



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

BRENDA GAIDZINSKI ALEXANDRE GREGÓRIO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DOSEAMENTO DE POTÁSSIO EM UM FÁRMACO POR ELETRODO DE
ÍON SELETIVO (ISE)**

Tubarão

2020



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

BRENDA GAIDZINSKI ALEXANDRE GREGÓRIO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DOSEAMENTO DE POTÁSSIO EM UM FÁRMACO POR ELETRODO DE
ÍON SELETIVO (ISE)**

Relatório Técnico/Científico apresentado ao Curso de Engenharia Química da Universidade do Sul de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Prof.Msc. Alessandro de Oliveira Lima

Tubarão

2020

BRENDA GAIDZINSKI ALEXANDRE GREGÓRIO

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA
DOSEAMENTO DE POTÁSSIO EM UM FÁRMACO POR ELETRODO DE
ÍON SELETIVO (ISE)**

Relatório de Estágio Obrigatório apresentado
ao Curso de Engenharia Química da
Universidade do Sul de Santa Catarina como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Tubarão, 02 de dezembro 2020.

Professor e orientador Alessandro de Oliveira Limas, Ms.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Cesar Renato Alves da Rosa, Ms.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Jair Juarez João, Dr.
Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof. Suzana Cimara Batista, Dra.
Universidade do Sul de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a mim, meus familiares, amigos e a todos que estiveram me dando apoio durante a minha caminhada até aqui.

RESUMO

Com o crescimento do ramo farmacêutico, torna-se crescente demanda de lançamentos de novos produtos na linha fármaco, se vê necessário, então, uma pesquisa para o desenvolvimento de metodologias analíticas que sejam capazes de atender a demanda de análise dos princípios ativo dos mesmos. Consequentemente, a fim de garantir a segurança e a confiabilidade de análises e resultados para que se torne possível a implantação das metodologias no sistema, realiza-se a validação analítica. A validação analítica é o conjunto de parâmetros, nos quais os ensaios devem ser submetidos, que é regulamento pelos órgãos responsáveis. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia analítica de doseamento de potássio para um produto farmacêutico por eletrodo de íon seletivo. Desenvolveu-se, portanto, uma alternativa de análise de doseamento através da potenciometria com eletrodo de íon seletivo (ISE). A mesma foi avaliada de acordo com os parâmetros estabelecidos de validação. A análise dos resultados obtidos a partir do método desenvolvido e validado fornece dados concisos e pode ser considerado como método indicativo de estabilidade farmacêutica. A Robustez demonstrou que o método responde de forma adequada às alterações submetidas e atende o teor estabelecido. Os limites de precisão foram adequados e atendeu ao sistema dentro de intervalos estatísticos estipulados considerando a faixa de estudo empregada e atendem as especificações de DPR. A recuperação média da exatidão foi de 99,5% atendendo nível esperado. Comprova-se, desta forma, a adequabilidade do método desenvolvido para a análise e quantificação do teor de Potássio no fármaco analisado, atendendo as RDC nº 166/2017 e o DOQ CGCRE 008 de 04/2020 (INMETRO).

Palavras-chave: Validação de método. Íon seletivo. Fármaco.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama de um eletrodo de membrana líquida para Ca^{2+}	18
Figura 2 – Medidor de bancada	19
Figura 3 – Eletrodo íon-seletivo K^{+}	20
Figura 3 – Gráfico da curva de calibração	33

.LISTA DE TABELAS.

Tabela 1 – Pontos da curva de calibração do eletrodo.....	21
Tabela 2 – Fator de diluição em cada ponto	22
Tabela 3 – Preparo das amostras da linearidade	25
Tabela 4 – Fator de diluição em cada ponto	29
Tabela 5 – Resultado das leituras com adição do placebo.....	30
Tabela 8 – Resultados para o ponto 80% da Linearidade.....	31
Tabela 9 – Resultados para o ponto 90% da Linearidade.....	31
Tabela 10 – Resultados para o ponto 100% da Linearidade.....	31
Tabela 11 – Resultados para o ponto 110% da Linearidade.....	32
Tabela 12 – Resultados para o ponto 120% da Linearidade.....	32
Tabela 13 – Resumo geral dos resultados da precisão.....	34
Tabela 14 – Análise de teste-t.....	35
Tabela 15 – Análise de teste F	35
Tabela 16 – Resumo ANOVA	36
Tabela 17 – Análise de ANOVA	36
Tabela 18 – Teor de recuperação de Potássio no ponto 80%	37
Tabela 19 – Teor de recuperação de Potássio no ponto 100%	37
Tabela 20 – Teor de recuperação de Potássio no ponto 120%	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	JUSTIFICATIVA E PROBLEMA	8
1.2	OBJETIVOS	9
1.2.1	Objetivo Geral	9
1.2.2	Objetivos Específicos	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1	LEGISLAÇÃO.....	10
2.2	GESTÃO DA QUALIDADE.....	10
2.3	BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO.....	11
2.4	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	11
2.5	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO.....	12
2.5.1	Seletividade.....	12
2.5.2	Linearidade.....	12
2.5.3	Efeito Matriz.....	13
2.5.3.1	Faixa de trabalho	13
2.5.4	Precisão	14
2.5.4.1	Repetibilidade	14
2.5.4.2	Intermediária	14
2.5.4.3	Equação para cálculo do DPR.....	14
2.5.5	Exatidão	15
2.5.5.1	Equações para cálculo	15
2.5.6	Limite de Detecção	16
2.5.7	Limite de Quantificação	16
2.5.8	Robustez.....	17
2.6	POTENCIOMETRIA POR ELETRODO DE ION SELETIVO	17
3	MÉTODOS	19
3.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES	20
3.1.1	Preparo do tampão de força iônica (TISAB).....	20
3.1.2	Solução padrão 0,1 M (1000 ppm).....	20
3.1.3	Solução amostra	21
3.1.4	Check do eletrodo (System Suitability).....	21
3.2	CURVA DE CALIBRAÇÃO	21

3.2.1 Equação para o cálculo da concentração da curva de calibração	22
3.3 CONDIÇÕES DE LEITURA	22
3.3.1 Equação para cálculo do princípio ativo.....	22
3.3.2 System Suitability.....	23
3.3.3 Parâmetros de leitura	23
3.4 ROBUSTEZ.....	24
3.4.1 Análise da robustez em parâmetros individuais:	24
3.4.1.1 Alteração do tempo de leitura	24
3.4.1.2 Alteração das quantidades de tampão adicionado.....	24
3.4.1.3 Alteração da temperatura da amostra.....	24
3.5 SELETIVIDADE	24
3.6 LINEARIDADE.....	24
3.6.1 Preparo das amostras para linearidade	25
3.6.1.1 Critérios de aceitação da Linearidade	25
3.7 PRECISÃO	26
3.7.1 Repetibilidade.....	26
3.7.2 Precisão Intermediária	26
3.7.3 Critério de aceitação da Precisão.....	26
3.8 EXATIDÃO	27
3.8.1 Procedimento de preparo das amostras	27
3.8.2 Critério de aceitação para Exatidão.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
4.1 ROBUSTEZ.....	29
4.2 SELETIVIDADE.....	30
4.2.1 Comparação das leituras	30
4.3 LINEARIDADE.....	30
4.3.1 Análise visual	32
4.4 PRECISÃO	34
4.4.1 Tratamento estatístico	34
4.4.1.1 Teste t.....	35
4.4.1.2 Teste F.....	35
4.4.1.3 Anova.....	36
4.5 EXATIDÃO	36
4.5.1 Concentrações teóricas de 80, 100 e 120%.....	36

4.5.2 Resultados obtidos.....	37
5 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICES	42
APÊNDICE A – <i>SYSTEM SUITABILITY</i> DOS PARÂMETROS	43
APÊNDICE B – PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO DOS PARÂMETROS	44
APÊNDICE C – PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DE PADRÃO PARA DOS PARÂMETROS.....	45
APÊNDICE D – RESULTADOS DAS LEITURAS DA ROBUSTEZ	46
APÊNDICE E – RESULTADOS DAS LEITURAS DA PRECISÃO.....	47
APÊNDICE F – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA LINEARIDADE	48
APÊNDICE G – FATOR DE DILUIÇÃO PARA CÁLCULOS DA LINEARIDADE....	49
APÊNDICE H – ANÁLISE DOS RESÍDUOS.....	50
APÊNDICE I – GRÁFICO DE RESÍDUO	51
APÊNDICE J – TESTE DE NORMALIDADE – SHAPIRO WILK	52
ANEXOS	53
ANEXO I – FÓRMULA PARA O CÁLCULO DA RECUPERAÇÃO DA EXATIDÃO	54
ANEXO II – CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA PRECISÃO.....	55
ANEXO III – CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA RECUPERAÇÃO.....	56
ANEXO IV – CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA HORRAT	57

1 INTRODUÇÃO

A origem das atividades relacionadas à área farmacêutica iniciara-se por volta do século X onde os pontos de venda de medicamentos, conhecidas hoje como farmácias eram chamadas de boticas. Na época, houve grande propagação da doença hanseníase, popularmente conhecida como lepra, onde número de farmácias na França se multiplicou.

