

MESTRADO PROFISSIONAL  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Paulo Ricardo de Souza e Souza

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO  
DO TEOR DE ÁCIDO VALPRÓICO EM CÁPSULAS DE 250 mg**

Rio de Janeiro  
2011

Paulo Ricardo de Souza e Souza

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO  
DO TEOR DE ÁCIDO VALPRÓICO EM CÁPSULAS DE 250 mg

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.

Orientadores: Dr. Josino Costa Moreira  
Dra. Kátia Christina Leandro

Rio de Janeiro  
2011

Paulo Ricardo de Souza e Souza

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO  
DO TEOR DE ÁCIDO VALPRÓICO EM CÁPSULAS DE 250 mg**

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 em 31 de março de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Silvana do Couto Jacob (INCQS / FIOCRUZ)

---

Prof. Dr. Wagner Felipe Pacheco (UFF)

---

Prof. Dra. Maria Helena Simões Villas Boas (INCQS / FIOCRUZ)

**ORIENTADORES**

---

Dr. Josino Costa Moreira (CESTEH / FIOCRUZ)

---

Dra. Katia Christina Leandro (INCQS / FIOCRUZ)

Rio de Janeiro

2011

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

Souza, Paulo Ricardo de Souza

Desenvolvimento e Validação de Metodologias Analíticas para  
Determinação do Teor de Ácido Valpróico em Cápsulas de 250 mg /  
Paulo Ricardo de Souza e Souza. – Rio de Janeiro, 2011.

xxvi, 121 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto  
Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Vigilância Sanitária,  
2011. Bibliografia: f. 112 – 119

1. Cromatografia líquida de alta pressão. 2. Ácido Valpróico. 3.  
Valproato. 4. Validação. 5. Voltametria. I Título

Título: Development and Validation of Analytical Methods for  
Determining the Content of Valproic Acid Capsules 250 mg

Dedico este trabalho a meu filho que me  
faz renascer a cada dia e superar limites.

## AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Laboratório Farmacêutico da Marinha que me apoiou e incentivou neste trabalho.

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

Ao Laboratório ABBOTT pela cessão de material de referência para execução da Validação analítica

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

## AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À Deus por me guiar em todos os momentos da minha vida.

Agradecimento especial ao meu filho e minha mãe pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Ao meu orientador professor Dr. Josino Costa Moreira pelas orientações sempre pertinentes e esclarecedoras.

À professora Dra. Kátia Christina Leandro, minha orientadora e amiga pelas idéias, conselhos, orientações e incentivo.

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

Ao amigo José Luiz Aguiar pelas dicas importantes sobre validação e a paciência nos inúmeros momentos que solicitei ajuda.

Ao Químico André Luís Mazzei Albert pelas dicas, incentivos e pela disponibilidade em todos os momentos em que precisei.

Aos amigos do Laboratório Farmacêutico Da Marinha, pela ajuda, auxílio e compreensão.

Aos Comandantes Giovani e Alex pela disponibilidade nos momentos em que precisei.

Ao Dr. Geison pela ajuda inestimável para este trabalho.

Aos amigos Odilon e Artur pela ajuda e cooperação.

À minha namorada Fernanda, pela ajuda, apoio, compreensão e paciência nos momentos difíceis.

Aos funcionários da Biblioteca e da secretaria do INCQS pela disponibilidade irrestrita.

A Juliana pela ajuda inestimável para o trabalho.

A certeza de um mundo melhor para os que vêm me enche de força para sobrepujar as dificuldades, não esmorecer e dedicar sempre o máximo, ainda que seja insuficiente.

Paulo Ricardo de Souza e Souza



## RESUMO

O ácido valpróico é um ácido carboxílico denominado como ácido 2-propilpentanóico utilizado como anticonvulsivante e também na terapêutica da desordem bipolar e depressão. A metodologia de análise deste medicamento nos compêndios oficiais é por cromatografia gasosa, por isso vislumbrou-se a possibilidade de desenvolver e validar uma técnica mais largamente utilizada na análise de medicamentos, ou seja, a técnica por CLAE. Os parâmetros usados na CLAE foram Coluna C18 250mm x 4mm, fluxo 1,0 mL/min, Comprimento de onda 210nm, fase móvel 55% ACN e 45% TFA, Volume de Injeção 25µL. As figuras de mérito avaliadas foram seletividade e efeito matriz, linearidade, repetitividade e precisão intermediária, exatidão e robustez. A metodologia desenvolvida mostrou identificar de forma inequívoca o analito de interesse, também se apresentou linear com um  $R^2 = 0,9996$ . A repetitividade foi evidenciada pelo DPR dentro das especificações, a precisão intermediária foi realizada entre três analistas e o desvio padrão de precisão intermediária foi verificado e se encontrava dentro dos limites. A exatidão foi avaliada pela taxa de recuperação e valores encontrados foram satisfatórios. Quando submetido a pequenas variações a metodologia mostrou-se robusta. Com os resultados apresentados nas figuras de mérito pelas quais a metodologia foi desafiada podemos concluir que a análise desenvolvida para quantificar Ácido Valpróico pode ser perfeitamente implantada na rotina laboratorial. Outra técnica que se mostrou promissora é a Técnica por voltametria, porém, nesta metodologia faz-se necessário a validação da mesma.

Palavras-chave :Ácido valpróico.Cromatografia líquida de alta eficiência.Validação. Voltametria.

## ABSTRACT

Valproic acid is a carboxylic acid known as 2-propilpentanóico used as an anticonvulsant and also in therapeutical bipolar disorder and depression. Analysis methodologies of this medicine in the official compendium is by gas chromatography, so it saw the possibility of developing and validate a technique most widely used in the analysis of drugs or the technique by HPLC. Parameters used in HPLC were column C 18 250mm x 4mm, flow1, 0 mL / min, wavelength 210nm, mobile phase ACN 55% and 45% TFA, Volume Injection 25uL. The figures of merit were evaluated selectivity and matrix effect, linearity, repeatability and intermediate precision, accuracy and robustness. The developed methodology to identify unequivocally the analyte of interest, also showed to be linear with an  $R^2 = 0.9996$ . Repeatability was demonstrated by the DPR within specification, the intermediate precision was carried out among three analysts and standard deviation for intermediate precision was checked, and its result was within the limits. The accuracy was assessed by recovery rate and values were satisfactory. When subjected to small variations in the methodology proved to be robust. With the results shown in the figures of merit for which the methodology was challenged we can conclude that the analysis conducted to quantify Valproic acid may be perfectly implemented in the routine laboratory. Another technique that showed promising is the technique by voltrametria however, this methodology is necessary to validate it.

Key-words: Valproic acid. High-performance liquid chromatography. Validation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Principais componentes de um sistema de cromatografia líquida de Alta Eficiência.....	41
Figura 2	Estrutura química do ácido valpróico.....	48
Figura 3	Cromatógrafo à Líquido, fabricante Young Lin, com detector espectrofotométrico de ultravioleta – visível com conjunto de diodos (DAD) utilizado para a avaliação de todas as figuras de mérito da validação .....	56
Figura 4	Cromatógrafo à Líquido, fabricante Varian, com detector espectrofotométrico de ultravioleta-visível utilizado para a avaliação do requisito precisão intermediária.....	57
Figura 5	Sistema voltamétrico 757VA Computrace, fabricante Metrohm utilizado para analisar o teor de ácido Valpróico em cápsulas de 250 mg pelo método de voltametria de pulso diferencial.....	58
Figura 6	Monitoramento da temperatura do laboratório durante uma corrida cromatográfica da solução de adequação do sistema. Condições: Coluna C18, 5 µm. 250 x 4,0 mm, fase móvel 55% de ACN e 45% de TFA 0,05%, pH 2,3, fluxo 1,0mL/min, detecção a 210 nm, temperatura 25° C, volume de injeção 25 µL.....	78
Figura 7	Monitoramento da temperatura da coluna durante uma corrida cromatográfica da solução de adequação do sistema. Condições: Coluna C18, 5 µm, 250 x 4,0 mm, fase móvel 55% de ACN e 45% de TFA 0,05%, pH 2,3, fluxo 1,0mL/min, detecção a 210 nm, temperatura 25° C, volume de injeção 25 µL.....	78
Figura 8	Monitoramento da pressão da coluna durante uma corrida cromatográfica da solução de adequação do sistema. Condições: Coluna C18, 5 µm, 250 x 4,0 mm, fase móvel 55% de ACN e 45% de TFA 0,05%, pH 2,3, fluxo 1,0mL/min, detecção a 210 nm, temperatura 25° C, volume de injeção 25 µL.....	79

Figura 9	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico padrão (1,030 mg/mL). Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA 0,05%(pH 2,3) , fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25 µL.....	80
Figura 10	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (medicamento referência) 1,0 mg/mL. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3) , fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25 µL.....	80
Figura 11	Estudo de Estabilidade da Solução Amostra de Ácido Valpróico.....	83
Figura 12	Estudo de Estabilidade da Solução padrão de Ácido Valpróico.....	83
Figura 13	Sinal Cromatográfico do medicamento referência. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25µL.....	84
Figura 14	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico padrão (1,024) mg/mL Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3) , fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25 µL .....	85
Figura 15	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (padrão) (1,024mg/mL) em análise tridimensional (3D). Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25 µL.....	85
Figura 16	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (medicamento de referência) em Análise tridimensional (3D). 1,0 mg/mL. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase	

	móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25µL.....	86
Figura 17	Espectro de Varredura na região do ultravioleta do medicamento referência (amostra) e do padrão de ácido valpróico. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µm, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25µL.....	87
Figura 18	Sinal Cromatográfico do Placebo 2- Sinal cromatográfico do medicamento referência. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µm, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25 µL.....	88
Figura 19	Curva analítica do Ácido Valpróico. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µm, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temp. 25 C, volume 25µL.....	92
Figura 20	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico 250mg/mL, Equipamento Varian. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µm, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25 µL.....	96
Figura 21	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (Amostra-Condição 1) (5,74min, 1mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5µm, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25° C, volume 25 µ L, amostra com agitação.....	102

Figura 22	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (Amostra Condição 2). (5,21 min, 1 MG/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 60 % ACN e 40 % TFA, (pH 2,6), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 30° C, volume 25 µ L, amostra sem agitação.....	103
Figura 23	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico ( Amostra-Condição 3). (4,74 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Supelco C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,6), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25° C,volume 25 µ L, amostra sem agitação .....	103
Figura 24	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (Amostra-Condição 4). (3,92 min , 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Supelco C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 60 % ACN e 40 % TFA (pH 2,3), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 30° C, volume 25 µ L, amostra com agitação.....	104
Figura 25	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (Amostra-Condição 5). (5,45min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA,(ph 2,3), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 30°C, volume 25µ L, amostra sem agitação.....	104
Figura 26	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (Amostra-Condição 6). (5,64 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 60 % ACN e 40 % TFA, (pH 2,6), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25° C, volume 25 µ L, amostra com agitação.....	105

Figura 27	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (Amostra-Condição 7). (5,62 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Supelco C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,6), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 C, volume 25 µ L, amostra com agitação.....	105
Figura 28	Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico (Amostra-Condição 8). (4,79 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Supelco C18 (5µ m, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 60 % ACN e 40 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25° C, volume 25 µ L, amostra sem agitação.....	106
Figura 29	Sinal Cromatográfico do Valproato de Sódio 250mg/mL Xpe (5,6 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µm, 250 x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 55 % ACN e 45 % TFA, (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25° C, volume 25 µL.....	108
Figura 30	Voltamogramas do ácido valpróico (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L) obtidos nas condições descritas na tabela 31.....	110
Figura 31	Curva analítica do ácido valpróico (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg L <sup>-1</sup> ) obtida nas condições descritas na tabela 31.....	110

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Fatores a serem considerados na determinação da robustez.....	35
Tabela 2	Classificação dos testes, segundo sua finalidade.....	36
Tabela 3	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	37
Tabela 4	Limites dos parâmetros para adequação do sistema cromatográfico.....	42
Tabela 5	Relação entre fator de cauda e o fator de assimetria.....	45
Tabela 6	Lotes envolvidos no estudo e suas respectivas finalidades.....	61
Tabela 7	Condições cromatográficas de análise.....	62
Tabela 8	Soluções utilizadas na adequação do sistema.....	63
Tabela 9	Formulação do placebo com as respectivas quantidades de excipientes.....	66
Tabela 10	Pesos, diluições e concentrações das soluções utilizadas no teste de linearidade.....	69
Tabela 11	Soluções de Trabalho 1.....	69
Tabela 12	Soluções de Trabalho 2.....	69
Tabela 13	Soluções de Trabalho 3.....	70
Tabela 14	Preparo das Soluções de Trabalho.....	72
Tabela 15	Quadro de analistas, data de análise e equipamentos utilizados na determinação da precisão intermediária.....	73
Tabela 16	Variações nos fatores para a determinação da robustez.....	74
Tabela 17	Matriz dos fatores para determinação da robustez do método.....	74
Tabela 18	Fator cauda, fator de retenção, números de pratos teóricos e repetitividade das áreas do Ácido Valpróico padrão.....	81
Tabela 19	Áreas encontradas após a injeção da 1ª solução de trabalho.....	89
Tabela 20	Áreas encontradas após a injeção da 2ª solução de trabalho.....	89



Tabela 21	Áreas encontradas após a injeção da 3ª solução de trabalho.....	90
Tabela 22	Resumo das premissas para a curva analítica do Ácido Valpróico 250 mg.....	91
Tabela 23	Repetitividade do método de análise do Ácido Valpróico 250mg realizada no Cromatógrafo Young Lin.....	94
Tabela 24	Resultados da precisão intermediária.....	95
Tabela 25	Áreas medidas após as injeções das soluções de trabalho de adição padrão de Ácido Valpróico.....	97
Tabela 26	Recuperação encontrada a partir das soluções de trabalho de adição padrão de Ácido Valpróico.....	97
Tabela 27	Oito combinações ensaiadas no teste de robustez.....	98
Tabela 28	Resultados dos parâmetros de adequação do sistema, verificados após as oito combinações ensaiadas.....	99
Tabela 29	Avaliação comparativa dos parâmetros do system suitability no início e no final do estudo de validação.....	100
Tabela 30	Diferença observada no system suitability após cada uma das sete variações.....	101
Tabela 31	Valores encontrados na análise pontual dos medicamentos na forma de Ácido Valpróico Cápsulas de 250mg, disponíveis no mercado.....	106
Tabela 32	Médias dos parâmetros de adequação do sistema obtidos na análise pontual do medicamento Valproato de Sódio 250mg/mL Xarope.....	108
Tabela 33	Condições experimentais para o método voltamétrico.....	109

## SIGLAS E ABREVIATURAS

(A)	Ampér
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C.G	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentração Média Determinada
CRFB	Constituição da República Federativa do Brasil
CV	Coefficiente de variação
°C	Grau Celsius
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
Di	Diâmetro interno
DOQ-CGCRE-008	Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos
DP	Desvio Padrão
DPRr	Desvio Padrão Relativo de repetitividade
DPR	Desvio Padrão Relativo
Ed.	Edição
EFM	Eletrodo de Filme de Mercúrio
F.B.	Farmacopéia Brasileira
FC	Fator de Cauda
FDA	Food and Drug Administration
f.e.	Fase Estacionária
f.m	Fase Móvel
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GMP	Good Manufacturing Practices
HMDE	Eletrodo de Gota Pendente
(I)	Corrente
ICH	International Conference on Harmonization.
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
K	Fator de capacidade
LACEN	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de Quantificação
LSC	Cromatografia líquido-sólido
µL	Microlitro
µm	Micrometro
mg	Miligrama
MS	Ministério da Saúde
N	Pratos teóricos
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PT	Pratos teóricos
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
R	Resolução
RE	Resolução Específica
RJ	Rio de Janeiro
Spi	Desvio padrão de precisão intermediária
SUS	Sistema Único de Saúde
Temp	Temperatura
TFA	Ácido Trifluoro acético
T <sub>R</sub>	Tempo de retenção
(U)	Potencial
USP	United State Pharmacopeia
U.V./ VIS	Ultra Violeta- Visível
(V)	Volt
W	Largura do pico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	23
1.1.1 Relação Produção-Consumo.....	25
1.1.2 Vigilância na Produção de Medicamento.....	26
1.2 VALIDAÇÃO.....	28
1.2.1 Figuras de Mérito Utilizadas na Validação de Metodologia Analítica.....	29
1.2.1.1 <i>Especificidade</i> .....	29
1.2.1.2 <i>Seletividade</i> .....	29
1.2.1.3 <i>Faixa de Trabalho e a Faixa Linear de Trabalho</i> .....	30
1.2.1.4 <i>Linearidade</i> .....	31
1.2.1.5 <i>Limite de Quantificação e Limite de Detecção</i> .....	31
1.2.1.6 <i>Tendência/ Recuperação</i> .....	32
1.2.1.7 <i>Precisão</i> .....	32
1.2.1.8 <i>Repetitividade</i> .....	33
1.2.1.9 <i>Precisão Intermediária</i> .....	33
1.2.1.10 <i>Robustez</i> .....	35
1.3 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	37
1.3.1 Definição.....	37
1.3.2 Principais Componentes de um Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	38
1.3.2.1 <i>Fase Móvel</i> .....	38
1.3.2.2 <i>Bombas</i> .....	38
1.3.2.3 <i>Injeção de Amostras</i> .....	39

1.3.2.4 Colunas.....	39
1.3.2.4.1 Colunas de Proteção ou de Guarda.....	40
1.3.2.4.2 Termostato para Coluna.....	40
1.3.2.5 Detectores.....	41
1.3.3 Adequação do Sistema por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	42
1.3.3.1 Volume interno ( $V_i$ ) e o volume “morto” referente à coluna ( $V_o$ ).....	42
1.3.3.2 Fator de retenção ( $K$ ) ou Fator de capacidade.....	43
1.3.3.3 Eficiência ou número de pratos teóricos( $N$ ).....	43
1.3.3.4 Fator de separação ou fator de seletividade ( $\alpha$ ).....	44
1.3.3.5 Fator de resolução ou resolução ( $R$ ).....	44
1.3.3.6 Fator de cauda ( $FC$ ) ou fator de assimetria do pico ( $As$ ).....	45
1.4 VOLTAMETRIA.....	46
1.4.1. Métodos Voltamétricos de Análise.....	46
1.4.2. Células voltamétricas.....	47
1.5 ÁCIDO VALPRÓICO.....	47
1.5.1 Farmacologia clínica.....	48
1.5.2 Farmacocinética.....	49
1.5.3 Usos terapêutico.....	49
1.5.4 Utilizações Off-Label.....	50
1.5.5 Concentrações Plasmáticas do Fármaco.....	50
1.5.6 Interações medicamentosas.....	51
1.5.7 Reações adversas.....	51
1.6. METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO VALPRÓICO EM CÁPSULAS.....	52
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>53</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>54</b>

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
<b>4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.....</b>	<b>55</b>
4.1 EQUIPAMENTOS.....	55
4.2 REAGENTES E MATERIAIS.....	59
4.2.1 Reagentes.....	59
4.2.2 Materiais.....	59
4.2.3 Padrões.....	60
4.2.4 Amostras.....	60
4.2.4.1 <i>Coleta de Amostras</i> .....	60
4.2.4.2 <i>Amostragem</i> .....	60
<b>5 METODOLOGIAS.....</b>	<b>62</b>
5.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	62
5.1.1 Condições Experimentais.....	62
5.1.2 Monitoramento das Condições Cromatográficas.....	63
5.1.3 Adequação do Sistema.....	63
5.1.4 Estudo da Estabilidade das Soluções Amostra e Padrão.....	63
5.1.5 Condições de validação.....	64
5.1.6 Parâmetros de Validação.....	64
5.1.6.1 <i>Seletividade</i> .....	65
5.1.6.2 <i>Faixa linear de trabalho</i> .....	67
5.1.6.3 <i>Linearidade</i> .....	67
5.1.6.4 <i>Limites de Detecção e Quantificação</i> .....	70
5.1.6.5 <i>Exatidão</i> .....	70
5.1.6.6 <i>Precisão</i> .....	72
5.1.6.6.1 <i>Repetitividade</i> .....	72

5.1.6.6.2 Precisão Intermediária.....	73
5.1.6.7 Robustez.....	73
5.2 AVALIAÇÃO PONTUAL DAS CÁPSULAS DE ÁCIDO VALPRÓICO 250 mg DISPONÍVEIS NO MERCADO.....	75
5.3 POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DO VALPROATO DE SÓDIO 250 mg / 5mL XAROPE.....	75
5.4 VOLTAMETRIA.....	75
5.4.1 Condições Experimentais.....	75
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	77
6.1.1 Condições cromatográficas.....	77
6.1.2 Monitoramento da Temperatura do Laboratório, da Temperatura e Pressão da Coluna.....	77
6.1.3 Resultados da Adequação do Sistema.....	79
6.1.4 Resultado do Estudo de Estabilidade das Soluções Amostra e Padrão de Ácido Valpróico nas Concentrações de Trabalho.....	81
6.1.5 Figuras de mérito avaliadas durante a Validação da Metodologia de Análise do Ácido Valpróico 250 mg.....	84
6.1.5.1 <i>Seletividade</i> .....	84
6.1.5.2 <i>Efeito matriz</i> .....	87
6.1.5.3 <i>linearidade</i> .....	88
6.1.5.3.1 Avaliação da Linearidade da Curva analítica do Ácido Valpróico.....	90
6.1.5.3.2 Verificação da condição necessária para que a linha da regressão do Ácido Valpróico passe pela origem.....	92
6.1.5.4 <i>Determinação dos Limites de Detecção e de Quantificação</i> .....	92
6.1.5.5 <i>Determinação da Precisão: Repetitividade e Precisão Intermediária</i> .....	93

6.1.5.5.1 Repetitividade.....	93
6.1.5.5.2 Precisão Intermediária.....	94
6.1.5.6 <i>Determinação da Exatidão</i> .....	96
6.1.5.7 <i>Determinação da Robustez</i> .....	98
6.2 AVALIAÇÃO PONTUAL DOS MEDICAMENTOS DISPONÍVEIS NO MERCADO.....	106
6.3 POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DO VALPROATO DE SÓDIO 250mg /mL XPE.....	107
6.4 VOLTAMETRIA.....	109
6.4.1 Otimização da metodologia.....	109
6.4.2 Curva Analítica do Medicamento Ácido Valpróico Cápsulas de 250 mg.....	109
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	111
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	112
Anexo 1- Certificado de Análise do Padrão Secundário nº PS 010/10.....	120



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

As primeiras ações de Vigilância Sanitária remontam à Antiguidade e visavam o controle sobre as práticas de cura, meio ambiente e sobre produtos relacionados à saúde e doença. Portugal, no século XV tomou como medida preventiva vigiar portos e navios com intuito de prevenir a chegada das pestes que assolavam a Europa, sendo esta a ação primeira de vigilância sanitária na metrópole (BUENO, 2005). Mas, apenas a partir do Século XVII, na Europa, as atividades de vigilância sanitária foram incorporadas à rotina social. A noção de salubridade, surgida no final do século XVIII na França, foi um marco histórico da vigilância sanitária, conceituando que o que era salubre favorecia a saúde. Essa noção desencadeou ações sanitárias estruturadas por políticas científicas que se consolidaram no século XX por meio da criação de órgãos nacionais de controle (COSTA; ROZENFELD, 2000). Em 1808, com o desembarque da família real no Brasil nosso país passou a integrar a rota comercial inglesa, alavancando as transações comerciais realizadas em nosso território. Para viabilizar tais relações econômicas houve a necessidade de um controle sanitário que permitisse a aceitação dos produtos brasileiros no mercado e que evitassem a disseminação de doenças no país, originando as primeiras ações de vigilância sanitária realizadas em solo brasileiro. Durante os séculos XVII e XVIII houve muitas evoluções nos conceitos e ações sanitárias, porém a consagração da Vigilância como atividade permanente com base no controle de qualidade se deu apenas com a criação da Lei nº 6.360/76 a chamada Lei de Vigilância Sanitária. Nesta época surgiu a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, organizada em cinco divisões: Portos, Aeroportos e Fronteiras, medicamentos, alimentos, Saneantes e Domissanitários, e cosméticos e Produtos (BUENO, 2005). Em 1977 surge a Lei nº 6.437 que dispõe sobre as sanções penais e administrativas que estão sujeitas às infrações sanitárias. Esta lei promulgou instrumentos que até hoje são utilizados pela Vigilância Sanitária no exercício de suas funções: a aplicação de autos de infração, notificação, defesa, impugnação, apreensão de amostras, inutilização de produtos e cancelamento de registros (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Dessa estrutura originaram-se as primeiras ações de Vigilância Sanitária baseada no Poder de Polícia, contudo esses esforços não tiveram impactos positivos esperados, na saúde da população. A década de 1980 foi fundamental para as mudanças ocorridas na saúde pública brasileira. O momento político recheado de cobranças pela abertura democrática contribuiu para o desenvolvimento de uma consciência cidadã da sociedade, isso gerou questionamento em relação às ações do Estado que às vezes se alternava entre defensor da saúde da população e partidário dos interesses comerciais dos produtos produzidos no país. Por pressão de Órgãos, como os Conselhos de Defesa do Consumidor e o Instituto de Defesa do Consumidor, o governo foi levado a se preocupar mais com o cidadão (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Nesse contexto, o movimento de reforma sanitária, ocorrida no final da década de 1980, determinou mudanças no sistema de saúde adotado no país e pela primeira vez uma equipe de sanitaristas assume o órgão nacional de Vigilância Sanitária em 1985. Os sanitaristas vislumbravam a abolição do regime autoritário e centralizador do sistema de saúde e a criação de um novo modelo, entretanto em função da divulgação de vários episódios de calamidade sanitária a equipe foi destituída. Porém, o reconhecimento de que saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas econômicas e sociais que visem à redução do risco de doenças e outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação (BRASIL, 1988), advém de proposta formulada durante o processo conhecido como reforma sanitária (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Outra vitória importante obtida pela reforma sanitária foi a Lei nº 8.080/90, conhecida como Lei Orgânica da Saúde, que regulamentou o Sistema Único de Saúde (SUS) e definiu um novo conceito de Vigilância Sanitária:

Um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que direta ou indiretamente, se relacionam com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos da produção ao consumo, e o controle da prestação de serviços que se relacionem direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990).

Esta conceituação avançou em relação à definição anteriormente postulada, introduzindo novos conceitos, como o de risco, e é acrescida da intervenção do Estado no espectro da concepção saúde/doença (COSTA, 2004).

O SUS tem como diretrizes principais a descentralização, universalidade e a integralidade do atendimento com prioridade à prevenção e a participação da comunidade. A ação de vigilância sanitária, portanto, não somente faz parte das competências do SUS como tem caráter prioritário, por sua natureza essencialmente preventiva. O SUS ainda é um sistema de saúde em construção e continua a ter desafios a enfrentar para a concretização dos seus princípios e diretrizes (LUCCHESI, 2001).

