

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS NOTURNO

---

**MARCELA PAULA SILVA**

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA  
*HYDRAMETHILNON* (HYDRA) POR  
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A  
UM DETECTOR DE MASSAS (GC-MS).**

MARCELA PAULA SILVA

**Validação de Metodologia para *Hydramethilnon* (Hydra) por Cromatografia Gasosa Acoplada a um Detector de Massas (GC-MS).**

Orientador: Osmar Malaspina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2016

543.5 Silva, Marcela Paula  
S586v Validação de metodologia para Hydramethilnon (Hydra)  
por cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) /  
Marcela Paula Silva. - Rio Claro, 2016  
73 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências  
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biociências de Rio Claro  
Orientador: Osmar Malaspina

1. Inseticidas. 2. Legislação segundo ANVISA. 3. Teores  
de hidrametilnona. 4. Curva de calibração. I. Título.

“Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Más há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isso não tem importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado”

(William Shakespeare)

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a vida e essa oportunidade de concluir o curso. Sou muito grata aos meus amigos por terem me ajudado e apoiado durante esse caminho, por terem dado forças para lutar e conseguir finalizar esta etapa da minha vida. Agradeço ao meu orientador de graduação, Prof. Doutor Osmar Malaspina, pelo apoio, chance e confiança pela oportunidade de desenvolver atividades em seu laboratório e com isso, aprender e descobrir os caminhos que quero traçar em minha vida profissional. Agradeço ao meu amigo Sebastião Zanão Filho pela ajuda no laboratório, por passar grandes ensinamentos, pelo seu companheirismo e amizade. Agradeço a Necis Miranda não só pela sua amizade, mas também pela ajuda e conselhos. Agradeço também aos demais colegas do CEIS que de uma maneira ou de outra contribuíram para meu aprimoramento como profissional e pessoa.

Agradeço a minha mãe e meu pai que me apoiou em toda essa etapa do curso, que esteve ao meu lado ajudando, dando forças para continuar e agradeço ao meu companheiro Ato, que considero muito, por estar sempre ao meu lado ajudando nos momentos difíceis, aconselhando e até mesmo corrigindo quando preciso. Se não fosse pelo seu companheirismo e amizade eu não estaria onde estou. Mostrou-me e ensinou muito da vida, e todos os ensinamentos e aprendizados que tive serão eternos.

Obrigado a todos os amigos e companheiros que fazem parte da minha vida.

Vocês são muito Caros para mim.

## Resumo

A preocupação com o controle de insetos sociais, como a formiga cortadeira, formigas domésticas, cupins e outros insetos como baratas e traças vem crescendo a cada ano, e o uso de defensivos agrícolas para conter a infestação por esses insetos também cresce. Segundo CAETANO, M, “O recente aparecimento de novas pragas, caso da lagarta *Helicoverpa armigera*, e o ressurgimento de velhas conhecidas, como a mosca branca e a lagarta falsa medideira, foram fatores determinantes para que as vendas de inseticidas voltassem a crescer”.

A forma mais comumente utilizada no controle doméstico para minimizar efeitos negativos destes insetos são as iscas tóxicas. E dentre vários princípios ativos que diferentes tipos de iscas podem apresentar, compreende a Hidrametilnona.

O uso de iscas em gel, principalmente através de aplicação com seringas, é considerado eficiente, prático e econômico, dispensa mão de obra e equipamentos especializados.

Todos os produtos que apresentam este inseticida precisam passar por análises qualitativas e quantitativas em uma metodologia de análise validada conforme protocolos da ABNT (INMETRO)<sup>4</sup> ou ANVISA<sup>5</sup>, submetendo-se de acordo com a legislação vigente.

Sendo assim, o presente estudo compreendeu em desenvolver e validar uma metodologia para detecção do princípio ativo hidrametilnona em formulados por cromatografia gasosa de acordo com a resolução RE nº. 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	7
1.1 Identificação química	8
1.2 Propriedades físicas e químicas	9
1.3 Legislação segundo a ANVISA	14
1.4. Métodos alternativos e justificativas da metodologia proposta.	16
2.OBJETIVO	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	19
3.1. As condições de análises do GC-MS	19
3.1.1. Cromatógrafo	19
3.1.2. Detector de massas	19
3.2. Condições de preparação das curvas de calibração	20
3.3. Preparação das amostras	20
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	22
4.1 Curvas de calibração	22
4.2 Validação	25
4.2.1. Especificidade e seletividade	25
4.2.2. Linearidade	26
4.2.3. Intervalo	26
4.2.4. Precisão	26
4.2.5. Limite de detecção	31
4.2.6. Limite de quantificação	31

4.2.7. Exatidão	31
4.2.8. Robustez	32
5. AMOSTRAS ANALISADAS PARA AJUSTE DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE ISCAS COM HIDRAMETILNONA.	33
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. ANEXO I	50