Os medicamentos podem ter finalidade de uso esporádico como aliviar a dor ou tratamentos como antibióticos, suplementos vitamínicos, entre outros. Com isso o estudo de medicamentos ganhou impulso notável, com a pesquisa sistemática dos princípios ativos das plantas e minerais capazes de curar doenças. Com o tempo, foi implantada no mundo a indústria farmacêutica, e, com ela, novos medicamentos são criados e estudos realizados para a segurança e eficácia do uso dos fármacos.

Alguns medicamentos utilizam eletrólitos como princípio ativo e são amplamente usados para manter a hidratação corporal de forma a auxiliar o balanço hidroeletrolítico do organismo. Os eletrólitos, elementos traço ou ultratraços, são minerais e elementos em pequenas concentrações requeridos para processos biológicos. A principal atuação desses elementos é na regulação do metabolismo enzimático mantendo o equilíbrio acidobásico e regulando a pressão osmótica (HAFEZ et al., 2009).

O potássio é essencial para o metabolismo celular durante a síntese de proteínas e de glicogênio, sendo o maior cátion intracelular participando da estrutura muscular cardíaca (HAFEZ et al., 2009). De acordo com a instrução normativa nº 28 de 26 de julho de 2018, da Agência Nacional de Saúde, ANVISA, estipula que o teor de potássio em suplementos líquidos compostos de carboidratos e eletrólitos não ultrapasse 700 mg por litro.

O doseamento de potássio em produtos farmacêuticos pode ser feito de diversas maneiras, uma delas realizada a através do uso de um eletrodo de íon seletivo, o qual possui uma membrana seletiva e um voltímetro de leitura capaz de atuar de maneira rápida e seletiva de vários cátions e ânions através de medida potenciométrica direta (SILVA, 2011).

Após o desenvolvimento de uma metodologia analítica, com o intuito de assegurar a eficácia e confiabilidade dos resultados do método em questão, as análises passam por uma avaliação fundamentada de acordo com os parâmetros de validação analítica.

Uma validação analítica compreende em avaliar por meio de parâmetros, previamente estabelecida pela ANVISA, como: seletividade, linearidade, efeito matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez.

Nesse contexto, o presente trabalho pretende analisar e validar de acordo com os órgãos reguladores, o desenvolvimento de uma metodologia para doseamento do eletrólito de potássio por meio do eletrodo de íon seletivo.

1.1 JUSTIFICATIVA E PROBLEMA

A ANVISA (Agência Nacional de Saúde) é o órgão responsável por estabelecer os pré-requisitos mínimos necessários para a validação da comprovação da qualidade através da RDC 166 de 24 de julho de 2017 e, da quantidade dos princípios ativos em medicamentos, bem como fiscalizar as boas práticas de fabricação, pela RDC 301 de 21 de agosto de 2019.

Os novos produtos são desenvolvidos pelo setor de P&D (pesquisa e desenvolvimento) que busca todas as informações necessárias, desde construção da fórmula até a sua posologia. Posteriormente, são desenvolvidos métodos analíticos para capazes de identificar e quantificar os princípios ativos presente no fármaco, gerando a implementação na rotina do controle de qualidade através da validação analítica do método.

Com o intuito de aumentar seu portfólio de produtos a empresa A que atualmente é uma indústria farmacêutica de medicamentos e suplementos considerados de baixo risco no sul de Santa Catarina.

O principal objetivo é lançar um novo medicamento com uma composição destinado à prevenção da desidratação ou para manutenção da hidratação e que potássio atua como um dos princípios ativos.

Em virtude do lançamento, a empresa em questão, precisa avaliar quais métodos analíticos utilizar para cumprir todas as exigências impostas pela legislação para a entrada desse produto no mercado.

Diante do exposto, **propõe-se o desenvolvimento de um método analítico para dosear o princípio ativo de potássio em um novo produto, segundo os órgãos regulamentadores, para aplicação numa indústria farmacêutica no Sul de Santa Catarina.**

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia analítica de doseamento de potássio para um produto farmacêutico por eletrodo de íon seletivo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar se o parâmetro da Robustez atende a especificação de teor estabelecida;
- b) Tratar estatisticamente a Linearidade e verificar se atende o estabelecido;
- c) Analisar estatisticamente e verificar se os limites calculados na Precisão atendem as especificações de DPR e teor;
- d) Verificar se a recuperação da exatidão obteve o nível dentro do esperado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LEGISLAÇÃO

A base estrutural e funcional das empresas é regida pela legislação, ela direciona desde a produção, análise e até a comercialização dos produtos oferecidos.

Dentro da indústria farmacêutica as operações são regidas por resoluções em vigência, publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS), que vai desde boas práticas de fabricação (BPF), regulamentada pela RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019, requisitos de validação para métodos analíticos pela RDC nº 166 de 24 de julho de 2017.

Outras legislações de apoio são RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015, a qual estabelece parâmetros para notificação, qualificação e identificação de produtos de degradação advindos das formulações farmacêuticas, RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, a qual dispõe sobre o registro e a notificação de produtos com base fitoterápica, grande aposta das indústrias farmacêutica.

2.2 GESTÃO DA QUALIDADE

A gestão de qualidade tem como principal objetivo melhorar a eficiência dos serviços, visa a eficiência das etapas de produção.

Segundo a seção III da RDC nº 63 de 25 de novembro de 2011:

Art. 4º Para efeito deste Regulamento Técnico são adotadas as seguintes definições:
I – Garantia da qualidade: totalidade das ações sistemáticas necessárias para garantir que os serviços prestados estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, para os fins a que se propõem. (RDC Nº 63/11).

Como elemento da garantia de gestão da qualidade, as boas práticas de fabricação (BPF), se tornam chave para que os serviços prestados estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos.

2.3 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

Regida pela RDC nº 301 de 21 de agosto de 2019, a qual preconiza as ações corretivas e preventivas com o intuito de evitar desvios nas conformidades.

As boas práticas de fabricação (BPF), são o conjunto de boas práticas por meio de condutas e diretrizes nas quais os profissionais da indústria farmacêutica devem seguir para evitar contaminações dos produtos que serão destinados ao uso humano.

De acordo com o capítulo I da RDC nº 301:

“LV - Validação: ação de provar, de acordo com os princípios das Boas Práticas de Fabricação, que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva aos resultados esperados. (RDC Nº 301/19).”

Art. 8º Um Sistema da Qualidade Farmacêutica adequado à fabricação de medicamentos deve garantir que:

I - A concepção do produto seja alcançada por meio do projeto, planejamento, implementação, manutenção e melhoria contínua de um sistema que permita a fabricação consistente de produtos com atributos de qualidade apropriado. (RDC Nº 301/19).

As definições de BPF, de acordo com a seção II da RDC nº 301:

Art. 12. Boas Práticas de Fabricação (BPF) é a parte do Gerenciamento da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados, de acordo com os padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro sanitário, da Autorização para uso em ensaio clínico ou especificações do produto. (RDC Nº 301/19).

2.4 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação analítica visa determinar a adequação de uma análise em fornecer a informação esperada, dando autenticidade e segurança ao método. (SKOOG et al, 2008, p. 202).

O método será validado por meio de estudos realizados de maneira sistemática, atendendo às normas e resoluções de órgãos fiscalizadores nacionais e internacionais como: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), de obras de referência como a *United States Pharmacopeia* (USP), *Ph.Eur.* - *European Pharmacopeia* – EP e etc. (VALDERRAMA et al, 2009).

No Brasil, apenas a ANVISA e o INMETRO regulamentam as validações de métodos analíticos.

De acordo com RIBEIRO et al., 2008:

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação. (RIBEIRO et al., 2008).

O método em estudo destina-se a determinação quantitativa de princípio ativo em forma farmacêutica. Conforme Programa de Validação Analítica baseado na RDC 166 de 24 de julho de 2017, serão apresentados os resultados atribuídos a todo o processo de Validação Analítica, onde foram avaliados os parâmetros de Seletividade, Linearidade, Precisão, Exatidão e a Robustez, que hoje é considerada um parâmetro de desenvolvimento.

2.5 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

2.5.1 Seletividade

Na análise de Seletividade, será avaliada a capacidade que o método possui em quantificar a substância química de interesse analítico frente a uma solução de padrão, de amostra e uma da amostra contaminada por matérias-primas ou excipientes, provando ser capaz de detectar somente o ativo e não as demais substâncias presentes em sua composição.

2.5.2 Linearidade

De acordo com o artigo 23 da seção II da RDC supracitada acima, neste parâmetro é avaliada a capacidade que o método possui em produzir respostas analíticas proporcionais à concentração de analítico presente no meio. É utilizado em testes de impurezas para ensaios quantitativos e no doseamento, a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação acima de 0,990 e o INMETRO um valor de R acima de 0,90.

