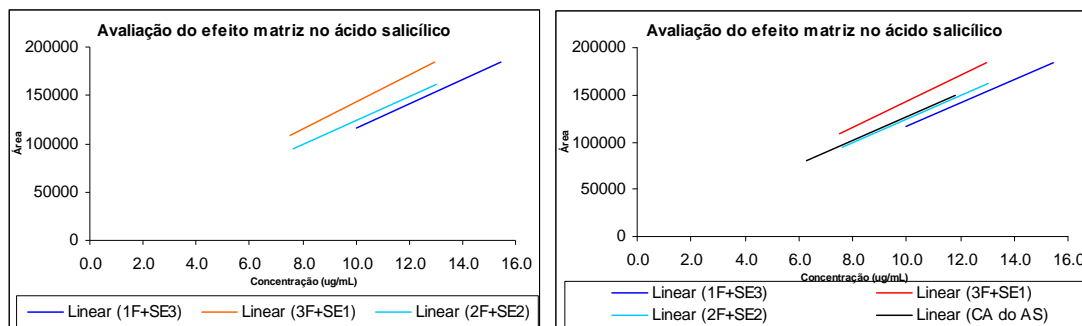


Gráfico 6 – Comparação gráfica entre as curvas de adição padrão do ácido salicílico (esquerda) e entre as curvas de adição padrão e a curva analítica (direita). Condições: coluna C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30° C, volume 5 µL

Os dados apresentados na Tabela 27 indicam que não ocorreu efeito da matriz pelas comparações das inclinações e interseções calculadas para as três curvas de adição padrão com a da curva analítica ($t_{\text{cal.}} < t_{\text{tab.}}$).

Tabela 27 – Teste t para comparação das curvas de adição padrão de ácido salicílico com a curva analítica a cada par

| | |
|---|-------------------------|
| <i>Equação da curva analítica (Ca)</i> | $y = 1,03E3 + 1,27E4x$ |
| <i>Equação da curva de adição padrão 1 (Cap 1)</i> | $y = -8,51E3 + 1,25E4x$ |
| <i>Equação da curva de adição padrão 2 (Cap 2)</i> | $y = 8,48E2 + 1,24E4x$ |
| <i>Equação da curva de adição padrão 3 (Cap 3)</i> | $y = 5,09E3 + 1,38E4x$ |
| <i>t calculado entre Ca e Cap 1</i> | 0,182 |
| <i>t calculado entre Ca e Cap 2</i> | 0,296 |
| <i>t calculado entre Ca e Cap 3</i> | 0,661 |
| <i>t tabelado</i> <small>$_{10; 0,05}$</small> | 2,228 |

6.4.8 Determinação da precisão: repetitividade e precisão intermediária

6.4.8.1 Repetitividade

Os resultados das repetitividades das análises efetuadas em cada fabricante por cada analista (usando o mesmo equipamento e no mesmo dia) estão indicados nas Tabelas 28, 29 e 30. Os valores dos desvios padrão relativos de repetitividade (DPRr) encontrados, atestam a repetitividade do método. Segundo Horwitz (1982), os limites estabelecidos de DPRr em função da concentração do analito não podem ultrapassar 5,3 % para o ácido acetilsalicílico e 10,7 % para o ácido salicílico.

Tabela 28 – Repetitividade do método para o ácido acetilsalicílico e salicílico, análises executada pelo primeiro analista (cromatógrafo Shimadzu 3)

| <i>Teor – primeiro fabricante</i> | | <i>Teor – segundo fabricante</i> | | <i>Teor – terceiro fabricante</i> | |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| <i>(%)</i> | | <i>(%)</i> | | <i>(%)</i> | |
| <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> | <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> | <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> |
| 93,5656 | 1,3905 | 99,7175 | 0,2651 | 99,9412 | 0,2312 |
| 94,1994 | 1,4336 | 97,7308 | 0,2621 | 100,6236 | 0,2362 |
| 94,6797 | 1,3959 | 99,7264 | 0,2859 | 100,0840 | 0,2408 |
| 89,6247 | 1,3915 | 98,5727 | 0,2854 | 99,2488 | 0,2460 |
| 91,3811 | 1,3516 | 98,8918 | 0,2949 | 100,0390 | 0,2541 |
| 96,9327 | 1,4336 | 101,3538 | 0,3084 | 99,4712 | 0,2478 |
| 95,1924 | 1,4573 | 99,0709 | 0,2945 | 100,2219 | 0,2459 |
| 96,7157 | 1,4498 | 99,8874 | 0,3216 | 98,9086 | 0,2263 |
| 93,0160 | 1,4772 | 99,0640 | 0,3203 | 98,5361 | 0,2495 |
| 95,9504 | 1,4818 | 99,7343 | 0,3402 | 98,0931 | 0,2821 |
| <i>média = 94,1257</i> | <i>média = 1,4263</i> | <i>média = 99,3749</i> | <i>média = 0,2978</i> | <i>média = 99,5167</i> | <i>média = 0,2460</i> |
| <i>DPRr = 2,5</i> | <i>DPRr = 2,9</i> | <i>DPRr = 1,0</i> | <i>DPRr = 8,4</i> | <i>DPRr = 0,8</i> | <i>DPRr = 6,2</i> |

DPRr: desvio padrão relativo de repetividade

Tabela 29 – Repetitividade do método para o ácido acetilsalicílico e salicílico, análises executada pelo segundo analista (cromatógrafo Warters 5)

| <i>Teor – primeiro fabricante</i> | | <i>Teor – segundo fabricante</i> | | <i>Teor – terceiro fabricante</i> | |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| <i>(%)</i> | | <i>(%)</i> | | <i>(%)</i> | |
| <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> | <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> | <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> |
| 94,3873 | 1,4175 | 97,0097 | 0,2220 | 99,7467 | 0,2320 |
| 93,9700 | 1,3764 | 95,9987 | 0,1941 | 99,7831 | 0,2378 |
| 93,8545 | 1,4081 | 96,2669 | 0,1892 | 99,3668 | 0,2448 |
| 95,0818 | 1,4435 | 96,1329 | 0,1985 | 96,9526 | 0,2408 |
| 94,6211 | 1,4004 | 100,4876 | 0,2144 | 102,2367 | 0,2770 |
| 94,5090 | 1,3458 | 101,2168 | 0,2223 | 100,5156 | 0,2149 |
| 96,0705 | 1,3583 | 97,0740 | 0,1840 | 98,6614 | 0,2168 |
| 92,4913 | 1,3703 | 99,9128 | 0,2052 | 100,1580 | 0,2311 |
| 92,4549 | 1,3921 | 97,2126 | 0,2197 | 99,1041 | 0,2362 |
| 95,0917 | 1,4193 | 99,8681 | 0,2203 | 99,4750 | 0,2477 |
| <i>média = 94,2532</i> | <i>média = 1,3932</i> | <i>média = 98,1180</i> | <i>média = 0,2070</i> | <i>média = 99,6000</i> | <i>média = 0,2379</i> |
| <i>DPRr = 1,2</i> | <i>DPRr = 2,2</i> | <i>DPRr = 2,1</i> | <i>DPRr = 7,1</i> | <i>DPRr = 1,4</i> | <i>DPRr = 7,3</i> |

DPRr: desvio padrão relativo de repetividade

Tabela 30 – Repetitividade do método para o ácido acetilsalicílico e salicílico, análises executada pelo terceiro analista (cromatógrafo Warters 4)

| <i>Teor – primeiro fabricante</i> | | <i>Teor – segundo fabricante</i> | | <i>Teor – terceiro fabricante</i> | |
|-----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| <i>(%)</i> | | <i>(%)</i> | | <i>(%)</i> | |
| <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> | <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> | <i>acetilsalicílico</i> | <i>salicílico</i> |
| 94,5234 | 1,5198 | 99,4881 | 0,2450 | 99,0104 | 0,2513 |
| 94,0400 | 1,4334 | 99,3938 | 0,2213 | 97,7546 | 0,2332 |
| 94,1258 | 1,4611 | 100,0138 | 0,2339 | 97,8654 | 0,2470 |
| 94,7798 | 1,4883 | 99,1983 | 0,2364 | 98,3404 | 0,2751 |
| 93,8959 | 1,4557 | 99,4811 | 0,2505 | 98,2347 | 0,2926 |
| 95,0829 | 1,4316 | 98,3572 | 0,2134 | 96,5994 | 0,2137 |
| 96,0469 | 1,4803 | 98,4382 | 0,2166 | 96,2281 | 0,2210 |
| 93,6578 | 1,4981 | 97,5916 | 0,2251 | 96,2281 | 0,2359 |
| 97,3036 | 1,5071 | 98,3944 | 0,2343 | 97,2866 | 0,2601 |
| 95,1369 | 1,4859 | 98,7104 | 0,2482 | 96,8228 | 0,2701 |
| <i>média = 94,8593</i> | <i>média = 1,4761</i> | <i>média = 98,9067</i> | <i>média = 0,2325</i> | <i>média = 97,6274</i> | <i>média = 0,2500</i> |
| <i>DPRr = 1,2</i> | <i>DPRr = 2,0</i> | <i>DPRr = 0,7</i> | <i>DPRr = 5,6</i> | <i>DPRr = 0,9</i> | <i>DPRr = 9,9</i> |

DPRr: desvio padrão relativo de repetividade

6.4.8.2 Determinação da Precisão Intermediária

Os resultados das precisões intermediárias das análises efetuadas em cada fabricante pelos três analistas (em equipamentos e dias diferentes) estão indicados nas Tabelas 31 e 32. Os valores dos desvios padrão relativos de reprodutibilidade (DPR_R) encontrados, atestam a reprodutibilidade do método. Segundo Horwitz (1982), os limites estabelecidos de DPR_R em função da concentração do analito não podem ultrapassar 8,0 % para o ácido acetilsalicílico e 16,0 % para o ácido salicílico.