## 1. Introdução

Hidrametilnona é um composto que pertence ao grupo químico amidinohidrazona, à classe dos inseticidas e apresenta uma classificação toxicológica de classe III ao qual seria medianamente tóxico, segundo a ANVISA.<sup>1</sup>

Historicamente, ele foi desenvolvido pela American Cyanamid Company e foi registrado pela primeira vez com a EPA (Environmental Protection Agency) dos EUA para o uso como um pesticida em 1980.<sup>2</sup>

Como consta no Pesticide Synthesis Handbook (Thomas A. Unger, 1996) a síntese da Hidrametilnona baseia-se principalmente na reação entre 5-dimetilperidro-pirimidine-2-hydrazide e 1.5-di-p.trifluorometil-1.4 pentadiene-3-one.<sup>3</sup>

Este composto é extremamente tóxico para os insetos porque ele funciona como um inibidor da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, fazendo com que desencadeie a supressão da respiração.<sup>4</sup>

Sendo assim, Hidrametilnona tornou-se eficaz ao combate de formigas, baratas, traças e outros tipos de insetos. O seu uso no Brasil, segundo licença expedida pela ANVISA, enquadra-se em formulações de iscas e gel para venda livre em porcentagens de 1,65% e 2,0% respectivamente, e para vendas a entidades especializadas de pasta de isca e gel sendo ambas as concentrações de 2,0%.

A preocupação com o controle de insetos sociais, como a formiga cortadeira, formigas domésticas, cupins e outros insetos como baratas e traças vem crescendo a cada ano, e o uso de defensivos agrícolas para conter a infestação por esses insetos também cresce. Segundo CAETANO, M, “O recente aparecimento de novas pragas, caso da lagarta *Helicoverpa armigera*, e o ressurgimento de velhas conhecidas, como a mosca branca e a lagarta falsa medideira, foram fatores determinantes para que as vendas de inseticidas voltassem a crescer”<sup>1</sup>.

De acordo com os dados publicados pela SEAGRI junto a Valor Econômico, o defensivo agrícola ao qual apresentou maior acréscimo nas vendas comerciais foi a dos inseticidas que, em 2013, aumentou 29,9% (em relação a 2012)<sup>1</sup>.

No ano de 2013, o mercado nacional de defensivos agrícolas totalizou US\$11,45 bilhões contra US\$9,71 bilhões em relação ao ano anterior, representando um aumento de 18% em doze meses. A classe de inseticidas foi a

que respondeu pelo maior valor das vendas, sendo responsável por 39,8% do faturamento total, ou seja, US\$4,55 bilhões<sup>1</sup>.

A forma mais comumente utilizada no controle doméstico para minimizar efeitos negativos destes insetos são as iscas tóxicas. E dentre vários princípios ativos que diferentes tipos de iscas podem apresentar, compreende a Hidrametilnona.

A Hidrametilnona é um inseticida ao qual pertence à família de produtos químicos conhecidos como Amidinohidrazona<sup>6</sup>. Na classificação toxicológica, enquadra-se na Classe III. Com relação ao homem, ele se enquadra em uma Classificação de câncer: Grupo C ao qual é um possível carcinogênico humano<sup>7</sup>.

Os produtos podem ser aprovados para uso ao ar livre em pastagens, formigueiros, plantas ornamentais, ou áreas internas, tais como residências, restaurantes e até mesmo hospitais. Devido a esta exposição humana direta e indireta ao praguicida, é necessário que as amostras estejam de acordo com os padrões de qualidade da ANVISA, ao qual garante que o produto tenha o mínimo e o máximo de teores exigidos pela legislação.

O uso de iscas em gel, principalmente através de aplicação com seringas, é considerado eficiente, prático e econômico, dispensa mão de obra e equipamentos especializados.

Todos os produtos que apresentam este inseticida precisam passar por análises qualitativas e quantitativas em uma metodologia de análise validada conforme protocolos da ABNT (INMETRO)<sup>4</sup> ou ANVISA<sup>5</sup>, submetendo-se de acordo com a legislação vigente.

## 1.1 Identificação química

Hidrametilnona (*2-tetra-hidro-5,5-dimetil (1H) -pirimidinona [3- [4 (trifluorometil) fenil] -1- [2- [4-trifluorometil] fenil] etenil] -2-propenilideno] hidrazona*) é um inseticida usado para controlar formigas (incluindo formigas lava-pés), baratas, cupins e outros insetos (Hollingshaus e Little, 1984 a e b). Os locais de uso incluem usos alimentares (abacaxi e pastagens de gramíneas e feno) e usos não alimentares (gramados, relvados, campos de golfe, casas e outras estruturas).