De acordo com o Art. 25 da seção III da RDC nº 166, “Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da SQR para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata.”

2.5.3 Efeito Matriz

Parâmetro no qual se avalia a influência dos compostos da matriz vegetal na resposta analítica do método, estando ligado aos ensaios determinados no parâmetro de Seletividade.

De acordo com o Art. 29 da seção III da RDC nº 166:

“O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito”.(RDC Nº 166/17).

2.5.3.1 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho corresponde a uma concentração ou intervalo com o qual se pode construir a curva analítica através da linearidade (VALDERRAMA et al, 2009).

Na seção IV da RDC nº 166:

Art. 31 A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida. Art. 32 Devem ser consideradas as seguintes faixas de trabalho: I.- para teor: de 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento); (RDC Nº 166/17).

O uso deste parâmetro é indispensável apenas para determinação de impurezas de produtos de degradação, determinação essa na qual é regulamentada pela resolução nº 53 de 4 de dezembro de 2015.

2.5.4 Precisão

Este parâmetro avalia a proximidade entre os resultados obtidos por ensaios preparados conforme a metodologia desenvolvida a ser validada.

O artigo 35 da seção V da RDC nº 166:

A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula "DPR= (DP/CMD) X 100", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. (RDC Nº 166/17).

2.5.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade é parametrizada pela avaliação de seis determinações na faixa de 100 % da concentração, realizadas por um mesmo analista, sob as mesmas condições de execução da validação analítica.

2.5.4.2 Intermediária

A precisão intermediária é avaliada pela concordância entre os resultados obtidos para amostras preparadas por outro analista, em dias diferentes e sob as mesmas condições operacionais utilizadas na execução dos ensaios.

2.5.4.3 Equação para cálculo do DPR

Segundo a RDC nº 166/17, o desvio padrão relativo (DPR) pode ser obtido a partir da equação 1, tendo seu limite estabelecido pelo Anexo II:

$$DPR (\%) = \frac{DP}{CMD} * 100 \text{ (eq. 1)}$$

Sendo:

- DP = desvio padrão;
- CMD = concentração média determinada;

2.5.5 Exatidão

A exatidão será avaliada se a presença de outros compostos presentes na composição da matriz vegetal pode alterar ou influenciar a resposta analítica da substância de interesse. Além disso, o ensaio de exatidão leva em conta a capacidade de recuperação do princípio ativo pelo processo extrativo empregado.

Para avaliar o ensaio de exatidão de um determinado método, (VALDERRAMA et al, 2009) cita os seguintes: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição de padrão. Nesta metodologia será abordado o ensaio de adição de um padrão referência a fim de medir o grau de recuperação.

O procedimento de recuperação em fitoterápicos é realizado transferindo alíquotas da preparação amostra, equivalente à metade da massa de preparação do extrato descrito no método, seguido da alíquota de uma solução estoque de padrão de potássio total equivalente às concentrações de 80, 100 e 120% da concentração geral.

Em produtos que não possuem matriz vegetal, é transferido uma alíquota cheia do placebo do produto no lugar da amostra e a adição do padrão deve ser equivalente às concentrações de 80, 100 e 120% da concentração geral.

A recuperação do método é obtida através da fórmula exposta no Anexo I do presente trabalho e seu intervalo de aceitação é baseado no Anexo III.

2.5.5.1 Equações para cálculo

De acordo com DOQ- CGCRE-008 de 04/2020 rev. 08 do INMETRO:

- O desvio padrão relativo (DPR) pela equação de Horwitz pode ser obtido a partir da equação 2:

$$DPRr (\%) = 2^{(1-0,5*\log(C))} \text{ (eq. 2)}$$

Onde C a concentração teórica do analito de interesse.

- O critério de aceitação de Horwitz pode ser obtido a partir da junção de HorRat, equação 3:

$$PDPRr (\%) = \frac{DPRr \text{ do estudo}}{DPRr \text{ previsto da equação de Horwitz}} \quad (eq. 3)$$

Onde o limite é baseado na tabela do Anexo IV.

2.5.6 Limite de Detecção

No caso de metodologias que fazem uso de uma curva analítica, o limite de detecção (LD), pode ser definido como a concentração analítica que gera um a resposta a um certo fator de confiança bem superior ao desvio padrão (DP) do ensaio do branco (SKOOG et al, 2008, p. 200).

O artigo 35 da seção V da RDC nº 166:

“Art. 49 Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas”. (RDC Nº 166/17).

2.5.7 Limite de Quantificação

O parâmetro analisa a menor quantidade possível da substância de interesse, na qual seja capaz de ser quantificada pelo método, através de um nível de incerteza máxima de 10% (VALDERRAMA et al, 2009).

Assim como o limite de detecção, o limite de quantificação (LQ), pode ser avaliado para métodos visuais, sinal – ruído e em métodos com parâmetros de curva analítica (RIBEIRO et al., 2008).

Os ensaios em diferentes métodos podem ser orientados pela seção VIII da RDC 166/17:

“Art. 57 Para a determinação deste parâmetro deve ser seguido o mesmo procedimento descrito no art. 53, sendo que a razão sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1”. (RDC Nº 166/17).

“Art. 58 Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de quantificação pode ser calculado pela fórmula 3 do anexo II”. (RDC Nº 166/17).

“Art. 59 Nos casos em que um valor estimado para o limite de quantificação é obtido por cálculo ou extrapolação, essa estimativa deve ser confirmada conforme art. 57”. (RDC Nº 166/17).

“Art. 60 Devem ser testadas precisão e exatidão nas concentrações correspondentes ao limite de quantificação”. (RDC Nº 166/17).

2.5.8 Robustez

Segundo Artigo 61 da RDC 166/17:

“A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas”. (RDC Nº 166/17).

Assim, a robustez de um método analítico avalia a capacidade do mesmo em reproduzir os resultados analíticos mesmo que pequenas variações sejam aplicadas de forma controladas e intencionais previstas e programadas pelo analista conforme a perícia do mesmo.

Ainda conforme a mesma RDC, segundo o Anexo III e conforme orientações para avaliação para robustez de métodos os quais utilizem outras técnicas analíticas, neste caso a potenciometria, as variações a serem testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados.

2.6 POTENCIOMETRIA POR ELETRODO DE ION SELETIVO

A potenciometria é a prática metodológica na qual o potencial das células eletroquímicas, é medida sem consumo de corrente (SKOOG et al, 2008, p. 553). É amplamente utilizada para verificação do ponto final em titulações e em leituras diretas.

Os eletrodos de íon seletivo (ISE), são eletrodos compostos por sensores analíticos capazes de detectar as variações na concentração de um analito, podendo ser de vidro, de membrana ou baseados em transistores de efeito de campo seletivos a íons (SKOOG et al, 2008, p. 558).

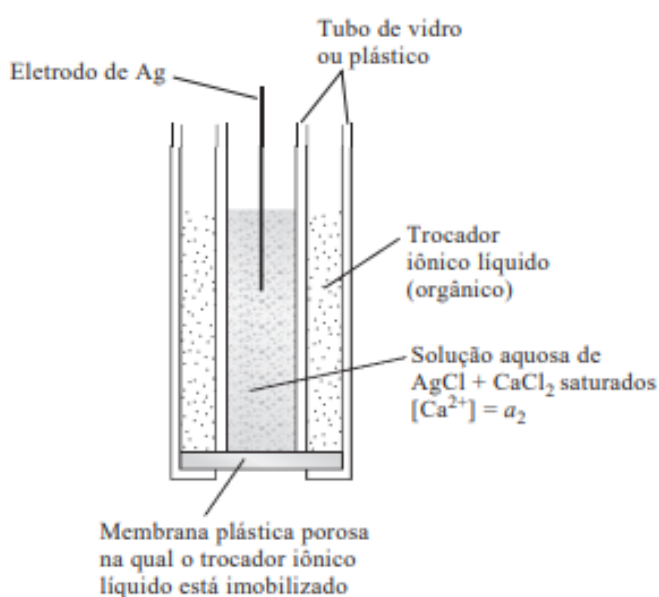
O funcionamento desse tipo de eletrodo ocorre através da formação de diferentes potenciais pela membrana semipermeável, capaz de obter rapidamente as concentrações dos

íons de interesse de forma direta, sendo livres de quaisquer inferências da solução (SILVA et al, 2003, p 04).

Os eletrodos de membrana podem ser de membrana cristalina, sendo monocristal ou policristalinos de combinação, ou podem ser de membrana não cristalina, sendo de vidro, líquido, ou líquido imobilizado em polímero.

A Figura 1 apresenta o esquema de um eletrodo de íon seletivo de membrana não cristalina, com trocadores iônicos líquidos, seletivos para cálcio.