Com a regulamentação do SUS, a vigilância sanitária ganhou visibilidade passando a ter sua importância reconhecida por todos. Contudo, as políticas públicas não foram capazes de promover a capacitação institucional para atender toda a demanda e as críticas sobre a atuação da Vigilância Sanitária aumentaram, paralelamente, vários medicamentos foram alvos de denúncias de falsificação, ineficácia e propostas de reformulação do modelo passaram a ganhar força (COSTA; ROZENFELD, 2000).

Em 26 de janeiro de 1999, a lei nº 9.782, criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em substituição à Secretaria Nacional e definiu como sua finalidade institucional 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.

### 1.1.1 Relação Produção-Consumo

Em uma sociedade onde a produção de bens de consumo era limitada ao atendimento de necessidades básicas, a verificação da qualidade destes bens e de sua eficácia se dava por conta do usuário. A insatisfação com determinado produto era comunicada diretamente ao produtor, e desta forma a especialização na manufatura dos produtos era pequena (LIMA, 1993). Por conta do aumento, quase

incomensurável, das formas de produção, o consumidor vem perdendo a capacidade de avaliar qualidade e eficácia dos produtos que consome. Qualidade e eficácia, do ponto de vista do consumidor, são avaliadas de uma forma bem diferente do que faz o fabricante. Para um consumidor, tais efeitos dizem respeito à aparência, à durabilidade, ao preço, à função e à utilidade do produto com relação ao seu uso imediato, e tem como parâmetro aferidor a sua própria experiência. Para um fabricante, tais conceitos só podem ser mensurados em função de um método analítico e um padrão de referência. É necessário que a população exija qualidade e fiscalize as situações vigentes (LIMA, 1993).

Cabe ao Estado promover a defesa do consumidor segundo lei específica, a qual foi elaborada e promulgada como Lei Federal nº 8.078, entrando em vigor em março de 1991, atendendo pelo nome Código de Defesa do Consumidor. O Art. 4º estabelece que a ação governamental terá o sentido de proteger o consumidor “pela garantia dos produtos e serviços com padrões adequados de qualidade, segurança, durabilidade e desempenho” (BRASIL, 1990).

### 1.1.2 Vigilância na Produção de Medicamentos

Durante a corrida do ouro nos anos de 1700, no Brasil, os abusos cometidos por aqueles que manipulavam os medicamentos eram tamanhos que levou o Capitão-geral das Minas de Ouro a enviar carta ao reino clamando contra os boticários que vendiam na região “medicamentos corruptos, sem substância, que não saravam doentes, mas matavam pela ausência de virtudes terapêuticas” (BUENO, 2005).

Este fato mostra que a preocupação com a qualidade e eficácia dos medicamentos no país é tão antiga quanto os relatos de não conformidades.

Atualmente a produção, distribuição e comercialização de medicamentos no país são reguladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e com o intuito de frear uma série de falsificações, ineficácia e outros problemas provocados pela fabricação de medicamentos com qualidade duvidosa a ANVISA realizou uma série de ações dentre elas, intensificou a fiscalização das indústrias, aumentou o rigor

para registro de produtos e editou a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 134/01.

Em 04 de agosto de 2003 a ANVISA, em substituição à RDC nº 134/01, publicou a RDC nº 210/03 que determinou a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das Boas Práticas para Fabricação de medicamentos, com base no risco potencial de qualidade e segurança, inerentes aos processos produtivos (ANVISA, 2003a).

A ANVISA vem atualizando rotineiramente suas resoluções de diretoria colegiada, e resoluções específicas caracterizando uma preocupação constante com a melhoria contínua da qualidade dos medicamentos comercializados no mercado Nacional. Por tais razões é imprescindível o desenvolvimento de métodos de análise eficazes e confiáveis para o controle da qualidade dos fármacos (LA ROCA et al., 2007).

A RDC nº 210/03 contribuiu significativamente para a melhoria dos processos fabris vinculados à produção de medicamentos, contudo, com o passar dos anos ela mostrou algumas deficiências, e em virtude disto a ANVISA percebeu a necessidade da revisão da referida RDC e no início do ano 2010 publicou a RDC nº 17/10 revogando à RDC nº 210/03 caminhando para um maior rigor na qualidade do produto fabricado pela indústria de medicamentos (ANVISA, 2010).

Um dos requisitos das Boas Práticas de Fabricação (BPF), preconizadas pela RDC nº17/10 da ANVISA, é que o laboratório produtor tenha capacidade de analisar a concentração do fármaco produzido, com total confiabilidade. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. Se o método utilizado estiver descrito em um compêndio oficial e for seguido integralmente está dispensado da validação, caso o método tenha sido desenvolvido no laboratório, este deverá ser validado. A validação de metodologia analítica tem como objetivo confirmar que os métodos empregados são adequados ao uso (NBR ISO/IEC 17025, 2005).

Para desempenhar o controle sanitário dos medicamentos, após a comercialização, a ANVISA conta com as vigilâncias estaduais e municipais e com o auxílio dos Laboratórios Centrais (LACEN) e do INCQS, que têm como uma de suas funções a avaliação analítica de alimentos, produtos biológicos, medicamentos e produtos para saúde, para fornecer subsídios e elucidar dúvidas quanto à qualidade

mínima dos produtos sujeitos à vigilância sanitária, e vem ao longo dos anos comprovando a possível ineficácia terapêutica de muitos medicamentos, levando ao recolhimento destes do mercado, esta retaguarda oferecida pelos LACEN e INCQS é fundamental no controle sanitário de medicamentos (COSTA, 2004).

## 1.2 VALIDAÇÃO

O primeiro registro que se tem do uso oficial do termo validação, encontra-se nas *Good Manufacturing Practices* - GMPs publicadas na *Food and Drug Administration* - FDA em 1978, contudo, somente em 1980 foi definido validação como o estabelecimento de evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado. Já em 1992 a validação de métodos e processos foi incorporada as GMPs da Organização Mundial da Saúde - OMS. (VALENTINI et al, 2007)

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Validar é a garantia legítima devidamente documentada de que a metodologia é adequada ao fim a que se destina. No Brasil duas normas são utilizadas para orientar os processos de validação de metodologias analíticas, o DOQ-CGE-008 de fevereiro de 2010 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e a resolução específica - RE nº899 de 29/05/2003 da ANVISA. Para o INMETRO (2010) o método de análise deve apresentar, quando aplicável, seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, limite de quantificação, limite de detecção, tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez adequados à análise. A ANVISA sugere que seja feita a figura de mérito especificidade e usa a designação intervalo, para o que o INMETRO chama de faixa de trabalho e dá o nome de exatidão, para aquilo que o INMETRO chama de recuperação, as demais figuras de mérito são iguais nas duas normas. Antes de se definir os parâmetros de validação de uma metodologia analítica, deve ser feita a verificação do sistema analítico observando se o mesmo apresenta qualificação de instalação, operação e desempenho, bem como avaliar a estabilidade das soluções amostra, padrão, reagentes antes de iniciar a validação do método. (SHARBIR,

2002). Antes das verificações complexas da validação deve-se fazer uma pré-validação completa ou exploratória onde deverá ser verificada, com menor rigor, a seletividade, linearidade, precisão, limite de quantificação e de detecção (TAPPIN et al, 2008).

## 1.2.1 Figuras de Mérito Utilizadas na Validação de Metodologias Analíticas

### 1.2.1.1 *Especificidade*

Os testes de especificidade estão relacionados com a capacidade do método de ser específico para um determinado analito. Desta forma, o analito, a matriz com e sem o analito, excipientes, impurezas, produtos de degradação e reagentes em branco devem ser testados para avaliar a interferência. No teste de especificidade, às vezes se faz necessário expor todos os componentes e a matriz a condições extremas (calor, ácido, álcali, oxidação, radiação UV/Visível), para determinar possíveis produtos de degradação (ANVISA, 2003).

### 1.2.1.2 *Seletividade*

A seletividade de um método analítico caracteriza sua capacidade em determinar, de forma inequívoca, o analito na presença de componentes da amostra que poderiam interferir com a sua determinação (RIBANI et al, 2004).

A amostra pode conter substâncias que interferem no desempenho da medição pelo método selecionado, sem causar um registro visível no teste de especificidade. Os interferentes podem alterar o resultado de uma análise, e a magnitude deste efeito também pode depender da concentração (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

Uma maneira de se avaliar a seletividade para técnicas cromatográficas é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação da amostra com o

de um padrão e utiliza-se o resultado como uma indicação da presença do composto puro (ANVISA, 2003).

Um tipo especial de interferência é o efeito matriz e consiste na diminuição ou aumento da resposta instrumental do analito devido à presença de outros interferentes. Para uma mesma concentração do analito, a análise de uma amostra real ou de uma solução de referência pura não fornece a mesma resposta instrumental. Para se avaliar o efeito matriz é comparada a matriz isenta da substância de interesse com a matriz adicionada desta substância, ressaltando-se que nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar claramente separada dos demais componentes da amostra. Entretanto, inúmeras vezes fica inviável obter a matriz sem analito, e a alternativa para sobrepujar este problema é utilizar a técnica de adição padrão, que consiste na adição de concentrações conhecidas e crescentes do analito à própria amostra em análise e posterior elaboração da curva de adição padrão. (LUNA; PINHO, 2009)

#### *1.2.1.3 Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho*

Qualquer método quantitativo tem valores em que o método pode ser aplicado com segurança. 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. A faixa de resposta linear pode ser verificada durante o estabelecimento da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para qual o ensaio está preconizado.

O intervalo entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico no qual é possível determinar o analito com precisão, exatidão e linearidade, nas condições especificadas no ensaio, é chamado faixa linear de trabalho. (INMETRO, 2010)

Os limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para os ensaios de teor (80% a 120%), uniformidade de conteúdo em formas farmacêuticas deverá ser de 70% a 130% da concentração teórica do teste (ANVISA, 2003).



#### 1.2.1.4 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico em emitir 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 com no mínimo cinco concentrações diferentes, e é avaliada por intermédio da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear mínimo da curva deve ser 0,99 (ANVISA, 2003). O INMETRO (2010), pede outras avaliações como verificar a homocedasticidade das variações e o cálculo dos resíduos e sugere que a curva analítica seja elaborada com no mínimo cinco pontos e com um número de replicatas em cada nível de concentração que expresse a realidade empregada no laboratório.

Segundo Souza e Junqueira (2005), na determinação da linearidade o primeiro passo é determinar a faixa de interesse, preparar a curva analítica com no mínimo seis pontos, em triplicatas genuínas e medir as respostas em ordem aleatória. Segundo passo é verificar os dados obtidos, fazer uma inspeção visual da curva; estimar o intercepto, o resíduo, as variâncias e a correlação; realizar análise visual dos resíduos; investigar e tratar os valores aberrantes. Terceiro passo é verificar a normalidade Homocedasticidade, independência dos resíduos, a regressão e falta de ajuste (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005)

#### 1.2.1.5 Limite de quantificação e limite de detecção

Em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito 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, sem se preocupar com a capacidade de quantificá-lo (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010). A avaliação visual pode ser usada em métodos instrumentais e não instrumentais. O limite de detecção do equipamento é definido como a concentração do analito que emite uma relação mínima sinal/ruído de 3:1. Análises estatísticas do limite de detecção podem servir de orientação para determinação deste limite, mas o ideal é que seja determinado experimentalmente,

já que este valor pode variar em função das características da amostra analisada não sendo possível encontrar uma fórmula estatística perfeita. (INMETRO, 2010)

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. O LQ é 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, 2010).

#### *1.2.1.6 Tendência/Recuperação*

Os processos utilizados para avaliar a tendência de um método são a comparação com Materiais de Referência Certificados (MRC); comparações interlaboratoriais e ensaios de recuperação do analito (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2010).

A tendência serve para avaliar numericamente a exatidão de um método analítico. A exatidão é expressa pelo grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito (BARROS, 2002; INMETRO, 2010).

A exatidão é caracterizada pela proximidade entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão pode ser expressa como a percentagem de recuperação do analito (ANVISA, 2003).

#### *1.2.1.7 Precisão*

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 formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, precisão intermediária e a reprodutibilidade, sendo

usualmente expressas pelo desvio-padrão e coeficiente de variação (ICH, 1996; ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

#### 1.2.1.8 Repetitividade

Repetitividade é expressa pelo grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito no menor espaço de tempo possível, nas mesmas condições de análise, ou seja, o mesmo procedimento de medição, mesmo analista, instrumento e local. Devem ser feitas, no mínimo, nove determinações contemplando a faixa linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta e o número de replicatas em cada nível de concentração devem ser semelhante a da rotina do laboratório. (INMETRO, 2010) A ANVISA sugere também a possibilidade de se fazer seis determinações a 100% da concentração do fármaco.

$$\text{DPRr} = (\text{DP} \times 100) / \text{CMD}$$

Equação 1

Sendo:

DP = desvio-padrão

CMD = concentração média determinada

O INMETRO 2010, aconselha que seja calculado o limite de repetitividade (r), por meio da equação 2, para avaliar se há diferença significativa entre duplicatas de uma mesma amostra.

$$r = t_{(n-1, 1-\alpha)} \sqrt{2} \cdot S$$

Equação 2

#### 1.2.1.9 Precisão intermediária

É definida como a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas

definindo claramente as condições a variar tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos. Esta medida de precisão é mais aconselhável de usar por ser a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2010).

Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se várias medições em replicatas, ou em ensaio único, sobre a mesma amostra, nas condições pré-definidas. Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo, existem vários métodos para a determinação deste tipo de precisão (INMETRO, 2010). Uma das formas de verificação da precisão intermediária é por meio do gráfico de controle do desvio padrão que poderá ser utilizado para replicatas de amostras e padrões comprovadamente estáveis ao longo do tempo, outra forma é pela expressão descrita na equação 3:

$$Spi_{(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad \text{Equação 3}$$

$Spi_{(j,k)}$  = desvio padrão de precisão intermediária

T= total de amostras ensaiadas

N= total de ensaios efetuados por amostras

J= nº da amostra, j=1, t

K= nº do ensaio da amostra j, k=1, n

$y_{jk}$  = valor do resultado k para amostra j

$y_j$  = representa a média aritmética dos resultados da amostra j.

No caso acima a determinação da precisão intermediária é feita por meio de t valores de n ensaios de amostras ou padrões e baseia-se na dispersão entre os ensaios. É recomendado que o valor t(n-1) seja no mínimo 15. (INMETRO, 2010).

### 1.2.1.10 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade de ser insensível 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 às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007).

A tabela 1 mostra exemplos de situações que podem ser consideradas para avaliação da robustez de um método analítico, levando em consideração o equipamento utilizado na metodologia que se pretende validar.

Tabela 1

Fatores a serem considerados na determinação da robustez

Preparo das Amostras	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Estabilidade das soluções analíticas</li> <li>·Tempo de extração</li> </ul>
Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Variação do pH da solução</li> <li>·Temperatura</li> <li>·Diferentes fabricantes de solventes</li> </ul>
Cromatografia Líquida	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Variação do pH da fase móvel</li> <li>·Variação na composição da fase móvel</li> <li>·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas</li> <li>·Temperatura</li> <li>·Fluxo da fase móvel</li> </ul>
Cromatografia Gasosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Diferentes lotes ou fabricantes de colunas</li> <li>·Temperatura</li> <li>·Velocidade do gás de arraste</li> </ul>

Fonte ANVISA, 2003

O teste de *Youden* é utilizado para determinar a robustez de um método analítico e ordenar a influência de cada uma das variações, as quais o método é submetido, nos resultados encontrados. O referido teste fundamenta-se na classificação das especificações nominais do método por letras maiúsculas, de A a G e as variações realizadas, por letras minúsculas. Depois, são realizados oito ensaios separados, em ordem aleatória, para determinar os efeitos da variação dos sete diferentes fatores, no procedimento analítico. (INMETRO, 2007; INMETRO, 2010).

As figuras de mérito que serão avaliadas dependerão da categoria na qual a validação se enquadra. A categoria do teste é baseada na finalidade do método que se pretende validar, conforme tabela 2 e para cada categoria será exigido um conjunto de testes apresentados na tabela 3.

Tabela 2

Classificação dos testes, segundo sua finalidade

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

Fonte ANVISA, 2003

Tabela 3

Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

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

Fonte ANVISA, 2003

### 1.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

#### 1.3.1 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) finamente dividida e a fase móvel líquida (fm). A fase estacionária é o “suporte” revestindo o interior da coluna, pela qual passa um fluxo contínuo de fase móvel ou eluente, estes sistemas são capazes de separar misturas bastante complexas (VOGEL, 2002; USP 33, 2010).

Os componentes da amostra são retidos, seletivamente, na fase estacionária, resultando em migrações em tempos diferentes, definidas pela maior ou menor afinidade da amostra com a fase móvel. As principais características da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são o alto poder de resolução,

separações rápidas, monitoramento contínuo do eluente, acuracidade das medidas quantitativas (VOGEL, 2002).

Os primeiros trabalhos com cromatografia líquida de alta eficiência datam de 1968 e comprovaram a possibilidade de utilizar equipamentos com fase móvel líquida sob alta pressão obtendo resultados satisfatórios e rápidos, comparável aos alcançados com cromatografia gasosa. (VALENTE et al, 1983)

1.3.2 Principais componentes de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 1.3.2.1 Fase Móvel

A separação satisfatória do analito depende da interação entre o soluto, a fase móvel e a fase estacionária. Para garantir a repetitividade do desempenho, os solventes devem ser os mais puros possíveis, o mercado já oferece solvente grau CLAE, inclusive água, porém não exclui a necessidade de degaseificá-los. O poder de eluição da fase móvel é determinado por sua polaridade, pela polaridade da fase estacionária e pela natureza do analito (VOGEL, 2002). Uma eluição com um único solvente ou com uma mistura de solventes de composição constante é **isocrática**.

Quando são utilizados dois ou mais solventes, de diferentes polaridades, e a razão entre os solventes varia em uma forma pré-programada de uma forma contínua ou em etapas estamos diante de uma eluição por **Gradiente**. A eluição por gradiente geralmente melhora a eficiência da separação (SKOOG; LEARY, 1992).

#### 1.3.2.2 Bombas

Uma bomba para cromatografia líquida necessita de requisitos como, habilidade de gerar pressões de até 6000 psi (libras/polegadas quadradas), saída livre de pulsação, vazões na faixa de 0,1 a 1,0 mL/min, reprodutibilidade relativa da vazão de 0,5% ou melhor, e resistência à corrosão por uma grande variedade de



solventes. Há três tipos principais de bomba: a de seringa acionada por rosca, a bomba recíproca e a bomba pneumática de pressão constante.

As bombas de seringa produzem uma saída livre de pulsação cuja vazão pode ser controlada facilmente, porém possuem pequena capacidade, aproximadamente 250 mL.

A bomba recíproca é a mais amplamente utilizada, e consiste em uma câmara pequena e cilíndrica que é preenchida e esvaziada pela movimentação de ida e vinda de um pistão. As vantagens das bombas recíprocas são volume interno pequeno, alta pressão de saída (até 10.000 psi), adaptação à eluição por gradiente e vazões constantes independentes da queda de pressão imposta pela coluna e da viscosidade do solvente.

A bomba pneumática consiste em um reservatório maleável de solvente inserido em um vaso que pode ser pressurizado por um gás comprimido. Estas bombas são simples, de baixo custo e livres de pulsação, porém apresentam capacidade e pressão de saída limitada e as vazões são dependentes da viscosidade do solvente. Este tipo de bomba não pode ser adaptado para eluição por gradiente (SKOOG; LEARY, 1992).

#### *1.3.2.3 Injeção de Amostras*

Normalmente, a injeção de amostras pode ser feita de duas maneiras: injeção manual utilizando-se uma seringa ou injeção automática com válvulas de amostragem, estas são mais utilizadas atualmente, e permitem a entrada de amostra de forma reprodutiva, sem interrupções significativas do fluxo da fase móvel. O volume de amostra varia de 2 a 100  $\mu$ L apenas com a mudança da válvula ou com válvulas de volume variável (VOGEL, 2002).

#### *1.3.2.4 Colunas*

As colunas mais usadas são as de tubo de aço inox com diâmetro interno de 4 a 5  $\mu$ m e comprimentos que variam de 7,5 a 30 cm. O empacotamento feito por

partículas porosas de sílica menores que 10 µm são utilizados em quase todas as colunas de CLAE. O tamanho da coluna pode influenciar a resolução da amostra, porque o número de pratos teóricos é proporcional ao comprimento da coluna, e a velocidade da análise. Quanto menor o diâmetro da partícula, maior a eficiência (HARRIS, 2008). O recheio mais comumente utilizado na cromatografia líquida é preparado a partir de sílica, as quais são sintetizadas aglomerando-se partículas de sílica de tamanho submicrométrico sob condições que levam a formação de partículas maiores com diâmetros altamente uniformes. Essas partículas geradas são recobertas com filmes orgânicos, os quais são química ou fisicamente ligados à superfície. Existem outros materiais utilizados como recheio como partículas de alumina, de polímeros porosos e resinas de troca iônica (SKOOG; LEARY, 1992).

#### *1.3.2.4.1 Colunas de Proteção ou de Guarda*

Nas análises por CLAE é comum se utilizar uma pré-coluna à frente da coluna analítica com a finalidade de aumentar a vida útil desta, a pré-coluna tem o intuito de remover o material particulado e os contaminantes de alguns solventes. A proteção da coluna serve, também, para saturar a fase móvel com a fase estacionária de forma a minimizar as perdas de fase estacionária na coluna analítica. A composição da pré-coluna deve ser semelhante a da coluna analítica, entretanto o tamanho de partícula é normalmente maior para minimizar a queda de pressão. (SKOOG; LEARY, 1992).

#### *1.3.2.4.2 Termostato para Colunas*

A maioria das aplicações cromatográficas não necessita de controle rigoroso de temperatura sendo realizada à temperatura ambiente. Porém, algumas análises necessitam de aquecedores que controlam a temperatura da coluna com tolerância de poucos décimos de graus. Estes aquecedores podem chegar a 150 °C (SKOOG; LEARY, 1992).

### 1.3.2.5 Detectores

Após os componentes de uma mistura serem separados na coluna cromatográfica eles devem ser detectados na saída. Um detector ideal de qualquer tipo deverá ser sensível a pequenas concentrações do analito, fornecer uma resposta linear, deve ser insensível a pequenas variações de temperatura e composição da fase móvel. Os detectores em CLAE devem apresentar um volume morto pequeno, para minimizar o alargamento de sinal extra coluna. O detector na CLAE mais utilizado é o de absorção no ultravioleta- visível (UV-Vis), ele mede a quantidade de luz absorvida durante a passagem do eluente por uma pequena célula de fluxo colocada no caminho ótico do feixe de radiação (VOGEL, 2002). Os instrumentos modernos usam arranjos lineares de fotodiodos que podem adquirir um espectro UV-vis completo à medida que o analito deixa a coluna. Outros detectores utilizados são; luminescência, índice de refração, eletroquímicos (SKOOG; LEARY, 1992). A figura 1 mostra um sistema simplificado de CLAE.

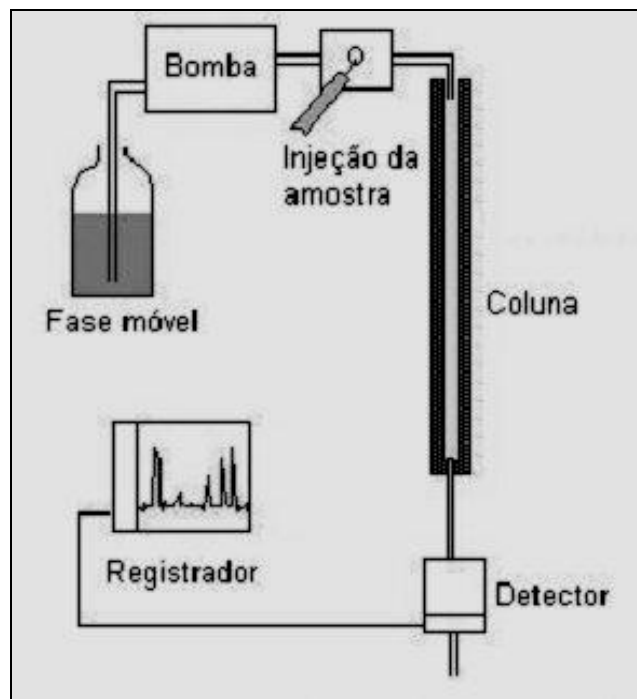


Figura1 - Estrutura básica de um cromatógrafo líquido de alta eficiência  
Fonte: <http://images.google.com.br>

### 1.3.3 Adequação do Sistema por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Alguns parâmetros apresentados na Tabela 4 são utilizados para verificar se os sistemas cromatográficos estão adequados quanto à resolução e a reprodutibilidade dentre eles (fator de retenção, número de pratos teóricos, fator de seletividade, resolução, fator de cauda e desvio padrão relativo entre as replicatas) (HARRIS, 2008; USP 33, 2010).

Tabela 4

Limites dos parâmetros para a adequação do sistema cromatográfico	
Parâmetros	(USP 33, 2008)
Fator de capacidade (K)	$K > 2$
Nº de pratos teóricos (N)	Em geral $N > 2000$
Resolução (R)	$R > 2$
Fator de cauda (FC)	$FC < 2$
Repetitividade (DPR)	DPR $< 2\%$

Fonte: SHABIR, 2003; USP 33, 2010

#### 1.3.3.1 Volume interno ( $V_i$ ) e o volume “morto” referente à coluna ( $V_o$ ).

É o volume compreendido entre o injetor e o detector incluindo a coluna. O  $V_o$  da coluna representa cerca de 95% do  $V_o$  total. O  $V_o$  dos injetores, das células de fluxo e dos detectores tende a ser minimizados pelos fabricantes isso 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 poderá ser determinado experimentalmente ou calculado levando-se em conta as dimensões da coluna e o tamanho da partícula. A equação 4 correlaciona o volume interno da coluna vazia ( $V_i$ ) com o  $V_o$  da coluna e o diâmetro da partícula de seu preenchimento (CASS; DEGANI; 2001).

$$V_i = R^2 C$$

Equação 4

R = raio interno da coluna

C = comprimento da coluna

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

0,5 e 0,7 são fatores matemáticos para tamanho de partícula igual a 5  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

### 1.3.3.2 Fator de retenção ( $K'$ ) ou Fator de capacidade

O fator de retenção ou fator de capacidade é um parâmetro importante, amplamente utilizado para descrever as velocidades de migração dos solutos nas colunas. Para um soluto A, o fator de retenção  $K_A$  é definido conforme a equação 5.

$$K'_A = K_A V_E / V_M \quad \text{Equação 5}$$

Onde  $K_A$  é a constante de distribuição da espécie A.  $V_E$  é o volume da fase estacionária e  $V_M$  é volume da fase móvel.