Em insetos, hidrametilnon é tóxico para as espécies que ingerem alimentos, ao contrário de outros modos de aplicação (Hollingshaus e Little, 1984a). Com a ingestão de 45 a 55% da dose administrada é encontrado nos tecidos, comparativamente menos que 11% é encontrada após a aplicação dérmica na cutícula. A hidrametilnona é o composto ativo e seus metabolitos conhecidos não têm atividade inseticida (Hollingshaus e Little, 1984b). Hidrametilnona provoca uma diminuição no apetite e letargia geral observado 24 horas após a exposição (Hollingshaus e Little, 1984b; Hollingshaus, 1987). Os insetos ficam moribundo num período de 72 a 96 horas e morrem alguns dias depois. As experiências com células de ovário de hamster chinês *in vitro* mostraram que hidrametilnona é um inibidor específico de sítio II da cadeia de transporte de eletrons nas mitocôndrias (Hollingshaus, 1987).

## 1.2 Propriedades Físicas e Químicas

Nome químico: *Tetra-hidro-5,5-dimetil-2 (1H) -pirimidinona [3- [4- (trifluorometil) fenil] -1- [2- [4- trifluorometil) fenil] etenil] -2-propenilideno] hidrazona*

CAS número de registro: 67485-29-4

Nome comum: hidrametilnona

Nome comercial: Amdro, combater, Maxforce, Cerco, Lábia, CL 217,300, 217,300 AC

Fórmula molecular:  $C_{25}H_{24}F_6N_4$

Peso molecular: 494,50 g / mols

Aparência física: amarelo para bronze sólido cristalino, odor de óleo vegetal.

Solubilidade: insolúvel em água (0,005-0,007 mg / L a 25 ° C, a pH 7,4), ligeiramente solúvel em alcoóis, e solúvel em acetona, clorobenzeno, e 1,2-dicloroetano.

Ponto de fusão: 189 °C a 191°C

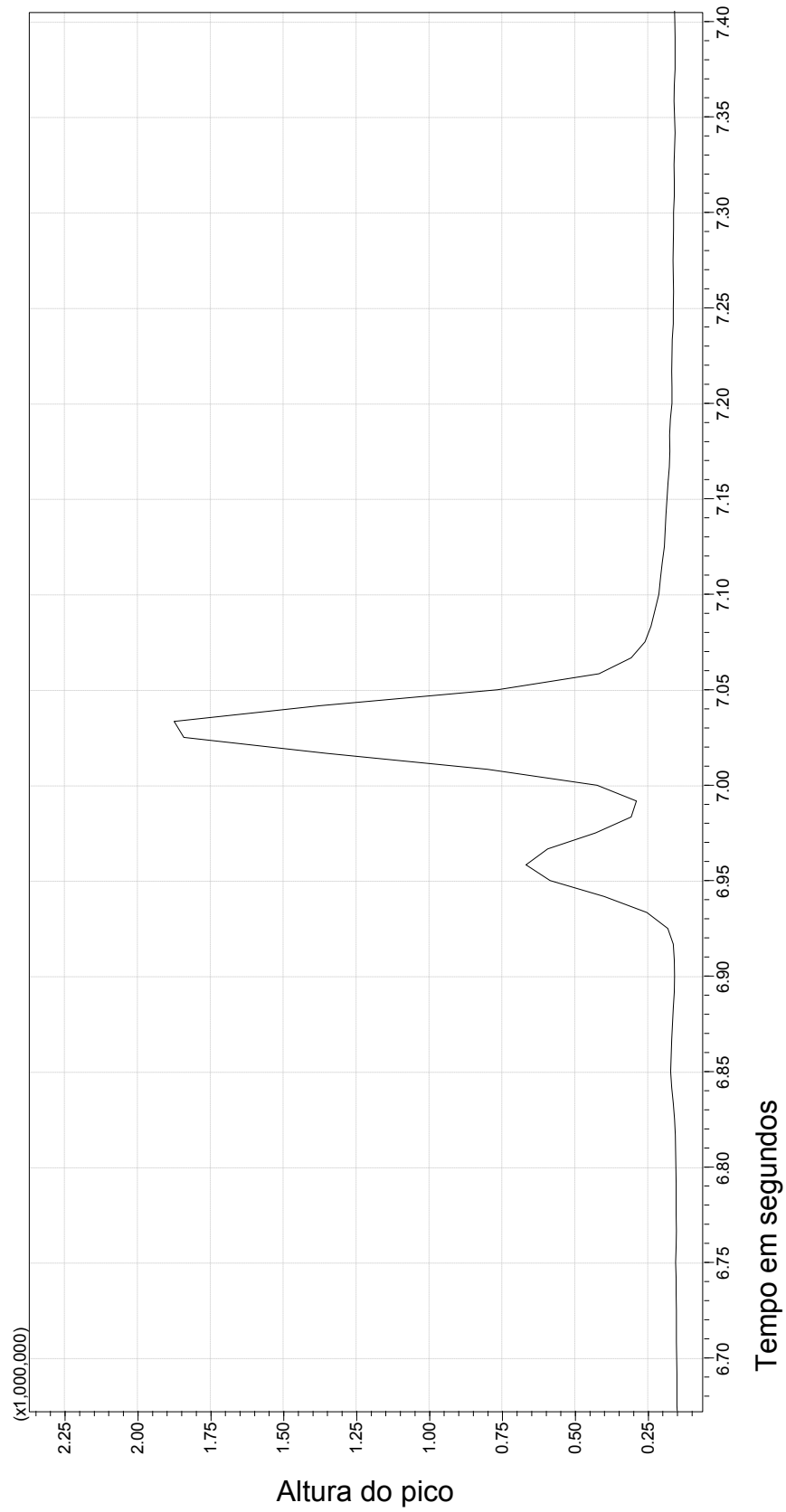
Pressão de vapor:  $6 \times 10^{-8}$  mm Hg a  $25^\circ \text{C}$