Figura 1 – Diagrama de um eletrodo de membrana líquida para Ca^{2+}



Fonte: SKOOG et al, 2008, p. 568

3 MÉTODOS

A metodologia foi baseada no doseamento de potássio descrito para produto acabado por Potenciometria com Eletrodo de Íon Seletivo (ISE), desenvolvido internamente. O equipamento utilizado foi um medidor de bancada para pH/mV/ISE da HANNA Instruments modelo HI5222-01 com dois canais conforme a Figura 2.

Figura 2 – Medidor de bancada



Fonte: Adaptado Hanna Instruments, 2020.

O eletrodo de íon seletivo ISE utilizado, HI 4014 Potassium half-cell e HI 4114 Potassium combination electrode, conforme exposto na Figura 3.

Figura 3 – Eletrodo íon-seletivo K^+



Fonte: Adaptado Hanna Instruments, 2020.

3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES

3.1.1 Preparo do tampão de força iônica (TISAB)

Pesar 175 g de cloreto de sódio grau reagente e transferir para balão volumétrico de 1000 mL. Dissolver em cerca de 500 mL de água purificada e completar o volume com o mesmo solvente.

3.1.2 Solução padrão 0,1 M (1000 ppm)

Pesar cerca de 190,68 mg de cloreto de potássio padrão (equivalente à 100mg de potássio), transferir para balão volumétrico de 100 mL seguindo de cerca de 50 mL de água purificada. Agitar até completa solubilização e completar o volume com o mesmo solvente.

(Concentração teórica: 1000ppm de potássio).

3.1.3 Solução amostra

Transferir 3,2 mL do produto (equivalente a 2,5 mg de K^+) para balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 1 mL de tampão de força iônica e completar o volume com água purificada.

3.1.4 Check do eletrodo (System Suitability)

Transferir 100 mL de água para um béquer seguindo de 10 mL de tampão ISA e manter sob agitação magnética; Configurar o medidor para leitura em mV e posicionar o eletrodo dentro da solução. Adicionar 1 mL da solução padrão 0,1 M (1000ppm) (item 3.1.2), aguardar 3 minutos para estabilização e anotar o valor em mV. Adicionar outros 10 mL da solução padrão 0,1 M (1000ppm), aguardar 3 minutos para estabilização e anotar os valores em mV.

3.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração antes da execução das leituras é uma forma de verificar a precisão do eletrodo. É adicionado uma alíquota do padrão em um balão volumétrico de 25 mL com o intuito de atingir diferentes concentrações em ppm de maneira linear a partir do ponto central de concentração do ativo em 100%.

Os respectivos pontos da curva e suas alíquotas e concentração constam na Tabela 1

Tabela 1 – Pontos da curva de calibração do eletrodo

Ponto	Alíquota Do Padrão (mL)	Diluição (mL) *	Concentração Final (ppm)
1	0,25	25	10
2	0,75	25	30
3	1,25	25	50
4	2,00	25	80
5	2,50	25	100

Fonte: Da Autora, 2020.

*Em cada um dos balões, adicionar 0,5 mL de tampão de força iônica (TISAB) e completar o volume com água purificada.

3.2.1 Equação para o cálculo da concentração da curva de calibração

As amostras serão quantificadas a partir da equação 1:

$$[\log] = \log(\text{massa do padrão} \times 0,5245 \times \text{pureza} \times fd \times 1000) \text{ (Eq. 1)}$$

Sendo o fd o fator de diluição da concentração, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Fator de diluição em cada ponto

Ponto	Fator de diluição (FD)
10	0,0001
30	0,0003
50	0,0005
80	0,0008
100	0,0010

Fonte: Da Autora, 2020

3.3 CONDIÇÕES DE LEITURA

Ao realizar as leituras da solução amostra e da curva de calibração, aguardar 3 min e anotar o valor do mV encontrado.

A especificação, conforme FNFB (2012, p.34), estabelece que os produtos farmacêuticos devem conter de 90% a 110% do princípio ativo declarado no rótulo de suas apresentações.

3.3.1 Equação para cálculo do princípio ativo

As amostras da precisão serão quantificadas a partir da equação 2:

$$[\log] = \log * (Pp * 0,5245 * P * FD * 1000) \quad (eq.2)$$

Sendo:

- Pp = peso do padrão de cloreto de potássio em mg;
- 0,5245 = fator de equivalência potássio elementar;
- P = pureza do padrão de cloreto de potássio, em mg;
- FD = fator de diluição, valor correspondente ao ponto da curva de calibração (Tabela 2).
- 1000 = fator de conversão, em ppm.

O teor de potássio pode ser obtido a partir da equação 3:

$$Potássio(\%) = 10^{\left(\frac{l-b}{a}\right)} * \frac{1}{50} * 100 \quad (eq.3)$$

Sendo:

- l = leitura da amostra, em mV;
- a = coeficiente angular, extraído do gráfico curva de calibração; b = coeficiente linear da curva de calibração;
- 50 = concentração teórica da amostra, em ppm;

3.3.2 System Suitability

É possível verificar a exatidão do eletrodo, realizando a leitura da solução descrita em *check do eletrodo*.

3.3.3 Parâmetros de leitura

O critério de aceitação desenvolvido internamente é de que a diferença de potencial

dos valores encontrados deve exceder 40 mV.

3.4 ROBUSTEZ

3.4.1 Análise da robustez em parâmetros individuais:

3.4.1.1 Alteração do tempo de leitura

O preparo das soluções amostra nas condições padrão de ensaio definidas em *Solução amostra*, serão realizados variando o tempo de leitura da amostra de 3 min para 1,5 e 4,5 min.

3.4.1.2 Alteração das quantidades de tampão adicionado

O preparo da solução amostra será realizado conforme descrito em *Solução amostra*, variando as quantidades de solução tampão adicionadas de 1 mL para 0,5 mL e 1,5 mL.

3.4.1.3 Alteração da temperatura da amostra

O preparo da solução amostra será realizado conforme descrito em *Solução amostra*, variando a temperatura de ambiente para gelado e quente.

3.5 SELETIVIDADE

Será realizada uma análise por meio da leitura do placebo, produto e padrão.

A especificação adotada é de que o placebo não poderá apresentar variação de potencial significativa quando adicionado, os diferenciais do produto e padrão devem ser similares.

3.6 LINEARIDADE

No preparo da solução amostra pipetou-se 3,2 mL do produto, o equivalente a 2,5 mg de potássio, para um balão volumétrico de 50 mL, em seguida adicionou-se 1 mL de tampão e completou o volume com água purificada. A especificação da análise de teor segue a descrita no item 3.3.

Levando em consideração o teor da especificação e as diluições da solução amostra, a concentração 100 % é de 0,05 mg/mL de potássio

3.6.1 Preparo das amostras para linearidade

As amostras para linearidade deverão ser preparadas cinco concentrações diferentes utilizando a solução padrão como concentração no ponto 100%. As amostras foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, os quais deverão ser diluídas em água e adicionados 0,5 mL de tampão, conforme descrição do preparo no da amostra.

As concentrações foram calculadas através da equação 1 do item 3.2.1, e as finais das amostras da linearidade constam na Tabela 3

Tabela 3 – Preparo das amostras da linearidade

Ponto (%)	Concentração final da solução (mg/mL)*
40	0,040
45	0,045
50	0,050
55	0,055
60	0,060

Fonte: Da Autora, 2020

3.6.1.1 Critérios de aceitação da Linearidade

- Decisão entre MMQO ou MMQP - Dados homocedásticos – utilização do (MMQO). Dados heterocedásticos – utilização de MMQP. Recomendação de utilização MMQO (Teste de Cochran).
- Equação da reta com inclusão dos erros experimentais nos coeficientes.
- Coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990.
- Avaliação do coeficiente linear (Teste t) – coeficiente linear não seja estatisticamente diferente de zero (reta da regressão passa pelo centroide).
- O coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero.
- Análise da normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos (modelo matemático de Shapiro e Wilk).

3.7 PRECISÃO

Na precisão, é realizada uma análise em que se mede o nível de dispersão dos resultados analíticos obtidos em diferentes dias e por diferentes analistas.

A partir do teste será avaliada a confiabilidade dos resultados das análises quando o procedimento é executado por outros analistas durante a rotina laboratorial.

3.7.1 Repetibilidade

A repetibilidade será parametrizada pela avaliação de seis determinações na faixa de 100 % da concentração, realizadas por um mesmo analista, sob as mesmas condições de execução da validação analítica.

3.7.2 Precisão Intermediária

A precisão intermediária será avaliada pela concordância entre os resultados obtidos para amostras preparadas por outro analista, em dias diferentes e sob as mesmas condições operacionais utilizadas na execução dos ensaios.

3.7.3 Critério de aceitação da Precisão

Conforme descrito da RDC 166 de 24 de julho de 2017, artigo 39, o critério de aceitação para o nível de variação entre as réplicas do parâmetro de precisão será estabelecido sobre a concentração do princípio ativo no produto.