Tabela 31 – Precisão intermediária do método para o ácido acetilsalicílico, análises executadas pelos três analistas (em cromatografos e dias diferentes)

| Primeiro fabricante (%) | | | Segundo fabricante (%) | | | Terceiro fabricante (%) | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 Analista | 2 Analista | 3 Analista | 1 Analista | 2 Analista | 3 Analista | 1 Analista | 2 Analista | 3 Analista |
| (Y1-MdY1) ² | (Y2-MdY2) ² | (Y3-MdY3) ² | (Y1-MdY1) ² | (Y2-MdY2) ² | (Y3-MdY3) ² | (Y1-MdY1) ² | (Y2-MdY2) ² | (Y3-MdY3) ² |
| 0,3148 | 0,0180 | 0,1128 | 0,1173 | 1,2283 | 0,3380 | 0,3206 | 2,6527 | 0,0107 |
| 0,0054 | 0,0802 | 0,6713 | 2,7033 | 4,4914 | 0,2373 | 1,5591 | 2,7725 | 1,3274 |
| 0,3069 | 0,1589 | 0,5380 | 0,1235 | 3,4267 | 1,2257 | 0,5027 | 1,5594 | 1,0843 |
| 20,2588 | 0,6866 | 0,0063 | 0,6437 | 3,9406 | 0,0850 | 0,0159 | 1,3582 | 0,3206 |
| 7,5324 | 0,1353 | 0,9281 | 0,2335 | 5,6150 | 0,3299 | 0,4410 | 16,9636 | 0,4516 |
| 7,8793 | 0,0654 | 0,0500 | 3,9160 | 9,6025 | 0,3019 | 0,0093 | 5,7484 | 5,3234 |
| 1,1379 | 3,3025 | 1,4103 | 0,0924 | 1,0900 | 0,2195 | 0,7173 | 0,2952 | 7,1747 |
| 6,7084 | 3,1043 | 1,4436 | 0,2626 | 3,2212 | 1,7294 | 0,2174 | 4,1618 | 2,6247 |
| 1,2314 | 3,2340 | 5,9745 | 0,0967 | 0,8198 | 0,2625 | 0,7037 | 0,9723 | 4,3427 |
| 3,3297 | 0,7030 | 0,0771 | 0,1291 | 3,0629 | 0,0385 | 1,6432 | 1,8413 | 0,6006 |
| <i>Spi(a,i,t) = 1,62624</i> | | | <i>Spi(a,i,t) = 1,35516</i> | | | <i>Spi(a,i,t) = 1,58367</i> | | |
| <i>média = 94,4127</i> | | | <i>média = 98,7999</i> | | | <i>média = 98,9147</i> | | |
| <i>DPR_R = 1,7</i> | | | <i>DPR_R = 1,4</i> | | | <i>DPR_R = 1,6</i> | | |

Spi(a,i,t): desvio padrão de precisão intermediária em condições intermediária de precisão (a = analista, i = instrumento, t = tempo)

DPR_R : desvio padrão relativo de reprodutibilidade

Tabela 32 – Precisão intermediária do método para o ácido salicílico, análises executadas pelos três analistas (em cromatografos e dias diferentes)

| Primeiro fabricante (%) | | | Segundo fabricante (%) | | | Terceiro fabricante (%) | | |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| 1 Analista | 2 Analista | 3 Analista | 1 Analista | 2 Analista | 3 Analista | 1 Analista | 2 Analista | 3 Analista |
| (Y1-MdY1) ² | (Y2-MdY2) ² | (Y3-MdY3) ² | (Y1-MdY1) ² | (Y2-MdY2) ² | (Y3-MdY3) ² | (Y1-MdY1) ² | (Y2-MdY2) ² | (Y3-MdY3) ² |
| 0.001279 | 0.000592 | 0.001904 | 0.001070 | 0.000225 | 0.000156 | 0.000220 | 0.000035 | 0.000002 |
| 0.000054 | 0.000281 | 0.001820 | 0.001279 | 0.000165 | 0.000125 | 0.000096 | 0.000000 | 0.000283 |
| 0.000922 | 0.000222 | 0.000226 | 0.000143 | 0.000314 | 0.000002 | 0.000027 | 0.000047 | 0.000009 |
| 0.001211 | 0.002530 | 0.000147 | 0.000156 | 0.000072 | 0.000016 | 0.000000 | 0.000008 | 0.000630 |
| 0.005583 | 0.000052 | 0.000417 | 0.000008 | 0.000055 | 0.000327 | 0.000066 | 0.001527 | 0.001814 |
| 0.000054 | 0.002242 | 0.001982 | 0.000112 | 0.000235 | 0.000363 | 0.000003 | 0.000529 | 0.001317 |
| 0.000961 | 0.001216 | 0.000017 | 0.000011 | 0.000528 | 0.000252 | 0.000000 | 0.000446 | 0.000841 |
| 0.000553 | 0.000521 | 0.000483 | 0.000565 | 0.000003 | 0.000054 | 0.000387 | 0.000046 | 0.000199 |
| 0.002593 | 0.000001 | 0.000959 | 0.000504 | 0.000162 | 0.000003 | 0.000012 | 0.000003 | 0.000102 |
| 0.003083 | 0.000684 | 0.000096 | 0.001793 | 0.000177 | 0.000246 | 0.001303 | 0.000096 | 0.000403 |
| <i>Spi(a,i,t) = 0.034794</i> | | | <i>Spi(a,i,t) = 0.018382</i> | | | <i>Spi(a,i,t) = 0.019676</i> | | |
| <i>média = 1.4319</i> | | | <i>média = 0.2458</i> | | | <i>média = 0.2446</i> | | |
| <i>DPR_R = 2.4</i> | | | <i>DPR_R = 7.5</i> | | | <i>DPR_R = 8.0</i> | | |

Spi(a,i,t): desvio padrão de precisão intermediária em condições intermediária de precisão (a = analista, i = instrumento, t = tempo)

DPR_R : desvio padrão relativo de reprodutibilidade

6.4.9 Determinação da robustez

Foram feitas injeções em quadruplicatas da solução de adequação do sistema (conforme item 5.15). As Figuras em anexo (I) mostram os cromatogramas obtidos para as oito combinações diferentes ensaiadas.

Os resultados obtidos foram analisados de acordo com os parâmetros de adequação do sistema (Tabela 3 do item 2.2.9). A Tabela 33 mostra os resultados dos parâmetros obtidos (repetitividade das áreas (DPR), pratos teóricos (PT), Fator de cauda (FC), retenção (Ret) e resolução (Res)).

Tabela 33 – Resultados dos parâmetros obtidos após ensaios das oito combinações

| | | <i>Acido acetilsalicílico</i> | | | | <i>Acido salicílico</i> | | | | |
|-------------|--------|-------------------------------|-----------|------------|-------------|-------------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | | <i>Área</i> | <i>PT</i> | <i>FC*</i> | <i>Ret.</i> | <i>Área</i> | <i>PT</i> | <i>Res.</i> | <i>FC</i> | <i>Ret.</i> |
| Cb 1 | média | 5113052 | 1184 | 1,23 | 1,66 | 7520678 | 2525 | 3,79 | 1,29 | 2,82 |
| | cv (%) | 1,1 | 0,4 | 2,0 | 0,6 | 1,1 | 0,5 | 0,2 | 3,0 | 0,2 |
| Cb 2 | média | 5714182 | 1935 | 1,06 | 2,31 | 8510401 | 3498 | 5,58 | 1,27 | 4,11 |
| | cv (%) | 0,5 | 0,2 | 1,2 | 0 | 0,4 | 0,3 | 0,1 | 1,0 | 0 |
| Cb 3 | média | 4778166 | 2753 | 1,13 | 3,09 | 6965771 | 5869 | 7,01 | 1,26 | 5,34 |
| | cv (%) | 0,3 | 4,6 | 1,9 | 0 | 0,4 | 0,1 | 1,1 | 1,5 | 0 |
| Cb 4 | média | 4798903 | 4072 | 1,04 | 4,44 | 7190366 | 5114 | 8,33 | 1,32 | 7,94 |
| | cv (%) | 0,8 | 0,3 | 1,9 | 0,1 | 0,7 | 2,5 | 0,6 | 2,2 | 0,3 |
| Cb 5 | média | 4565184 | 1195 | 1,14 | 1,67 | 7043354 | 2160 | 3,67 | 1,43 | 2,84 |
| | cv (%) | 0,5 | 0,1 | 0,8 | 0 | 0,5 | 4,3 | 1,1 | 1,1 | 0 |
| Cb 6 | média | 4629201 | 869 | 1,15 | 1,29 | 6825962 | 1698 | 2,89 | 1,26 | 2,18 |
| | cv (%) | 0,4 | 1,1 | 3,1 | 0,4 | 0,2 | 2,0 | 1,8 | 4,5 | 0,6 |
| Cb 7 | média | 5668452 | 3943 | 1,11 | 5,46 | 8755818 | 5268 | 6,52 | 1,40 | 8,51 |
| | cv (%) | 0,4 | 0,6 | 1,7 | 0,4 | 0,4 | 2,5 | 0,5 | 1,8 | 0,4 |
| Cb 8 | média | 5696671 | 4380 | 1,13 | 4,29 | 8540318 | 7056 | 7,08 | 1,26 | 6,72 |
| | cv (%) | 0,4 | 1,0 | 2,0 | 0,2 | 0,4 | 13 | 1,9 | 2 | 0,1 |

* Fatores de cauda convertidos conforme a Tabela 2 (item 2.2.6)

Cb – combinação ensaiada

Os valores de resolução sempre foram superiores a 2, indicando a plena separação entre os picos.

Os valores dos desvios padrão relativos das áreas foram sempre inferiores a 2 %, demonstrando assim satisfatória repetitividade entre as injeções.

Os fatores de cauda dos picos foram sempre inferiores a 2, demonstrando um bom formato dos picos.

Os fatores de retenção foram sempre superiores a um e inferiores a vinte, demonstrando uma boa diferenciação do volume morto da coluna.

O número de pratos teóricos nas combinações 1 e 6 para o ácido acetilsalicílico apresentaram-se inferiores ao recomendado ($N > 2000$), este fato se justifica pelo desgaste natural devido ao uso da coluna (Waters C18) durante os trabalhos de validação, uma vez que a robustez foi a última etapa do estudo.

O declínio de performance da coluna pode ser evidenciada comparando os parâmetros obtidos no estudo inicial de adequação do sistema (Tabela 17), com os mesmos parâmetros obtidos no estudo da robustez no ensaio da combinação 1 (Tabela 33), conforme a Tabela 34.

Tabela 34 – Comparação dos parâmetros obtidos no início e no final do estudo da validação

| <i>Para o AAS</i> | <i>DPR (áreas)</i> | <i>PT</i> | <i>Res</i> | <i>FC</i> | <i>Ret</i> |
|------------------------------|--------------------|-----------|------------|-----------|------------|
| <i>Início</i> | | | | | |
| <i>adequação do sistema</i> | 0,3 | 2485 | 5,06 | 1,20 | 1,61 |
| <i>Final</i> | | | | | |
| <i>robustez Combinação 1</i> | 1,1 | 1184 | 3,79 | 1,23 | 1,66 |

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o método é robusto, em relação a pequenas alterações positivas no pH da fase móvel (2,3 → 2,6), composição da fase móvel (30 → 20% de orgânico), temperatura da coluna (30° → 25°C), fluxo da fase móvel (1,0 → 1,2 mL/minuto), diferente fabricante de coluna (Waters → Merck) e tempo de extração no ultra-son (5 → 10 minutos).