Constante da Lei de Henry:  $1,95 \times 10^{-7}$  atm  $\text{m}^3$  /g moles

Coefficiente de partição:  $K_{ow} = 27.965$  (n-octanol e água),  $\log K_{ow} = 4.45$

Tem baixa pressão de vapor, constante baixa da Lei de Henry e, portanto, pouco provável de ser encontrado no ar. Tem baixo potencial para lixiviar a partir do solo e alcançar a água do solo, uma vez que é insolúvel em água e adsorve ao solo. É estável à hidrólise abiótica mas fotólise rapidamente. Ela é solúvel em lípidos, mas é pouco provável que acumulem nos organismos aquáticos porque os seus níveis na água é baixo devido a sua polaridade. No solo, hidrametilnona é degradada pela luz solar. A degradação microbiana é baixa devido a ela ligar-se fortemente às partículas do solo. Resíduos em plantas podem ser considerados insignificantes, uma vez que não é absorvida através de raízes e é metabolizada no forrageamento de ruminantes.

As suas características no cromatógrafo, no método apresentado, compreendem um tempo de retenção de 6,952 até 7,200 minutos. Essa substância apresenta um cromatograma específico (figura 01) com um espectro de massas padrão (figura 2 e 3)



**Figura 1: Cromatograma específico de Hidrametilnona.**

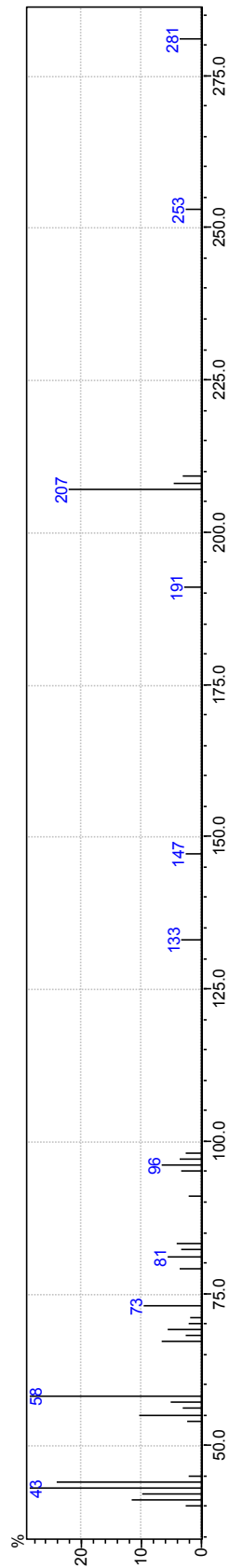


Figura 2: Espectro de massas específico de Hidrametilnona do padrão analisado.