Quando o fator de retenção de um soluto for muito menor que a unidade, a eluição se dará muito rapidamente e a determinação precisa do tempo de retenção ficará prejudicada. Quando o ( $K'$ ) for maior que 20 ou 30, os tempos de eluição tornam-se extraordinariamente longos. O ideal é que as separações sejam feitas em condições nas quais os fatores de retenção dos solutos em uma mistura caiam em um intervalo entre 2 e 10. (SKOOG; LEARY, 1992; HARRIS, 2008)

### 1.3.3.3 Eficiência ou número de pratos teóricos ( $N$ )

Dois termos são largamente utilizados para expressar a eficiência de uma coluna cromatográfica são eles: H- altura equivalente a um prato teórico e N- números de pratos teóricos, estes termos estão relacionados na equação 6:

$$N = L/H \quad \text{Equação 6}$$

Onde L é o comprimento da coluna.

Quanto maior for o número de pratos teóricos maior será a eficiência da coluna e o número de pratos teóricos será maior à medida que se diminui a altura de um prato teórico (VOGEL, 2002).

#### 1.3.3.4 Fator de separação ou fator de seletividade ( $\alpha$ )

O fator de separação ( $\alpha$ ) de uma coluna para as duas espécies A e B é expresso pela equação 7.

$$(\alpha) = K_B/K_A \quad \text{Equação 7}$$

Onde  $K_B$  é a constante de distribuição da espécie B retida mais fortemente e  $K_A$  é a constante de distribuição da espécie A, retida menos fortemente, ou que elui mais rapidamente. Conforme esta definição, ( $\alpha$ ) é sempre maior que um.

Atualmente prefere-se usar o termo fator de separação a fator de seletividade. (SKOOG; LEARY, 1992)

#### 1.3.3.5 Fator de resolução ou resolução ( $R$ )

A resolução da coluna fornece quantitativamente evidências sobre a habilidade da coluna de separar dois analitos, a resolução é calculada utilizando a equação 8

$$R = 2 (T_R)_A \cdot (T_R)_B / W_A + W_B \quad \text{Equação 8}$$

Uma resolução de 1,5 permite a separação essencialmente completa de dois componentes, a superposição dos sinais cromatográficos nestes casos é de aproximadamente 0,3%. Alongar a coluna pode ser uma saída para melhorar a resolução, pois aumentaria o número de pratos teóricos, porém, a adição de pratos teóricos aumentaria o tempo necessário para a separação, o que não é desejável. (SKOOG; LEARY, 1992; HARRIS, 2008)

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

As variações em relação à dispersão normal dos sinais dos analitos dão origem a deformações no início ou no final do sinal cromatográfico.

As caudas ocorrem devido à presença de sítios ativos na fase estacionária que retém algumas moléculas do soluto segundo forças de interação mais altas do que as usuais em cromatografia líquida de alta eficiência.

As deformações frontais ocorrem quando algumas moléculas fora da zona de concentração percolam a frente do pico, ou seja, são menos retidas pela fase estacionária. Isso acontece, por exemplo, quando uma grande quantidade de amostra é injetada, super saturando a coluna, excedendo a sua capacidade de retenção. (HARRIS, 2008)

Existem duas formas de se calcular o formato do sinal cromatográfico, no caso do fator de cauda se calcula a 5% da altura do pico, já o fator de assimetria é avaliado a 10% da altura do pico e a correlação dos dois fatores é apresentada na tabela 5.

Tabela 5

Relação entre fator de cauda e o fator de assimetria

Fator cauda 5%	Fator de assimetria 10%
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

## 1.4 VOLTAMETRIA

Em 1922, Jaroslav Heyrovsky publicou um artigo (PETERS et al., 1974) descrevendo uma nova técnica eletroanalítica denominada “polarografia”. A importância desta técnica para o desenvolvimento científico foi de tal ordem que por esta descoberta recebeu o Prêmio Nobel de Química em 1959.

A polarografia é um caso particular da voltametria, na qual se utiliza o eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho. As técnicas voltamétricas utilizam outros tipos de eletrodos como os eletrodos sólidos (de carbono vítreo, platina, ouro, entre outros) ou eletrodos estáticos de mercúrio (eletrodo de gota pendente - HMDE, eletrodo de filme de mercúrio, EFM) como eletrodo de trabalho. Estas técnicas se baseiam no estudo das curvas corrente-potencial resultantes de processos de transferência de elétrons que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho sempre que um processo de transferência de elétrons (redução ou oxidação de espécies eletroquimicamente ativas) é observado, em função do potencial aplicado.

Dentre as vantagens da voltametria, pode-se citar a possibilidade de se analisar qualitativamente e quantitativamente soluções diluídas (até cerca de  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>), requerer pequeno volume de amostra (em alguns casos apenas 0,05 mL de amostra é suficiente) e possibilitar a determinação quantitativa tanto de substâncias orgânicas quanto inorgânicas (PETERS et al., 1974).

A importância analítica da voltametria origina-se de duas características dos voltamogramas (curvas de potencial-corrente) obtidos. Primeiro, a posição dos sinais analíticos em relação ao potencial aplicado pode ser utilizada como ferramenta útil na identificação das espécies eletroativas. Segundo, sob condições experimentais específicas, a corrente limite é governada pela concentração da espécie eletroativa na solução em análise.

### 1.4.1 Métodos voltamétricos de análise

Os métodos voltamétricos podem ser aplicados tanto para análise de espécies inorgânicas (íons metálicos - incluindo especiação, complexos, ânions) quanto para espécies orgânicas, como pesticidas, herbicidas, corantes, medicamentos (BAREK et al., 2001)



Atualmente observa-se um grande número de pesquisas desenvolvidas na aplicação de métodos voltamétricos de análise em preparações farmacêuticas, em fluidos biológicos e amostras ambientais. Estes trabalhos estão relacionados às análises qualitativas e quantitativas de princípios ativos em medicamentos como dipirona, captopril (MARCOLINO JUNIOR, 2007), ranitidina (SOUZA et. al, 2004) e paracetamol (SANTOS, 2003) e também relacionados à determinação e/ou detecção de seus produtos de degradação e metabólitos.

#### 1.4.2 Células voltamétricas

As células eletroquímicas utilizadas em voltametria/polarografia são constituídas do eletrólito suporte e de dois ou três eletrodos. Nas células com dois eletrodos, um é o eletrodo de trabalho e outro o eletrodo de referência. Em virtude da menor superfície o eletrodo de trabalho se polarizará, assumindo o potencial aplicado, de modo que a corrente que flui através dele seja proporcional à concentração da espécie eletroativa (ALEIXO, 2003). Paralelamente, o eletrodo de referência, por possuir maior superfície, não se polarizará e manterá seu potencial constante ao longo do processo. Este tipo de célula obriga a utilização de eletrodos de referência com áreas relativamente grandes, para que mantenham o potencial constante durante a aplicação de potencial. Devido à passagem de corrente através do eletrodo de referência e reações que ocorrem no mesmo, as medições de sinal analítico seriam afetadas, uma vez que esta corrente se aproximaria do valor da corrente de difusão, sendo isto um inconveniente das células de dois eletrodos. As células de três eletrodos vieram para corrigir este problema (WANG, 2006) já que a presença de um eletrodo auxiliar, na célula voltamétrica, assegura que a corrente produzida no sistema não interfira no potencial constante do eletrodo de referência.

#### 1.5 ÁCIDO VALPRÓICO

O ácido valpróico (Figura 2) é um ácido carboxílico denominado como ácido 2-propilpentanóico sendo sua fórmula empírica  $C_8H_{16}O_2$  e seu peso molecular 144. Apresenta-se como um líquido incolor, levemente insolúvel em água e muito solúvel

em solventes orgânicos, seu pKa é de 4,6, ponto de ebulição 120 a 130°C (THE MERCK, 2001; DRUGBANK, 2010). Valproato é o termo genérico usado para o ácido valpróico, seus sais e ésteres (MARTINDALE, 2005). O ácido valpróico teve seu uso aprovado nos Estados Unidos em 1978, suas propriedades anticonvulsivantes foram descobertas acidentalmente quando este foi usado como veículo para outras substâncias utilizadas como anticonvulsivante.

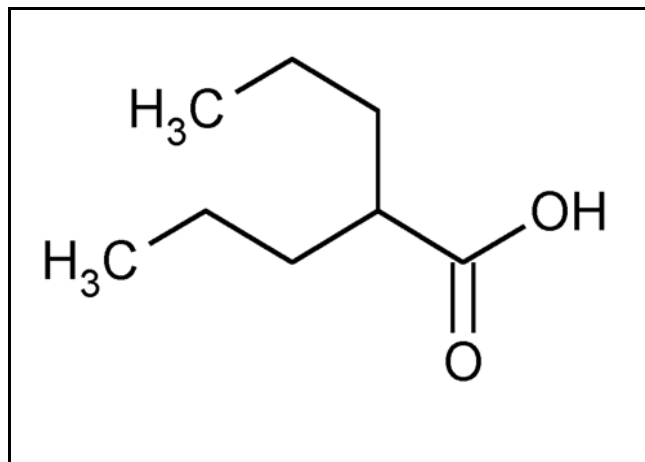


Figura 2 Estrutura química do ácido valpróico  
Fonte USP 33, 2010

### 1.5.1 Farmacologia clínica

O ácido valpróico (valproato) é um agente anticonvulsivante não relacionado quimicamente com outras drogas empregadas no tratamento de distúrbios convulsivos. Não apresenta nitrogênio ou moléculas aromáticas características de outras drogas anticonvulsivantes. Seu mecanismo de ação ainda não foi bem estabelecido, porém, o ácido valpróico produz pequenas reduções da corrente de cálcio de baixo limiar (T) em concentrações que limitam a deflagração repetida e mantida essas ações parecem contribuir para eficácia do uso do ácido valpróico nos distúrbios epilépticos (GOODMAN; GILMAN, 2005). A ação é semelhante tanto à da fenitoína como à da carbamazepina, e parece ser mediada por uma recuperação prolongada dos canais de Na<sup>+</sup> ativados por voltagem do estado de inativação. Outro mecanismo possível está relacionado com o aumento dos níveis do ácido gama-

aminobutírico (GABA) no cérebro, pela inibição das enzimas GABA-transaminase e semi aldeído succínico desidrogenase. Até hoje é difícil estabelecer a correlação do aumento dos níveis de GABA e a atividade anticonvulsivante do Valproato. (CANTELLO et al., 2006; GOODMAN; GILMAN, 2005).

### 1.5.2 Farmacocinética

É rapidamente absorvido por via oral e atinge níveis sanguíneos máximos entre uma a quatro horas após a ingestão de uma dose única de ácido valpróico. Ocorre ligeira demora na absorção inicial quando o medicamento é administrado com alimentos ou na forma de comprimidos com revestimento entérico. O volume de distribuição aparente do ácido valpróico é de cerca de 0,2 L/Kg. Não foi estabelecida uma relação entre a dose diária, o nível sérico e o efeito terapêutico. A droga é rapidamente distribuída nos tecidos e se liga fortemente (90%) às proteínas plasmáticas humanas, essa ligação diminui à medida que a concentração total de valproato aumenta na faixa terapêutica. Sua metabolização ocorre principalmente no fígado (95%), menos de 5% são excretados em forma inalterada. Seu metabolismo hepático ocorre principalmente através da enzima UGT e de  $\beta$ - oxidação (GOODMAN; GILMAN, 2005). O valproato é substrato para a CYP2C9 e CYP2C19, porém o metabolismo via essas enzimas responde por apenas uma pequena parte de sua eliminação. Alguns dos metabólitos desse fármaco, principalmente o ácido 2-propil-2-pentenóico e ácido 2-propil-4-pentenóico, são anticonvulsivantes quase tão potentes quanto à própria substância, porém, somente o primeiro se acumula no plasma e no cérebro de modo significativo. A meia-vida do valproato é de cerca de 15 horas, sendo menor nos pacientes que estão fazendo uso de outros antiepiléticos.

### 1.5.3 Usos terapêuticos

Valproato está indicado como monoterápico em crises de ausência, mioclônica, parciais e tônico-clônicas. A dose inicial geralmente é de 15 mg/Kg sendo aumentada semanalmente até a dose máxima de 60 mg/Kg. Doses

fracionadas devem ser administradas quando a dose total ultrapassar 250 mg (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Indicado na Epilepsia juvenil mioclônica, porém alguns efeitos tóxicos sistêmicos são observados (LEVISOHN; HOLLAND, 2007). Valproato, também, é usado como alternativa ao lítio em pacientes portadores de desordem bipolar; em casos de depressão; enxaqueca e convulsões febris. (MARTINDALE, 2005). Também pode ser utilizado sozinho ou combinado com outros fármacos em convulsões causadas por tumor de cérebro (MÉLANIE et al., 2009)

#### 1.5.4 Utilizações Off-Label

Recentes estudos mostram que o ácido valpróico pode ser útil para diminuir a carga viral em portadores de HIV, porém a erradicação do vírus é considerada impossível (ALBRECHT, 2005).

Existem três medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para a terapêutica da dependência de álcool (dissulfiram, naltrexona e acamprosato). O ácido valpróico mostrou excelentes resultados para tratamento da síndrome de abstinência do álcool e para prevenção de recaídas. Porém, seu uso para este fim não está aprovado pelo FDA (CASTRO; COUZI, 2006).

Recentes pesquisas também mostram que o ácido valpróico pode ser eficaz no tratamento do mal da retina pigmentosa. (KAUSHAL, 2010)

#### 1.5.5 Concentrações Plasmáticas do Fármaco

A concentração de valproato associada aos efeitos terapêuticos é de aproximadamente 30-100 µg/mL, porém a correlação entre concentração e efeito terapêutico não é muito boa. Supõe-se ter um limiar ótimo de concentração em torno de 30-50 µg/mL, nesta faixa de concentração os sítios de ligação da albumina plasmática começam a ficar saturados.

### 1.5.6 Interações medicamentosas

As medicações que afetam o nível de expressão das enzimas hepáticas, particularmente, aquelas que elevam os níveis de glucuronil transferase, podem aumentar a depuração de valproato. Por exemplo, fenitoína, carbamazepina e fenobarbital podem duplicar a depuração de valproato. Então, pacientes em monoterapia geralmente terão meias-vidas maiores e concentrações mais altas que pacientes recebendo politerapia com medicações antiepilépticas (GOODMAN; GILMAN, 2005). Devido a estas alterações na depuração de valproato, a sua monitoração e as concentrações de medicações concomitantes deverão ser aumentadas sempre que medicações indutoras de enzimas forem introduzidas ou retiradas.

### 1.5.7 Reações adversas

Os efeitos colaterais mais freqüentemente relatados no início da terapia são náusea, vômito, anorexia. São efeitos usualmente transitórios e raramente requerem interrupção do tratamento. Erupção cutânea, alopecia, hepatotoxicidade e aumento do apetite com ganho de peso têm sido informados. Ainda que raramente, o uso de ácido valpróico pode levar a hepatite fulminante, muitas vezes fatal. Efeitos sobre o sistema nervoso central são sedação, ataxia e tremor estes sintomas ocorrem com pouca freqüência e diminuem com a dose (GOODMAN; GILMAN, 2005). Casos de pancreatite aguda induzida por ácido valpróico também são relatados (SANTOS et. al, 2010). Entre os anticonvulsivantes o ácido valpróico está relacionado como o mais freqüente causador de intoxicações intencionais ou não intencionais. Entretanto, concentrações menores que 450 mg/L produzem toxicidade limitada, já valores acima de 850 mg/L causam severas intoxicações podendo induzir ao coma (BROEK et al., 2009).

Estudos apontam para uma tendência de efeitos endócrinos como ganho de peso e hiperleptinemia em pacientes sob tratamento com ácido valpróico (BORTOLINI et al. 2008).

O ácido valpróico também está relacionado com a má formação congênita, mas precisamente espinha bífida em crianças cuja mãe fez uso do medicamento no primeiro trimestre da gravidez. (JENTINK et. Al, 2010)

## 1.6 METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO VALPRÓICO EM CÁPSULAS

Na farmacopéia americana USP 33, a metodologia preconizada para quantificar ácido valpróico em cápsulas é por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, usando uma coluna de vidro 2 mm x 1.8 m, gás hélio como fase móvel, fluxo de 40 mL/min e injeção de 2 µL. Por não possuir um cromóforo adequado e ser volátil, é indicada a análise por esta técnica, porém já existem estudos quantificando ácido valpróico em plasma humano por CLAE/UV sem derivatização, utilizando como fase móvel acetonitrila e tampão fosfato 30 : 70 v/v coluna CN 250 mm x 4.6 mm, 5 µm fluxo 1mL/min (AMINI et al., 2006) . Estes estudos fazem vislumbrar a possibilidade de se desenvolver um método por CLAE/UV para quantificar o princípio ativo ácido valpróico em cápsulas de 250 mg.

## 2 JUSTIFICATIVA

O método preconizado nos compêndios oficiais para análise quantitativa de cápsulas de Ácido Valpróico 250 mg é realizado por cromatografia gasosa, porém, em virtude da técnica exigir que o analito seja volátil ou volatilizável, ocorre uma diminuição do número de medicamentos quantificados por esta técnica. A maioria dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública não possui o referido equipamento, inviabilizando a análise destes fármacos, por esta metodologia, nestes Laboratórios. Em virtude disto, existe a necessidade de se aumentar as possibilidades de análise do Ácido Valpróico 250 mg, desenvolvendo um método confiável e mais adequado a rotina laboratorial como, por exemplo, o método por cromatografia líquida de alta eficiência e, ainda, desenvolver um método por voltametria, oferecendo alternativas diversas para análise deste fármaco, uma vez que o ácido valpróico possui sítio eletroativo.

Existem três fabricantes de cápsulas de Ácido Valpróico 250 mg, com registro ativo na ANVISA, porém, somente dois tem sido comercializados normalmente, no mercado Nacional. O Ácido Valpróico 250 mg faz parte da Relação Nacional de Medicamentos e é disponibilizado, gratuitamente, aos usuários do SUS.

Estes fármacos são utilizados principalmente na terapêutica da epilepsia, que é uma doença que acomete cerca de 1% da população mundial e a cada ano surgem três milhões de novos casos (LI MIN; SANDER, 2003). Face ao exposto, é extremamente necessário, do ponto de vista da saúde pública, que o monitoramento destes medicamentos, desde a fabricação até a fase pós venda, seja feito de forma fácil, segura e confiável com métodos analíticos adequados e validados que permitam avaliar de forma segura e inequívoca a qualidade destes fármacos, no que concerne ao teor do princípio ativo.

O teor deste fármaco, fora do especificado, pode levar a episódios recorrentes de crises convulsivas diminuindo a qualidade de vida do paciente.

### 3 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias analíticas para determinar o teor de ácido valpróico em cápsulas de 250 mg.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver uma metodologia para quantificar cápsulas de Ácido Valpróico 250 mg por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- b) desenvolver e avaliar de forma preliminar uma metodologia para quantificar cápsulas de Ácido Valpróico 250 mg por Voltametria;
- c) validar intralaboratorialmente a metodologia desenvolvida para quantificar ácido valpróico, por CLAE;
- d) realizar uma análise pontual do teor das cápsulas de Ácido Valpróico 250 mg disponíveis no mercado utilizando a metodologia desenvolvida e validada;
- e) verificar a possibilidade da metodologia ser utilizada também para análise do medicamento Valproato de Sódio 250 mg/5 mL xarope.



## 4 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

### 4.1 EQUIPAMENTOS

- a) Cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Young Lin com detector ultravioleta - visível (espectrofotométrico) com conjunto de diodos YL 9160 PDA - Detector, Compartimento de Coluna YL9130, bomba Quaternária YL9110 e injetor automático YL e Degaseificador YL 9101. Programa usado para aquisição de dados. (Divisão de Controle de Qualidade - Laboratório Farmacêutico da Marinha);
- b) cromatógrafo líquido de alta eficiência, fabricante Varian com detector ultravioleta-visível, modelo PROSTAR com injetor automático PS 410, detector PS 325, bomba modelo PS 240. (Divisão de Controle de Qualidade - Laboratório Farmacêutico da Marinha);
- c) aparelho de ultrassom, fabricante Nova Ética modelo Unique (Divisão de Desenvolvimento - Laboratório Farmacêutico da Marinha);
- d) balança analítica com resolução de 0,001 mg, fabricante Mettler Toledo (Divisão de Controle de Qualidade - Laboratório Farmacêutico da Marinha);
- e) sistema voltamétrico 757 VA Computrace, fabricante Metrohm;
- f) medidor de pH fabricante Micronal modelo B474;
- g) Sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Millipore modelo A-10 (Divisão de Controle de Qualidade - Laboratório Farmacêutico da Marinha).

A figura 3 mostra o cromatógrafo Young Lin utilizado para avaliar todos os parâmetros apresentados na validação do Ácido Valpróico 250 mg cápsulas.



Figura 3 - Cromatógrafo Líquido, fabricante Young Lin, com detector espectrofotométrico de ultravioleta-visível com detector de arranjo de diodos (DAD) utilizado para a avaliação de todas as figuras de mérito da validação.

A figura 4 representa o cromatógrafo líquido fabricante Varian utilizado na determinação da precisão intermediária.



Figura 4- Cromatógrafo Líquido, fabricante Varian, com detector espectrofotométrico de ultravioleta-visível utilizado para a avaliação do requisito precisão intermediária.

A figura 5 ilustra o sistema voltamétrico utilizado para determinar o teor de ácido valpróico em cápsulas de 250 mg



Figura 5- Sistema voltamétrico 757VA Computrace, fabricante Metrohm utilizado para analisar o teor de ácido valpróico em cápsulas de 250 mg pelo método de voltametria de pulso diferencial.

## 4.2 REAGENTES E MATERIAIS

### 4.2.1 Reagentes

- a) Água grau CLAE (0,22  $\mu\text{m}$ ) purificada por meio do sistema de purificação Milli-Q-Millipore;
- b) Acetonitrila grau CLAE – Vetec;
- c) Ácido trifluoracético grau pró-análise – Merck;
- d) Hidróxido de sódio P. A – Vetec;
- e) Ácido acético (conc) – Merck;
- f) Ácido fosfórico (conc) – Merck;
- g) Ácido bórico P.A – Vetec.

### 4.2.2 Materiais

- a) Vidrarias de uso comum no laboratório todas devidamente calibradas;
- b) Termohigrômetro Calibrado;
- c) Coluna Lichrospher® de fase reversa de sílica recoberta com octadecilsilano (C18) de partícula 5  $\mu\text{m}$  de tamanho e dimensões de 4,0 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento, fabricante Merck lote HX 760504 nº736709;
- d) Coluna Supelco Hypersil BDS de fase reversa de sílica recoberta com

octadecilsilano (C18) de partícula 5 µm de tamanho e dimensões de 4,0 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento.

#### 4.2.3 Padrões

-Padrão de Referência - ácido valpróico - Teor: 100,17%, Lote - 4011153528 – ABBOTT- Anexo 1 – Certificado de Análise nº PS 010/10

#### 4.2.4 Amostras

##### 4.2.4.1 Coleta de Amostras

O medicamento referência, designado medicamento A, utilizado na validação e na adequação da metodologia foi adquirido no mercado. O medicamento similar, designado medicamento B, foi adquirido na rede Pública de saúde. O Valproato de Sódio 250 mg/5mL xarope, foi doado pelo INCQS.

##### 4.2.4.2 Amostragem

A validação da metodologia foi realizada apenas com o medicamento A utilizando-se o mesmo lote para avaliar todas as figuras de mérito. Outro lote do medicamento A e um segundo fabricante participaram da avaliação pontual do mercado.

O medicamento genérico Valproato de Sódio 250 mg/5mL xarope, serviu para verificar a possibilidade de análise deste fármaco pela metodologia proposta. A tabela 6 mostra os lotes envolvidos no estudo e suas respectivas finalidades.

Tabela 6

Lotes envolvidos no estudo e suas respectivas finalidades

<b>NOME</b>	<b>LOTE</b>	<b>FINALIDADE</b>
Medicamento A 250 mg/caps	710098F01	Adequação do Sistema Avaliação Pontual
Medicamento A 250 mg/caps	850758F01	Validação
Medicamento B 250 mg/caps	809707	Avaliação Pontual
Valproato de Sódio 250 mg/5mL	2511/08	Avaliação Pontual

## 5 METODOLOGIAS

### 5.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

#### 5.1.1 Condições Experimentais

As condições cromatográficas adotadas para o doseamento do ácido valpróico nos medicamentos foram estabelecidas com base em estudos de otimização do método desenvolvido por Amini et al. (2006). Parâmetros como fase móvel, fluxo, coluna, volume de injeção foram experimentados.

As fases móveis testadas foram 50% ACN : 50% TFA; 60% ACN : 40 TFA e 55% ACN : 45%TFA. Os fluxos avaliados foram 0,8; 1,0; 1,2 mL/min. As colunas utilizadas foram C18 (250 mm x 4 mm) 5 µm e C18 (125 mm x 4 mm) 5 µm. Os volumes de injeção variaram entre 20 e 25 µL. Depois da avaliação destes parâmetros cromatográficos foram estabelecidas as condições descritas na tabela 7.

Tabela 7

Condições cromatográficas de análise.

Fase Móvel	55% ACN : 45% Solução de TFA 0,05% v/v - pH fase móvel -2,3
Fluxo	1 mL/min
Coluna	C18 (250 mm x 4 mm) 5 µm
Volume de Injeção	25 µL
Comprimento de onda	210 nm
Equipamento	Cromatógrafo a liquido de alta eficiência com DAD marca Young Lin

ACN- Acetonitrila

TFA- Ácido trifluoroacético

DAD- Detector por arranjos de diodos



### 5.1.2 Monitoramento das Condições Cromatográficas

Durante todo o desenvolvimento e validação do método foram utilizados reagentes com grau analítico compatível com CLAE, equipamentos qualificados, vidrarias calibradas e condições ambientais monitoradas. A coluna utilizada na validação completa e a utilizada nas variações realizadas no teste de robustez estavam novas e dentro do prazo de validade.

### 5.1.3 Adequação do Sistema

Para avaliar as condições de adequabilidade do sistema foram preparadas soluções amostra e padrão de ácido valpróico nas concentrações descritas na tabela 8 e injetadas no Cromatógrafo líquido da marca Young Lin com detector UV-Vis com DAD.

Tabela 8

Soluções utilizadas na adequação do sistema cromatográfico.

SOLUÇÃO	CONCENTRAÇÃO
Diluyente	55% ACN : 45% TFA
Padrão de ácido valpróico	1,030 mg/mL
Solução de Adequação do sistema	1,000 mg/mL

ACN- Acetonitrila

TFA- Ácido trifluoroacético

### 5.1.4 Estudo da Estabilidade das Soluções Amostra e Padrão

Preparo da solução amostra:

Foi preparada uma solução em fase móvel (55% Acetonitrila : 45% Solução de ácido trifluoroacético 0,05% v/v) do medicamento referência na concentração de 1,0 mg/mL

Preparo da solução padrão:

O padrão do ácido valpróico foi diluído na fase móvel (55% Acetonitrila : 45% Solução de ácido trifluoroacético 0,05% v/v) na concentração de 1,06 mg/mL.