A robustez do método em relação a analistas, equipamentos e dias diferentes foi avaliada na determinação da precisão intermediária e foi considerada satisfatória conforme Tabelas 31 e 32.

Foram calculados todos os setes efeitos (E1 a E7). As Tabelas 35 e 36 mostram respectivamente os efeitos determinados para cada variação de fator na determinação do ácido acetilsalicílico e na determinação do ácido salicílico de acordo com o item 2.4.10 (robustez - cálculo do efeito)

Tabela 35 - Resultados dos efeitos na determinação do ácido acetilsalicílico

| <i>Fatores</i> | <i>Res.</i> | <i>FC</i> | <i>Ret.</i> | <i>PT</i> | <i>DPR</i> |
|---|-------------|-----------|-------------|-----------|------------|
| 1. Variação do pH da fase móvel (2,3 → 2,6) | 1,14 | -0,02 | -0,30 | -111 | 0,24 |
| 2. Variação da composição da fase móvel (30 → 20) % orgânico | -3,25 | 0,05 | -2,59 | -2491 | 0,17 |
| 3. Variação da temperatura da coluna (30 → 25) C | -0,72 | 0,06 | -0,11 | -545 | 0,06 |
| 4. Variação do fluxo da fase móvel (1,0 → 1,2) mL/minuto | 0,26 | 0,01 | 0,81 | 639 | 0,07 |
| 5. Diferente fabricante de coluna (Waters → Merck) | -0,83 | 0,07 | -0,89 | -490 | 0,01 |
| 6. Estabilidade das soluções (1 → 2) dias de preparo | 0,22 | 0,03 | -0,03 | 333 | 0,30 |
| 7. Tempo de extração no ultrason (5 → 10) minutos de extrason no ultrason | -0,45 | 0,02 | 0,37 | -49 | 0,26 |

Tabela 36 - Resultados dos efeitos na determinação do ácido salicílico

| <i>Fatores</i> | <i>Res.</i> | <i>FC</i> | <i>Ret.</i> | <i>PT</i> | <i>DPR</i> |
|--|-------------|-----------|-------------|-----------|------------|
| 1. Variação do pH da fase móvel <i>(2,3 → 2,6)</i> | 1,14 | -0,05 | -0,01 | 206 | 0,24 |
| 2. Variação da composição da fase móvel <i>(30 → 20) % orgânico</i> | -3,25 | 0,01 | -4,14 | -3357 | 0,08 |
| 3. Variação da temperatura da coluna <i>(30 → 25) C</i> | -0,72 | 0,07 | -0,36 | -386 | 0,19 |
| 4. Variação do fluxo da fase móvel <i>(1,0 → 1,2) mL/minuto</i> | 0,26 | -0,01 | 0,97 | 877 | 0,09 |
| 5. Diferente fabricante de coluna <i>(Waters → Merck)</i> | -0,83 | -0,09 | -1,58 | 277 | 0,01 |
| 6. Estabilidade das soluções <i>(1 → 2) dias de preparo</i> | 0,22 | 0,02 | 0,05 | 130 | 0,31 |
| 7. Tempo de extração no ultrason <i>(5 → 10) minutos de extrason no ultrason</i> | -0,45 | 0,01 | 0,61 | -995 | 0,19 |

Os efeitos foram avaliados com a finalidade de revelar aqueles efeitos mais significante nos resultados dos parâmetros da adequação do sistema para as duas substâncias.

Na resolução dos picos, o efeito da variação da composição da fase móvel foi o mais significativo. Sugere-se trabalhar com a composição de 30 % de orgânico.

No desvio padrão relativo das áreas, o efeito da estabilidade das soluções foi o que provocou maiores variações donde conclui-se que é importante que se trabalhe com soluções preparadas no dia da injeção.

No fator de cauda dos picos, não houve efeito capaz de causar variações significativa, todos os valores foram próximo do zero.

Nos fatores de retenção e número de pratos teóricos, o efeito da variação da composição da fase móvel foi o mais significativo, portanto sugere-se trabalhar com a composição de 30 % de orgânico.

6.4.10 Comparação dos resultados

Foram analisados pelo método validado dez lotes (651189 a 651198) de um quarto fabricante conforme o esquema apresentado na Tabela 8 (item 5.4 amostragem) dos medicamentos que continham 100 mg de ácido acetilsalicílico por comprimido proveniente do Programa da Farmácia Popular.

Foram feitas comparações do teor de ácido acetilsalicílico determinado no ensaio de dissolução (por espectrofotometria) com aquele determinado pelo método validado (por CLAE).

A Tabela 37 - mostra os teores e as técnicas usadas por cada laboratório do INCQS na determinação de ácido acetilsalicílico (AAS). Também é mostrado os teores de ácido salicílico (AS) dosado pelo novo método.

Tabela 37 - Teores de ácido acetilsalicílico encontrados em dez amostras do quarto fabricante, análises por CLAE e por espectrofotometria

| <i>INCQS</i> | <i>Fabricante</i> | <i>Método novo</i> | <i>Método novo</i> | <i>Dissolução</i> |
|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| <i>nº Amostra</i> | lote | <i>AAS-CLAE</i> | <i>AS-CLAE</i> | <i>AAS-Espec.</i> |
| | | (%) | (%) | (%) |
| <i>1696/2007</i> | 651189 | (95 ± 3) | 0,69 | (97 ± 2) |
| <i>1715/2007</i> | 651190 | (93 ± 2) | 0,61 | (96 ± 5) |
| <i>1720/2007</i> | 651191 | (94 ± 1) | 0,91 | (94 ± 4) |
| <i>1718/2007</i> | 651192 | (95 ± 1) | 0,81 | (100 ± 3) |
| <i>1697/2007</i> | 651193 | (99 ± 2) | 0,87 | (97 ± 2) |
| <i>1717/2007</i> | 651194 | (93 ± 2) | 0,78 | (96 ± 3) |
| <i>1719/2007</i> | 651195 | (94 ± 3) | 0,74 | (97 ± 2) |
| <i>1716/2007</i> | 651196 | (98 ± 2) | 0,72 | (93 ± 6) |
| <i>1714/2007</i> | 651197 | (98 ± 1) | 0,70 | (100 ± 4) |
| <i>1713/2007</i> | 651198 | (103 ± 1) | 0,65 | (99 ± 3) |

Com base na Tabela 37 foi aplicado o teste t para comparação de médias. O valor de t calculado foi menor que o valor de t tabelado, portanto, não há diferença significativa (nível de confiança de 95 %), entre os resultados dos teores analisados pelo método proposto por CLAE comparados aos teores por espectrofotometria. A Tabela 38 representa estas comparações.

Tabela 38 - Teste t para comparações das médias dos teores de ácido acetilsalicílico

| <i>INCQS</i> | <i>desvios</i> |
|--|--|
| <i>amostra</i> | <i>média CLAE – média espectrofotometria</i> |
| 1696/2007 | -2.220 |
| 1715/2007 | -2.550 |
| 1720/2007 | -0.090 |
| 1718/2007 | -4.270 |
| 1697/2007 | 2.210 |
| 1717/2007 | -3.000 |
| 1719/2007 | -2.940 |
| 1716/2007 | 5.790 |
| 1714/2007 | -1.060 |
| 1713/2007 | 3.270 |
| <i>média</i> | -0.486 |
| <i>s</i> | 3.252 |
| <i>t cal.</i> | 0.47 |
| <i>t tab.</i>_{9; 0,05} | 2.26 |

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A validação do método estudado produziu resultados adequados para garantir a confiabilidade dos resultados analíticos de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico em comprimidos realizadas no INCQS.

O estudo da cinética de degradação do ácido acetilsalicílico demonstrou ser uma boa ferramenta para assegurar uma previsão do aumento do teor de ácido salicílico em função do tempo, previsão necessária principalmente em amostras que apresentam teor de ácido salicílico próximo ao limite de restrição (3,0 %).

Pelo estudo da robustez foi possível constatar que este método pode ser utilizado para dosar o teor de ácido acetilsalicílico e ácido salicílico sob as oito combinações testadas, dentro dos limites estabelecidos para os parâmetros de adequação do sistema. Foi possível também verificar os efeitos mais significativos, principalmente com respeito aos resultados de resolução.

A comparação dos resultados demonstraram não haver diferença significativa do teor de ácido acetilsalicílico determinado pelas técnicas estudadas, em presença de teores de ácido salicílico menores que 1 %.

Futuramente os resultados da validação apresentados neste trabalho poderão ser reavaliados pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira (CPRFB) e, sendo aprovada a monografia é enviada à apreciação e oficialização da Anvisa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS.BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, Shirley de Mello Pereira. *O uso da eletroforese capilar para determinação da migração química em alimentos em contato com embalagens*. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro/Instituto de Química, 1998.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, D.O.U. 02/06/2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). REBLAS (Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde). Tradução dos Guias da EURACHEM. Métodos adequados ao uso - Guia de laboratório para validação de métodos e tópicos relacionados. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/reblas/eurachem/index.htm>>. Acesso em: março de 2007.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *AOAC Official methods of analysis*. Appendix D: guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis. Washington: AOAC, 2002.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. *Statistical methods in medical research*. Oxford: Blackwell Science Ltda., 1994. 620 p.

BELSLEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. *Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity*. New York: Wiley, 1980. 292 p.

BEMELMANS, Tatiana Alves de Souza Abrantes. *Nível residual de estireno em embalagem de poliestireno para alimentos*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Instituto de Tecnologia, 2003.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. *J.Am. Stat. Assoc.*, v. 69, p. 364-367, 1974.

BRUCE, B.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim. Acta*, v. 128, p. 93-106, 1998.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. *Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação*. Ed. UFSCar. Universidade Federal de São Carlos, Série apontamentos, São Paulo: 2001.

DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas, DEF 2004/05, 32 ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 2003, p. 103 - 107.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. *Applied regression analysis*. New York: Wiley. 1998. 706 p.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. *Biometrika*, v. 38, p. 159-178, 1951.

EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics*. Teddington: LGC, 1998. 61 p.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. Atheneu: São Paulo, 2002.

FERRAZ, V. *Cromatografia líquida de alta eficiência*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001. 32 p.