Como forma de avaliar os resultados obtidos, serão feitas análises com 95% de confiança e $DPR\% \leq 3,7\%*$ nas seguintes comparações:

- Entre resultados da Repetibilidade (média de cada leitura e entre a média das médias);
- Entre resultados da Precisão Intermediária (média de cada leitura e entre a média das médias);

- Comparação dos resultados obtidos entre analistas;
- Aplicação de teste t e teste F para avaliação da variação.
- Variabilidade dos resultados em função do dia de análise tratando os dados em conjunto e por analista.

O parâmetro de precisão será dado como aprovado após o atendimento de todos os requisitos especificados.

* Como a concentração de potássio na amostra representa 0,05%, o coeficiente de variação, ou desvio padrão relativo, será especificado segundo o DOQ- CGCRE-008 de 04/2020 rev. 08 do INMETRO para concentração 0,1%, conforme Anexo II:

3.8 EXATIDÃO

O procedimento será realizado transferindo alíquotas do placebo da amostra, seguido da alíquota de uma solução estoque de padrão de Potássio equivalente às concentrações de 80, 100 e 120% da concentração descrita.

3.8.1 Procedimento de preparo das amostras

Adicionar 3,2 mL de placebo do produto, seguido de uma alíquota da solução estoque de padrão de Potássio* em um balão volumétrico de 50 mL, adicionar 1 mL de tampão de força iônica. Realizar a leitura e após 3 minutos anotar o mV.

*A alíquota das soluções estoque de padrão de potássio deverá ser equivalente à quantidade necessária para que a solução final, após o processo de extração, apresente uma concentração teórica equivalente aos pontos 80%, 100% e 120% da curva de calibração determinada no parâmetro de linearidade.

3.8.2 Critério de aceitação para Exatidão

As amostras deverão cumprir a especificação de recuperação da faixa de 95 – 105% , para 0,1% do analito, conforme o DOQ-CGCRE-008 de 04/2020 rev. 08 do INMETRO descrito no Anexo III.

O critério de aceitação para o desvio padrão relativo da exatidão, deve ser calculado pela equação 6 do item 2.5.5.1 e obedecer o limite exposto no Anexo IV para 100%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ROBUSTEZ

A condição padrão se refere a uma amostra preparada conforme descrito no protocolo. A concentração obtida será o referencial para o 100% da leitura se o ensaio for realizado conforme o método sem alterações. Os desvios em relação a esta concentração serão calculados em cima dos valores da amostra analisada com condição referencial.

O resultado de cada leitura e o *system suitability* do parâmetro é disposto nos Apêndices D e A, respectivamente.

O resumo dos resultados dos ensaios segue abaixo:

Tabela 4 – Fator de diluição em cada ponto	
Alteração	Teor (%)
Análise condições normais	106,465
Tempo de leitura de 1,5 minutos	106,465
Tempo de leitura de 4,5 minutos	106,892
Volume de tampão 0,5 mL	101,071
Volume de tampão 1,5 mL	109,707
Temperatura da amostra para quente	90,543
Temperatura da amostra para frio	107,320

Fonte: Da Autora, 2020

De acordo com os resultados obtidos e descrito ao longo deste capítulo, pode-se observar a resistência que o método proposto tem ao ser perturbado em relação a sua condição ideal. Considerando o valor apontado no relatório do fornecedor da matéria prima o qual mostra o teor como sendo de 90 a 110%, os resultados atendem a especificação de variação máxima do teor do ativo medido dentro da faixa de aceitação de $\pm 5\%$ em relação à condição padrão.

Com relação às leituras, era de se esperar que as mesmas variassem condição a qual foi confirmada. Porém, embora haja esta oscilação, não ocorreram problemas.

Com isto, pode-se concluir que a robustez ensaiada demonstra que o método responde de forma adequada às alterações provocadas na condição padronizada de ensaio.

4.2 SELETIVIDADE

Foi executada uma leitura avaliando a resposta do eletrodo, coletando os diferenciais potenciométricos: Placebo, Amostra e o padrão de potássio 0,05 mg/mL. O critério de aceitação estabelecido para o parâmetro é de que o diferencial potenciométrico seja ≥ 40 mV, para que possa ter algum impacto significativo de teor.

O *system suitability* do parâmetro foi apresentado no Apêndice A.

4.2.1 Comparação das leituras

Tabela 5 – Resultado das leituras com adição do placebo

Adição de placebo				
Alíquota 1 (ml)	Leitura 1 (mv)	Alíquota 2 (ml)	Leitura 2 (mv)	Diferencial (mv)
1	-112,2	10	-114,4	2,2
Adição de produto				
Alíquota 1 (ml)	Leitura 1 (mv)	Alíquota 2 (ml)	Leitura 2 (mv)	Diferencial (mv)
1	-54,8	10	2,8	-57,6
Adição de padrão				
Alíquota 1 (ml)	Leitura 1 (mv)	Alíquota 2 (ml)	Leitura 2 (mv)	Diferencial (mv)
1	-48,7	10	8,6	-57,3

Fonte: Da Autora, 2020

De acordo com os resultados observados, afirma-se que o sinal analítico obtido com a preparação amostra de produto é similar ao padrão de Potássio o qual foi de -57,3 mV.

4.3 LINEARIDADE

A seguir estão apresentados os resultados obtidos para cada condição de ensaio estipulada no protocolo desta validação. A concentração foi calculada pela seguinte equação:

O *system suitability* do parâmetro foi apresentado no Apêndice A.

Tabela 6 – Resultados para o ponto 80% da Linearidade

Ponto 80%			
	1	2	3
Massa pesada do padrão (mg)	190,33	190,36	190,41
Pureza do padrão (mg/mg)	1,001	1,001	1,001
Fator de diluição do ponto (fd)	0,00040	0,00040	0,00040
Equivalência de Potássio	0,5245	0,5245	0,5245
Concentração final (mg/mL)*	1,6017	1,6018	1,6019
Leituras da repetição (mV)			
Leitura 01	-17,500	-17,500	-17,400
Leitura 02	-17,600	-17,700	-17,600
Média	-17,550	-17,600	-17,500

Fonte: Da Autora, 2020

Tabela 7 – Resultados para o ponto 90% da Linearidade

Ponto 90%			
	1	2	3
Massa pesada do padrão (mg)	190,33	190,36	190,41
Pureza do padrão (mg/mg)	1,001	1,001	1,001
Fator de diluição do ponto (fd)	0,00045	0,00045	0,00045
Equivalência de Potássio	0,5245	0,5245	0,5245
Concentração final (mg/mL)*	1,6529	1,6530	1,6531
Leituras da repetição (mV)			
Leitura 01	-14,600	-14,500	-14,700
Leitura 02	-14,800	-14,700	-14,900
Média	-14,700	-14,600	-14,800

Fonte: Da Autora, 2020

Tabela 8 – Resultados para o ponto 100% da Linearidade

Ponto 100%			
	1	2	3
Massa pesada do padrão (mg)	190,33	190,36	190,41
Pureza do padrão (mg/mg)	1,001	1,001	1,001
Fator de diluição do ponto (fd)	0,00050	0,00050	0,00050
Equivalência de Potássio	0,5245	0,5245	0,5245
Concentração final (mg/mL)*	1,6987	1,6987	1,6988
Leituras da repetição (mV)			
Leitura 01	-11,800	-11,900	-12,200
Leitura 02	-12,400	-12,200	-12,300
Média	-12,100	-12,050	-12,250

Fonte: Da Autora, 2020

Tabela 9 – Resultados para o ponto 110% da Linearidade

Ponto 110%			
	1	2	3
Massa pesada do padrão (mg)	190,33	190,36	190,41
Pureza do padrão (mg/mg)	1,001	1,001	1,001
Fator de diluição do ponto (fd)	0,00055	0,00055	0,00055
Equivalência de Potássio	0,5245	0,5245	0,5245
Concentração final (mg/mL)*	1,7400	1,7401	1,7402
Leituras da repetição (mV)			
Leitura 01	-9,900	-9,700	-9,700
Leitura 02	-10,000	-9,900	-9,600
Média	-9,950	-9,800	-9,650

Fonte: Da Autora, 2020.