A solução padrão foi analisada imediatamente após o preparo e nas 6, 12, 24, 48, 72 horas e uma semana subsequente à preparação. A diferença percentual em relação ao valor obtido imediatamente após a preparação e os valores encontrados nos tempos avaliados foram verificados.

A solução amostra foi avaliada 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas após a preparação e tratada da mesma forma que a solução padrão.

Ambas as soluções foram armazenadas protegidas da luz e a 25°C.

#### 5.1.5 Condições de Validação

Para verificação dos parâmetros de validação foi utilizado o medicamento referência adquirido no mercado Nacional. Todas as cápsulas pertenciam ao mesmo lote.

Todos os equipamentos, instrumentos e vidrarias utilizados na validação estavam qualificados e/ou calibrados e aprovados para uso.

#### 5.1.6 Parâmetros de Validação

Os parâmetros de verificação foram baseados na Resolução Específica nº 899, de 29 de Maio de 2003, da ANVISA e no Documento de Orientação para validação de ensaios químicos DOQ CGCRE-8 2010 do INMETRO. A validação em questão foi classificada como sendo pertencente à Categoria I (Quantificação do principal componente), sendo exigidos os seguintes parâmetros.

- a) Seletividade - Efeito matriz
- b) Linearidade
- c) Faixa linear de trabalho

- d) Exatidão
- e) Precisão (repetitividade e precisão intermediária).
- f) Robustez

#### 5.1.6.1 Seletividade

Preparo do padrão:

Pesou-se 51,2 mg de ácido valpróico padrão para balão volumétrico de 50 mL. Avolumou-se com fase móvel, filtrou-se e injetou-se 25  $\mu$ L.

Preparo da amostra:

Transferiu-se uma cápsula do medicamento A para balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se aproximadamente 80 mL de fase móvel e levou-se ao ultrassom por 30 minutos, agitando de 5 em 5 minutos. Avolumou-se com fase móvel. Transferiu-se 40 mL para balão de 100 mL. Avolumou-se com fase móvel, filtrou-se em membrana PTFE 0,45  $\mu$ m e injetou-se 25  $\mu$ L.

O método deve ser capaz de identificar de forma inequívoca, a resposta do analito na presença dos componentes da formulação e demais interferentes. E a solução amostra deverá apresentar o mesmo comportamento da solução padrão (INMETRO, 2010).

Foi utilizado o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD), fabricante Young Lin para verificar a pureza dos sinais cromatográficos.

Os espectros de absorção molecular e espectros tridimensionais, a partir dos picos cromatográficos do ácido valpróico padrão e amostra, foram emitidos. Foram feitas comparações dos espectros de ultravioleta antes, durante e depois do tempo de retenção característico da substância. Também se evidenciou por meio

da imagem em 3D que os sinais do ácido valpróico padrão e amostra apresentavam-se com o mesmo comportamento.

Foi preparado um placebo com todos os excipientes utilizados na fabricação do medicamento Ácido Valpróico 250 mg cápsulas menos o princípio ativo, nas concentrações descritas na tabela 9. As quantidades utilizadas foram determinadas de acordo com o especificado para cada excipiente presente na formulação (ROWE, 2006). Pesou-se 157 mg da mistura de excipientes (placebo) e foi dado o mesmo tratamento da amostra. A solução foi injetada nas mesmas condições de análise do medicamento referência, para verificar a possibilidade da interferência da matriz, no sinal cromatográfico do analito.

Tabela 9

Formulação do placebo com a quantidade de excipiente por cápsula e a quantidade total manipulada.

Insumos	Quantidade (mg) por cápsula	Percentual	Peso médio do conteúdo
Ácido valpróico	250	61,43	<b>407 mg</b>
Óleo de milho	90	22,11	
Propilparabeno	0,08	0,02	
Metilparabeno	0,08	0,02	
Glicerina	20	4,91	
Água deionizada	32	7,86	
Dióxido de titânio	4,1	1,01	
Óleo mineral	10,74	2,64	
<b>TOTAL</b>	<b>407</b>	<b>100</b>	
<b>Peso cápsula cheia (mg)</b>		<b>583</b>	
<b>Peso cápsula vazia (mg)</b>		<b>176</b>	
<b>Peso do conteúdo (mg)</b>		<b>407</b>	
<b>QUANTIDADE MANIPULADA</b>			
Insumos	mg/cáps	mg (total)	g (total)
Óleo de milho	90	18000	18
Propilparabeno	0,08	16	0,016
Metilparabeno	0,08	16	0,016
Glicerina	20	4000	4
água deionizada	32	6400	6,4
Dióxido de titânio	4,1	820	0,82
Óleo mineral	10,74	2148	2,148

#### 5.1.6.2 Faixa linear de trabalho

Compreende a faixa de concentração do analito em que a resposta é linear. Para a determinação quantitativa do ácido valpróico foi escolhida a faixa de 70 % (0,70 mg/mL) a 130 % (1,30 mg/mL) da concentração teórica do teste (1,0 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.

#### 5.1.6.3 Linearidade

Foi realizada analisando em triplicata soluções de trabalho genuínas com sete concentrações diferentes espaçadas entre 70% e 130% (70, 80, 90, 100, 110, 120 e 130%) da concentração.

Para avaliação da linearidade foi realizado o procedimento a seguir:

- a) 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;
- b) 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
- c) Injeções das soluções se deram aleatoriamente (SOUZA, 2005).

A fase seguinte na avaliação da linearidade foi à aplicação do método dos mínimos quadrados - MMQO, com a estimativa dos parâmetros da regressão e tratamento dos valores extremos conforme descrito abaixo:

- a) aquisição dos cromatogramas relativos ao ácido valpróico;
- b) estimativa da inclinação, interseção, resíduos da regressão, respectivas

variâncias e  $R^2$ ;

- c) observação visual dos dados;
- d) construção e inspeção visual do gráfico x-y das respostas versus a concentração do analito;
- e) investigação e exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados por Jackknife (SOUZA, 2005).

A terceira etapa consistiu na verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear:

- a) normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan - Joiner;
- b) independência dos resíduos pelo teste de Durbin - Watson;
- c) homocedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown - Forsythe; e
- d) verificação da significância da regressão e do ajuste ao modelo linear por análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2005).

Foi também testada a condição necessária para que a linha passe pela origem (a intercessão não seja significativamente diferente de zero). (SOUZA, 2005).

Preparo da Solução Estoque de ácido valpróico:

Pesou-se três massas de ácido valpróico padrão as quais foram transferidas para balão de 50 mL e estes avolumados com fase móvel. Considerando a pureza do ácido valpróico de 100,17%, este procedimento resultou em soluções com as concentrações descritas na tabela 10.

Tabela 10

Massas, diluições e concentrações das soluções utilizadas no teste de linearidade.

Massa de ácido valpróico (mg)	Diluição (mL)	Concentração mg/mL
102,5	50	2,054
102,8	50	2,060
102,5	50	2,054

Foram tomadas alíquotas das soluções estoque para o preparo das soluções de trabalho, conforme as tabelas 11, 12 e 13. As alíquotas foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, os quais foram, em seguida, completados com diluente e agitados para homogeneizar seus conteúdos.

Tabela 11

Soluções de trabalho 1 (ácido valpróico), utilizadas na avaliação da linearidade.

Concentração de Ácido Valpróico							
	70%	80%	90%	100%	110%	120%	130%
Alíquota (mL)	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
Conc. (mg/mL)	0,719	0,821	0,924	1,027	1,129	1,232	1,334

Tabela12

Soluções de trabalho 2 (ácido valpróico) utilizadas na avaliação da linearidade.

Concentração de ácido valpróico							
	70%	80%	90%	100%	110%	120%	130%
Alíquota (mL)	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
Conc. (mg/mL)	0,721	0,824	0,927	1,03	1,133	1,236	1,339

Tabela 13

Soluções de trabalho 3 (ácido valpróico) utilizadas na avaliação da linearidade.

	Concentração de ácido valpróico						
	70%	80%	90%	100%	110%	120%	130%
Alíquota (mL)	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
Conc. (mg/mL)	0,719	0,821	0,924	1,027	1,129	1,232	1,334

#### 5.1.6.4 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) e quantificação do ácido valpróico foi determinado por meio da planilha de Souza e Junqueira que utiliza o mesmo procedimento de Thier e Kirchoff, 1992. 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 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; KIRCHOF, 1992).

#### 5.1.6.5 Exatidão

Foi avaliada pela taxa de recuperação, e como a amostra já contém o analito, a taxa de recuperação é dada pela relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do



analito. A adição foi realizada nas concentrações de 80, 90, 100, 110, 120, 130% e calculada a recuperação em cada nível da curva pela equação abaixo.

$$\text{Taxa de recuperação} = \frac{\text{Concentração experimental} - \text{Concentração da amostra}}{\text{Concentração da adição}} \times 100$$

Foram traçadas três curvas analíticas, em sete níveis, com adição-padrão em solução onde o teor de ácido valpróico foi previamente determinado. A área média de cada nível das três curvas foi utilizada para verificar a recuperação em cada ponto da curva analítica. A exatidão foi comprovada pelo o cálculo da recuperação do analito em cada nível da curva de adição padrão.

#### Preparo da Solução Estoque:

Pesou-se 54,5 mg de ácido valpróico padrão para balão volumétrico de 25 mL e diluiu-se com a fase móvel. Considerando a pureza do ácido valpróico de 100,17% chegou numa solução estoque de concentração 2,184 mg/mL

#### Preparo das Soluções Amostra:

Pesou-se cinco cápsulas do medicamento A e colocou-se em balão volumétrico de 500 mL levou-se para o ultrassom por 30 minutos com agitação de 5 em 5 minutos. Pegou-se 40 mL desta solução e diluiu-se para balão de 100 mL. Adicionou-se 7 mL desta solução em um balão de 10 mL

#### Preparo das Soluções de trabalho:

As soluções de trabalho foram preparadas conforme tabela 14. A solução amostra foi preparada conforme descrito acima e o teor utilizado foi 99,89% determinado no ensaio da repetitividade.

Tabela 14

Preparo das soluções de trabalho utilizadas para avaliação da recuperação, no teste de exatidão.

	Nível						
	1	2	3	4	5	6	7
Vol. Sol. Amostra (mL)	7	7	7	7	7	7	7
Conc. da amostra (mg/mL)	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Vol. sol. padrão (mL)	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Conc. do padrão (mg/mL)	0	0,109	0,218	0,327	0,437	0,546	0,655
Vol. Total (mL)	10	10	10	10	10	10	10
Conc. da sol. trabalho (mg/mL)	0,70	0,809	0,918	1,027	1,137	1,246	1,355

#### 5.1.6.6 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

##### 5.1.6.6.1 Repetitividade

Foram realizadas trinta análises a 100% da concentração do fármaco, pelo mesmo analista, no mesmo dia e com intervalo reduzido. Foi calculado o teor, desvio padrão e o desvio padrão relativos sendo estes comparados com os valores de referência estabelecidos em função da concentração do analito em questão. Também foi calculado o valor do “t” de student e o Limite de repetitividade (r).

#### Preparo da Solução Amostra:

Transferiu-se 5 cápsulas do medicamento A para balão de 500 mL. A partir desta solução mãe foram preparadas 30 soluções, tomando-se alíquotas de 10 mL para balão de 25 mL, resultando em 30 soluções de concentração 1mg/mL.

### Preparo da Solução Padrão:

Pesou-se 51,9 mg de ácido valpróico padrão e transferiu-se para balão de 50 mL e este foi avolumado com fase móvel. Considerando a pureza do ácido valpróico de 100,17%, este procedimento resultou em uma solução com 1,04 mg/mL.

#### 5.1.6.6.2 Precisão intermediária

Três analistas realizaram dez análises da mesma amostra (1 mg/mL), no mesmo laboratório, utilizando o mesmo método realizado pelo 1º analista, mas em dias e equipamentos diferentes conforme tabela 15. Os dados obtidos foram avaliados no tocante ao desvio-padrão de precisão intermediária ( $S_{pi}$ ) e o desvio-padrão relativo de reprodutibilidade ( $DPR_R$ ) e compararam-se os resultados obtidos com os limites estabelecidos em função da concentração do analito.

Tabela 15

Quadro de analistas com as datas de análise e equipamentos utilizados na determinação da precisão intermediária.

	1º analista	2º analista	3º analista
Data	24/08/2010	25/08/2010	29/08/2010
Cromatógrafo	1(Young Lin)	2 (Varian)	2 (Varian)

#### 5.1.6.7 Robustez

Foram realizadas sete pequenas variações na metodologia conforme tabela 16. Para cada uma das sete variações foi calculado o efeito nos parâmetros de adequação. As análises foram realizadas nas amostras em condições normais e nas modificadas depois se aplicou o teste de *youden* para verificar a influência de cada variação realizada.

Tabela 16

Variações nos fatores para a determinação da robustez do método analítico

FATORES	NOMINAL	LETRA	VARIAÇÃO	LETRA
1. Tempo de extração no ultrassom	30 minutos	A	20 minutos	A
2. Diferente fabricante de coluna	Merck	B	Supelco	B
3. Variação da composição da fase móvel	55:45	C	60:40	C
4. Variação do fluxo da fase móvel	1,0 mL/min	D	1,2 mL/min	D
5. Variação da temperatura da coluna	25 °C	E	30 °C	E
6. Variação no pH da fase móvel	2,3	F	2,6	F
7. Frequência de agitação	De 5 em 5 min	G	s/ agitação	G

Preparou-se uma tabela formada pela matriz dos fatores para a determinação da robustez do método. A Tabela 17 a seguir representa esta matriz.

Tabela 17

Matriz dos fatores para determinação da robustez do método

FATOR	COMBINAÇÃO ENSAIADA							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A ou a</i>	A	A	A	A	a	a	a	a
<i>B ou b</i>	B	B	b	b	B	B	b	b
<i>C ou c</i>	C	c	C	c	C	c	C	c
<i>D ou d</i>	D	D	d	d	d	d	D	D
<i>E ou e</i>	E	e	E	e	e	E	e	E
<i>F ou f</i>	F	f	f	F	F	f	f	F
<i>G ou g</i>	G	G	g	G	g	G	G	g
<b>RESULTADO</b>	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater, 21<sup>st</sup> Edition.

## 5.2 AVALIAÇÃO PONTUAL DAS CÁPSULAS DE ÁCIDO VALPRÓICO 250 mg DISPONÍVEIS NO MERCADO.

Existem três fabricantes com registro ativo na ANVISA, porém apenas dois medicamentos a base de Ácido Valpróico 250 mg cápsulas foram encontrados, o medicamento A e o medicamento B.

Pesou-se cinco cápsulas do medicamento A e do medicamento B colocou-se em balões volumétrico de 500 mL e completou-se com fase móvel 55% de ACN : 45% TFA, levou-se para o ultrassom por 30 minutos com agitação de 5 em 5 minutos. Pegou-se 40 mL desta solução e diluiu-se para balão de 100 mL com fase móvel obtendo-se soluções na concentração de 1,0 mg/mL e uma solução padrão na concentração de 1,08 mg/mL. Os lotes foram analisados em triplicata pela metodologia validada e foram verificadas as áreas correspondentes a cada solução.

## 5.3 POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DO VALPROATO DE SÓDIO 250 mg/5mL XAROPE.

Pipetou-se 2 mL do medicamento Valproato de Sódio 250 mg/5 mL para um balão de 100 mL, adicionou-se 1mL de TFA e completou-se o volume com fase móvel, filtro-se em membrana de PTFE 0,45  $\mu$  e injetou-se 25  $\mu$ L, utilizando-se a mesma metodologia empregada na análise do Ácido valpróico 250 mg cápsulas. E os parâmetros de adequação foram verificados.

## 5.4 VOLTAMETRIA

### 5.4.1 Condições Experimentais

A metodologia eletroanalítica foi desenvolvida por voltametria de pulso diferencial (DPV) utilizando o analisador voltamétrico, fabricante Metrohm, modelo 757 VA Computrace acoplado a um sistema de multi-eletrodos (eletrodo de trabalho: mercúrio; eletrodo auxiliar: platina e eletrodo de referência: Ag/AgCl KCl 3 mol/ L).

Os parâmetros voltamétricos estudados foram velocidade de varredura de 10 a 25 mV/s ; amplitude de 40 a 80 mV; tempo de pulso de 20 a 50 ms; tempo de equilíbrio de 10 a 20 s.

Foi estudado o pH na faixa de 2,0 a 10,0 utilizando-se a solução tampão de Britton Robinson.

Preparo do tampão Britton Robinson - Em um balão volumétrico de um litro adicionou-se ácido acético P.A 5,72 mL, ácido fosfórico P.A. 6,74 mL, ácido bórico P.A. 6,183g e completou-se o volume com água Milli-Q.

Ajuste do pH- Solução de Hidróxido de sódio 2 mol/L.

O preparo da curva analítica foi feito a partir de cinco adições consecutivas de 50  $\mu$ L de um padrão de 100 mg/mL de ácido valpróico- ABBOTT lote 4011153528, à célula eletrolítica contendo 10,0 mL de tampão Britton Robinson pH 5.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

#### 6.1.1 Condições Cromatográficas

Durante a otimização das condições cromatográficas foi evidenciado que a concentração da fase móvel que apresentou os melhores valores de desvio padrão relativo (DPR), fator de cauda, fator de capacidade, resolução e pratos teóricos foi 55% ACN : 45%TFA 0,05%.

Dentre os fluxos avaliados 0,8 mL/min deixou a corrida um pouco longa e com o fluxo 1,2 mL/min o fator de capacidade foi muito baixo, sendo o valor ótimo 1 mL/min que apresentou um tempo de retenção de cerca de 5,7 min e fator de capacidade 4,7 com uma coluna de(250 mm x 4 mm) 5 µm.

A coluna C18 (125 mm x 4 mm) de 5 µm mostrou boa adequação, porém o fator de capacidade ficou baixo, por isso optamos pela coluna C18 (250 mm x 4 mm) 5 µm.

O volume de injeção 25 µL apresentou melhor DPR e mostrou-se mais adequado para a corrida cromatográfica.

#### 6.1.2 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 6, 7 e 8, respectivamente, mostram o monitoramento durante uma corrida de 10 minutos, onde pode ser verificado que não houve variação significativa nos parâmetros avaliados. O monitoramento destas condições é de suma importância para o sucesso da análise. Variações de temperatura e pressão durante a corrida podem prejudicar a veracidade dos sinais cromatográficos.

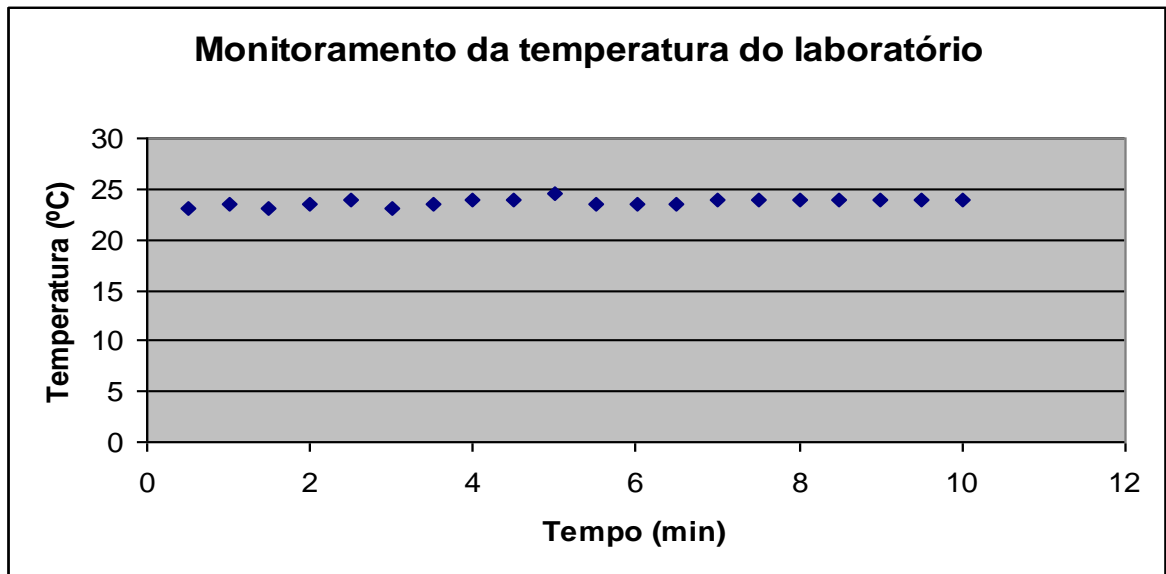


Figura 6- Monitoramento da temperatura do laboratório durante uma corrida cromatográfica da solução de adequação do sistema. Condições: Coluna C18, 5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm, fase móvel 55% de acetonitrila e 45% de ácido trifluoroacético 0,05%, pH 2,3, fluxo 1,0 mL/min, detecção a 210 nm, temperatura 25°C, volume de injeção 25  $\mu$ L.

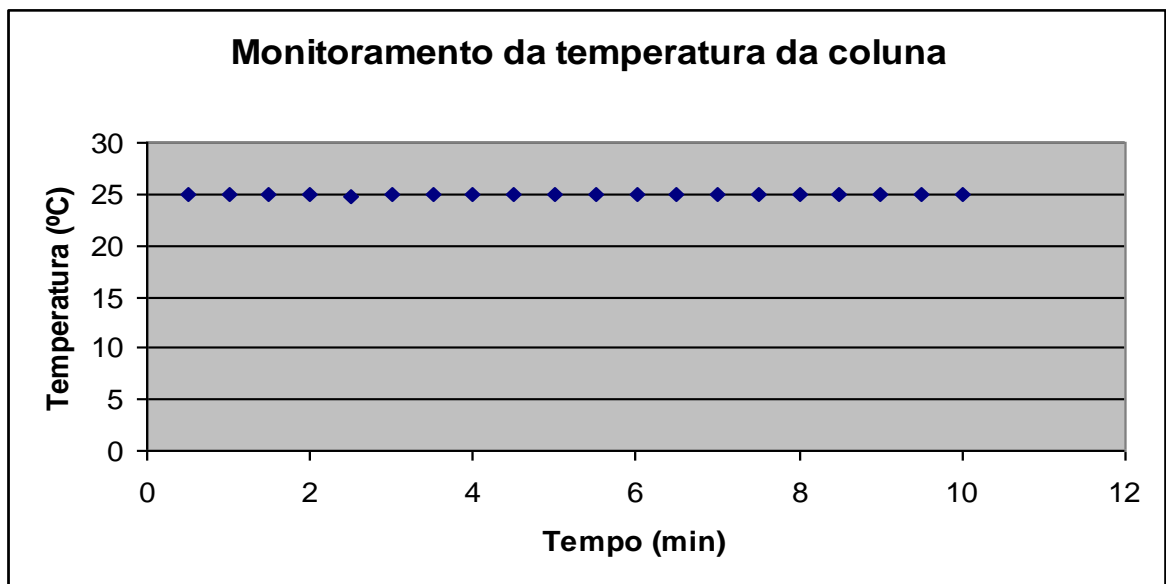


Figura 7- Monitoramento da temperatura da coluna durante uma corrida cromatográfica da solução de adequação do sistema. Condições: Coluna C18, 5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm, fase móvel 55% de acetonitrila e 45% de ácido trifluoroacético 0,05%, pH 2,3, fluxo 1,0 mL/min, detecção a 210 nm, temperatura 25°C, volume de injeção 25  $\mu$ L.



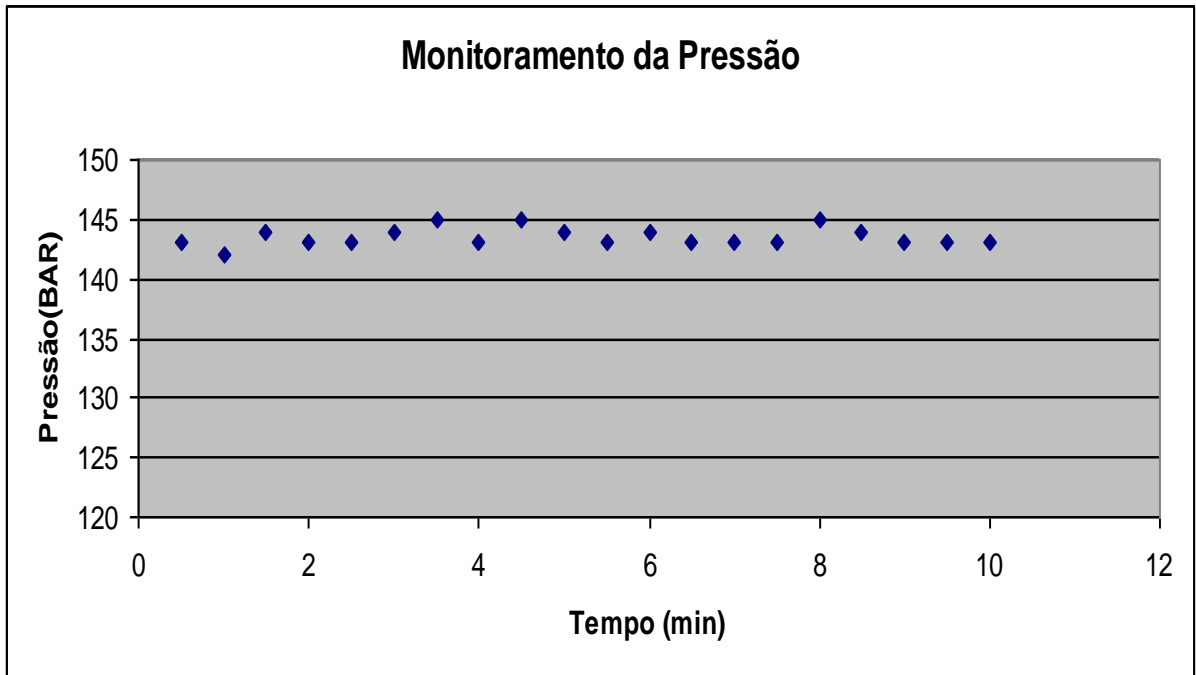


Figura 8- Monitoramento da pressão da coluna durante uma corrida cromatográfica da solução de adequação do sistema. Condições: Coluna C18, 5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm, fase móvel 55% de acetonitrila e 45% de ácido trifluoroacético 0,05%, pH 2,3, fluxo 1,0 mL/min, detecção a 210 nm, temperatura 25°C, volume de injeção 25  $\mu$ L.

### 6.1.3 Resultados da Adequação do Sistema

O ácido valpróico padrão apresentou um sinal cromatográfico bem definido com tempo de retenção de cerca de 5,7 minutos. A Figura 9 representa o cromatograma desta separação. A figura 10 mostra o sinal do ácido valpróico na amostra do medicamento referência apresentando-se como um sinal bem resolvido no tempo de retenção característico da substância.