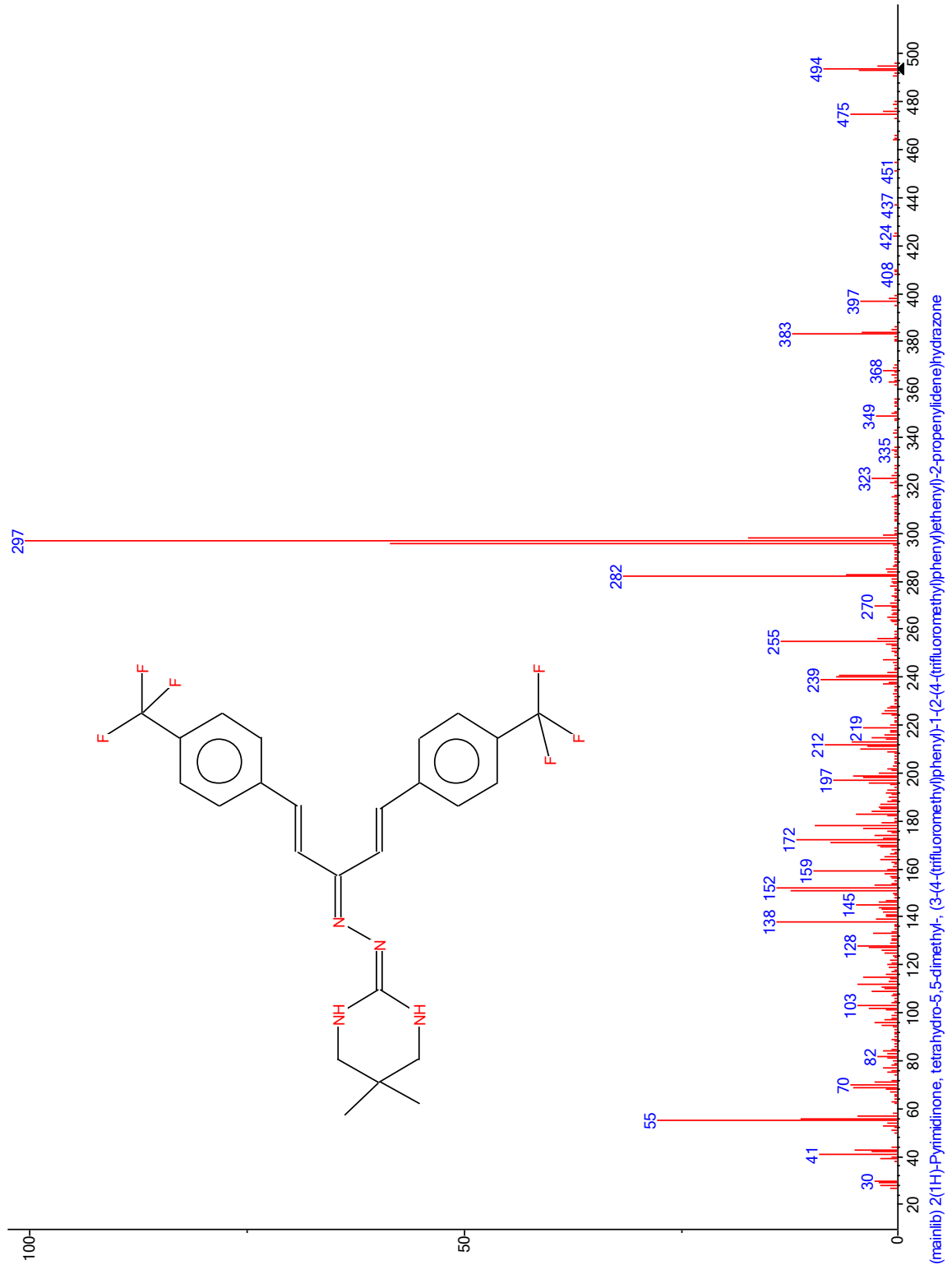


Figura 3: Espectrograma junto com a forma espacial da molécula de Hidrametilnona.

### 1.3 Legislação segundo a ANVISA

A normativa que rege a validação de métodos analíticos e bioanalíticos encontra-se na Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003. Apresenta os seguintes artigos:

“Art. 1º Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" anexo

Art. 2º Fica revogada a Resolução RE no 475, de 19 de março de 2002.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.” (ANVISA Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003)

O guia contido no anexo, “apresenta as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (ANVISA Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 D.O.U. 02/06/2003).

As informações fornecidas no guia aplicam-se para técnicas analíticas que utilizam métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e para métodos não cromatográficos, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável (como por ex. titulometria, espectrofotometria UV-VIS).

Em se tratando de metodologias analíticas não descritas em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia só será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, conforme especificado de acordo com a categoria segundo sua finalidade, como mostra na tabela 01:

Parâmetros: Especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão, robustez.



Categorias: A categoria I apresenta como finalidade testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas; A categoria II apresenta como finalidade testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas; a categoria III apresenta como finalidade testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo) e a categoria IV está relacionada com testes de identificação.

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II Quantitativo</b>	<b>Categoria II - Ensaio limite</b>	<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
<b>Especificidade</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>Sim</b>
<b>Linearidade</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Intervalo</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Precisão - Repetibilidade</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>Precisão - Intermediária</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>Não</b>	<b>**</b>	<b>Não</b>
<b>Limite de Detecção</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Limite de Quantificação</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Exatidão</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Robustez</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>

**Tabela 1: Ensaos necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.**

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

A proposta da metodologia para *hydramethilnon* (hydra) por cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS) se enquadra na categoria I.

Em anexo (Anexo 1) encontra-se toda a Legislação-Resolução da ANVISA utilizada.

#### 1.4. Métodos alternativos e justificativas da metodologia proposta.

A técnica de LC (Cromatografia Líquida) é a ferramenta analítica mais frequente para a identificação de moléculas em solução<sup>9</sup>. Antes do desenvolvimento de outros métodos como o GC, o LC foi a técnica mais amplamente utilizada devido à grande quantidade de informação estrutural fornecida, a simplicidade da interface, e de alta resolução do método e sensibilidade. No entanto, a sua aplicação também sofre alguns inconvenientes importantes, tais como a necessidade de extração a partir de matrizes aquosas e derivatização.