FURMAN, W. B.; DORSEY, J.G.; SNYDER, L.R. *Testes de sensibilidade do sistema para métodos oficiais de cromatografia líquida e gasosa: ajustes versus modificações*. *Pharm. Techno.*, 1998.

GRUBBS, F. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, v. 11, p. 1-21, 1969.

HORWITZ, W. Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.*, v. 54, p. 67A-76A, 1982.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure Appl. Chem.*, v.67, p. 331-343, 1995.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC/GC Int.*, Feb., p. 96-105, 1998.

ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). *Validation of analytical procedures: methodology*. Geneva: ICH/IFPMA, 1996. 8 p.

INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. *Atividades institucionais*, 2001-2004. Rio de Janeiro.

INMAN, E.L.; FRISCHMAN, J.K.; JIMENEZ, P.J.; WINKEL, G.D.; PERSINGER, M.L.; RUTHEFORD, B.S. General method validation guidelines for pharmaceutical samples. *J. Chromatogr. Sci.*, v. 25, p. 252-256, 1987.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). *DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007).

JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. I. General concepts and guidelines. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, v. 19, p. 719-736, 1996.

KOROLKOVAS A., *Análise Farmacêutica*. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Dois, 1984, p. 2-33.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S.G.; HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.). *Contributions to probability and statistics*. Stanford: University Press, 1960. p. 278-292.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. *Statistics for analytical chemistry*. New York: Ellis Horwood Limited. 1993. p. 101-141.

NATA (National Association of Testing Authorities - Australia). *Technical note 17. Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods*. Sydney: NATA, 1997. 8 p.

PIOVESAN, M. F. *A construção política da agência nacional de vigilância sanitária*. Rio de Janeiro: Fiocruz/ ENSP, 2002.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. *Normal probability plots and tests for normality*. The State College: Pennsylvania State University, 1976. 15 p.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. *A procedure to assess linearity by ordinary least squares method*. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais/Faculdade de Farmácia/Departamento de Alimentos, 2005.

SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos*. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais/Faculdade de Farmácia/Departamento de Alimentos, 2007.

SILVA, A.C.P. *O laboratório oficial na avaliação analítica*. In: Fundamentos da Vigilância Sanitária (Rozenfeld S.,org.). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2000, p. 271-301.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. Ames: Iowa State University, 1989. 503 p.

THIER P.; KIRCHHOFF J. *Manual of pesticide residue analysis*. DFG-Konzept. Federal Republic of German, 1992.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, v. 74, p. 835-855, 2002.

TRIOLA, M. F. *Introdução à Estatística*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1999, 410p.

THE UNITED STATES PHARMACOPÉIA. USP 30 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. US-FDA; Guidance for Industry, *Analytical Procedures and Method Validation*, 2000.

VESSMAN, J. *Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. J.Pharm.Biom. Anal.*, v. 14, p. 867-869, 1996.

VESSMAN, J.; STERFAN, R.I.; VAN STADEN, J.E.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.*; v. 73, p. 1381-1386, 2001.



WEISBERG, S. *Applied linear regression*. New York: Wiley, 1985. 324 p.

ZILDA,P.S. ; COROA,M.L. *Vigilância Sanitária: Um Histórico Discursivo*, 1998.

QMCWEB – Revista eletrônica do Departamento de Química – UFSC, Florianópolis (MINATTI, 2005). Disponível em:
<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/aspirina.html>. Acesso em 03 de maio de 2007.

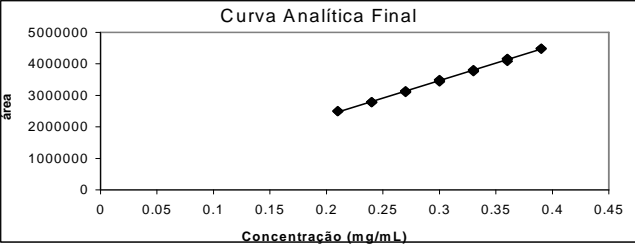
ANEXO A – Tabela da avaliação da linearidade da curva analítica de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

Anexo A – Avaliação da linearidade do ácido acetilsalicílico

|  | Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |  | |
|---|---|---|---------------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | |
| Análise: | Curva analítica do ácido acetilsalicílico | | |
| Data de Confeção da Curva: | 15/03/2007 | Curva N ^o : 7 | |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N ^o de Níveis (n): 7 | |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu | Responsável: José Luiz | |
| Tabela de dados originais | | | |
| Nível (k) | i | Conc. mg/mL | Resposta área |
| 1 | 01 | 2.10E-01 | 2.50E+06 |
| | 02 | 2.10E-01 | 2.51E+06 |
| | 03 | 2.10E-01 | 2.49E+06 |
| 2 | 04 | 2.40E-01 | 2.79E+06 |
| | 05 | 2.40E-01 | 2.78E+06 |
| 3 | 07 | 2.70E-01 | 3.13E+06 |
| | 08 | 2.70E-01 | 3.10E+06 |
| | 09 | 2.70E-01 | 3.14E+06 |
| 4 | 10 | 3.00E-01 | 3.48E+06 |
| | 11 | 3.00E-01 | 3.44E+06 |
| | 12 | 3.00E-01 | 3.49E+06 |
| 5 | 13 | 3.30E-01 | 3.76E+06 |
| | 14 | 3.30E-01 | 3.79E+06 |
| | 15 | 3.30E-01 | 3.81E+06 |
| 6 | 16 | 3.60E-01 | 4.16E+06 |
| | 17 | 3.60E-01 | 4.08E+06 |
| | 18 | 3.60E-01 | 4.17E+06 |
| 7 | 19 | 3.90E-01 | 4.47E+06 |
| | 20 | 3.90E-01 | 4.49E+06 |
| | 21 | 3.90E-01 | 4.49E+06 |

Avaliação de Valores Extremos
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Curva Analítica Final

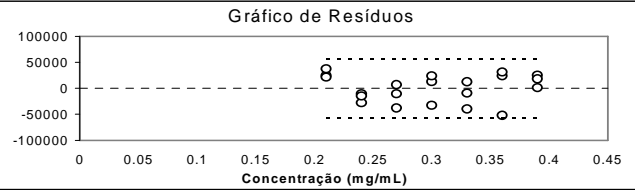


Gráfico de Resíduos

| | |
|---|------|
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | |
| Req | 0.97 |
| Rcrit ($\alpha = 0,05$) | 0.95 |

| | |
|--|------|
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | |
| d (calculado) | 2.12 |
| dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$ | 1.22 |
| dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$ | 1.42 |

| | |
|---|-----------|
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | |
| Variância Combinada | 7.98E+08 |
| t _i calculado | -1.69E-02 |
| t _{tabelado} ($\alpha = 0,05$) | 2.09E+00 |
| p | 9.87E-01 |

| | |
|---|-------------|
| Resumo da Avaliação | |
| Homogeneidade de variância | |
| Há Homocedasticidade | $p > 0,05$ |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | |
| A regressão é significativa | $p < 0,001$ |
| Não há desvio de Linearidade | $p > 0,05$ |
| Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$) | |
| Não há autocorrelação | $d > dU$ |
| Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$) | |
| Segue a Normal | Req > Rcrit |

| | | | |
|--|----------|-------------------------|----------|
| Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$) | | | |
| <i>Estatísticas da Regressão</i> | | | |
| Coeficiente Angular (b): | 1.11E+07 | Coeficiente Linear (a): | 1.42E+05 |
| r | 0.9992 | R ² | 0.9985 |
| N | 21 | Graus de Liberdade | 19 |



| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
|--|------|----------|----------|----------|----------|
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 9.31E+12 | 9.31E+12 | 1.26E+04 | 2.80E-28 |
| resíduos | 19 | 1.40E+10 | 7.39E+08 | | |
| Ajuste | 4 | 4.97E+09 | 1.24E+09 | 2.06E+00 | 1.37E-01 |
| erro puro | 15 | 9.06E+09 | 6.04E+08 | | |
| total | 20 | 9.32E+12 | | | |

Observações

Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

ANEXO B – Tabela da avaliação da linearidade da primeira curva de adição padrão de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

Anexo B – Avaliação da linearidade da primeira curva de adição padrão do ácido acetilsalicílico

|  Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde | |  INCQS | |
|---|---|---|--------------------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | |
| Análise: | Primeira curva de adição padrão do ácido acetilsalicílico | | |
| Data de Confeção da Curva: | 15/3/2007 | Curva N°: | 1 Fabricante + SE3 |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N° de Níveis (n): | 7 |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu 3 | Responsável: | José Luiz |
| Tabela de dados originais | | | |
| Nível (k) | i | Conc. mg/mL | Resposta área |
| 1 | 01 | 2.10E-01 | 2.30E+06 |
| | 02 | 2.10E-01 | 2.39E+06 |
| | 03 | 2.10E-01 | 2.41E+06 |
| 2 | 04 | 2.40E-01 | 2.73E+06 |
| | 05 | 2.40E-01 | 2.75E+06 |
| | 06 | 2.40E-01 | 2.76E+06 |
| 3 | 07 | 2.70E-01 | 3.04E+06 |
| | 08 | 2.70E-01 | 3.06E+06 |
| | 09 | 2.70E-01 | 3.07E+06 |
| 4 | 10 | 3.00E-01 | 3.31E+06 |
| | 11 | 3.00E-01 | 3.34E+06 |
| | 12 | 3.00E-01 | 3.37E+06 |
| 5 | 13 | 3.30E-01 | 3.65E+06 |
| | 14 | 3.30E-01 | 3.68E+06 |
| | 15 | 3.30E-01 | 3.73E+06 |
| 6 | 16 | 3.60E-01 | 4.05E+06 |
| | 17 | 3.60E-01 | 4.07E+06 |
| | 18 | 3.60E-01 | 4.08E+06 |
| 7 | 19 | 3.90E-01 | 4.33E+06 |
| | 20 | 3.90E-01 | 4.39E+06 |
| | 21 | 3.90E-01 | 4.43E+06 |

Avaliação de Valores Extremos
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

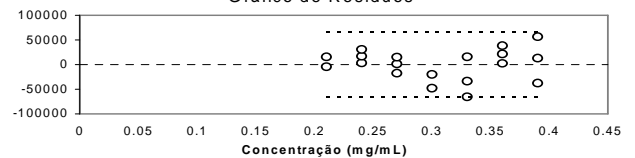
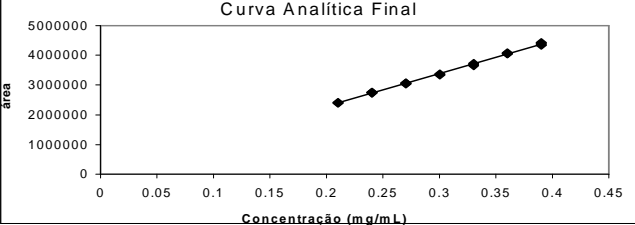