Tabela 10 – Resultados para o ponto 120% da Linearidade

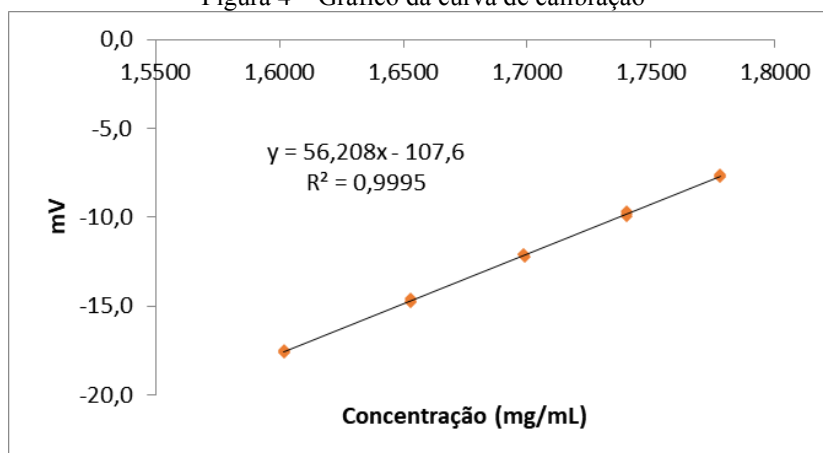
Ponto 120%			
	1	2	3
Massa pesada do padrão (mg)	190,33	190,36	190,41
Pureza do padrão (mg/mg)	1,001	1,001	1,001
Fator de diluição do ponto (fd)	0,00060	0,00060	0,00060
Equivalência de Potássio	0,5245	0,5245	0,5245
Concentração final (mg/mL)*	1,7778	1,7779	1,7780
Leituras da repetição (mV)			
Leitura 01	-7,500	-7,800	-7,600
Leitura 02	-7,800	-7,400	-7,800
Média	-7,650	-7,600	-7,700

Fonte: Da Autora, 2020.

4.3.1 Análise visual

Conforme a Guia 10 da ANVISA de 30 de agosto de 2012, a análise visual do comportamento dos dados deve preceder o uso de qualquer modelo estatístico de forma que permita a constatação da adequação do modelo linear para tratamento dos dados. A Figura 4 apresenta o gráfico demonstrando a relação entre concentração e leituras médias obtidas durante os experimentos para a validação do método de análise adotado.

Figura 4 – Gráfico da curva de calibração



Fonte: Da Autora, 2020.

Logo, a equação da reta obtida é:

$$y = 56,208x - 107,6$$

$$R^2 = 0,9995$$

Pode-se verificar que conforme a concentração do analito se eleva a resposta medida em absorbância se eleva proporcionalmente, dentro da faixa analítica estudada. Esta observação é um indicativo inicial da adequação do modelo linear ao ajuste a ser estudado.

Com base nos resultados obtidos e no tratamento estatístico, exposto no Apêndice F, H, I e J, dado aos resultados dos ensaios se podem chegar as seguintes conclusões:

- Não se rejeita a significância do modelo linear;
- A ANOVA comprova a dependência dos valores de absorbância (y) com a concentração (x);
- R^2 é maior que o proposto (0,99);
- Não se rejeita a hipótese de normalidade dos resíduos;
- Não se rejeita a homocedasticidade da variância;

As constatações acima permitem a conclusão da adequabilidade da linearidade do sistema dentro de intervalos estatísticos estipulados considerando a faixa de estudo empregada

nesta validação. Além disso, os métodos usados e resultados obtidos corroboram com as diretrizes descritas.

4.4 PRECISÃO

A precisão é avaliada pela equação de HorRat da guia do INMETRO descrita no (item 3.7).

A leitura de cada analista e o system suitability está apresentada no Apêndice E e A

De forma geral, os resultados obtidos pelos dois analistas que participaram da determinação da Precisão podem ser resumidos conforme a seguinte tabela:

Tabela 11 – Resumo geral dos resultados da precisão

Soluções Teste	Analista 01	Analista 02	Média Geral	CV (%)
1	106,46	106,07	106,23	0,4593
2	106,25	106,70		
3	105,83	106,92		
4	106,25	105,66		
5	105,20	106,70		
6	106,46	106,28		

Fonte: Da Autora, 2020.

4.4.1 Tratamento estatístico

De acordo com a nota de observação no capítulo da precisão do DOQ-CGCRE-008 de 04/2020 rev. 08 do INMETRO a qual diz: “Para avaliar se os grupos testados (ex: analistas diferentes) são considerados estatisticamente semelhantes, os resultados dos estudos efetuados sob condições variadas podem ser comparados pelos testes F e t ou pela ANOVA.”

4.4.1.1 Teste t

Tabela 12 – Análise de teste-t		
Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes		
	Variável 1	Variável 2
Média	106,0762	106,3902
Variância	0,2404	0,2242
Observações	6	6
Variância agrupada	0,2323	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	10	
Stat t	1,1281	
P(T<=t) uni-caudal	0,1428	
t crítico uni-caudal	1,8125	
P(T<=t) bi-caudal	0,2856	
t crítico bi-caudal	2,22813	

Fonte: Da Autora, 2020.

O t calculado (1,1281) foi menor que o t crítico (2,228) demonstrando que as médias não diferem entre os dois analistas.

4.4.1.2 Teste F

Tabela 13 – Análise de teste F		
Teste-F: duas amostras para variâncias		
	Variável 1	Variável 2
Média	106,0762	106,3902
Variância	0,2404	0,2242
Observações	6	6
Gl	5	5
F	1,0721	
P(F<=f) uni-caudal	0,4704	
F crítico uni-caudal	5,0503	

Fonte: Da Autora, 2020.

O F calculado (1,0721) foi menor que o F crítico (5,05), demonstrando que as variâncias entre os dois analistas não são significativas.

4.4.1.3 Anova

Tabela 14 – Resumo ANOVA

Anova: fator único				
RESUMO				
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Coluna 1	6	636,4575659	106,0763	0,24044
Coluna 2	6	638,3413279	106,3902	0,224255

Fonte: Da Autora, 2020

Tabela 15 – Análise de ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,272719	0,285596	4,964603
Dentro dos grupos			
Total			

Fonte: Adaptado Da Autora, 2020

O valor-P (0,28559) é maior que 0,05; dessa forma, não rejeitamos a hipótese de que o efeito analista é nulo ao nível de significância de 5%, demonstrando que a alteração de analista não interferiu no resultado.

A baixa dispersão dos valores de teor de potássio associado a considerável quantidade de repetições/amostragens feitas durante o ensaio de Repetibilidade e Precisão Intermediária comprovam que os resultados são confiáveis para quantificação do princípio ativo no produto acabado utilizando o método descrito nesta validação.

4.5 EXATIDÃO

4.5.1 Concentrações teóricas de 80, 100 e 120%

O preparo da amostra descreve uma alíquota de 3,2 mL da amostra do produto em um balão volumétrico de 50 mL seguida de 1 mL da solução de tampão (ISA).

Serão calculados volumes de padrão para atingir as concentrações da linearidade que segue abaixo:

Concentração 80 % - 0,040 mg/mL.

Concentração 100 % - 0,050 mg/mL.

Concentração 120 % - 0,060 mg/mL.

4.5.2 Resultados obtidos

Resultados da Exatidão – Ponto 80 %

Tabela 16 – Teor de recuperação de Potássio no ponto 80%

Exatidão Ponto 80 %	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
Alíquota da solução	1,000	1,000	1,000
Absorbância obtida no ensaio			
Leitura 1	-17,0	-17,3	-17,7
Leitura 2	-17,9	-17,4	-17,6
Média das leituras	-17,5	-17,4	-17,7
Resposta do método	39,3596	39,5242	39,0326
Recuperação (%)	98,4701	99,3148	99,9306
Média		99,2385	
CV (%)		0,7389	

Fonte: Da Autora, 2020

Resultados da Exatidão – Ponto 100 %

Tabela 17 – Teor de recuperação de Potássio no ponto 100%

Exatidão Ponto 100 %	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
Alíquota da solução	1,2500	1,2500	1,2500
Absorbância obtida no ensaio			
Leitura 1	-11,9	-12,1	-12,4
Leitura 2	-11,8	-12,0	-12,6
Média das leituras	-11,9	-12,1	-12,5
Resposta do método	49,7171	49,3040	48,3871
Recuperação (%)	99,5059	99,1113	99,1038
Média		99,2403	
CV (%)		0,2317	

Fonte: Da Autora, 2020.

Resultados da Exatidão – Ponto 120 %

Tabela 18 – Teor de recuperação de Potássio no ponto 120%

Exatidão Ponto 120 %	Amostra 01	Amostra 02	Amostra 03
Alíquota da solução	1,500	1,500	1,500
Absorbância obtida no ensaio			
Leitura 1	-7,1	-7,8	-7,8
Leitura 2	-7,2	-7,6	-7,9
Média das leituras	-7,2	-7,7	-7,9
Resposta do método	60,4860	59,1140	58,7453
Recuperação (%)	100,8827	99,0263	100,2658
Média		100,0583	
CV (%)		0,9449	

Fonte: Da Autora, 2020.

De acordo com a faixa de recuperação de 95 – 105% conforme Segundo o DOQ-CGCRE-008 de 04/2020 rev. 08 do INMETRO, pode-se concluir que o método é adequado comprovando a eficiência em recuperar, medir e quantificar o composto de interesse sem que existam fatores que influenciem no processo.