As vantagens da LC sobre GC em resolver estes problemas analíticos seriam a capacidade de análises dos compostos hidrofílicos altamente polares, substâncias menos voláteis e termicamente instáveis são mais facilmente analisadas, exigindo pouca ou nenhum *clean-up* da amostra.

Metanol e acetonitrila (ACN) são os reagentes orgânicos mais utilizados para as metodologias de LC. Tampões voláteis, tais como formato de amônio ou de etila em concentrações próximas a milésimos de molar são geralmente aplicáveis.

No caso da Hidrametilnona a fase estacionária utilizada é composta de Octilsilica. A fase móvel usual é uma mistura de água – ACN (acetonitrila) – trietilamina em gradiente crescente e a interface utilizada é a ionização por ESI (*eletrospray*)<sup>10</sup>.

Outra metodologia engloba o LC equipado com um detector de UV. Neste tipo de análise são utilizados solventes como cloreto de metileno, acetonitrila, metanol e acetona. Os reagentes para fazer a extração de hidrametilnona são trietilamina e ácido clorídrico concentrado, além de água deionizada. A sensibilidade compreende em 10 ng.<sup>11</sup>

Em contrapartida, o método proposto por GC-MS utiliza como solvente apenas acetona e a fase móvel é gás hélio.

Em relação a resíduos, tanto a metodologia em LC quanto a do LC com detector de UV geram resíduos mais tóxicos que a acetona e o volume é

consideravelmente maior, visto que a fase móvel líquida que circula pelo equipamento é de água-acetonitrila-trietanolamina.

Levando também em conta a metodologia de extração, o LC requer uma extração e posteriormente filtração do material em colunas específicas. Sendo assim, o manuseio e o tempo de extração é muito maior do que na metodologia proposta neste trabalho.

## **2. Objetivo**

Os objetivos foram desenvolver e validar segundo normas da ANVISA um método para determinação qualitativa e quantitativa de hidrametilnona em produto técnico e formulados a partir do produto técnico.

### **3. Materiais e métodos.**

Este método foi desenvolvido para determinação dos teores de hidrametilnona por cromatografia gasosa com detector de massas (quadrupolos). O equipamento utilizado foi um GC-MS marca *Shimadzu*, modelo GC-2010/GCMS-QP2010 Plus com auxílio de injetor automático de amostra AOC-20i. O gás de arraste utilizado foi gás hélio ultra-puro (9999) da empresa White Martins.

#### **3.1. As condições de análises do GC-MS**

##### **3.1.1. Cromatógrafo**

Coluna utilizada – RTX-5MS da Restek com 30 metros de comprimento e diâmetro de 0,25 mm

Temperatura do injetor: 300 °C;

Modo de injeção: *Splitless*;

Volume da amostra injetado: 1 µl;

Modo de controle de fluxo: Velocidade Linear (50 cm/s);

Temperatura inicial da coluna: 200 °C;

Programação da temperatura de trabalho: 20 °C por minuto até atingir 300 °C e permanência desta temperatura por 4 minutos.

##### **3.1.2. Detector de massas**

Tipo do detector: quadrupolo simples;

Ionização por impacto eletrônico: 70 eV;

Temperatura da interface GC-MS: 300 °C;

Temperatura do ionizador: 230 °C;

Potencial do detector: Relativo ao tuning;

Faixa de detecção de massas: de 40 a 500 m/z.

Modo de captura de massas: *scanner*.

### **3.2. Condições de preparação das curvas de calibração**

Foi utilizado para a preparação das curvas de calibração padrão de *Hydramethilnon* da marca *Fluka Analytical*; Lot#*SZBB223XV*.

O padrão foi convenientemente pesado e diluído com acetona marca Merck lote: K45278520.

Foi feita uma curva de calibração com sete pontos em triplicatas, perfazendo 21 pontos mais o branco de acetona, nas seguintes concentrações:

5, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 ppm

### **3.3. Preparação das amostras**

Foram utilizadas três amostras:

Amostra 01 – Formulado pastoso;

Amostra 02 – Formulado granulado;

### Amostra 03 – Produto técnico.

As amostras foram convenientemente pesadas e diluídas em acetona. Feitas as devidas separações de fases, transferiu-as para frascos de injeção e foram injetadas.

Cada amostra foi repetida cinco vezes. A amostra 01 apresentava teores teóricos próximos ao início da curva (concentrações menores); a amostra 02, concentrações teóricas intermediárias e a amostra 03, concentrações teóricas próximas ao limite superior da curva.

Os cálculos de concentração do princípio ativo nas amostras foram determinados utilizando a curva de calibração e equação da reta.

Foram feitas adições padrões conhecidas nas amostras para a verificação do coeficiente de recuperação.