Gráfico de Resíduos



Curva Analítica Final

| | |
|---|------|
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | |
| Req | 0.98 |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.95 |

| | |
|--|------|
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | |
| d (calculado) | 1.47 |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.18 |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.40 |

| | | | |
|---|-----------|--|--|
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | | | |
| Variância Combinada | 1.08E+09 | | |
| t _L calculado | -8.35E-01 | | |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.11E+00 | | |
| p | 4.15E-01 | | |

| | | | |
|--|-------------|--|--|
| Resumo da Avaliação | | | |
| Homogeneidade de variância | | | |
| Há Homocedasticidade | p > 0,05 | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | |
| A regressão é significativa | p < 0,001 | | |
| Não há desvio de Linearidade | p > 0,05 | | |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | | | |
| Não há autocorrelação | d > dU | | |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | | | |
| Segue a Normal | Req > Rcrit | | |

| | |
|---|----------|
| Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX) | |
| Estatísticas da Regressão | |
| Coefficiente Angular (b): | 1.10E+07 |
| Coefficiente Linear (a): | 9.43E+04 |
| r | 0.9989 |
| R ² | 0.9979 |
| N | 19 |
| Graus de Liberdade | 17 |

| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
|--|------|----------|----------|----------|----------|
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 8.06E+12 | 8.06E+12 | 8.00E+03 | 3.59E-24 |
| resíduos | 17 | 1.71E+10 | 1.01E+09 | | |
| Ajuste | 4 | 7.15E+09 | 1.79E+09 | 2.33E+00 | 1.11E-01 |
| erro puro | 13 | 9.98E+09 | 7.68E+08 | | |
| total | 18 | 8.08E+12 | | | |

Observações



Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

| | |
|---|----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | Pág.:1/1 |
|---|----------|

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

ANEXO C – Tabela da avaliação da linearidade da segunda curva de adição padrão de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

Anexo C – Avaliação da linearidade da segunda curva de adição padrão do ácido acetilsalicílico

|  | Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde |  | |
|---|---|---|---------------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | |
| Análise: | Segunda curva de adição padrão do ácido acetilsalicílico | | |
| Data de Confeção da Curva: | 15/3/2007 | Curva N°: 2 Fabricante + SE2 | |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N° de Níveis (n): 7 | |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu 3 | Responsável: José Luiz | |
| Tabela de dados originais | | | |
| Nível (k) | i | Conc. mg/mL | Resposta área |
| 1 | 01 | 2.10E-01 | 2.49E+06 |
| | 02 | 2.10E-01 | 2.49E+06 |
| | 03 | 2.10E-01 | 2.50E+06 |
| 2 | 04 | 2.40E-01 | 2.77E+06 |
| | 05 | 2.40E-01 | 2.79E+06 |
| | 06 | 2.40E-01 | 2.74E+06 |
| 3 | 07 | 2.70E-01 | 3.11E+06 |
| | 08 | 2.70E-01 | 3.14E+06 |
| | 09 | 2.70E-01 | 3.05E+06 |
| 4 | 10 | 3.00E-01 | 3.45E+06 |
| | 11 | 3.00E-01 | 3.47E+06 |
| | 12 | 3.00E-01 | 3.42E+06 |
| 5 | 13 | 3.30E-01 | 3.77E+06 |
| | 14 | 3.30E-01 | 3.82E+06 |
| | 15 | 3.30E-01 | 3.79E+06 |
| 6 | 16 | 3.60E-01 | 4.09E+06 |
| | 17 | 3.60E-01 | 4.04E+06 |
| | 18 | 3.60E-01 | 4.06E+06 |
| 7 | 19 | 3.90E-01 | 4.48E+06 |
| | 20 | 3.90E-01 | 4.35E+06 |
| | 21 | 3.90E-01 | 4.44E+06 |

Avaliação de Valores Extremos
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

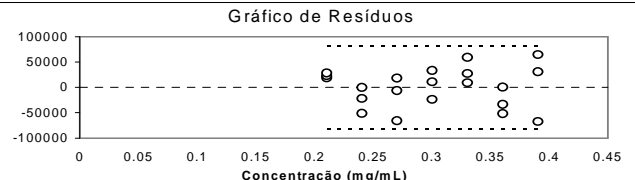
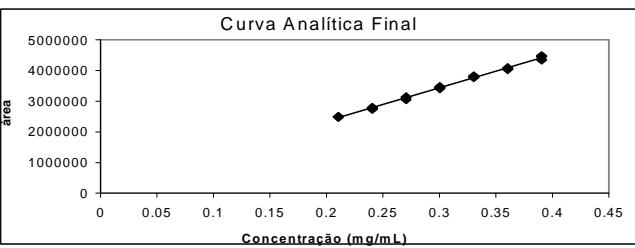


Gráfico de Resíduos



Curva Analítica Final

| | |
|---|------|
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | |
| Req | 0.98 |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.95 |

| | |
|--|------|
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | |
| d (calculado) | 2.41 |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.22 |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.42 |

| | |
|---|-----------|
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | |
| Variância Combinada | 1.57E+09 |
| t _L calculado | -6.81E-01 |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.09E+00 |
| p | 5.04E-01 |

| | |
|--|-------------|
| Resumo da Avaliação | |
| Homogeneidade de variância | |
| Há Homocedasticidade | p > 0,05 |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | |
| A regressão é significativa | p < 0,001 |
| Não há desvio de Linearidade | p > 0,05 |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | |
| Não há autocorrelação | d > dU |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | |
| Segue a Normal | Req > Rcrit |

| | | | |
|---|----------|-------------------------|----------|
| Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX) | | | |
| <i>Estadísticas da Regressão</i> | | | |
| Coeficiente Angular (b): | 1.08E+07 | Coeficiente Linear (a): | 1.97E+05 |
| r | 0.9984 | R ² | 0.9967 |
| N | 21 | Graus de Liberdade | 19 |

| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
|--|------|----------|----------|----------|----------|
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 8.82E+12 | 8.82E+12 | 5.76E+03 | 4.67E-25 |
| resíduos | 19 | 2.91E+10 | 1.53E+09 | | |
| Ajuste | 4 | 1.03E+10 | 2.56E+09 | 2.04E+00 | 1.40E-01 |
| erro puro | 15 | 1.88E+10 | 1.26E+09 | | |
| total | 20 | 8.85E+12 | | | |

Observações



Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

| | |
|---|----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | Pág.:1/1 |
|---|----------|

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

ANEXO D – Tabela da avaliação da linearidade da terceira curva de adição padrão de ácido acetilsalicílico usado na avaliação do efeito matriz

Anexo D – Avaliação da linearidade da terceira curva de adição padrão do ácido acetilsalicílico

|  Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde | |  INCQS | |
|---|---|---|--------------------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | |
| Análise: | Terceira curva de adição padrão do ácido acetilsalicílico | | |
| Data de Confeção da Curva: | 15/3/2007 | Curva N.º: | 3 Fabricante + SE1 |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N.º de Níveis (n): | 7 |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu 3 | Responsável: | José Luiz |
| Tabela de dados originais | | | |
| Nível (k) | i | Conc. mg/mL | Resposta área |
| 1 | 01 | 2.10E-01 | 2.41E+06 |
| | 02 | 2.10E-01 | 2.45E+06 |
| | 03 | 2.10E-01 | 2.43E+06 |
| 2 | 04 | 2.40E-01 | 2.84E+06 |
| | 05 | 2.40E-01 | 2.79E+06 |
| | 06 | 2.40E-01 | 2.81E+06 |
| 3 | 07 | 2.70E-01 | 3.14E+06 |
| | 08 | 2.70E-01 | 3.16E+06 |
| | 09 | 2.70E-01 | 3.10E+06 |
| 4 | 10 | 3.01E-01 | 3.48E+06 |
| | 11 | 3.01E-01 | 3.51E+06 |
| | 12 | 3.01E-01 | 3.45E+06 |
| 5 | 13 | 3.31E-01 | 3.86E+06 |
| | 14 | 3.31E-01 | 3.81E+06 |
| | 15 | 3.31E-01 | 3.83E+06 |
| 6 | 16 | 3.61E-01 | 4.14E+06 |
| | 17 | 3.61E-01 | 4.17E+06 |
| | 18 | 3.61E-01 | 4.11E+06 |
| 7 | 19 | 3.91E-01 | 4.51E+06 |
| | 20 | 3.91E-01 | 4.46E+06 |
| | 21 | 3.91E-01 | 4.53E+06 |

Avaliação de Valores Extremos
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

Curva Analítica Final

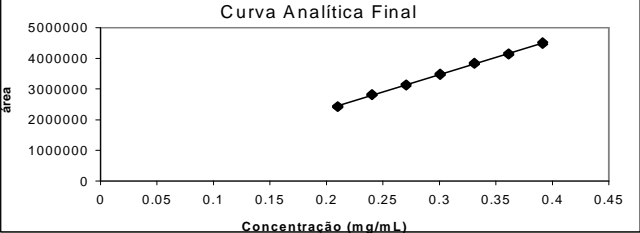
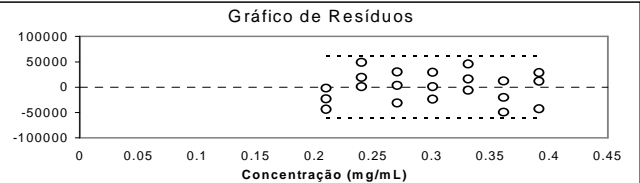


Gráfico de Resíduos



| | |
|---|------|
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | |
| Req | 0.99 |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.95 |

| | |
|--|------|
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | |
| d (calculado) | 2.71 |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.22 |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.42 |

| | |
|---|-----------|
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | |
| Variância Combinada | 9.49E+08 |
| t _L calculado | -2.46E-01 |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.09E+00 |
| p | 8.09E-01 |

| | |
|--|-------------|
| Resumo da Avaliação | |
| Homogeneidade de variância | |
| Há Homocedasticidade | p > 0,05 |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | |
| A regressão é significativa | p < 0,001 |
| Não há desvio de Linearidade | p > 0,05 |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | |
| Não há autocorrelação | d > dU |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | |
| Segue a Normal | Req > Rcrit |

| | | | |
|---|----------|--------------------------|----------|
| Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX) | | | |
| <i>Estatísticas da Regressão</i> | | | |
| Coefficiente Angular (b): | 1.13E+07 | Coefficiente Linear (a): | 7.68E+04 |
| r | 0.9992 | R ² | 0.9983 |
| N | 21 | Graus de Liberdade | 19 |

| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
|--|------|----------|----------|----------|----------|
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 9.82E+12 | 9.82E+12 | 1.12E+04 | 8.51E-28 |
| resíduos | 19 | 1.67E+10 | 8.77E+08 | | |
| Ajuste | 4 | 5.34E+09 | 1.34E+09 | 1.77E+00 | 1.87E-01 |
| erro puro | 15 | 1.13E+10 | 7.55E+08 | | |
| total | 20 | 9.84E+12 | | | |