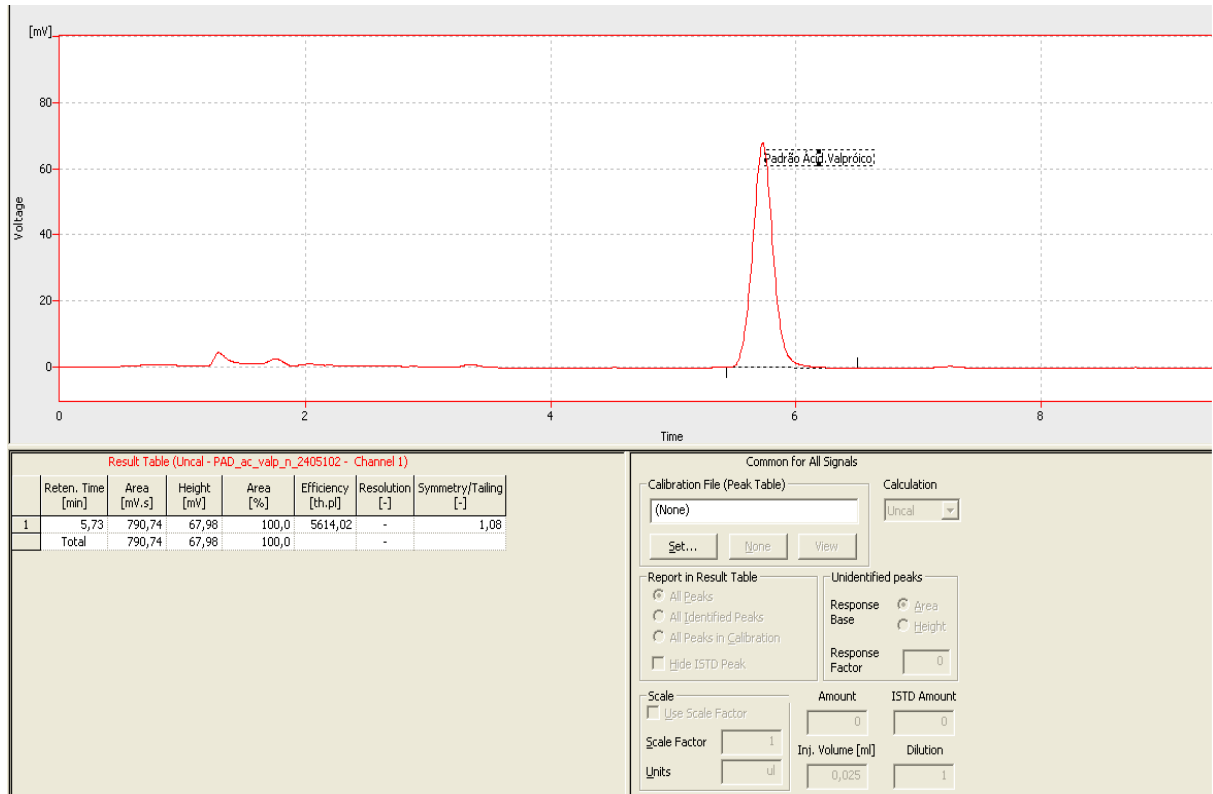


Figura 9- Sinal Cromatográfico do ácido valpróico (padrão), 1,030 mg/mL, Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L

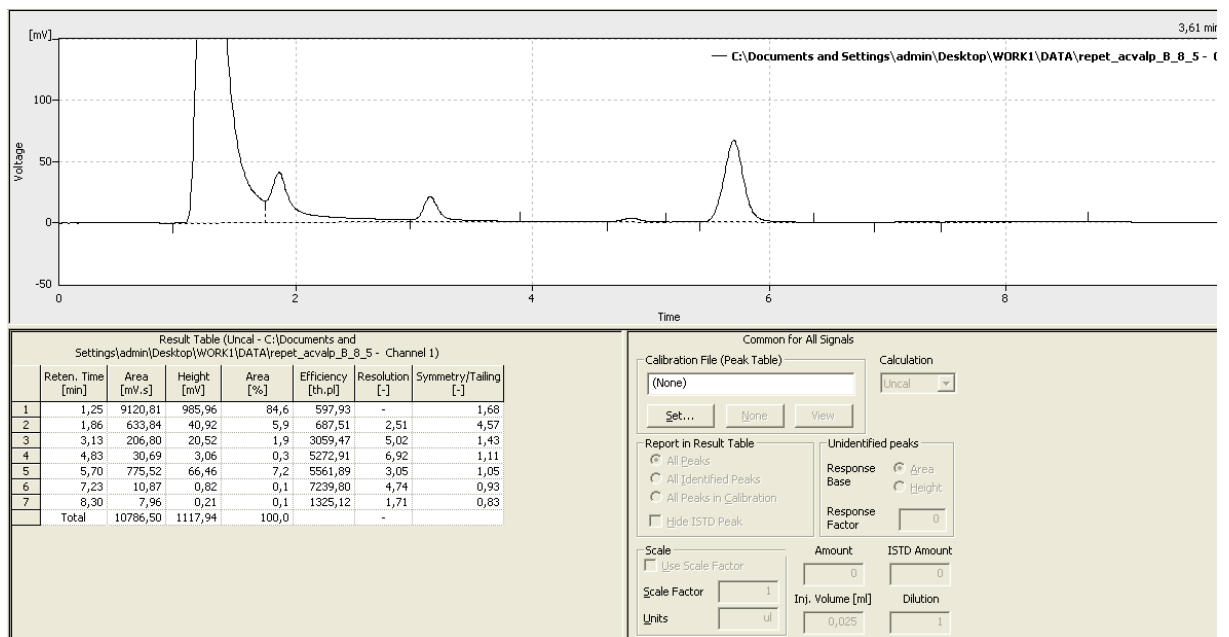


Figura 10- Sinal Cromatográfico do ácido valpróico (medicamento referência) (5,7 min, 1,0 mg/mL Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C, volume 25  $\mu$ L

A tabela 18 apresenta os valores médios e seus respectivos coeficientes de variação dos parâmetros avaliados no *System Suitability*. Observa-se na tabela que os valores do fator de cauda 1,06 e 1,07 mostram a simetria entre os sinais cromatográficos, o fator de capacidade de 4,7 minutos está dentro das especificações requeridas (faixa 1 a 10) ratificando que a combinação da força eluente com a coluna está satisfatória. O número de pratos teóricos, também, está bem acima do valor mínimo especificado de 2000 pratos teóricos tanto para amostra como para o padrão mostrando que a coluna é eficiente para realizar esta corrida cromatográfica. Os valores do desvio padrão relativo 0,43% e 0,35% indicam que a repetitividade entre as áreas tanto na amostra quanto no padrão estão dentro da especificação de 2% requerida pelo teste. Os valores encontrados nos parâmetros de adequação foram satisfatórios e mostram que a metodologia é adequada para determinação do ácido valpróico.

Tabela 18

Fator cauda, fator de retenção, números de pratos teóricos e repetitividade das áreas do Ácido Valpróico padrão e do medicamento referência.

<b>Parâmetro cromatográfico avaliado</b>	<b>ácido valpróico padrão</b>	<b>ácido valpróico Medicamento referência</b>
<b>Fator cauda</b>	1,06 (DPR 0,5%)	1,07(DPR 0,2%)
<b>Fator de capacidade</b>	4,72 (DPR 0,3 %)	4,72(DPR 0,03%)
<b>Número de pratos teóricos</b>	5619 (DPR 1,2%)	5397(DPR 0,1%)
<b>Repetitividade das áreas (DPR)</b>	0,43%	0,35%

DPR- Desvio padrão relativo

#### 6.1.4 Resultado do Estudo de Estabilidade das Soluções Amostra e Padrão de Ácido Valpróico nas Concentrações de Trabalho

A estabilidade é o parâmetro que visa verificar se um analito permanece quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em um determinado intervalo de tempo. Uma vez determinada a estabilidade para um tipo de matriz, em uma dada temperatura e em um acondicionamento específico não se pode extrapolar para as demais matrizes ou formas de armazenamento (STORPIRTIS, 2009).

As soluções recém preparadas foram injetadas e as áreas relativas ao ácido valpróico foram determinadas ao longo do tempo. A solução amostra foi analisada na concentração de 1,0 mg/mL ao longo de 24 horas. Na análise inicial o valor da área foi 766 mV.s e a amplitude dos resultados durante as seis horas de análise foi 759 a 772 mV.s, com média de 764,8 mV.s e DPR-0,57%. Na Figura 11 observa-se que não houve queda significativa do teor do ácido valpróico, portanto, pode-se analisar a amostra mesmo se ela não tiver sido preparada recentemente, respeitando o tempo de estabilidade avaliado neste estudo. A figura 12 representa as análises realizadas ao longo do período de uma semana na solução padrão. A área do Padrão recém preparado foi 826 mV.s e as demais variaram de 816 a 823 mV.s ao longo de uma semana, mostrando uma variação de 1,2% entre a menor área e a área inicial. A média entre as análises ao longo da semana foi de 821 mV.s DPR-0,44%. Segundo Sharbir (2003), admite-se uma variação de até 2,0 % em relação a amostra recém preparada.

Os resultados mostram que não houve queda significativa nas áreas da solução padrão nos 07 dias avaliados podendo-se concluir que o mesmo pode ser preparado e armazenado por esse tempo mantendo neste período a confiabilidade dos resultados.

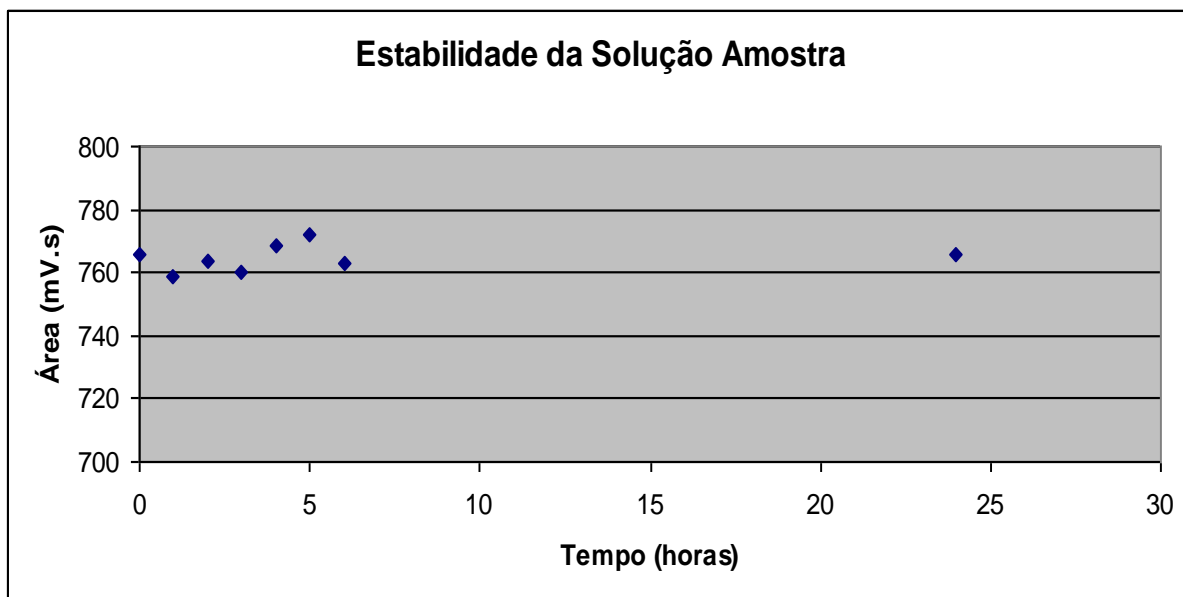


Figura 11- Estudo da estabilidade da solução Amostra de ácido valpróico. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5  $\mu$ m, 2,50 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C, volume 25  $\mu$ L.

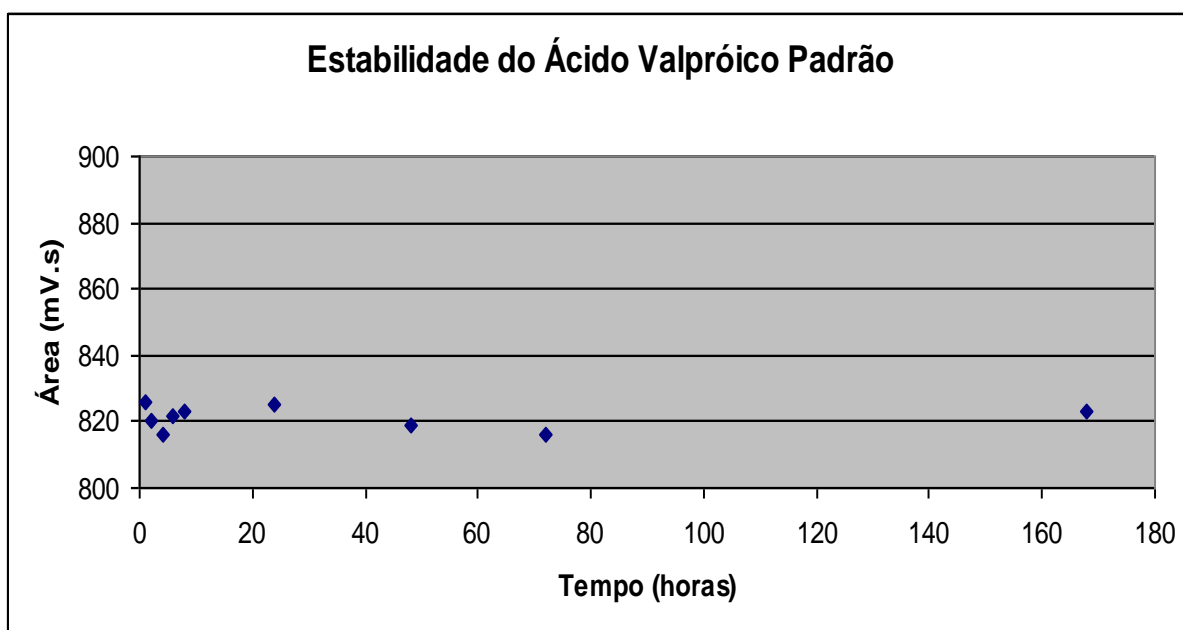


Figura 12- Estudo de estabilidade da solução padrão de ácido valpróico. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5  $\mu$ m, 2,50 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L.

## 6.1.5 Figuras de Mérito Avaliadas Durante a Validação da Metodologia de Análise do Ácido Valpróico 250 mg

### 6.1.5.1 Seletividade

Para a visualização da pureza do sinal cromatográfico, foram emitidos espectros de absorção molecular na região do ultravioleta antes, durante e depois do tempo de retenção do sinal cromatográfico. Pela visualização dos espectros e sua sobreposição e comparação com o espectro da substância pura, fica evidenciada a pureza e a seletividade do método empregado.

As figuras 13 e 14 mostram o sinal cromatográfico do medicamento referência obtido na repetitividade amostra 3 do analista (A) e do ácido valpróico substância de referência obtido também na realização do teste de repetitividade, respectivamente.

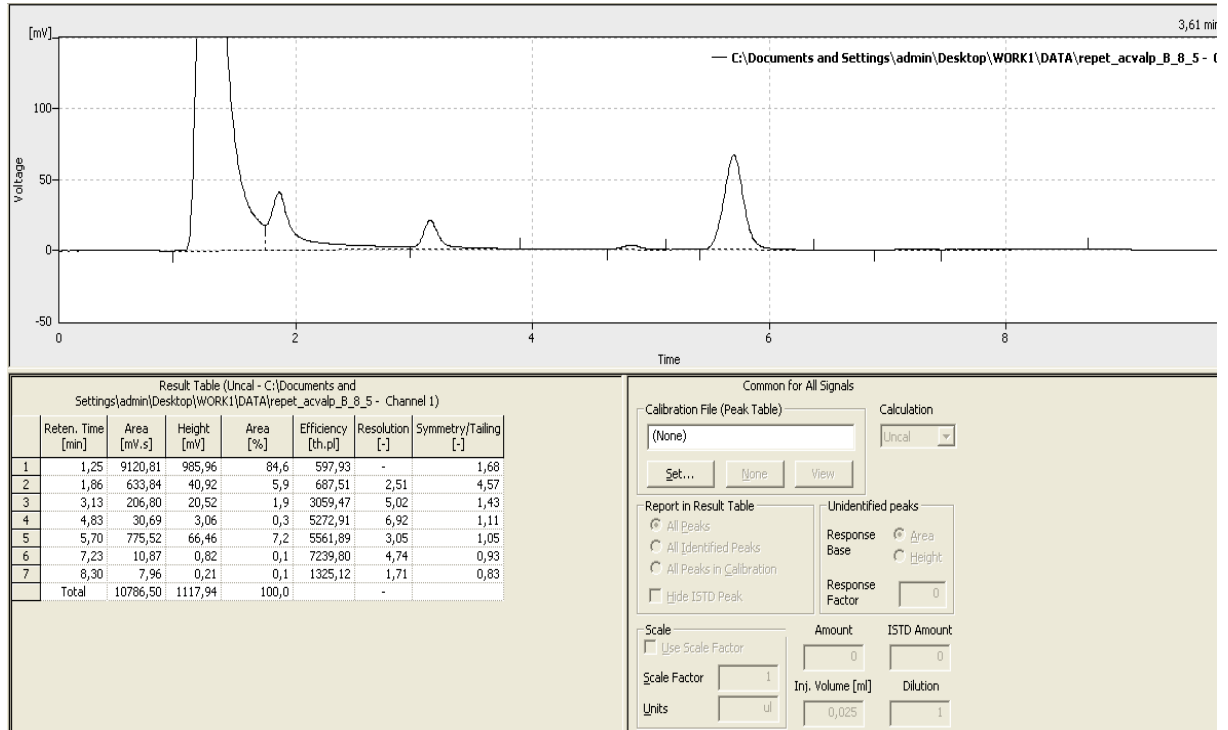


Figura 13- Sinal Cromatográfico do ácido valpróico (medicamento referência) (5,7min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C, volume 25 µL

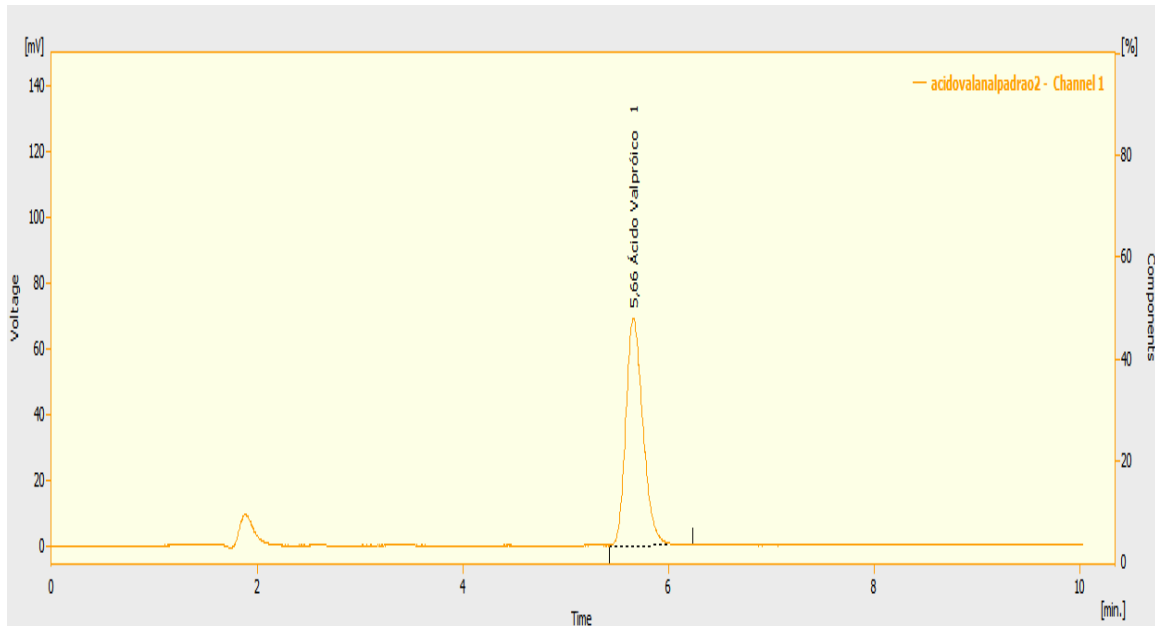


Figura 14- Sinal Cromatográfico do ácido valprórico (padrão) (5,7min, 1,024 mg/mL) Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L

A figura 15 mostra o sinal cromatográfico do ácido valprórico padrão em terceira dimensão (3D) no tempo de retenção de 5,7min.

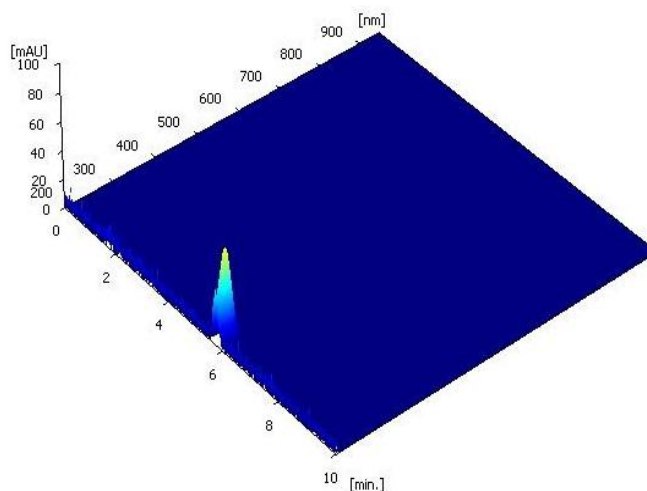


Figura 15- Sinal Cromatográfico do ácido valprórico (Padrão) Análise tridimensional do pico (5,7 min, 1,024 mg/mL) Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L

A figura 16 mostra o sinal cromatográfico do medicamento referência em terceira dimensão (3D). Na visualização do cromatograma em terceira dimensão fica evidenciado um pico único no tempo de retenção do ácido valpróico, e mostra, de forma clara, o sinal anterior com absorção de componentes em outro comprimento de onda, porém, eluindo no mesmo tempo de retenção fato não observado no sinal referente ao analito de interesse.

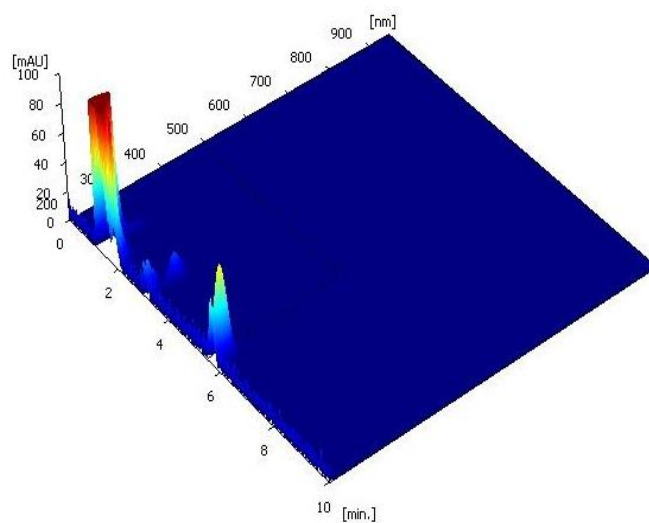


Figura 16- Sinal Cromatográfico do ácido valpróico (Amostra). (5,7 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L

Foram realizados os espectros de absorção na região do ultravioleta da amostra e do padrão, conforme ilustrado na Figura 17. Comparando-se os espectros antes, durante e depois do tempo de retenção, pode-se verificar que os comportamentos do padrão e da amostra são iguais, evidenciando a pureza do pico.



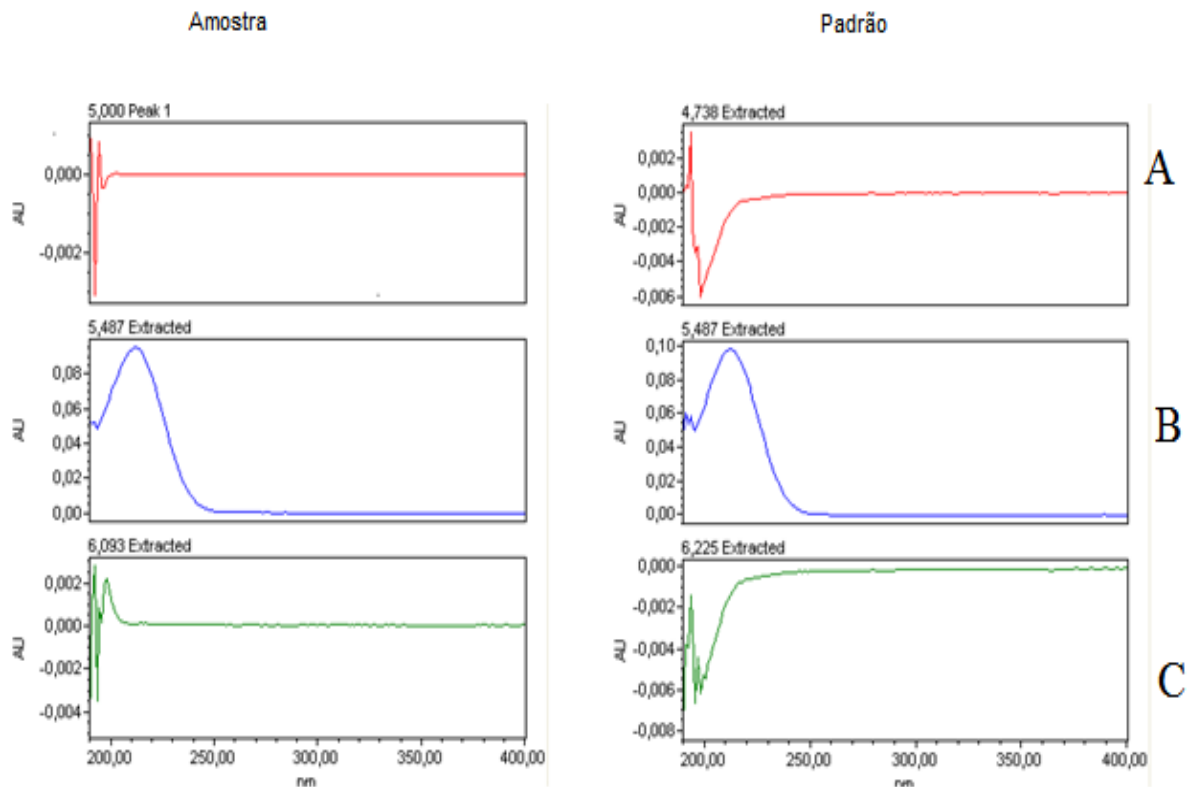


Figura 17- Espectro de Varredura na região do ultravioleta do medicamento referência (amostra) e do padrão de ácido valpróico antes (A), durante (B) e depois (C) do tempo de retenção. Condições de análise: coluna Mick Lichrospher C18 (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C, volume 25  $\mu$ L

#### 6.1.5.2 Efeito Matriz

A identificação por CLAE é realizada por comparação dos tempos de retenção do padrão e do analito. Porém, em um sistema cromatográfico, mesmo empregando-se como fluxo da fase móvel aquele considerado ideal segundo Van Deemter, ainda assim, existe a possibilidade de um outro componente da matriz coeluir com o analito de interesse (SCHULER, 2009). Para verificar a possibilidade da matriz do medicamento interferir na quantificação do sinal cromatográfico, foi preparado um placebo e a amostra do ácido valpróico (Figura 18), e ficou evidenciado que não há nenhuma substância co-eluindo no tempo de retenção do ácido valpróico ratificando a seletividade do método.