## 4. Resultado e Discussão

### 4.1 Curvas de calibração

Foi confeccionada uma curva de calibração com sete pontos em triplicatas, perfazendo 21 pontos mais o branco de acetona, nas seguintes concentrações:

5, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 ppm. (conforme tabela 02 e figuras 4, 5, 6, 7 e 8 que representam os cromatogramas).

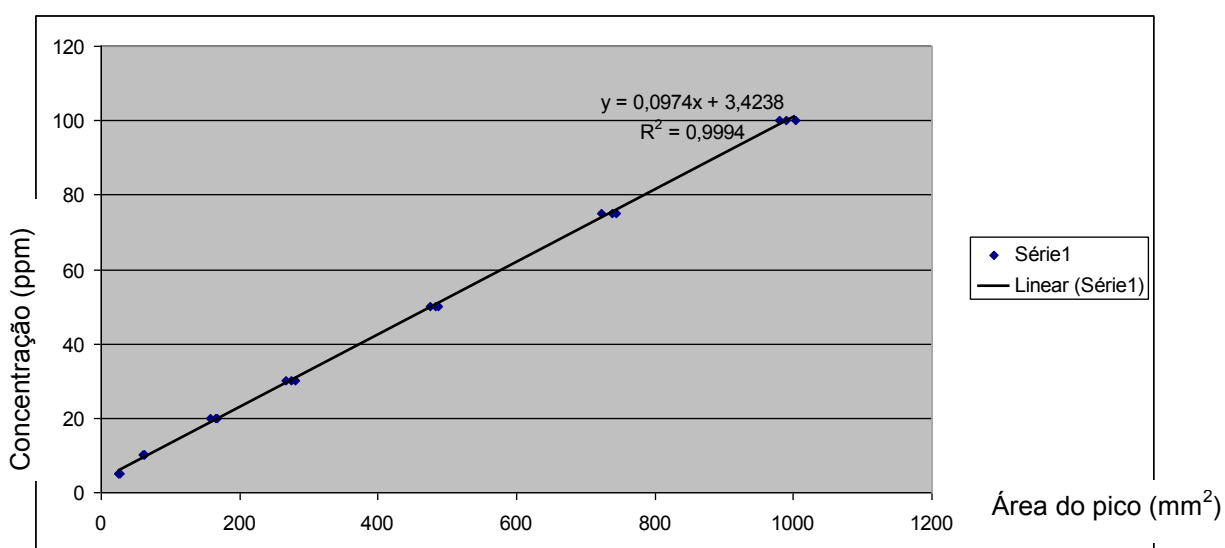


Figura 4: Todos os pontos plotados no gráfico.



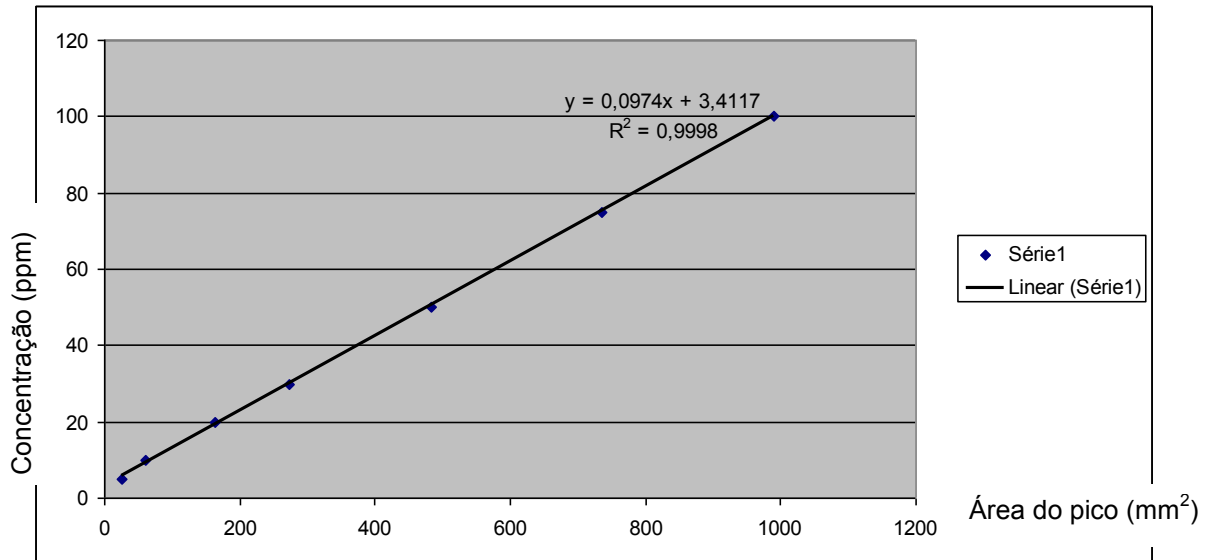
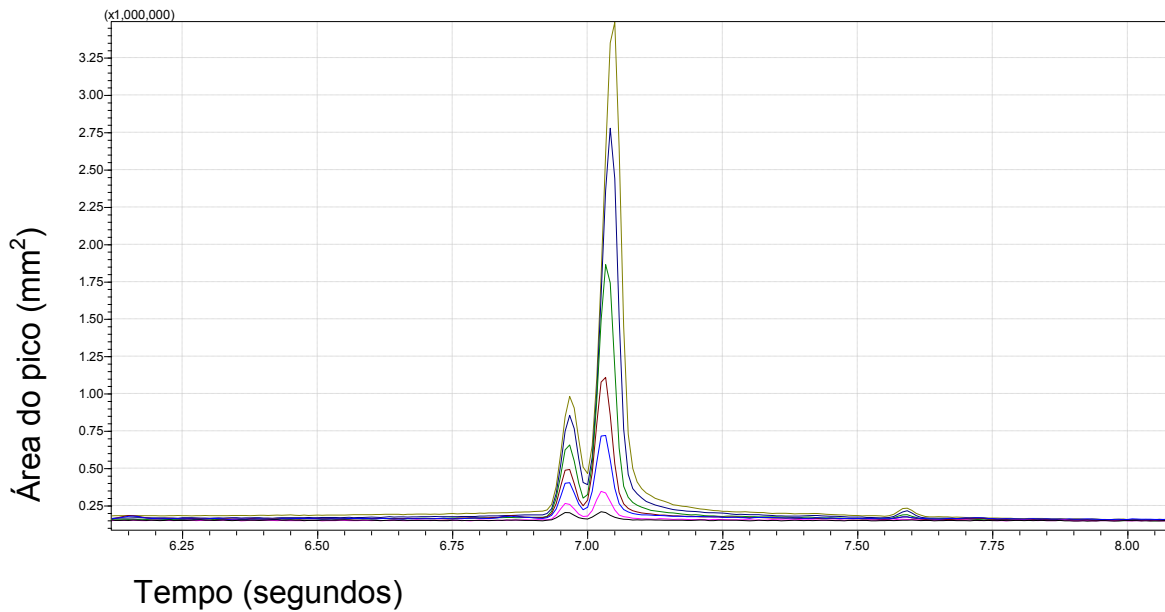