Observações



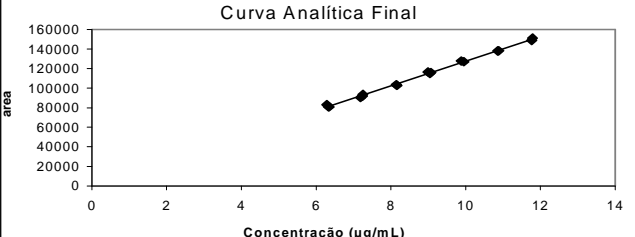
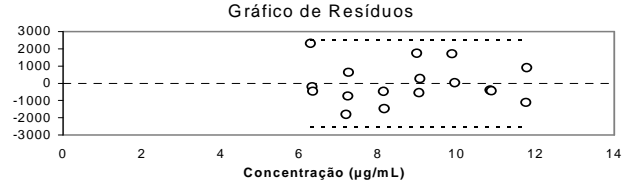
Responsável: _____ Data: ____/____/____ Verificado por: _____ Data: ____/____/____

| | |
|---|----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | Pág.:1/1 |
|---|----------|

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

ANEXO E – Tabela da avaliação da linearidade da curva analítica de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz



Anexo E – Avaliação da linearidade do ácido salicílico

|  Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde | |  INCQS | | | |
|---|--|---|----------------------|----------|----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | | | |
| Análise: | Acido salicílico - replicatas independente - 1,2 e 3 | | | | |
| Data de Confeção da Curva: | 22/01/07 | Curva N°: | replic. independente | | |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N° de Níveis (n): | 7 | | |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu | Responsável: | Jose Luiz | | |
| Tabela de dados originais | | | | | |
| Nível (k) | i | Conc. µg/mL | Resposta area | | |
| 1 | 01 | 6.33E+00 | 8.10E+04 | | |
| | 02 | 6.29E+00 | 8.30E+04 | | |
| | 03 | 6.35E+00 | 8.09E+04 | | |
| 2 | 04 | 7.24E+00 | 9.19E+04 | | |
| | 05 | 7.19E+00 | 9.03E+04 | | |
| 3 | 06 | 7.25E+00 | 9.35E+04 | | |
| | 07 | 8.14E+00 | 1.04E+05 | | |
| | 08 | 8.09E+00 | 1.07E+05 | | |
| 4 | 09 | 8.16E+00 | 1.03E+05 | | |
| | 10 | 9.05E+00 | 1.15E+05 | | |
| | 11 | 8.99E+00 | 1.17E+05 | | |
| 5 | 12 | 9.07E+00 | 1.16E+05 | | |
| | 13 | 9.95E+00 | 1.27E+05 | | |
| | 14 | 9.88E+00 | 1.28E+05 | | |
| 6 | 15 | 9.97E+00 | 1.23E+05 | | |
| | 16 | 1.09E+01 | 1.38E+05 | | |
| | 17 | 1.08E+01 | 1.43E+05 | | |
| 7 | 18 | 1.09E+01 | 1.38E+05 | | |
| | 19 | 1.18E+01 | 1.49E+05 | | |
| | 20 | 1.17E+01 | 1.54E+05 | | |
| | 21 | 1.18E+01 | 1.51E+05 | | |
| Avaliação de Valores Extremos (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos) | | | | | |
| Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas. | | | | | |
| Curva Analítica Final | | | | | |
|  | | | | | |
| Gráfico de Resíduos | | | | | |
|  | | | | | |
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | | | | | |
| Req | 0.97 | | | | |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.94 | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | | | | | |
| d (calculado) | 2.08 | | | | |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.13 | | | | |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.38 | | | | |
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | | | | | |
| Variância Combinada | 1.54E+06 | | | | |
| t _i calculado | 1.95E-01 | | | | |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.13E+00 | | | | |
| p | 8.48E-01 | | | | |
| Resumo da Avaliação | | | | | |
| Homogeneidade de variância | | | | | |
| Há Homocedasticidade p > 0,05 | | | | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | | | |
| A regressão é significativa p < 0,001 | | | | | |
| Não há desvio de Linearidade p > 0,05 | | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | | | | | |
| Não há autocorrelação d > dU | | | | | |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | | | | | |
| Segue a Normal Req > Rcrit | | | | | |
| Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX) | | | | | |
| Estatísticas da Regressão | | | | | |
| Coeficiente Angular (b): | 1.27E+04 | Coeficiente Linear (a): | 1.03E+03 | | |
| r | 0.9988 | R ² | 0.9977 | | |
| N | 17 | Graus de Liberdade | 15 | | |
| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 8.91E+09 | 8.91E+09 | 6.38E+03 | 3.85E-21 |
| resíduos | 15 | 2.10E+07 | 1.40E+06 | | |
| Ajuste | 4 | 8.25E+06 | 2.06E+06 | 1.79E+00 | 2.02E-01 |
| erro puro | 11 | 1.27E+07 | 1.15E+06 | | |
| total | 16 | 8.93E+09 | | | |
| Observações | | | | | |
| <div style="border: 1px solid black; height: 40px;"></div> | | | | | |
| Responsável: _____ | | Data: ___/___/___ | | | |
| Verificado por: _____ | | Data: ___/___/___ | | | |
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | Pág.:1/1 | | |

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

ANEXO F – Tabela da avaliação da linearidade da primeira curva de adição padrão de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz

Anexo F – Avaliação da linearidade da primeira curva de adição padrão do ácido salicílico

|  Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde | |  INCQS | |
|---|---|---|--------------------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | |
| Análise: | Primeira curva de adição padrão do ácido salicílico | | |
| Data de Confeção da Curva: | 15/3/2007 | Curva N°: | 1 Fabricante + SE3 |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N° de Níveis (n): | 7 |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu | Responsável: | José Luiz |
| Tabela de dados originais | | | |
| Nível (k) | i | Conc. microgramam | Resposta área |
| 1 | 01 | 1.00E+01 | 1.15E+05 |
| | 02 | 1.00E+01 | 1.16E+05 |
| | 03 | 1.00E+01 | 1.13E+05 |
| 2 | 04 | 1.09E+01 | 1.28E+05 |
| | 05 | 1.09E+01 | 1.29E+05 |
| | 06 | 1.09E+01 | 1.28E+05 |
| 3 | 07 | 1.18E+01 | 1.40E+05 |
| | 08 | 1.18E+01 | 1.40E+05 |
| | 09 | 1.18E+01 | 1.37E+05 |
| 4 | 10 | 1.27E+01 | 1.50E+05 |
| | 11 | 1.27E+01 | 1.51E+05 |
| | 12 | 1.27E+01 | 1.52E+05 |
| 5 | 13 | 1.36E+01 | 1.62E+05 |
| | 14 | 1.36E+01 | 1.62E+05 |
| | 15 | 1.36E+01 | 1.60E+05 |
| 6 | 16 | 1.45E+01 | 1.72E+05 |
| | 17 | 1.45E+01 | 1.74E+05 |
| | 18 | 1.45E+01 | 1.73E+05 |
| 7 | 19 | 1.54E+01 | 1.84E+05 |
| | 20 | 1.54E+01 | 1.85E+05 |
| | 21 | 1.54E+01 | 1.82E+05 |

Avaliação de Valores Extremos
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.

Curva Analítica Final

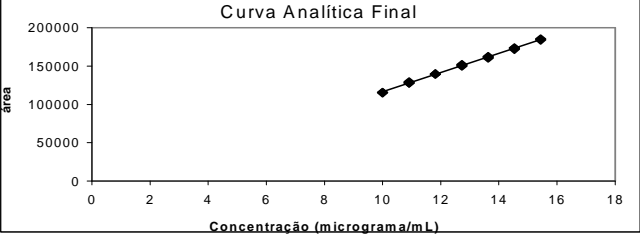
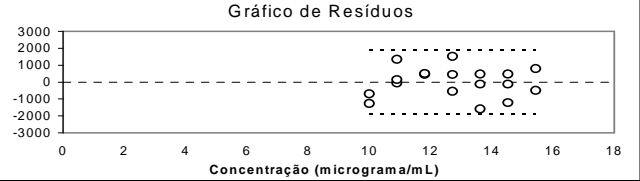


Gráfico de Resíduos



| | |
|---|------|
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | |
| Req | 0.99 |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.95 |

| | |
|--|------|
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | |
| d (calculado) | 1.58 |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.16 |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.39 |

| | |
|---|----------|
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | |
| Variância Combinada | 7.56E+05 |
| t _L calculado | 9.45E-02 |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.12E+00 |
| p | 9.26E-01 |

| | |
|--|--|
| Resumo da Avaliação | |
| Homogeneidade de variância | |
| Há Homocedasticidade p > 0,05 | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | |
| A regressão é significativa p < 0,001 | |
| Não há desvio de Linearidade p > 0,05 | |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | |
| Não há autocorrelação d > dU | |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | |
| Segue a Normal Req > Rcrit | |

| | | | |
|---|----------|--------------------------|-----------|
| Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX) | | | |
| <i>Estatísticas da Regressão</i> | | | |
| Coefficiente Angular (b): | 1.25E+04 | Coefficiente Linear (a): | -8.51E+03 |
| r | 0.9992 | R ² | 0.9985 |
| N | 18 | Graus de Liberdade | 16 |

| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
|--|------|----------|----------|----------|----------|
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 8.34E+09 | 8.34E+09 | 1.06E+04 | 5.41E-24 |
| resíduos | 16 | 1.26E+07 | 7.90E+05 | | |
| Ajuste | 4 | 4.60E+06 | 1.15E+06 | 1.71E+00 | 2.11E-01 |
| erro puro | 12 | 8.04E+06 | 6.70E+05 | | |
| total | 17 | 8.35E+09 | | | |

Observações



Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

| | |
|---|-----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | Pág.: 1/1 |
|---|-----------|