5 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos a partir do método desenvolvido e validado para o doseamento de potássio por eletrodo de íon seletivo fornece dados concisos para garantir que o mesmo é preciso e linear e ainda pode ser considerado como método indicativo de estabilidade farmacêutica.

O parâmetro de Robustez demonstrou que o método responde de forma adequada às alterações submetidas e atende o teor estabelecido. e atende o teor estabelecido.

Os limites calculados na Precisão foram 106,2% de teor e 0,4536 de DPR, atendendo as especificações de teor e DPR.

A recuperação média da exatidão obteve o nível dentro do esperado que foi de 99,5%

Assim foi comprovada a adequabilidade do método desenvolvido para a análise e quantificação do teor de Potássio no fármaco analisado, atendendo as RDC nº 166/2017 e o DOQ CGCRE 008 de 04/2020 (INMETRO).

REFERÊNCIAS

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 166. 2017.**

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 301. 2019.**

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 26. 2014.**

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 63. 2011.**

ANVISA, BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC Nº 53. 2015.**

BRITO, Natilene Mesquita et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

DE BARROS, Cleide Bassani. Validação de métodos analíticos. **Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

DOQ-CGCRE-008 - REVISÃO 08. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. INMETRO, Rio de Janeiro, ABR/2020.

FNFB. Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira / Brasil. Ministério da Saúde. 2.ed. Brasília: Anvisa, 2012.

HAFEZ, V.C.B. et al. Eletrólitos e minerais, elementos traço e elementos ultratraço. In: WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

NETO, Alex Malavazi dos Santos. **Pesquisa e desenvolvimento na indústria farmacêutica brasileira**. 2005. 60 f. (Mestrado em Trabalho de Conclusão de Curso - TCC) - Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2005.

RIBEIRO, Fabiana Alves de Lima et al. Planilha De Validação: Uma Nova Ferramenta Para Estimar Figuras De Mérito Na Validação De Métodos Analíticos Univariados. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 31, n. 1, 2008.

SILVA, Alessandra Furtado da et al. Construção de eletrodos Ag/Ag₂S de configuração convencional, com membrana sinterizada e não sinterizada, para determinação potenciométrica de sulfeto em fluxo. 2003.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. Fundamentos de Química Analítica. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SILVA, Julio CJ. Aula 3–Potenciometria. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2011. Disponível em:< <https://www.ufjf.br/nupis/files/2011/02/aula-3-potenciometria.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2020.

VALDERRAMA, P.; BRAGA J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova*, Vol. 32, No. 5, 1278-1287, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – *SYSTEM SUITABILITY* DOS PARÂMETROS

System suitability da Robustez				
POSIÇÃO INICIAL (mV)	POSIÇÃO FINAL (mV)	DIFERENÇA (mV)	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO (mV)	RESULTADO
-51,2	-6,5	-44,7	≥ 40	Aprovado
-52,3	-7,4	-44,9	≥ 40	Aprovado
-50,7	-6,5	-44,2	≥ 40	Aprovado
System suitability da Seletividade				
POSIÇÃO INICIAL (mV)	POSIÇÃO FINAL (mV)	DIFERENÇA (mV)	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO (mV)	RESULTADO
-52,4	-7,9	-44,5	≥ 40	Aprovado
-51,9	-7,1	-44,8	≥ 40	Aprovado
-51,2	-7,2	-44	≥ 40	Aprovado
System suitability da Linearidade				
POSIÇÃO INICIAL (mV)	POSIÇÃO FINAL (mV)	DIFERENÇA (mV)	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO (mV)	RESULTADO
-50,7	-6,6	-44,1	≥ 40	Aprovado
-51,6	-7,2	-44,4	≥ 40	Aprovado
-50,2	-6,2	-44	≥ 40	Aprovado
System suitability da Precisão - Repetibilidade				
POSIÇÃO INICIAL (mV)	POSIÇÃO FINAL (mV)	DIFERENÇA (mV)	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO (mV)	RESULTADO
-50,1	-6,3	-43,8	≥ 40	Aprovado
-52,1	-7,8	-44,3	≥ 40	Aprovado
-50,9	-7,3	-43,6	≥ 40	Aprovado
System suitability da Precisão - Intermediária				
POSIÇÃO INICIAL (mV)	POSIÇÃO FINAL (mV)	DIFERENÇA (mV)	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO (mV)	RESULTADO
-51,3	-7,3	-44	≥ 40	Aprovado
-50,5	-6,3	-44,2	≥ 40	Aprovado
-50,7	-6,1	-44,6	≥ 40	Aprovado
System suitability da Precisão - Exatidão				
POSIÇÃO INICIAL (mV)	POSIÇÃO FINAL (mV)	DIFERENÇA (mV)	CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO (mV)	RESULTADO
-50,7	-7,1	-43,6	≥ 40	Aprovado
-51,5	-7,8	-43,7	≥ 40	Aprovado
-50,4	-7,2	-43,2	≥ 40	Aprovado

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE B – PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO DOS PARÂMETROS

	Robustez	Repetibilidade	Intermediária	Exatidão
Peso do Padrão de Potássio (mg)	190,36	190,33	186,13	190,33
Pureza do Padrão (mg/mg)	1,001	100	100	100
Diluição / Balão (mL)	100	1,001	1,001	1,001
Concentração da solução estoque (mg/mL)	1,9055	1,9052	1,8631	1,9052
Média das leituras obtidas				
10	-51,8	-51,8	-53,5	-50,3
30	-24,6	-24,6	-25,4	-23,8
50	-12,2	-12,2	-12,7	-12,1
80	0,2	0,2	-0,6	-0,4
100	5,8	5,8	4,8	5,0

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE C – PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DE PADRÃO PARA DOS PARÂMETROS

SOLUÇÃO ESTOQUE – POTÁSSIO			
Linearidade			
	1	2	3
Peso do Padrão de Potássio (mg)	190,33	190,36	190,41
Pureza do Padrão (mg/mg)	1,001	1,001	1,001
Massa corrigida (mg)	190,52	190,55	190,6
Diluição / Balão (mL)	100	100	100
Concentração da solução estoque (mg/mL)	1,9052	1,9055	1,9041
Alíquota 2 (mL)	1	1	1
Diluição / Balão 2 (mL)	10	10	10
Concentração da solução estoque 2 (mg/mL)	0,19052	0,19055	0,19041
Exatidão			
	1	2	3
Massa pesada do padrão (mg)	190,33	189,5	185,99
Pureza do padrão (mg/mg)	1,001	1,001	1,001
Fator diluição	0,01	0,01	0,01
Concentração da solução estoque (mg/mL)	1,9052	1,8969	1,8618

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE D – RESULTADOS DAS LEITURAS DA ROBUSTEZ

	CONDIÇÃO ES NORMAIS	LEITURA A 1,5 MIN	LEITURA A 4,5 MIN	TAMPÃO O 0,5 ML	TAMPÃO O 1,5 ML	TEMP. QUENTE	TEMP. FRIA
Alíquota do produto	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2	3,2
Volume do balão (mL)	50	50	50	50	50	50	50
Concentração da amostra (mg/mL)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Leituras da amostra							
Leitura 01	-10,2	-10,2	-10	-11,5	-9,3	-14	-9,9
Leitura 02	-10,1	-10,1	-10,1	-11,4	-9,5	-14,4	-10
Média	-10,2	-10,2	-10,1	-11,5	-9,4	-14,2	-10
Teor de Potássio (%)	106,46	106,46	106,89	101,07	109,7	90,54	107,3

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE E – RESULTADOS DAS LEITURAS DA PRECISÃO.

Repetibilidade						
AMOSTRA	LEITURA 1	LEITURA 2	MÉDIA	TEOR (%)	MÉDIA	DPR (%)
1	-10,2	-10,1	-10,2	106,465	106,076	0,4622
2	-10,2	-10,2	-10,2	106,252		
3	-10,4	-10,2	-10,3	105,828		
4	-10,1	-10,3	-10,2	106,252		
5	-10,5	-10,4	-10,5	105,195		
6	-10	-10,3	-10,2	106,465		
Intermediária						
AMOSTRA	LEITURA 1	LEITURA 2	MÉDIA	TEOR (%)	MÉDIA	DPR (%)
1	-10,8	-10,3	-10,6	106,075	106,39	0,4451
2	-10,6	-10,2	-10,4	106,705		
3	-10,4	-10,3	-10,4	106,915		
4	-10,6	-10,7	-10,7	105,657		
5	-10,5	-10,3	-10,4	106,705		
6	-10,6	-10,4	-10,5	106,284		

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE F – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA LINEARIDADE