O cromatograma do placebo mostra de forma inequívoca que os outros sinais da amostra são relativos aos excipientes e que não existe absorção no tempo de

retenção do analito. É necessário deixar claro que a avaliação do efeito matriz se restringe à matriz testada, ou seja, o medicamento referência, não podendo ser extrapolada para todas as possíveis matrizes que contenham ácido valpróico na forma de cápsulas (AGUIAR, 2007).

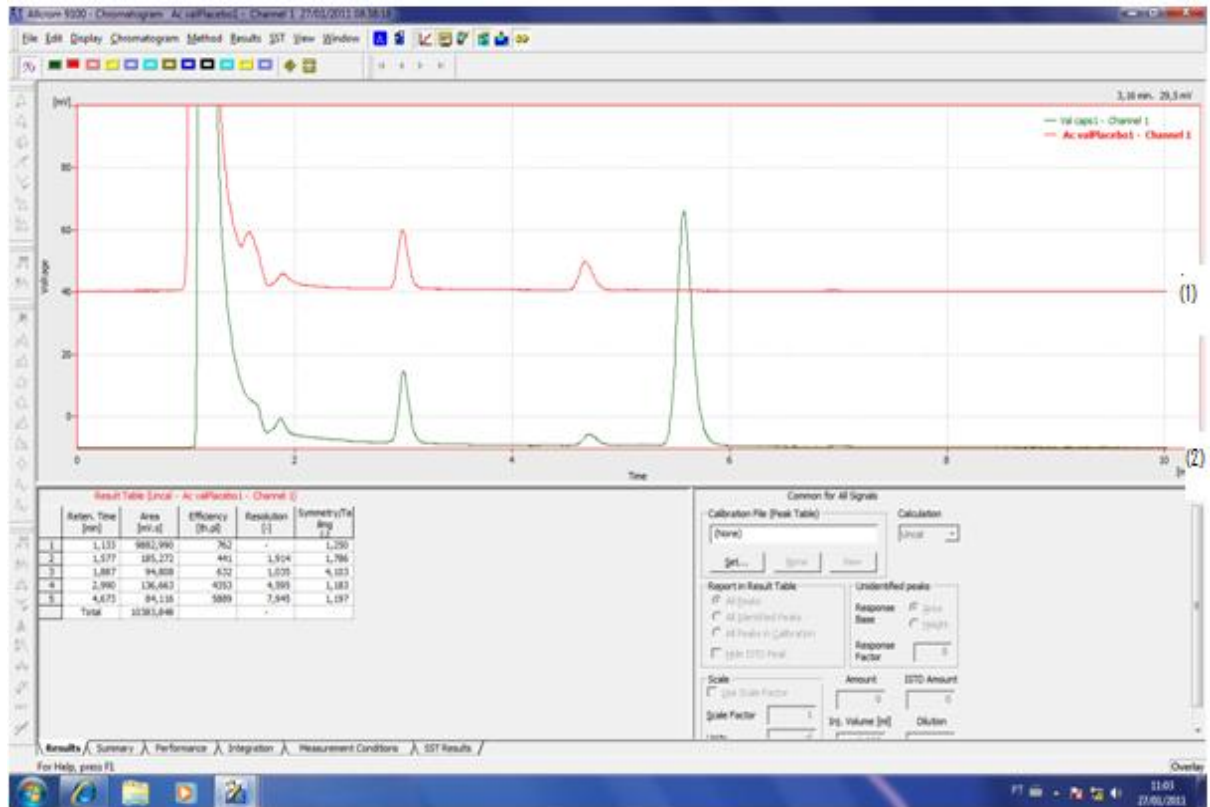


Figura 18- 1-Sinal Cromatográfico do Placebo 2- Sinal cromatográfico do medicamento referência. Condições de análise: coluna Mick Lichrospher C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C, volume 25 µL

### 6.1.5.3 Linearidade

Foi construída uma curva analítica por meio da injeção de três soluções de trabalho em concentrações conhecidas e que forneceram suas respectivas áreas, que são apresentadas nas tabelas 19, 20 e 21.

Tabela 19

Áreas encontradas após a injeção da 1ª solução de trabalho.

<b>Níveis da Curva</b>	<b>Concentração mg/mL</b>	<b>Áreas (mV.s)</b>	<b>DPR%</b>
Nível 1	0,719	553,744	0,803
Nível 2	0,821	628,344	1,004
Nível 3	0,924	707,594	0,672
Nível 4	1,027	783,905	0,067
Nível 5	1,129	866,246	0,646
Nível 6	1,232	943,066	0,225
Nível 7	1,334	1024,515	0,445

DPR- Desvio padrão relativo

Tabela 20

Áreas encontradas após a injeção da 2ª solução de trabalho.

<b>Níveis da Curva</b>	<b>Concentração mg/mL</b>	<b>Áreas (mV.s)</b>	<b>DPR%</b>
Nível 1	0,721	553,123	0,910
Nível 2	0,824	635,740	0,543
Nível 3	0,927	709,292	0,634
Nível 4	1,030	792,072	0,397
Nível 5	1,133	871,573	0,464
Nível 6	1,236	944,473	0,996
Nível 7	1,339	1027,182	0,172

DPR- Desvio padrão relativo

Tabela 21

Áreas encontradas após a injeção da 3ª solução de trabalho.

<b>Níveis da Curva</b>	<b>Concentração mg/mL</b>	<b>Áreas (mV.s)</b>	<b>DPR%</b>
Nível 1	0,719	558,643	0,622
Nível 2	0,821	629,487	0,651
Nível 3	0,924	710,280	0,842
Nível 4	1,027	791,980	0,204
Nível 5	1,129	871,391	0,076
Nível 6	1,232	950,563	0,462
Nível 7	1,334	1025,649	0,611



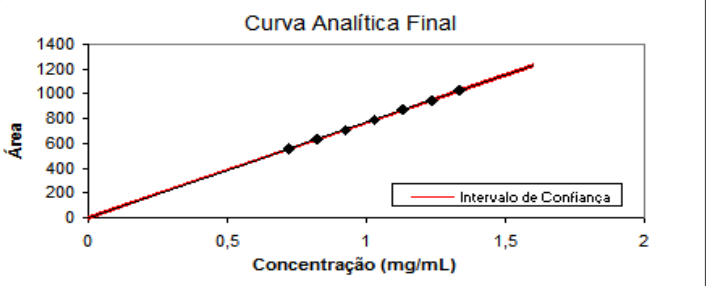
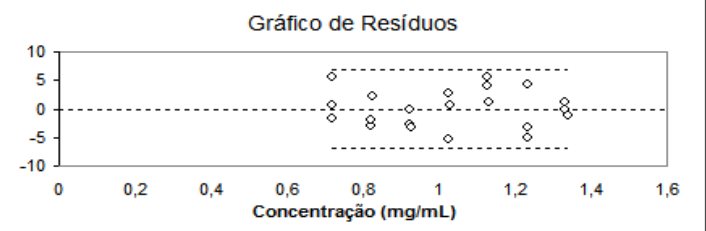
DPR- Desvio padrão relativo

#### 6.1.4.3.1 Avaliação da Linearidade da Curva Analítica do Ácido Valpróico.

Os resultados foram gerados com uma curva de sete níveis oriunda de três pesagens genuínas, e confirmaram a linearidade da curva analítica do ácido valpróico na faixa de concentração avaliada. Foi aplicado o teste de Jackknife para verificação de valores extremos não sendo observado nenhum valor aberrante. Foi utilizado o teste de Ryan-Joiner para verificar a distribuição normal dos resíduos, o que foi confirmado pelo resultado apresentado. A homocedasticidade dos resíduos foi estudada pela estatística  $t$  de Levene e pelo valor encontrado ( $p > 0,05$ ) ficou evidenciado que não houve variabilidade dos resíduos da regressão. O teste de Durbin-Watson foi usado para confirmar a independência dos resíduos da regressão e mostrou-se satisfatório. Observando-se a Curva analítica fica claro que a significância da regressão foi satisfatória ( $p < 0,001$ ) com o desvio de linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ) e que o método está livre de tendência (valor  $p$  da interseção  $> 0,05$ ).

A tabela 22, desenvolvida por Souza (2005) e adaptada pelo INCQS mostra o resumo das premissas para a curva analítica do Ácido Valpróico 250 mg.

Tabela 22- Resumo das premissas da curva analítica do Ácido Valpróico 250 mg

 Ministério da Saúde <b>FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ</b> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde					
<b>AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA</b>					
<b>Dados da Curva Analítica</b>					
Análise:	Acido Valpróico				
Data de Confeção da Curva:	17/08/2010	Curva N°:	2		
Replicatas por Nível (k):	3	N° de Níveis (n):	7		
Equipamento:	Young Lin	Responsável:	Paulo		
<b>Tabela de dados originais</b>					
Nível (k)	i	Conc. mg/mL	Resposta Área		
1	01	0,719	553,744		
	02	0,721	553,123		
	03	0,719	558,643		
2	04	0,821	628,344		
	05	0,824	635,740		
	06	0,821	629,487		
3	07	0,924	707,594		
	08	0,927	709,292		
	09	0,924	710,280		
4	10	1,027	783,905		
	11	1,030	792,072		
	12	1,027	791,980		
5	13	1,129	873,041		
	14	1,133	871,573		
	15	1,129	871,391		
6	16	1,232	943,066		
	17	1,236	944,473		
	18	1,232	950,563		
7	19	1,334	1024,515		
	20	1,339	1027,182		
	21	1,334	1025,649		
<b>Avaliação de Valores Extremos</b> (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.					
<b>Curva Analítica Final</b>					
					
<b>Gráfico de Resíduos</b>					
					
<b>Normalidade dos Resíduos</b> (Teste de Ryan-Joiner)					
Req	0,99				
Rcrit ( $\alpha = 0,05$ )	0,95				
<b>Autocorrelação dos Resíduos</b> (Teste de Durbin-Watson)					
d (calculado)	2,15				
dL (Limite Inferior) $\alpha = 0,05$	1,22				
dU (Limite Superior) $\alpha = 0,05$	1,42				
<b>Estadísticas da Regressão Linear (Modelo: <math>Y = a + bX</math>)</b>					
Coefficiente Angular (b):	7,66E+02	Coefficiente Linear (a):	2,08E+00		
r	0,9998	R <sup>2</sup>	0,9996		
N	21	Graus de Liberdade	19		
<b>Limites de Detecção e Quantificação (LD e LQ)</b>					
Limite de Detecção	1,35E-02	Limite de Quantificação	4,04E-02		
<b>ANOVA da Regressão e Teste de Desvio de Linearidade (Falta de Ajuste)</b>					
fonte	G.L.	SQ	MQ	F	p
regressão	1	5,21E+05	5,21E+05	4,75E+04	9,49E-34
resíduos	19	2,08E+02	1,10E+01		
Ajuste	5	7,38E+01	1,48E+01	1,53E+00	2,42E-01
erro puro	14	1,35E+02	9,62E+00		
total	20	5,21E+05			
<b>Resumo da Avaliação</b>					
<b>Homogeneidade de variância</b>					
Há Homocedasticidade	$p > 0,05$				
<b>Regressão e Teste de Desvio de Linearidade</b>					
A regressão é significativa	$p < 0,001$				
Não há desvio de Linearidade	$p > 0,05$				
<b>Autocorrelação dos Resíduos (<math>\alpha = 0,05</math>)</b>					
Não há autocorrelação	$d > dU$				
<b>Teste de Normalidade (<math>\alpha = 0,05</math>)</b>					
Segue a Normal	Req > Rcrit				
<b>Observações</b>					
Responsável: _____ Data: ___/___/___ Verificado por: _____ Data: ___/___/___					
AVALIAÇÃO DE LINEARIDADE DE CURVA ANALÍTICA			Pág.:1/1		

#### 6.1.5.3.2- Verificação da condição necessária para que a linha da regressão do ácido valpróico passe pela origem

A figura 19 mostra que o intercepto não é significativamente diferente de zero, e o coeficiente de correlação da curva analítica é 0,9998 que somado aos outros parâmetros avaliados, nos garante a linearidade dada pela equação  $y = 2,08 + 766 x$ .

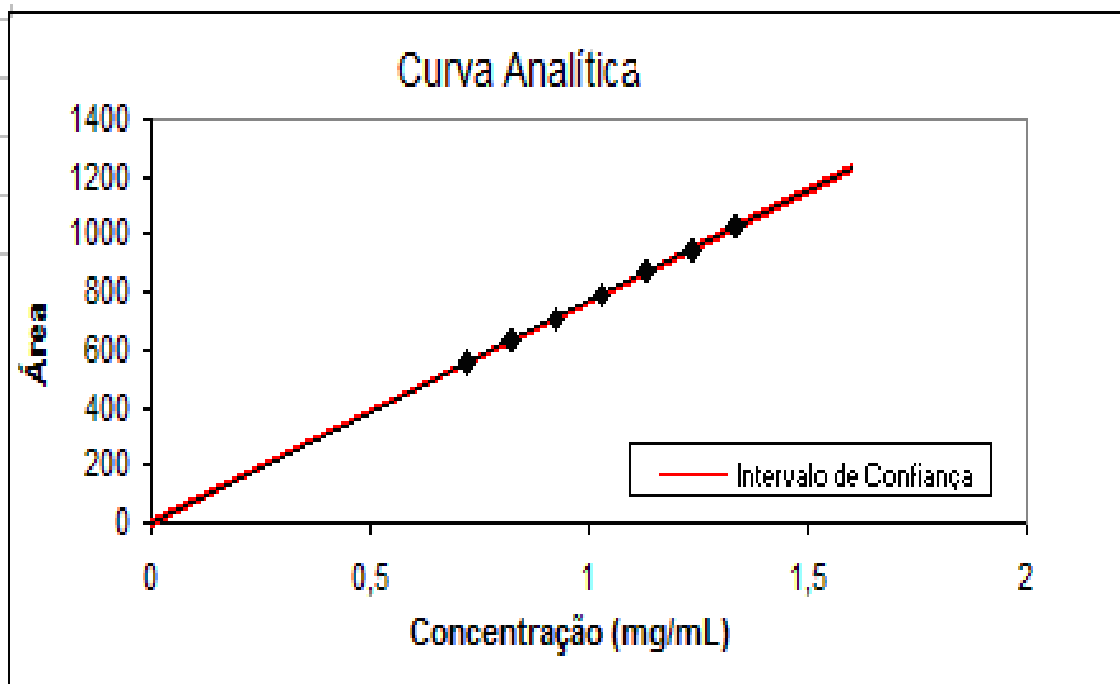


Figura 19- Curva analítica do ácido valpróico. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5 $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético (pH 2,3) e 55 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L.

#### 6.1.5.4 Determinação dos Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de quantificação e de detecção foram obtidos por meio da curva analítica e os resultados foram LD=0,0135 mg/mL e LQ=0,0404 mg/mL. Podemos observar que o limite de quantificação é aproximadamente três vezes o limite de detecção, esses limites não necessitariam ser determinados em função do tipo de

validação que está sendo executada, e foram extraídos estatisticamente. Segundo o INMETRO, 2010 esse resultado serve apenas como orientação e recomenda nos casos em que há a necessidade de se determinar o LD e LQ que seja feito experimentalmente já que uma análise pode variar em função do seu tipo e por isso não poderia ter uma fórmula estatística.

#### *6.1.5.5 Determinação da Precisão: Repetitividade e Precisão Intermediária*

##### *6.1.5.5.1 Repetitividade*

A tabela 23 apresenta os valores de repetitividade obtidos nas análises efetuadas no medicamento Ácido Valpróico 250 mg em condições específicas de medição, ou seja, no mesmo dia, mesmo equipamento e analista. Os valores encontrados para os desvios padrão relativos de repetitividade (DPRr) evidenciam a confiabilidade do método no tocante a repetitividade. Para ANVISA (2003), não se admite valores maiores que 5% para este parâmetro e os valores encontrados na análise ficaram bem abaixo deste limite.

Foi realizado um teste “t” de Student para verificar se as médias encontradas nas análises realizadas sob condições de repetitividade não eram significativamente diferentes. O fato foi comprovado ao evidenciarmos que o t calculado 0,903 era menor que o t tabelado 2,045. O limite de repetitividade (r) foi calculado para capacitar o analista a decidir se a diferença entre replicatas da mesma amostra foi significativa. Os resultados entre as replicatas foram inferiores ao limite de repetitividade 4,90.

Tabela 23

Repetitividade do método de análise do Ácido Valpróico 250 mg realizada no Cromatógrafo Young Lin.

<b>REPETITIVIDADE %</b>		
<b>ANALISTA A (mg/mL)</b>		
250,18	250,73	249,60
250,38	248,10	250,08
252,80	249,00	247,80
249,68	249,30	247,03
248,95	249,88	250,23
252,20	249,08	247,40
250,68	251,05	248,90
250,80	247,28	250,63
253,33	247,83	246,75
252,65	249,60	249,88
<b>MÉDIA (mg/mL)</b>	<b>249,72</b>	
<b>DESVPAD</b>	<b>1,70</b>	
<b>DPR</b>	<b>0,68</b>	
<b>Limite de repetitividade (r)</b>	<b>4,90</b>	
	<b>CALCULADO</b>	<b>TABELADO</b>
<b>Teste "t"</b>	<b>0,903</b>	<b>2,045</b>

DPR- Desvio padrão relativo

DESVPAD- Desvio padrão

#### 6.1.5.5.2- Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada sobre a mesma amostra e os resultados das análises efetuadas no medicamento Ácido Valpróico 250 mg realizados pelos três analistas em dias e equipamentos diferentes, são apresentados na tabela 24. Os resultados encontrados para o Spi e o DPR<sub>R</sub> mostram a reprodutibilidade interna



do método. A precisão intermediária baseia-se na dispersão entre resultados de ensaios. Segundo Horwitz (1982) o limite de referência para o  $DPR_R$ , em função da concentração do fármaco, é no máximo 5,6%.

Tabela 24

Resultados da precisão intermediária realizada na validação do método analítico.

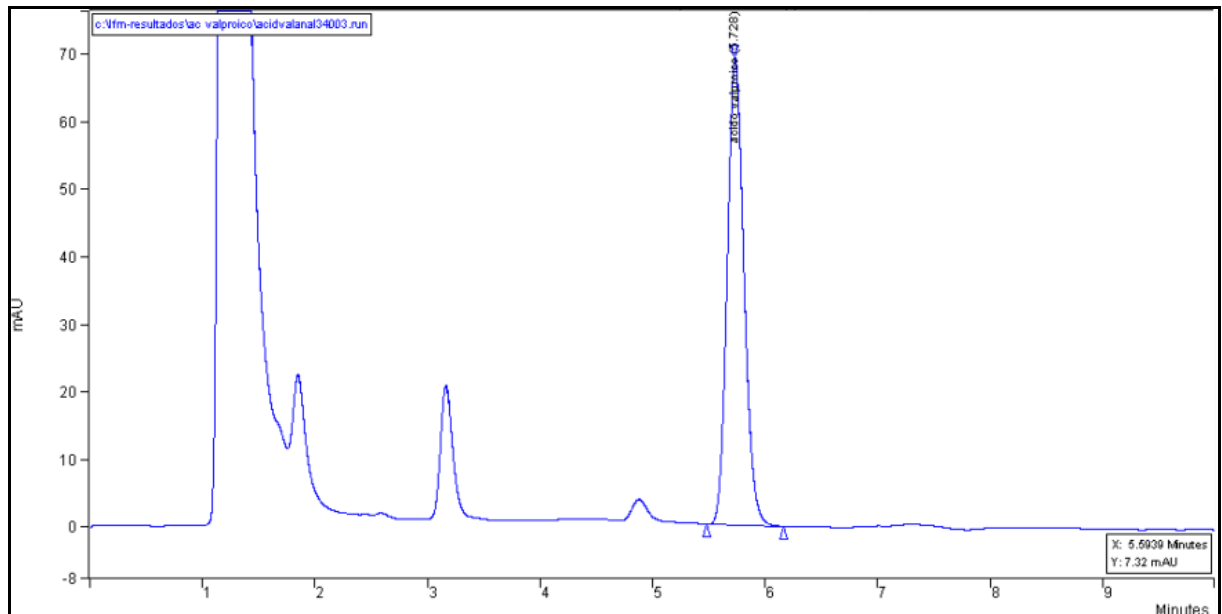
<b>RESULTADOS DA PRECISÃO INTERMEDIÁRIA</b>			
<b>DIA 2</b>			
<b>ANÁLISE</b>	<b>ANALISTA A</b> (mg/mL)	<b>ANALISTA B</b> (mg/mL)	<b>ANALISTA C</b> (mg/mL)
1	246,63	250,08	248,87
2	250,09	250,37	247,54
3	247,11	247,78	250,60
4	247,11	250,84	249,38
5	246,69	248,49	250,19
6	249,04	246,45	248,04
7	247,42	247,17	250,06
8	246,54	248,97	249,85
9	247,80	248,05	249,37
10	246,19	249,83	248,93
<b>MÉDIA (mg/mL)</b>	<b>247,46</b>	<b>248,80</b>	<b>249,28</b>
<b>DESVPAD</b>	<b>1,22</b>	<b>1,46</b>	<b>0,97</b>
<b>DPR</b>	<b>0,49</b>	<b>0,59</b>	<b>0,39</b>
<b>MEDIA</b>		<b>248,51</b>	
<b>Desvio padrão de precisão intermediária (Spi)</b>		<b>1,23</b>	
<b><math>DPR_R</math></b>		<b>0,49</b>	

DPR- Desvio padrão relativo

DESVPAD- Desvio padrão

A figura 20 ilustra um cromatograma oriundo de análise realizada no equipamento 2, pelo analista 2, pode-se observar, como era de se esperar, que os resultados dos parâmetros de adequação estão satisfatórios. O tempo de retenção

bastante similar ao conseguido com o aparelho usado na avaliação das outras figuras de mérito. O cromatograma mostra um sinal bem resolvido com fator cauda de 1,14 e um número de pratos teóricos de 7130 comprovando a eficiência da coluna.



Injection Date: Tue Aug 24 14:58:04 2010    Recalculation : Wed Jan 26 04:30:56 2011  
 Operator : Fernanda    Detector Type : 0325  
 Workstation : HPLC    Bus Address : 44  
 Instrument : HPLC    Sample rate : 20.000 Hz  
 Channel : 1 = 210 na    Run Time : 10.000 min.

\*\* IC Workstation Version 6.41 \*\* 03076-2290-AE7-0724 \*\*

Run Mode: Analysis    Peak Measurement: Area    Calc. Type: %    Normalize Results: No

Peak No.	Peak Name	tR (min)	Result	Sep. Code	W 1/2 (sec)	Efficiency Plates	Efficiency Plates/m	k'	R	Tailing (5.0%)
1	acido valp	5.728	100.000	BB	9.59	7130	1	4.73		1.14

Figura 20- Sinal Cromatográfico do Ácido Valpróico 250 mg, Equipamento Varian. Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético (pH 2,3) e 55 partes de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25 °C, volume 25 µL.

#### 6.1.5.6 Determinação da Exatidão

A exatidão foi aferida por intermédio de uma curva analítica com adição-padrão em concentração previamente conhecida de ácido valpróico. O cálculo da recuperação em cada um dos sete níveis da curva serviu para avaliação da exatidão

do método por intermédio da recuperação. Foram preparadas soluções do medicamento referência e do padrão de ácido valpróico. Às soluções do medicamento referência foram adicionadas concentrações crescentes de ácido valpróico padrão e depois, essas soluções de trabalho tiveram suas respectivas áreas determinadas e o resultado apresentado na tabela 25. Após a determinação das áreas foi calculada a recuperação em cada ponto da curva e os valores se encontram na tabela 26. O teste de recuperação visa avaliar a capacidade de extração do analito na presença da matriz, a recuperação não precisa ser 100% mas deve ser consistente e precisa (STORPIRTIS, 2009). Segundo Horwitz, 1982 para a concentração do fármaco em estudo, a recuperação pode variar de 95% a 105%.

Tabela 25

Áreas medidas após as injeções das soluções de trabalho de adição padrão de ácido valpróico.

Áreas (mV.s)			Média	DP	DPR
554, 740	548, 331	547, 211	550, 094	4,062	0,738
628, 891	635, 922	633, 450	632, 754	3,567	0,564
725, 258	722, 344	725, 567	724, 390	1,778	0,245
817, 688	815, 345	812, 515	815, 183	2,590	0,318
894, 861	899, 030	903, 890	899, 260	4,519	0,503
996, 230	995, 234	992, 234	994, 566	2,080	0,209
1083, 432	1083, 235	1080,760	1082, 476	1,489	0,138

DPR- Desvio padrão relativo

DP- Desvio padrão

Tabela 26

Recuperação encontrada a partir das soluções de trabalho de adição padrão de ácido valpróico

Conc. Experimental (mg/mL)	Conc. teórica (mg/mL)	Recuperação %
0,7	0,700	0, 000
0,805	0,809	99,42
0,922	0,918	100,30
1,037	1,028	100,80
1,144	1,137	100,53
1,266	1,246	101,46
1,377	1,355	101,55
<b>Recuperação Média</b>		<b>100,68</b>
<b>DPR</b>		<b>0,79</b>

DPR- Desvio padrão relativo

### 6.1.5.7 Determinação da Robustez

A robustez de um método informa a susceptibilidade da condição analítica quanto á variação do sistema, e não é um parâmetro de aprovação ou rejeição da metodologia analítica, mas funciona como um alerta de que variações devem ser monitoradas (LEITE, 2008). Foram ensaiadas oito combinações, conforme os parâmetros descritos na tabela 27.

Os resultados obtidos nos cromatogramas foram avaliados de acordo com os parâmetros de adequação do sistema (Tabela 28) e analisada a influência de cada variação encontrada.