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

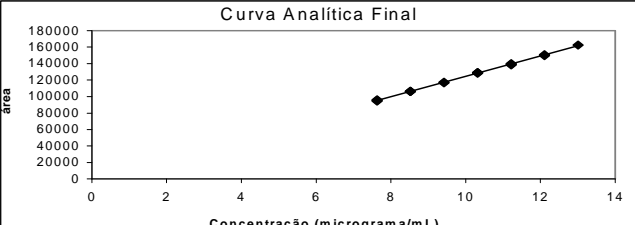
ANEXO G – Tabela da avaliação da linearidade da segunda curva de adição padrão de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz

Anexo G – Avaliação da linearidade da segunda curva de adição padrão do ácido salicílico

|  Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde | |  INCQS | |
|---|--|---|--------------------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | |
| Análise: | Segunda curva de adição padrão do ácido salicílico | | |
| Data de Confeção da Curva: | 15/3/2007 | Curva N°: | 2 Fabricante + SE2 |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N° de Níveis (n): | 7 |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu 3 | Responsável: | José Luiz |
| Tabela de dados originais | | | |
| Nível (k) | i | Conc. microgramam/ml | Resposta área |
| 1 | 01 | 7.63E+00 | 9.60E+04 |
| | 02 | 7.63E+00 | 9.51E+04 |
| | 03 | 7.63E+00 | 9.44E+04 |
| 2 | 04 | 8.52E+00 | 1.07E+05 |
| | 05 | 8.52E+00 | 1.06E+05 |
| | 06 | 8.52E+00 | 1.06E+05 |
| 3 | 07 | 9.42E+00 | 1.18E+05 |
| | 08 | 9.42E+00 | 1.20E+05 |
| | 09 | 9.42E+00 | 1.17E+05 |
| 4 | 10 | 1.03E+01 | 1.29E+05 |
| | 11 | 1.03E+01 | 1.29E+05 |
| | 12 | 1.03E+01 | 1.28E+05 |
| 5 | 13 | 1.12E+01 | 1.39E+05 |
| | 14 | 1.12E+01 | 1.40E+05 |
| | 15 | 1.12E+01 | 1.38E+05 |
| 6 | 16 | 1.21E+01 | 1.51E+05 |
| | 17 | 1.21E+01 | 1.53E+05 |
| | 18 | 1.21E+01 | 1.50E+05 |
| 7 | 19 | 1.30E+01 | 1.60E+05 |
| | 20 | 1.30E+01 | 1.63E+05 |
| | 21 | 1.30E+01 | 1.67E+05 |

Avaliação de Valores Extremos
(Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos)

Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas.



Curva Analítica Final

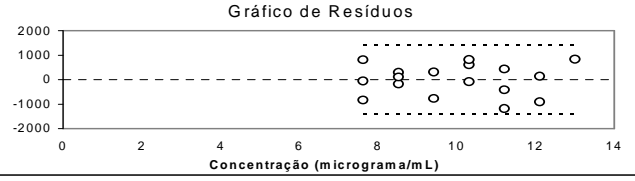


Gráfico de Resíduos

| | |
|---|------|
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | |
| Req | 0.98 |
| Rcrit ($\alpha = 0,05$) | 0.94 |

| | |
|--|------|
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | |
| d (calculado) | 2.49 |
| dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$ | 1.13 |
| dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$ | 1.38 |

| | | | |
|--|----------|-------------------------|----------|
| Análise de Regressão Linear (Modelo: $Y = a + bX$) <i>Estatísticas da Regressão</i> | | | |
| Coeficiente Angular (b): | 1.24E+04 | Coeficiente Linear (a): | 8.48E+02 |
| r | 0.9995 | R ² | 0.9991 |
| N | 17 | Graus de Liberdade | 15 |

| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
|--|------|----------|----------|----------|----------|
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 7.15E+09 | 7.15E+09 | 1.65E+04 | 3.13E-24 |
| resíduos | 15 | 6.50E+06 | 4.33E+05 | | |
| Ajuste | 4 | 2.17E+06 | 5.43E+05 | 1.38E+00 | 3.04E-01 |
| erro puro | 11 | 4.33E+06 | 3.94E+05 | | |
| total | 16 | 7.15E+09 | | | |

| | |
|---|---------------|
| Resumo da Avaliação | |
| Homogeneidade de variância | |
| Há Homocedasticidade | $p > 0,05$ |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | |
| A regressão é significativa | $p < 0,001$ |
| Não há desvio de Linearidade | $p > 0,05$ |
| Autocorrelação dos Resíduos ($\alpha = 0,05$) | |
| Não há autocorrelação | $d > dU$ |
| Teste de Normalidade ($\alpha = 0,05$) | |
| Segue a Normal | $Req > Rcrit$ |

Observações



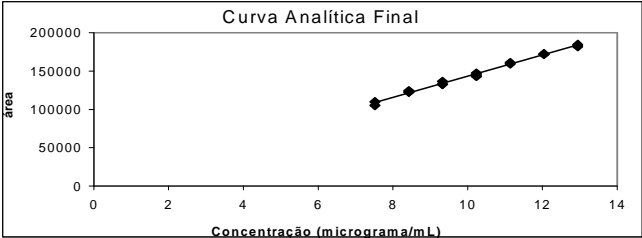
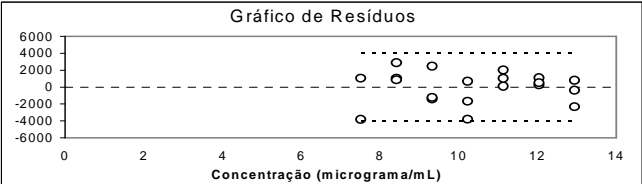
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___

| | |
|---|----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | Pág.:1/1 |
|---|----------|

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

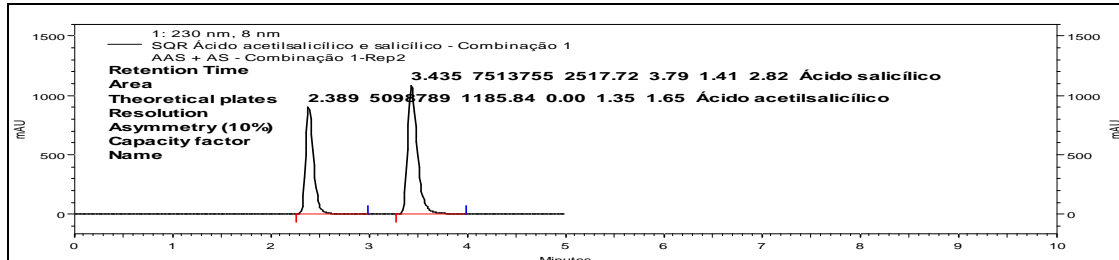
ANEXO H – Tabela da avaliação da linearidade da terceira curva de adição padrão de ácido salicílico usado na avaliação do efeito matriz

Anexo H – Avaliação da linearidade da terceira curva de adição padrão do ácido salicílico

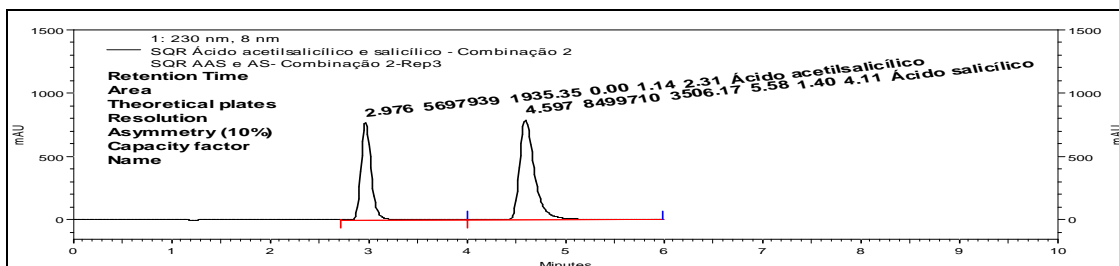
|  Ministério da Saúde FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde | |  INCQS | | | |
|---|---|---|--------------------|----------|----------|
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | | | |
| Dados da Curva Analítica | | | | | |
| Análise: | Terceira curva de adição padrão do ácido salicílico | | | | |
| Data de Confeção da Curva: | 15/3/2007 | Curva N.º: | 3 Fabricante + SE1 | | |
| Replicatas por Nível (k): | 3 | N.º de Níveis (n): | 7 | | |
| Equipamento: | HPLC Shimadzu 3 | Responsável: | José Luiz | | |
| Tabela de dados originais | | | | | |
| Nível (k) | i | Conc. microgramam | Resposta área | | |
| 1 | 01 | 7.52E+00 | 1.10E+05 | | |
| | 02 | 7.52E+00 | 1.05E+05 | | |
| | 03 | 7.52E+00 | 1.04E+05 | | |
| 2 | 04 | 8.42E+00 | 1.23E+05 | | |
| | 05 | 8.42E+00 | 1.22E+05 | | |
| | 06 | 8.42E+00 | 1.24E+05 | | |
| 3 | 07 | 9.33E+00 | 1.36E+05 | | |
| | 08 | 9.33E+00 | 1.33E+05 | | |
| | 09 | 9.33E+00 | 1.33E+05 | | |
| 4 | 10 | 1.02E+01 | 1.45E+05 | | |
| | 11 | 1.02E+01 | 1.47E+05 | | |
| | 12 | 1.02E+01 | 1.43E+05 | | |
| 5 | 13 | 1.11E+01 | 1.59E+05 | | |
| | 14 | 1.11E+01 | 1.61E+05 | | |
| | 15 | 1.11E+01 | 1.60E+05 | | |
| 6 | 16 | 1.20E+01 | 1.73E+05 | | |
| | 17 | 1.20E+01 | 1.72E+05 | | |
| | 18 | 1.20E+01 | 1.72E+05 | | |
| 7 | 19 | 1.29E+01 | 1.84E+05 | | |
| | 20 | 1.29E+01 | 1.85E+05 | | |
| | 21 | 1.29E+01 | 1.82E+05 | | |
| Avaliação de Valores Extremos (Teste de Jack-Knife para avaliação de valores extremos) | | | | | |
| Os dados da tabela marcados em vermelho foram avaliados e retirados do conjunto de dados por se tratarem de valores extremos (outliers). Estes dados não serão considerados na avaliação das premissas. | | | | | |
| Curva Analítica Final | | | | | |
|  | | | | | |
| Gráfico de Resíduos | | | | | |
|  | | | | | |
| Normalidade dos Resíduos (Teste de Ryan-Joiner) | | | | | |
| Req | 0.96 | | | | |
| Rcrit (α = 0,05) | 0.95 | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos (Teste de Durbin-Watson) | | | | | |
| d (calculado) | 1.90 | | | | |
| dL (Limite Inferior) α = 0,05 | 1.20 | | | | |
| dU (Limite Superior) α = 0,05 | 1.41 | | | | |
| Homogeneidade da Variância dos Resíduos (Teste de Brown-Forsythe) | | | | | |
| Variância Combinada | 4.12E+06 | | | | |
| t _L calculado | 1.13E+00 | | | | |
| t _{tabelado} (α = 0,05) | 2.10E+00 | | | | |
| p | 2.75E-01 | | | | |
| Resumo da Avaliação | | | | | |
| Homogeneidade de variância | | | | | |
| Há Homocedasticidade p > 0,05 | | | | | |
| Regressão e Teste de Desvio de Linearidade | | | | | |
| A regressão é significativa p < 0,001 | | | | | |
| Não há desvio de Linearidade p > 0,05 | | | | | |
| Autocorrelação dos Resíduos (α = 0,05) | | | | | |
| Não há autocorrelação d > dU | | | | | |
| Teste de Normalidade (α = 0,05) | | | | | |
| Segue a Normal Req > Rcrit | | | | | |
| Análise de Regressão Linear (Modelo: Y = a + bX) | | | | | |
| <i>Estatísticas da Regressão</i> | | | | | |
| Coefficiente Angular (b): | 1.38E+04 | Coefficiente Linear (a): | 5.09E+03 | | |
| r | 0.9972 | R ² | 0.9944 | | |
| N | 20 | Graus de Liberdade | 18 | | |
| ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste) | | | | | |
| fonte | G.L. | SQ | MQ | F | p |
| regressão | 1 | 1.17E+10 | 1.17E+10 | 3.18E+03 | 1.05E-21 |
| resíduos | 18 | 6.59E+07 | 3.66E+06 | | |
| Ajuste | 4 | 2.48E+07 | 6.19E+06 | 2.11E+00 | 1.34E-01 |
| erro puro | 14 | 4.11E+07 | 2.94E+06 | | |
| total | 19 | 1.17E+10 | | | |
| Observações | | | | | |
| <div style="border: 1px solid black; height: 40px; width: 100%;"></div> | | | | | |
| Responsável: _____ Data: ____/____/____ Verificado por: _____ Data: ____/____/____ | | | | | |
| AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA | | | Pág.:1/1 | | |