Teste de Cochran					
ESTATÍSTICA		NÚMERO DE RÉPLICAS		P. VALOR	
0,3937		6		0,5065	
Teste do Coeficiente Angular					
	G.L.	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	ESTAT. F	P-VALOR
Concentração(mg/mL)	1	366,053889	366,053889	5531,969	4,2
Resíduos	28	1,852778	0,066171		
ANOVA					
PONTOS DE VARIAÇÃO	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	VARIANCIA DO QUADRADO	RAZÃO F DE FISCHER	
Entre Médias	367,2033	4	91,8008	3263,0628	
Entre Amostras	0,703333	25	0,02813		
TOTAL	553,892	29			
Coeficiente de correlação de Person					
DESVIO PADRÃO DOS RESÍDUOS		GRAUS DE LIBERDADE	R²	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO	
0,257237		28	0,995	0,9975	

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE G – FATOR DE DILUIÇÃO PARA CÁLCULOS DA LINEARIDADE

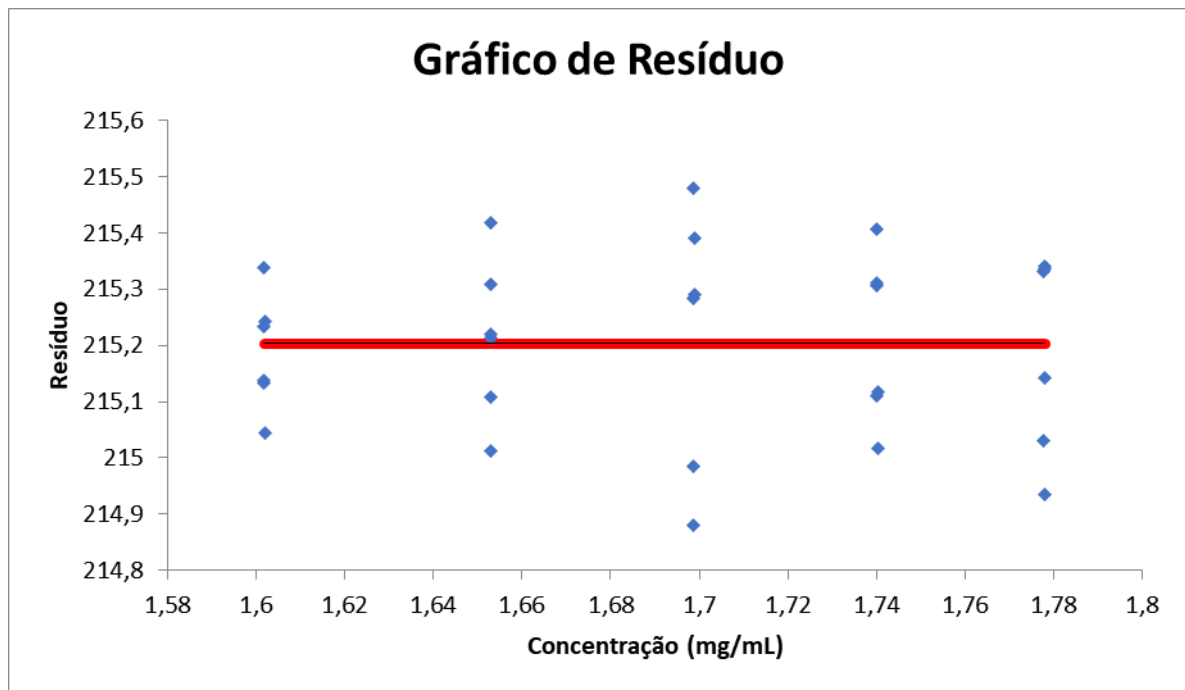
PONTO	FATOR DILUIÇÃO
40	0,00040
45	0,00045
50	0,00050
55	0,00055
60	0,00060

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE H – ANÁLISE DOS RESÍDUOS

PONTO	mV	Y PREDITO	RESÍDUO	RESÍDUO ²
80	-17,50	197,6334	215,1334	46282,3660
	-17,60	197,6334	215,2334	46325,4027
	-17,50	197,6372	215,1372	46284,0214
	-17,70	197,6372	215,3372	46370,1163
	-17,40	197,6436	215,0436	46243,7612
	-17,60	197,6436	215,2436	46329,8187
	-17,60	197,6436	215,2436	46329,8187
90	-14,60	200,5086	215,1086	46271,6964
	-14,80	200,5086	215,3086	46357,7798
	-14,50	200,5124	215,0124	46230,3391
	-14,70	200,5124	215,2124	46316,3841
	-14,70	200,5188	215,2188	46319,1436
	-14,90	200,5188	215,4188	46405,2711
	-14,90	200,5188	215,4188	46405,2711
100	-11,80	203,0805	214,8805	46173,6394
	-12,40	203,0805	215,4805	46431,8561
	-11,90	203,0844	214,9844	46218,2798
	-12,20	203,0844	215,2844	46347,3604
	-12,20	203,0908	215,2908	46350,1208
	-12,30	203,0908	215,2908	46350,1208
	-12,30	203,0908	215,3908	46393,1890
110	-9,90	205,4071	215,3071	46357,1644
	-10,00	205,4071	215,4071	46400,2358
	-9,70	205,4110	215,1110	46272,7368
	-9,90	205,4110	215,3110	46358,8212
	-9,70	205,4174	215,1174	46275,4950
	-9,60	205,4174	215,0174	46232,4815
	-9,60	205,4174	215,0174	46232,4815
120	-7,50	207,5312	215,0312	46238,4057
	-7,80	207,5312	215,3312	46367,5144
	-7,80	207,5350	215,3350	46369,1714
	-7,80	207,5350	215,3350	46369,1714
	-7,40	207,5414	214,9350	46197,0633
	-7,60	207,5414	215,1414	46285,8358
	-7,80	207,5414	215,3414	46371,9324

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE I – GRÁFICO DE RESÍDUO

Fonte: Da Autora, 2020.

APÊNDICE J – TESTE DE NORMALIDADE – SHAPIRO WILK

I	N-I+1	AN-I+1	XN-I+1	X(I)	NA-I+1(X(N-I+1)-X(I))
1	30	0,4254	215,4805	214,8805	0,25524
2	29	0,2944	215,4188	214,9350	0,14243
3	28	0,2487	215,4071	214,9844	0,10514
4	27	0,2148	215,3908	215,0124	0,08127
5	26	0,1870	215,3414	215,0174	0,06059
6	25	0,1630	215,3372	215,0312	0,04988
7	24	0,1415	215,3350	215,0436	0,04123
8	23	0,1219	215,3312	215,1086	0,02714
9	22	0,1036	215,3110	215,1110	0,02072
10	21	0,0862	215,3086	215,1174	0,01648
11	20	0,0697	215,3071	215,1334	0,01211
12	19	0,0537	215,2908	215,1372	0,00825
13	18	0,0381	215,2844	215,1414	0,00545
14	17	0,0227	215,2436	215,2124	0,00071
15	16	0,0076	215,2334	215,2188	0,000111
SOMA (B) =					0,8268
w =					0,9635

Fonte: Da Autora, 2020.

ANEXOS

ANEXO I – FÓRMULA PARA O CÁLCULO DA RECUPERAÇÃO DA EXATIDÃO

$$Recuperação = \frac{Concentração\ média\ experimental}{Concentração\ teória} \times 100$$

Fonte: Adaptado de ANVISA, RDC 166/17.

ANEXO II – CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA PRECISÃO

Analito %	Razão do Analito	Unidade	DPR %
100	1	100%	1,3
10	10^{-1}	10%	1,9
1	10^{-2}	1%	2,7
0,01	10^{-3}	0,1%	3,7
0,001	10^{-4}	100 ppm	5,3
0,0001	10^{-5}	10 ppm	7,3
0,00001	10^{-6}	1 ppm	11
0,000001	10^{-7}	100 ppb	15
0,0000001	10^{-8}	10 ppb	21
0,00000001	10^{-9}	1 ppb	30

Fonte: Adaptado do INMETRO, DOQ-CGCRE-008.

ANEXO III – CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA RECUPERAÇÃO

Analito %	Razão do Analito	Unidad e	Recuperação média %
100	1	100%	98 - 102
10	10^{-1}	10%	98 - 102
1	10^{-2}	1%	97 - 103
0,01	10^{-3}	0,1%	95 - 105
0,001	10^{-4}	100 ppm	90 - 107
0,0001	10^{-5}	10 ppm	80 - 110
0,00001	10^{-6}	1 ppm	80 - 110
0,000001	10^{-7}	100 ppb	80 - 110
0,0000001	10^{-8}	10 ppb	60 - 115
0,00000001	10^{-9}	1 ppb	40 - 120

Fonte: Adaptado do INMETRO, DOQ-CGCRE-008.

ANEXO IV – CRITÉRIO DE ACEITAÇÃO PARA HORRAT

Razão da concentração	PDPR _R
1 (100%)	2
10^{-1}	2,8
10^{-2} (1%)	4
10^{-3}	5,6
10^{-4}	8
10^{-5}	11
10^{-6} (ppm)	16
10^{-7}	23
10^{-8}	32
10^{-9} (ppb)	45

Fonte: Adaptado do INMETRO, DOQ-CGCRE-008.