Tabela 27

Oito combinações ensaiadas no teste de robustez

<b>Teste de Robustez</b>				
	<b>Condição 1</b>	<b>Condição 2</b>	<b>Condição 3</b>	<b>Condição 4</b>
<b>Tempo de Extração</b>	30 min	30 min	30 min	30 min
<b>Coluna</b>	Merck	Merck	Supelco	Supelco
<b>Fase móvel</b>	55:45	60:40	55:45	60:40
<b>Fluxo</b>	1,0	1,0	1,2	1,2
<b>Temperatura</b>	25°C	30°C	25°C	30°C
<b>pH</b>	2,3	2,6	2,6	2,3
<b>Agitação</b>	Presente	Ausente	Ausente	Presente
	<b>Condição 5</b>	<b>Condição 6</b>	<b>Condição 7</b>	<b>Condição 8</b>
<b>Tempo de extração</b>	20 min	20 min	20min	20min
<b>Coluna</b>	Merck	Merck	Supelco	Supelco
<b>Fase móvel</b>	55:45	60:40	55:45	60:40
<b>Fluxo</b>	1,2	1,2	1,0	1,0
<b>Temperatura</b>	30°C	25°C	30°C	25°C
<b>pH</b>	2,3	2,6	2,6	2,3
<b>Agitação</b>	Ausente	Presente	Presente	Ausente

Tabela 28

Resultados dos parâmetros de adequação do sistema, verificados após as oito combinações ensaiadas.

		<b>Área (mV.s)</b>	<b>Pratos Teóricos</b>	<b>Fator de Cauda</b>	<b>Fator de capacidade</b>
Combinação1	Média	778,622	4519	1,36	4,74
	DPR (%)	0,61	1,93	0,42	0,17
Combinação2	Média	833,375	4250	1,39	4,17
	DPR (%)	0,20	0,45	0,83	0,11
Combinação3	Média	663,369	6636	1,29	3,73
	DPR (%)	1,11	0,62	0,89	0,37
Combinação4	Média	677,433	6259	1,48	2,93
	DPR (%)	0,54	0,47	1,03	0,15
Combinação5	Média	623,025	4741	1,05	3,42
	DPR (%)	0,38	6,71	0,48	0,26
Combinação6	Média	640,773	4181	1,07	2,78
	DPR (%)	1,44	7,27	1,43	0,00
Combinação7	Média	789,344	6680	1,38	4,63
	DPR (%)	1,20	2,12	1,26	0,18
Combinação8	Média	783,266	6167	1,45	3,78
	DPR (%)	0,11	0,29	1,44	0,12

DPR- Desvio padrão relativo

Observando os valores dos desvios padrão relativo das áreas fica evidenciado que os mesmos são satisfatórios e se encontram abaixo do máximo permitido para este parâmetro de adequação do sistema que é 2% confirmando a repetitividade das áreas.

Os resultados dos fatores de cauda das oito combinações foram inferiores a 2 mostrando que a assimetria dos sinais cromatográficos foi boa e está dentro dos níveis aceitáveis.

Os valores encontrados para os fatores de capacidade dos ensaios realizados estiveram entre 2,78 e 4,74 confirmando que a diferenciação do volume morto da coluna foi satisfatório.

Os dados oriundos da observação dos pratos teóricos avaliados nas combinações realizadas nos ensaios mostraram resultados acima do valor recomendado  $N > 2000$  evidenciando que a coluna é adequada para realizar a análise pretendida. Uma diminuição destes valores quando comparados com os resultados obtidos durante a adequação do sistema (tabela 29) é considerado normal em função da utilização excessiva da coluna durante o processo de validação da metodologia analítica (AGUIAR, 2007). A diminuição dos pratos teóricos deixa clara uma diminuição na eficiência da coluna, entretanto os valores encontrados ainda se encontram bem acima do valor mínimo exigido, pelos compêndios oficiais, para avaliar este parâmetro. As combinações que utilizaram a coluna C18 Supelco apresentaram um número de pratos teóricos maior do que as análises com a coluna Merck utilizada na validação.

Tabela 29

Avaliação comparativa dos parâmetros do *System Suitability* no início e no final do estudo de validação.

<b>Ácido Valpróico</b>	<b>DPR- Entre as áreas</b>	<b>Pratos teóricos</b>	<b>Fator de cauda</b>	<b>Fator de capacidade</b>
<b>Adequação do Sistema (Início)</b>	0,35%	5397	1,22	4,70
<b>Adequação do Sistema Combinação 1</b>	0,61%	4519	1,36	4,74

DPR- Desvio padrão relativo

Os resultados encontrados para as combinações avaliadas, evidenciam a robustez do método analítico quando exposto as mudanças descritas na tabela 27. A estabilidade da solução amostra foi verificada separadamente no início do estudo e mostrou-se satisfatória no período em que foi avaliada. A robustez em relação a analistas, equipamento, e dias diferentes foi verificada durante o teste de precisão intermediária.

Foram calculados os efeitos das sete variações (tabela 30) para avaliar o impacto de cada uma na análise do medicamento.

Tabela 30

Diferença observada no system suitability após cada uma das sete variações.

	DPR- entre as áreas	Pratos Teóricos	Fator de Cauda	Fator de Capacidade
<b>1. tempo de extração 30-20 min</b>	- 0,17	- 26	0,14	0,24
<b>2. Diferente fabricante de coluna Merck-Supelco</b>	- 0,08	- 2013	- 0,18	0,01
<b>3. Variação da composição da fase móvel 55/45 – 60/40</b>	0,25	430	- 0,08	0,72
<b>4. Variação do fluxo da fase móvel 1,0-1,2 mL/min</b>	- 0,34	- 50	0,17	1,12
<b>5. Variação da temperatura da coluna 25 – 30 °C</b>	0,24	- 107	- 0,03	- 0,03
<b>6. Variação no pH da fase móvel 2,3-2,6</b>	- 0,58	- 15	0,05	- 0,11
<b>7. Frequência de agitação Presente – ausente</b>	0,23	- 39	0,03	0,23

DPR- Desvio padrão relativo

Verificando as diferenças observadas nos parâmetros de adequação do sistema, após as variações implementadas, pode-se concluir que os efeitos não foram significativos.

A diferença maior no desvio padrão das áreas foi observada na variação da fase móvel sugerindo manter a fase móvel 55% ACN : 45% TFA.

Como observado anteriormente a coluna Supelco apresentou um número de pratos teóricos acima das análises realizadas com a coluna Merck, o que evidencia um desgaste natural da coluna utilizada durante o processo de validação.

As maiores diferenças no fator de cauda se deram com a variação da fase móvel e a mudança da coluna, a diferença verificada com a utilização da coluna Supelco também pode ser atribuído ao desgaste da coluna Merck. A variação em função do aumento do fluxo sugere a manutenção do fluxo escolhido para a validação.

As figuras 21 a 28 ilustram os cromatogramas de uma injeção, das oito combinações ensaiadas durante o teste de robustez do Ácido Valpróico 250 mg.

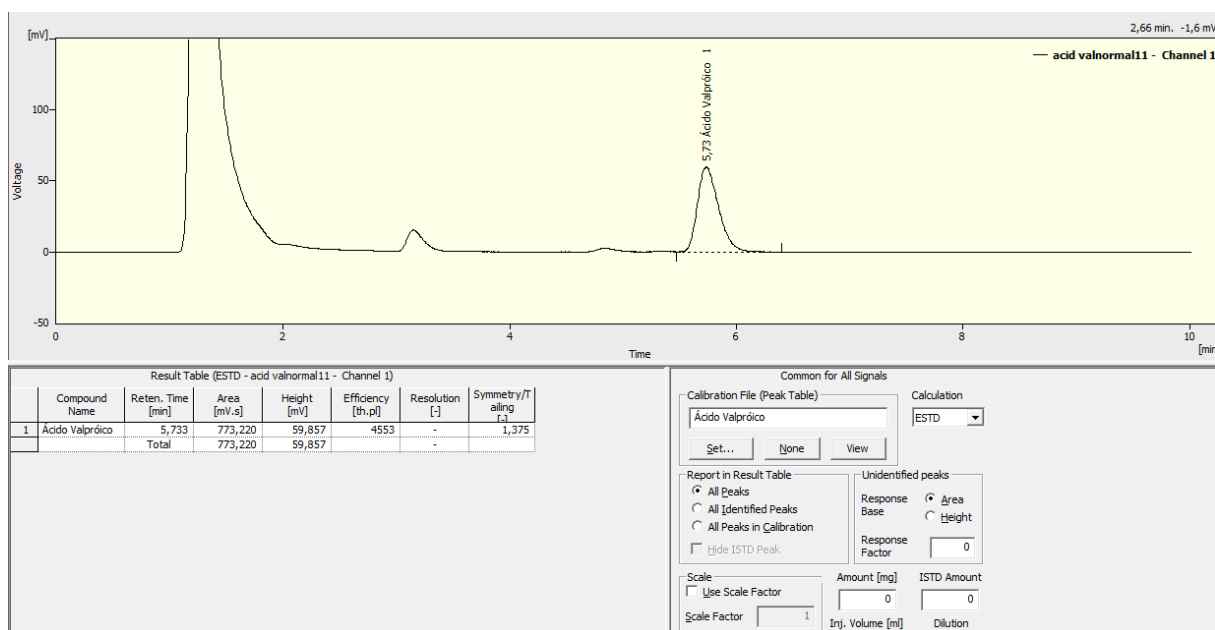


Figura 21 - Pico Cromatográfico do ácido valpróico (Amostra-Condição 1). (5,74min, 1 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25 µL, amostra com agitação.



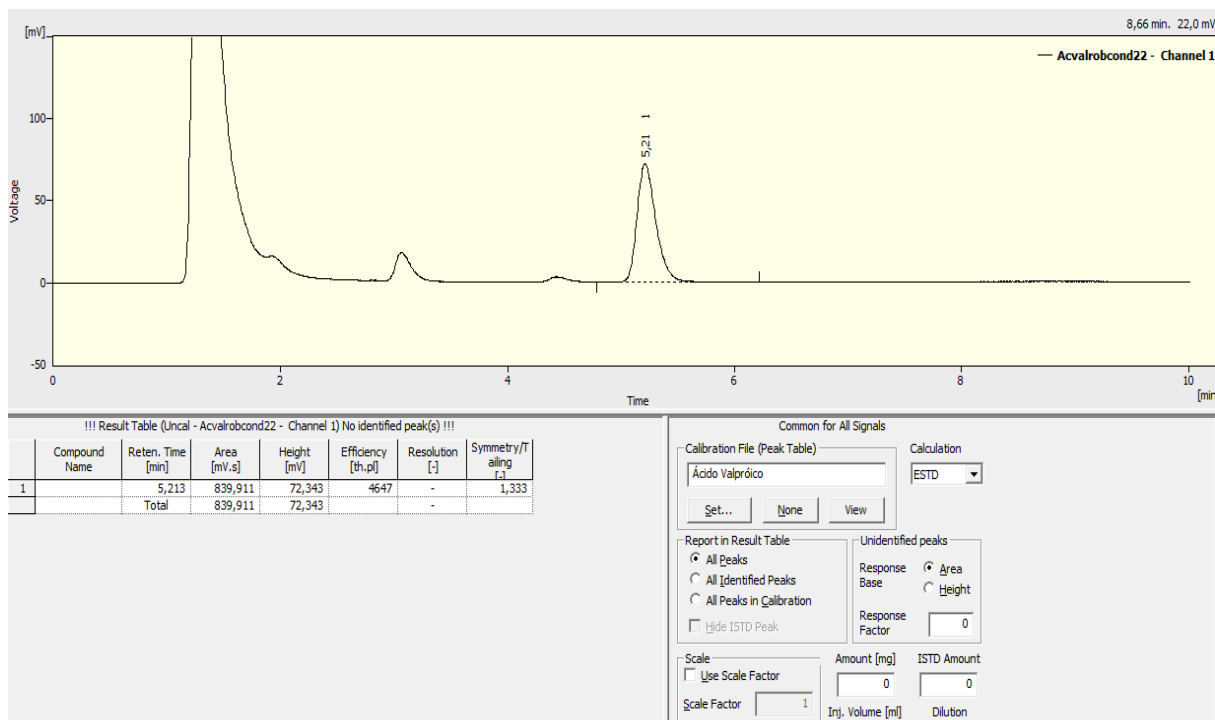


Figura 22 - Pico Cromatográfico do ácido valprórico (Amostra-Condição2). (5,21 min, 1 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 40 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético e 60 partes de acetonitrila (pH 2,6), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 30°C, volume 25  $\mu$ L, amostra sem agitação.

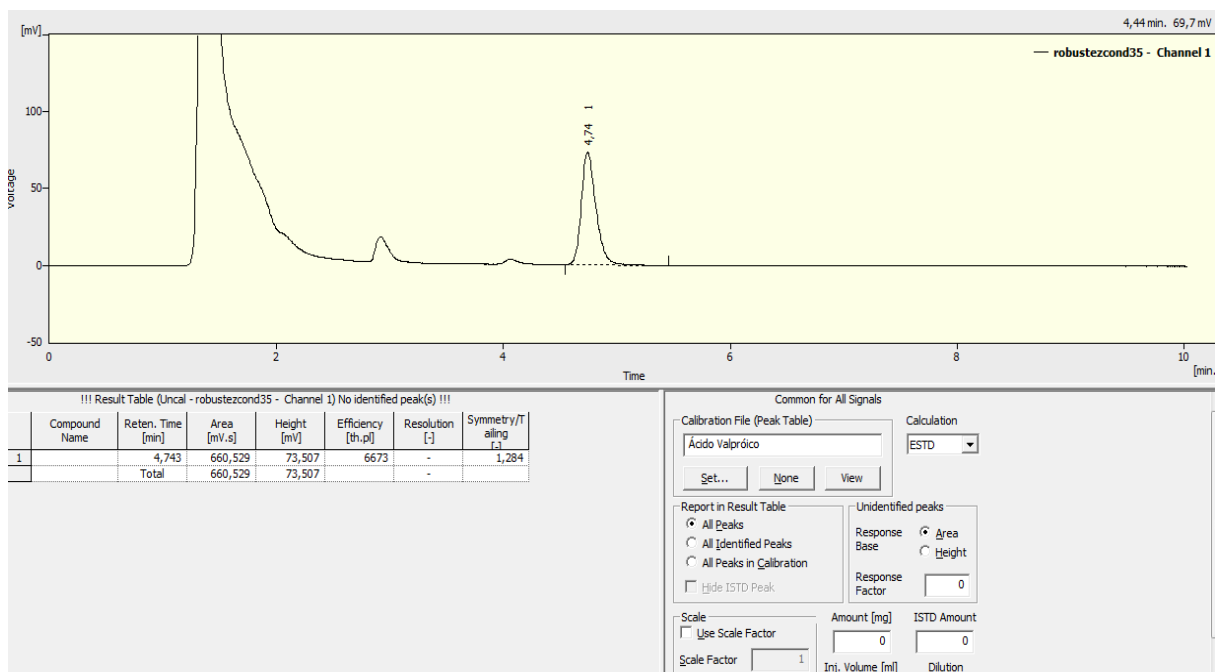


Figura 23 - Pico Cromatográfico do ácido valprórico (Amostra-Condição 3). (4,74 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Supelco C18 (5  $\mu$ m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,6), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L, amostra sem agitação.

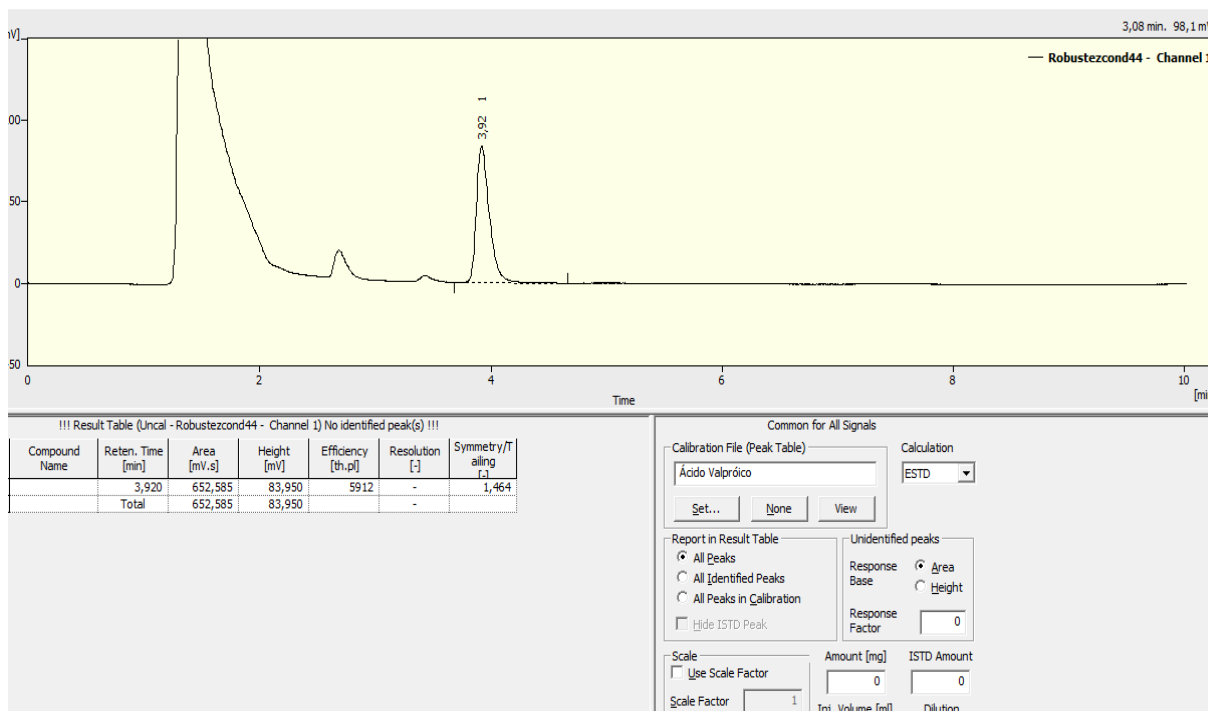


Figura 24 - Pico Cromatográfico do ácido valpróico (Amostra-Condição 4). (3,92 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 30 min, coluna Supelco C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 40 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 60 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 30° C, volume 25 µL, amostra com agitação.

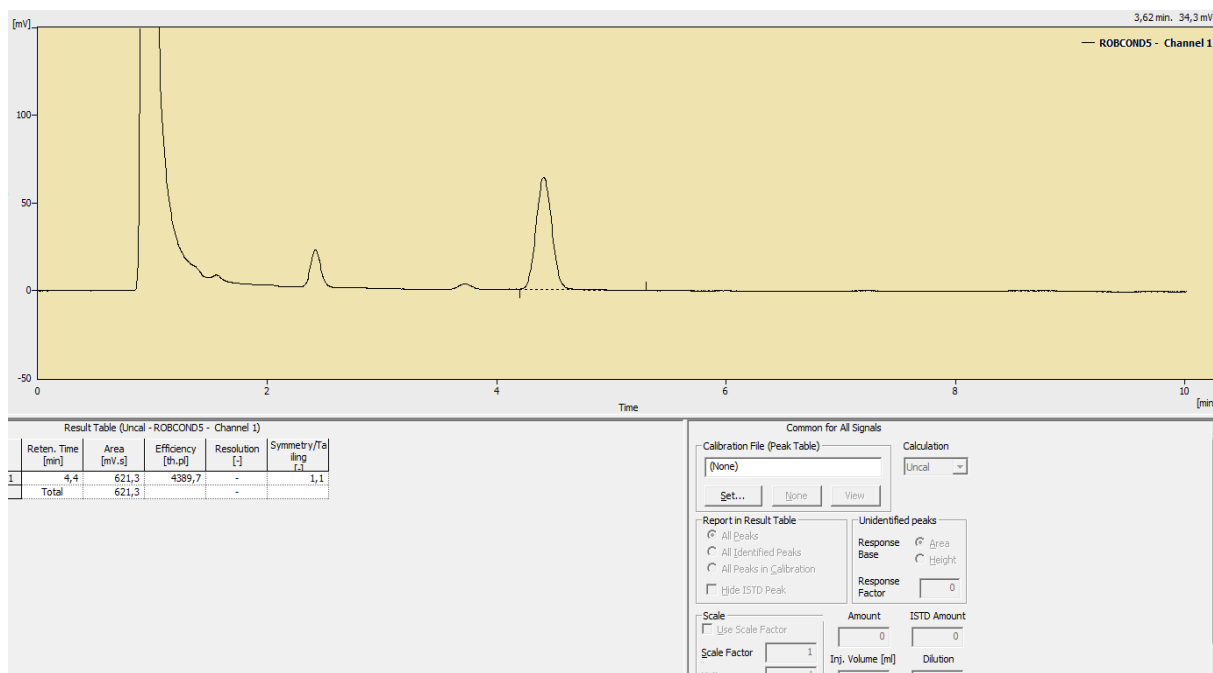


Figura 25 - Pico Cromatográfico do ácido valpróico (Amostra-Condição 5). (4,4 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 30°C, volume 25 µL, amostra sem agitação.

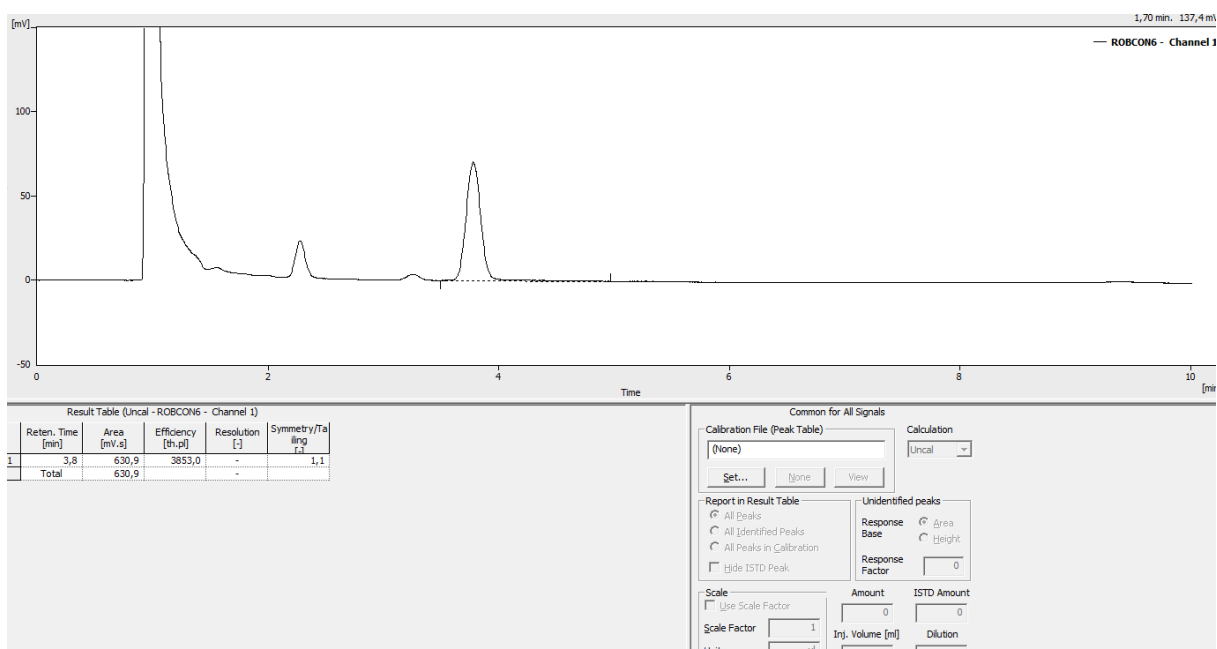


Figura 26 - Pico Cromatográfico do ácido valpróico (Amostra-Condição 6). (3,8 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Merck Lichrospher C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 40 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético e 60 partes de acetonitrila (pH 2,6), fluxo 1,2 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25 µL, amostra com agitação.

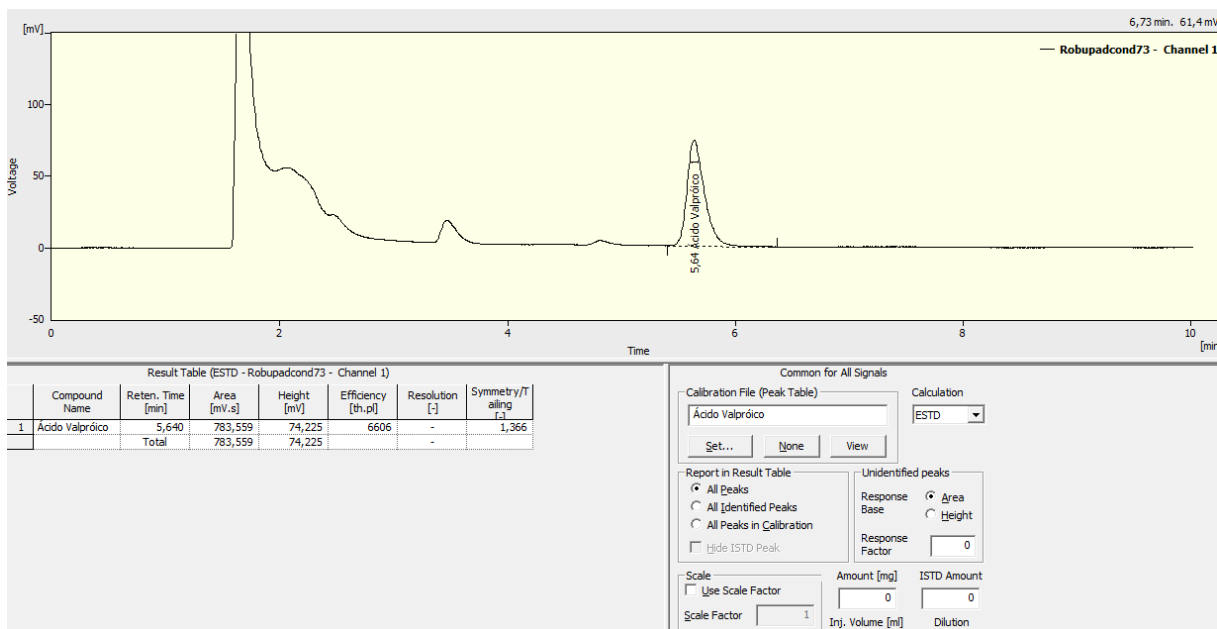


Figura 27 - Pico Cromatográfico do ácido valpróico (Amostra-Condição 7). (5,62 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Supelco C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoroacético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,6), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 30°C, volume 25 µL, amostra com agitação.