Fonte da planilha: (SOUZA & JUNQUEIRA, 2005)

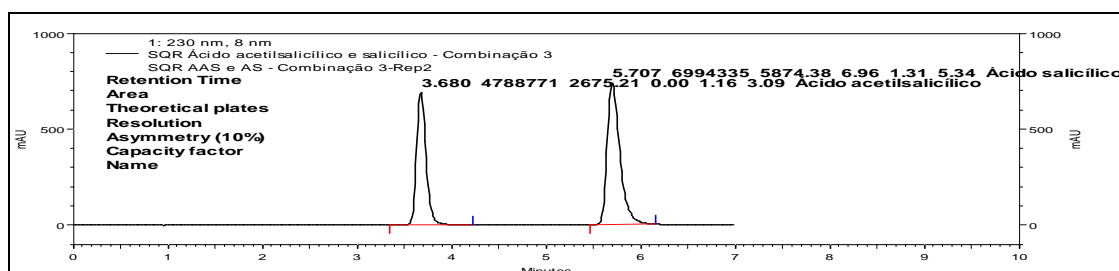
ANEXO I – Cromatogramas das oito combinações ensaiadas usada na avaliação da robustez do método.



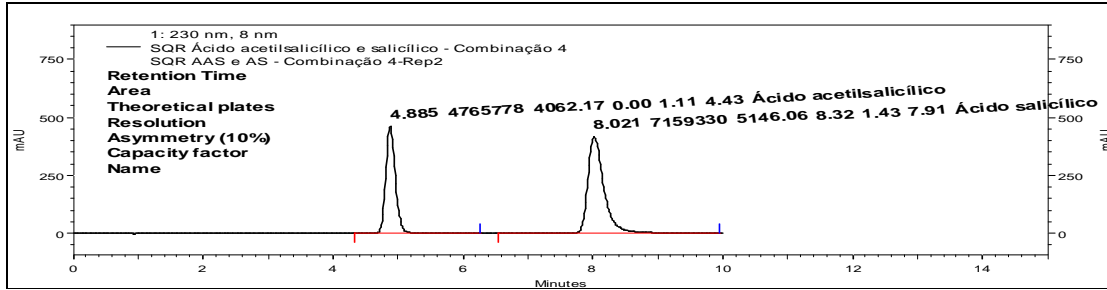
Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (2,38 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (3,44 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 1:** coluna Waters C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 5 µL, um dia de preparo e extração em cinco minutos



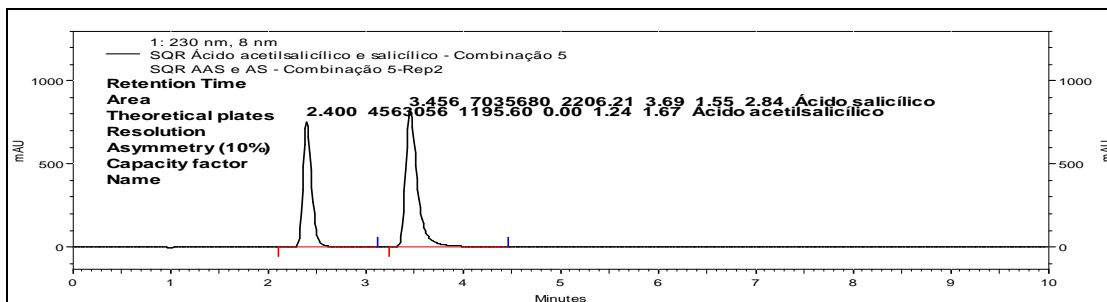
Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (2,98 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (4,60 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 2:** coluna Merck C18 (5µm, 125 x 4 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético (pH 2,3) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 25 C, volume 5 µL, dois dias de preparo e extração em dez minutos



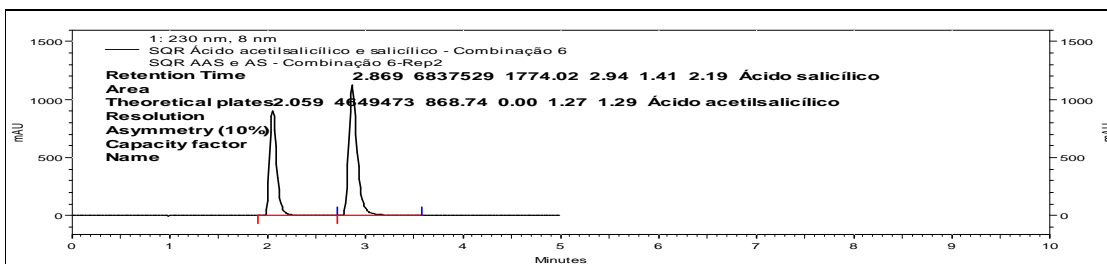
Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (3,88 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (5,71 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 3:** coluna Waters C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 80 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético (pH 2,3) e 20 partes de acetonitrila, fluxo 1,2 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 5 µL, dois dias de preparo e extração em dez minutos



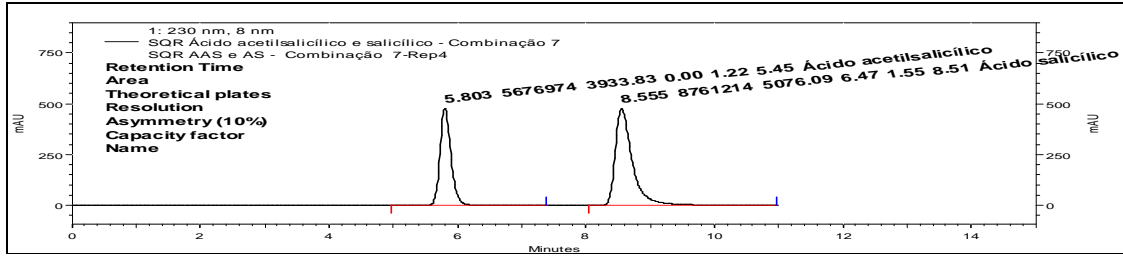
Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (4,89 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (8,02 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 4:** coluna Merck C18 (5µm, 125 x 4 mm d.i), fase móvel mistura de 80 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 20 partes de acetonitrila, fluxo 1,2 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 25 C, volume 5 µL, um dia de preparo e extração em cinco minutos



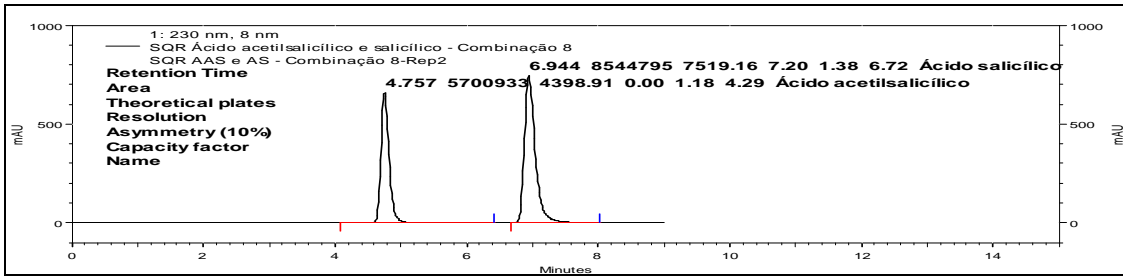
Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (2,40 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (3,47 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 5:** coluna Merck C18 (5µm, 125 x 4 mm d.i), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,6) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,2 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 5 µL, um dia de preparo e extração em dez minutos



Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (2,07 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (2,87 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 6:** coluna Waters C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 70 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,6) e 30 partes de acetonitrila, fluxo 1,2 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 25 C, volume 5 µL, dois dias de preparo e extração em cinco minutos



Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (5,80 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (8,56 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 7:** coluna Merck C18 (5µm, 125 x 4 mm d.i), fase móvel mistura de 80 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,6) e 20 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 30 C, volume 5 µL, dois dias de preparo e extração em cinco minutos



Picos cromatograficos do ácido acetilsalicílico (4,77 min, 0,505 mg/mL) e do ácido salicílico (6,94 min, 0,511 mg/mL). **Condições da combinação 8:** coluna Waters C18 (4µm, 150 x 3,9 mm d.i.), fase móvel mistura de 80 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,6) e 20 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 230 nm, temperatura 25 C, volume 5 µL, um dia de preparo e extração em dez minutos