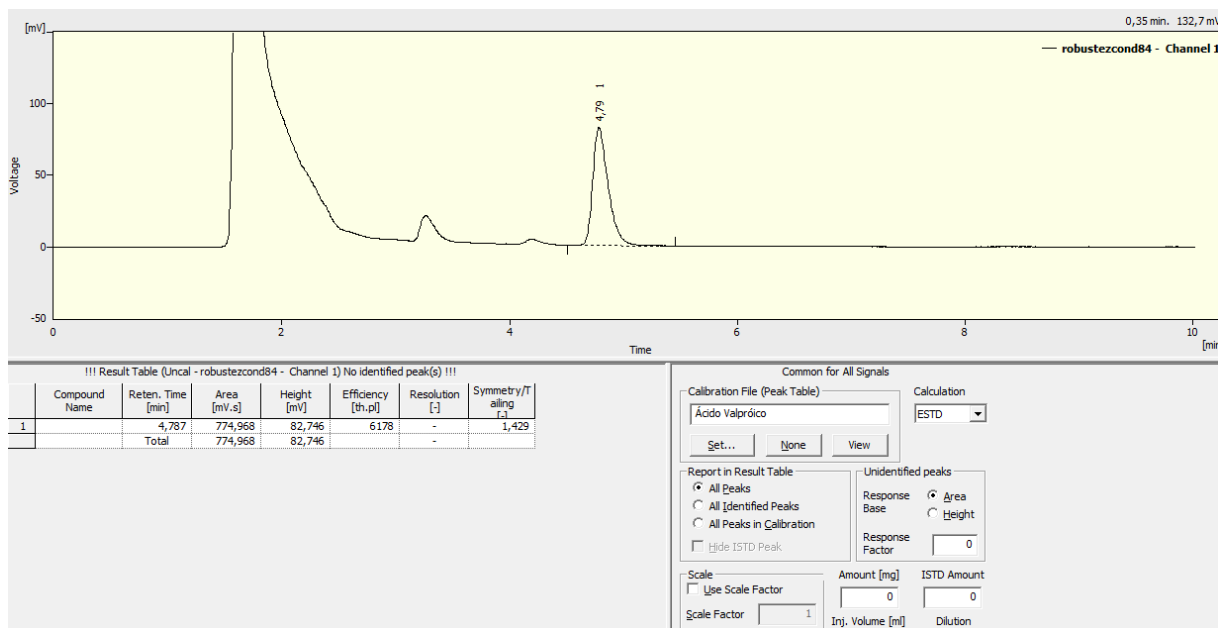


Figura 28 - Pico Cromatográfico do ácido valpróico (Amostra-Condição 8). (4,79 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: Tempo de extração 20 min, coluna Supelco C18 (5 µm, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 40 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 60 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25 µL, amostra sem agitação.

## 6.2 AVALIAÇÃO PONTUAL DOS MEDICAMENTOS DISPONÍVEIS NO MERCADO.

Foram avaliados dois medicamentos que se apresentam na forma de Ácido Valpróico Cápsulas de 250 mg, disponíveis no mercado. As análises foram feitas em triplicata e os resultados estão descritos na tabela 31.

Tabela 31

Valores encontrados na análise pontual dos medicamentos na forma de Ácido Valpróico Cápsulas de 250 mg, disponíveis no mercado

	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Média	DPR
	Análise	Análise	Análise		
Medicamento A	100,17%	99,80%	99,49%	99,82%	0,34%
Medicamento B	104,17%	104,81%	104,76%	104,58%	0,34%

DPR- Desvio padrão relativo

Avaliando os resultados encontrados para os dois produtos, pode-se concluir

que ambos estão dentro da especificação farmacopeica no tocante ao teor de Ácido Valpróico 250 mg. Segundo a farmacopéia USP 33 o teor do medicamento tem que estar na faixa de 90% a 110%. Os valores encontrados para os medicamentos referência e similar foram 99,82% (DPR de 0,34%) e 104,58% (DPR de 0,34%), respectivamente.

### 6.3 POSSIBILIDADE DE UTILIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DO VALPROATO DE SÓDIO 250 mg /5mL Xarope

O medicamento Valproato de Sódio 250 mg/5mL xarope foi analisado pela mesma metodologia validada para analisar Ácido Valpróico 250 mg/caps. Após a injeção da solução de Valproato de Sódio e do padrão de ácido valpróico foram analisados os cromatogramas do medicamento quanto aos parâmetros Tempo de retenção, fator de assimetria, pratos teóricos, resolução e repetitividade das áreas e os valores encontrados são apresentados na Tabela 32.

Observando os valores encontrados podemos inferir que a metodologia apresenta um excelente prognóstico para a avaliação do valproato de sódio 250 mg/5mL xarope.

Um fato que deve ser levado em consideração é a necessidade de acidificar a amostra com 1 mL de TFA, para garantir que todo valproato de sódio tenha sido transformado em ácido valpróico, para quantificá-lo frente ao padrão de ácido valpróico.

A figura 29 mostra um cromatograma do Valproato de Sódio, injeção 3, onde se evidencia a boa resolução do método, fator de assimetria, pratos teóricos, tempo de retenção satisfatórios.

No mercado, os medicamentos a base de Valproato de sódio, tem suas concentrações expressas em ácido valpróico.

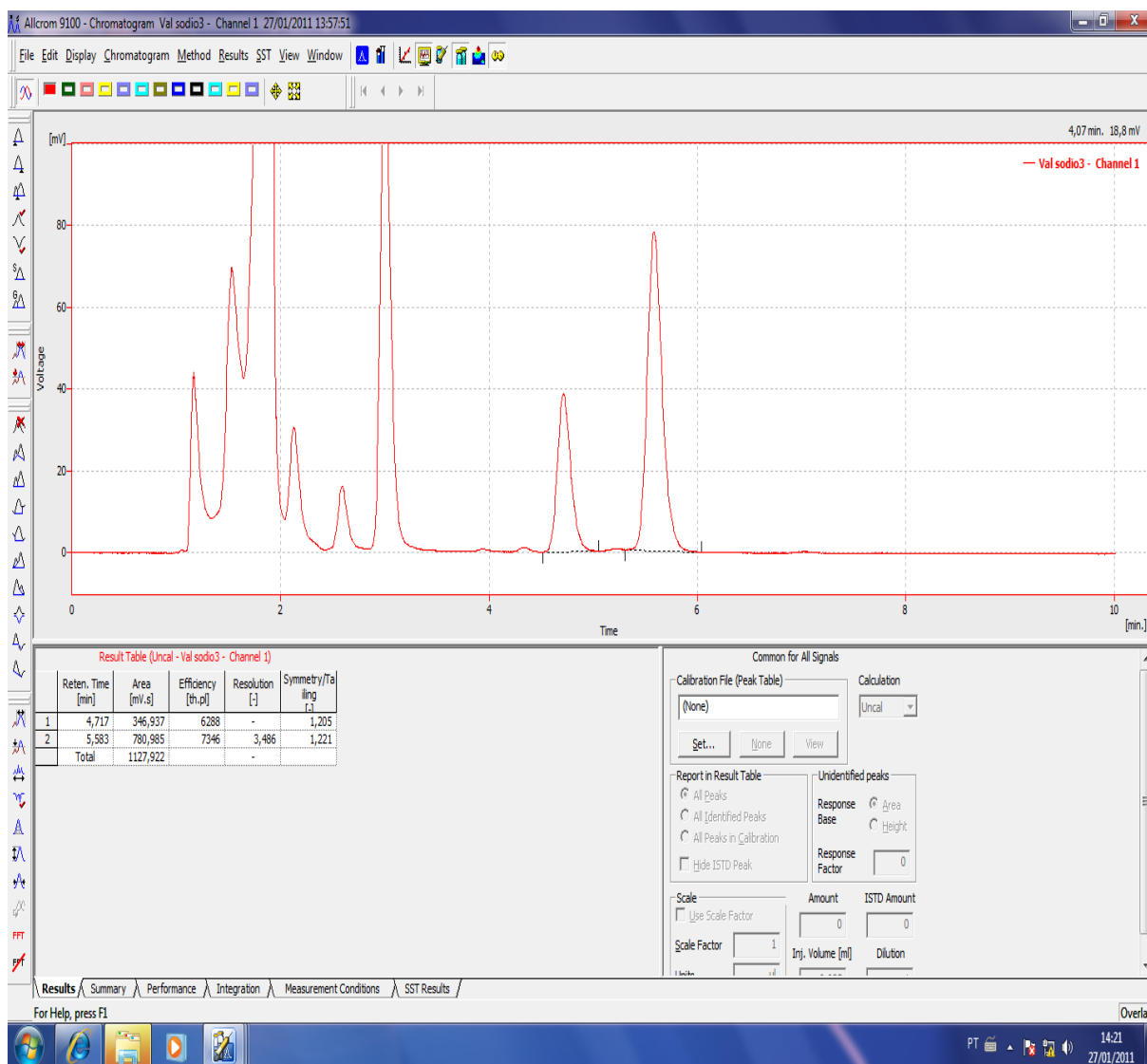


Figura 29- Sinal Cromatográfico do Valproato de Sódio 250 mg/mL Xpe. (5,6 min, 1,0 mg/mL) Condições de análise: coluna Merck Lichrospher C18 (5 $\mu$  m, 250 mm x 4,0 mm d.i.), fase móvel mistura de 45 partes de solução 0,05% de ácido trifluoracético e 55 partes de acetonitrila (pH 2,3), fluxo 1,0 mL/min, detecção 210 nm, temperatura 25°C, volume 25  $\mu$ L.

Tabela 32

Média dos parâmetros de adequação obtidos na análise pontual do medicamento Valproato de Sódio 250 mg/5mL Xarope.

Resolução	Pratos Teóricos	Fator de Assimetria	de Tempo de Retenção	de Repetitividade das Áreas
3,5	7124	1,2	5,6	0,1

## 6.4 VOLTAMETRIA

### 6.4.1 Otimização da Metodologia

Durante o desenvolvimento do método por voltametria os parâmetros voltamétricos velocidade de varredura, amplitude, tempo de pulso e tempo de equilíbrio foram estudados, buscando a otimização do método. Após os testes, ficaram estabelecidas as condições descritas na tabela 33 para determinação do teor de ácido valpróico .

Tabela 33

Condições experimentais para o método voltamétrico

Velocidade de varredura	20 mV s <sup>-1</sup>
Amplitude	70 mV
Tempo de pulso	40 ms
Tempo de equilíbrio	15s
Potencial	-0,1 a -0,7

Após a avaliação do pH da solução tampão Britton Robbinson na faixa de 2,0 a 10, verificou-se que a melhor resposta se deu em pH 5,0

### 6.4.2 Curva Analítica do Medicamento Ácido Valpróico 250 mg/Cápsulas .

Utilizando as condições da tabela 33 foi preparada uma curva analítica, utilizando o padrão de referência ácido valpróico lote 4011153528, ABBOTT, nas concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L ). Os voltamogramas obtidos e a curva analítica estão apresentados nas figuras 30 e 31. O coeficiente de correlação obtido foi  $R^2 = 0.9999$  e a equação da reta estabelecida foi  $y = 31,28 x + 1,3972$ .

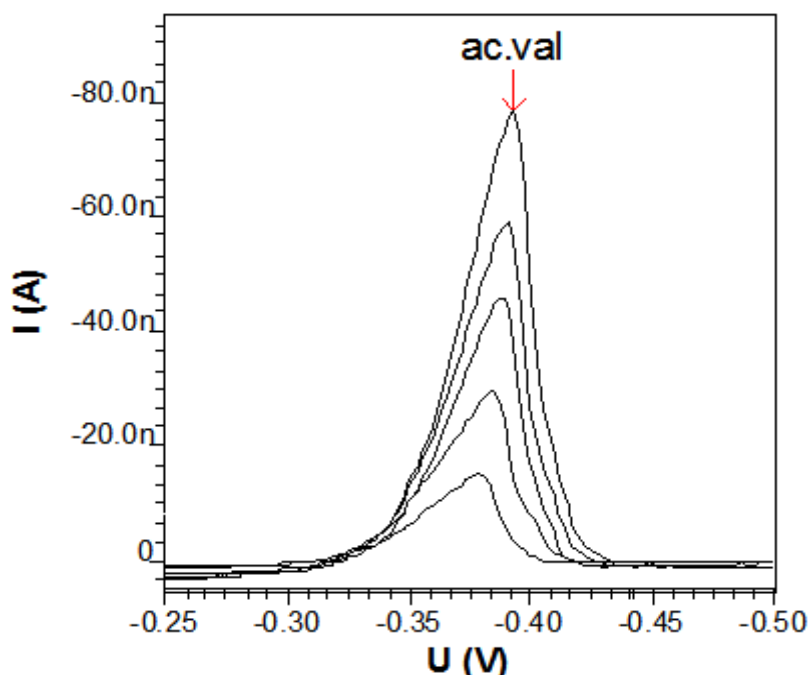


Figura 30- Voltamogramas do ácido valpróico (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L) obtidos nas condições descritas na tabela 33.

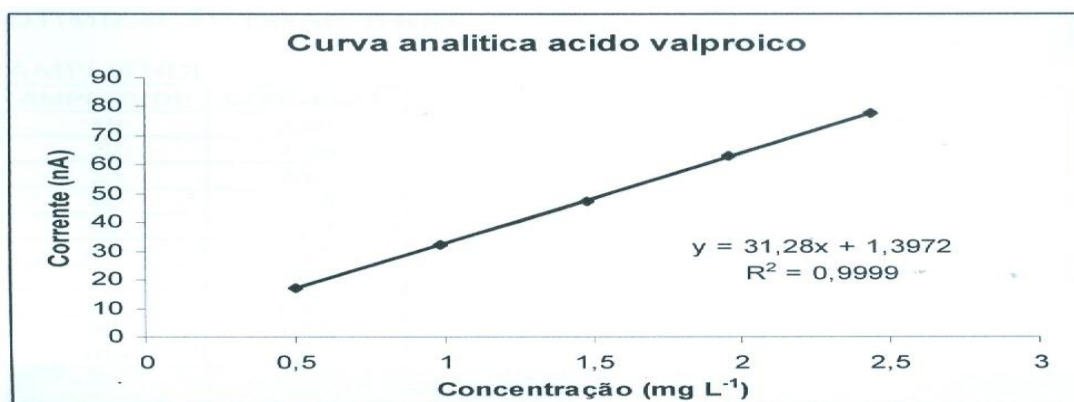


Figura 31-Curva analítica do ácido valpróico (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mg/L) obtida nas condições descritas na tabela 33

Com os resultados descritos acima podemos concluir preliminarmente que a técnica voltamétrica é exequível para analisar ácido valpróico. Porém, a realização de mais estudos, bem como, a validação do método e a comparação das metodologias (CLAE / Voltametria) por meio de inferências estatísticas, se faz necessário.



## 7 CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida para analisar Ácido Valpróico 250 mg por Cromatografia à Líquido mostrou ser adequada ao fim que se destina. A validação ratificou a confiabilidade da metodologia para a identificação inequívoca e quantificação segura e confiável do analito em questão, obtendo resultados satisfatórios para as figuras de mérito seletividade, linearidade, repetitividade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

Uma análise pontual dos medicamentos à base de ácido valpróico na forma de cápsulas 250 mg, disponíveis no mercado Nacional, evidenciou que, no tocante ao teor do fármaco, foram encontrados resultados dentro do especificado. O medicamento A, apresentou teor de 99,82% com DPR- 0,34% e o medicamento B 104,58% com DPR de 0,34%.

A metodologia proposta para analisar Ácido Valpróico 250 mg cápsulas, também poderá ser utilizada com intuito de identificar e quantificar Valproato de Sódio 250 mg/5mL xarope, tomando-se o devido cuidado de acidificar a amostra para garantir que todo o princípio ativo a ser quantificado esteja sob a forma de ácido valpróico na hora da análise.

A voltametria mostrou ser uma técnica bastante promissora e de baixo custo, podendo ser uma alternativa analítica, embora, em laboratórios de controle de Qualidade de Medicamentos o equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência seja mais largamente utilizado e por este motivo a CLAE seja uma técnica mais fácil de implantar.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Poder Executivo, Seção1, 02 de jun. de 2003.

\_\_\_\_\_. RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos o cumprimento das diretrizes estabelecidas no regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Poder Executivo, seção1, 16 de abril de 2010.

AGUIAR, J.L. N; **Validação Intralaboratorial de um novo método analítico por cromatografia em fase líquida do ácido acetilsalicílico e do ácido salicílico**. Rio de janeiro, 2007. 90 p. II. Tese de Mestrado em Vigilância Sanitária- Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Nacional De Controle De Qualidade em Saúde, Rio de janeiro, 2007.

ALBRECHT, H., Can valproic acid help deplete latent reservoir of HIV?. **Aids Clinical Care**, Massachusetts Medical Society. v.3, n.10, Sep., 2005.

ALEIXO, L.M. **Voltametria**: conceitos e técnicas. Chemkeys, 2003. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2003/03/25/voltametria-conceitos-e-tecnicas/>>. Acesso em 25 de setembro de 2009.

AMINI, H.; JAVAN, M.; AHMADIANI, A. Development and validation of a sensitive assay of acid valproic in human plasma by high-performance liquid chromatography without prior derivatization. **Journal of Chromatography B**. n.830, p. 368-371, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT, NBR ISO/IEC 17025. **Normas Gerais para Competência de Laboratórios de ensaio e Calibração**- Rio de janeiro, 2005.

BAREK, J., FOGG, A. G., MUCK, A., ZIMA, J. Polarography and voltammetry at mercury electrodes. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 291-309, 2001.

BARROS, C.B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, São paulo, v.64, n2, p.175-177, jul/dez, 2002

BELIN, G.K.; KRAHENBUHL, S.; HAUSER, P.C. Direct determination of valproic acid in biological fluids by capillary eletrophoresis with contactless conductivity detection. **Journal Chromatography B**, n.847, p. 205-209, 2007

BORTOLINI, L.G.C.; KULAK, C.A.M.; BOGUSZEWSKI, C.L. Endocrine and metabolic effects of antiepileptics drugs. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**. v. 14 (suppl), p. 32-38, 2008.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, DF: Senado; 1988.

\_\_\_\_\_. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, DF, seção 1, 12 de set. de 1990.

\_\_\_\_\_. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, DF, seção 1, 20 de set. de 1990a.

\_\_\_\_\_. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília. Seção1, p.1, 11 de fevereiro de 1999.

BROEK, M.P. V.; SIKMA, M. A.; VERVERS, T.F.; MENLEUBELT, J. Severe valproic acid intoxication: case study on the unbound fraction and the applicability of extracorporeal elimination. **Eur J. Emerg. Med.** 6 may 2009.

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

BUENO, E. **À sua saúde**: a vigilância sanitária na história do Brasil. Brasília: Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005.

CANTELO, R.; CIVARDI, C.; VARRASI, C. et.al; Excitability of the human epileptic cortex after chronic valproate: A reappraisal. **Brain Research**. n. 1099, p. 160-166, 2006.

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.

CASTRO, L.A.; COUZI, C.; Uso potencial dos anticonvulsivantes no tratamento ambulatorial da dependência de álcool. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v. 55, n.3, 2006.

COSTA, E.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Rosenfeld, S.(org). **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.15-39, 2000.

COSTA,E.A. **Vigilância Sanitária**: Proteção e Defesa da saúde. São Paulo : Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos, 2004.

DRUGBANK. Estrutura química do ácido valpróico. Disponível em:<[http://www.drugbank.ca/structure\\_viewer](http://www.drugbank.ca/structure_viewer)>. Acesso em 28 de out.2010.

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

GOODMAN and GILMAN'S: **The pharmacological basis of therapeutics**. Edited by Laurence I. Bruton, John S. Lazo, Keith I. Parker. 11ed. New York: Mc Graw-Hill, XXIII, p.514-15, 2005.

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

HARRIS, D.C.; **Análise química quantitativa**. 7ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos Científicos Editora S.A, 2008.

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

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

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007).

\_\_\_\_\_. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010).

JENTINK, J.; LOANE, M.A.; DOLK, H. BARISIC, I.; GARNE, E.; MORRIS, J.K.; LOLKJE. Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformation. **The New England Journal of Medicine**. 362, 2185-2193, june, 2010.

KAUSHAL, S. Valproic acid shown to halt vision loss in patients with retinitis pigmentosa. **British journal of ophthalmology**. 20, july, 2010.

LA ROCA, M.F; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C.; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos, **Rev. Bras. Farm.** v.88, n.4, p.177-180. 2007.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5 ed. Campinas, SP: editora Átomo, 2008.

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, p. 278-292, 1960.

LEVISOHN, P.M.; HOLLAND, K. D.; Topiramate and valproate in patients with juvenile myoclonic epilepsy: A randomized open-label comparasion. **Epilepsy & Behavior**. v.10, p.547-552, 2007.

LIMA, L.F.M. MELLO, A.L., MUSSOI, A.S., GOMES, C., PAZ. E.P., MOURA, M.L. **Vigilância sanitária de medicamentos e correlatos**. Rio de janeiro: Qualitymark Ed., 1993.

LI MIN, L.; SANDER, J.W.A.S. Projeto demonstrativo em epilepsia no Brasil. **Arq. Neuro-psiquiatria**. v.61, n.1, São Paulo, mar. 2003.

LUCCHESI, G. **Globalização e regulação sanitária**; os rumos da vigilância sanitária no Brasil. Rio de janeiro, 2001. 329 p. II. Tese de Doutorado em Saúde Pública- Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de janeiro, 2001.

LUNA, A. S.; PINHO, J. S. A.; A seletividade de um método analítico. **Revista analytica**. n. 41, p.85-88, jun/jul, 2009.

MARCOLINO JUNIOR, L.H. **Eletrodos voltamétricos e amperométricos para determinação de espécies de interesse farmacêutico**, 2007. Tese Doutorado em Ciências- Química Analítica. Universidade Federal de São Carlos – São Paulo, 2007

MARTINDALE: **The complete drug reference**. Edited by S.C. Sweetman. 34 ed. London: Pharmaceutical Press, p. 380-2, 2005.

MÈLANIE, S.M.; VAN BREEMEN, R. M.; TAPEROORN, M. J. B.; WALCHENBACK, R.; ZWINKELS, H.; VECHT, C. J. Efficacy of anti-epileptic drugs in patients with gliomas and seizures. **J. Neurol.** May, 2009

PETERS, D. G., HAYES, J. M., HIEFTJE, G. M. **Chemical Separations and Measurements: Theory and Practice of Analytical Chemistry.** USA: Saunders Company, p.431-450, 1974.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova.** v.27, n.5,p.771-780, 2004.

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

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C.; **Handbook of Pharmaceutical Excipients.** 5 ed. American Pharmaceutical Association, 2006.

SANTOS, B.L.; FERNANDES, R.M.F.; NEVES, F.F.; Pancreatite aguda em adulto induzida pelo ácido valpróico. **Arq. Neuro Psiquiatria.** V.68, n.1, São Paulo, fev, 2010.

SANTOS, L. O. **Estudos comparativos entre as técnicas de voltametria de pulso diferencial, espectrofotometria de ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química paracetamol,** 2003. Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária-Fundação Oswaldo Cruz-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2003.

SCHULER, A. **Cromatografia a Gás e a Líquido:** detectores, aquisição de dados, validação e avaliação estatística. 11ed., 2009.

SHARBIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between

validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. n.987, p. 57-66, 2003.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. Principles of Instrumental Analysis. Cap.26: **High-Performance Liquid Chromatography**, 4 ed. Saunders College Publishing, p.628-667, 1992.

SNYDER, R.L.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**, 2ed, Wiley Interscience: New York, 1997.

SOUZA, D.; CODOGNATA, L. MALAGUTTI, A.R.; TOLEDO, R.K.; PEDROSA, R.T.; OLIVEIRA, R.T.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v.27, n.5, São Paulo, set/out, 2004.

SOUZA, S.V.C; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v.552, p.25-35, 2005.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, CHANG.; GAI, M.N. **Ciências farmacêuticas** : Biofarmacotécnica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, p.122, 2009

TAPPIN, M.R.R.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A.C.; LUCCHETTI, L. Development of an HPLC method for the determination of tetranortriterpenoids in *Carapa guianensis* seed oil by experimental design. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. n.48, p.1090-1095, 2008.

THEIR, P. ; KIRCHOFF, J. **Manual of pesticide residue analysis**. DFG-Konzept. Federal Republic of Germany, 1992.

THE MERCK index. **An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 13ed. Raway, N.J. Merck & Co., 2001



UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP): 33 ed. Rockville: **United States Pharmacopeial**, v.3, 2010.

VALENTE, A. L. P.; COLLINS, C. H.; MANFREDI, J. E.; Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. p. 103-108, jul., 1983.

VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arq. Mundi**. v.11, n.2, p.26-31, 2007.

VOGEL, A. J.; **Análise química quantitativa**. 6ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos Editora S.A, 2002.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**. Vch Published. New York, 3ed, 2006.

## ANEXO 1 – Certificado de Análise do Padrão Secundário nº PS 010/10.

Abbott - Global Pharmaceutical Operations

Documents ID: PO-713-125 F001  
 Documents Type: Non-Rendered Form  
 Title: CERTIFICADO DE ANÁLISE E ETIQUETA

Version 4,0 Effective

## Certificado de Análise e Etiqueta

Padrão Secundário: Ácido Valpróico

Nº PS 010/10

DADOS TÉCNICOS	
Lote do Padrão Utilizado	MOG249
Procedência	USP
Nome Técnico	Valproic Acid
Fórmula Molecular	C8H16O2
Categoria Farmacêutica	Anti-convulsivo

DADOS DA RECEPÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA			
Data da Recepção da matéria-prima	25/03/2010	Número de Análise	87056FI
Fornecedor	ABBOTT	Lote do Fornecedor	4011153528

CERTIFICADO DO FORNECEDOR			
Teor (Anidro): 100.0%	Umidade: N/A	Validade: 10/03/2012	Data de Fabricação: 30/03/2009

DADOS DE PADRONIZAÇÃO			
Teor (Tal qual)	99.99%	Umidade (K.F.) (%)	0,18
Data da Padronização	10/07/2010	Quantidade Padronizada	30g
Data de Reanálise	NA	Data de Expiração de Validade	10/01/2011

Condições de Armazenamento	Manter em frasco âmbar bem fechado em dessecador.
Perigo	NA
Outros Testes	NA
Observações	NA

## ANEXO 1 – Certificado de Análise do Padrão Secundário nº PS 010/10.

Abbott - Global Pharmaceutical Operations

Documents ID: PO-713-125 F001


Version 4,0 Effective

Documents Type: Non-Rendered Form

Title: CERTIFICADO DE ANÁLISE E ETIQUETA

Segundo os testes realizados no Abbott Ltda., de acordo com o PO de Preparação de Padrões, e em conformidade com o método de análise desta matéria-prima, comprovamos que a mesma pode ser usada como padrão secundário (de trabalho) a partir da data de padronização.

Data	12/04/10	Data	12/07/10
Analistas	Denise Gomes	Coordenador	plance

PADRÃO SECUNDÁRIO Nº PS 010-10 Ácido Valpróico		 ABBOTT
Cód: 10002216 Teor: 99,99% (Tal Qual) Padronização: 10/07/2010 Secagem: Não seque antes do uso. Armazenamento: Manter em frasco âmbar bem fechado em dessecadores. PERIGO: N/A	Umidade: 0,18% Validade: 10/01/2011 Quantidade: 30g	
"Uso Laboratorial"		