Figura 5: Plotados as médias dos pontos.

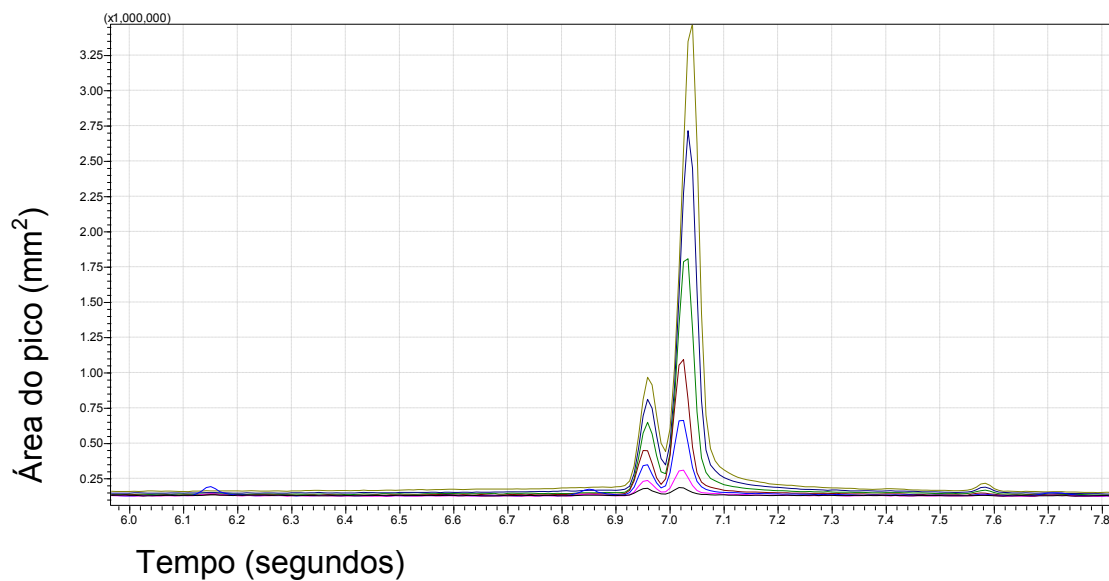
Área do pico (mm <sup>2</sup> )	Concentração (ppm)
27,2278	5
24,5237	5
25,6136	5
59,7546	10
62,5980	10
61,8427	10
165,5687	20
157,6645	20
166,6486	20
274,6323	30
265,9438	30
280,4796	30

476,2491	50
482,8623	50
487,8938	50
743,6253	75
723,239	75
737,7542	75
1003,8348	100
989,9786	100
979,2793	100

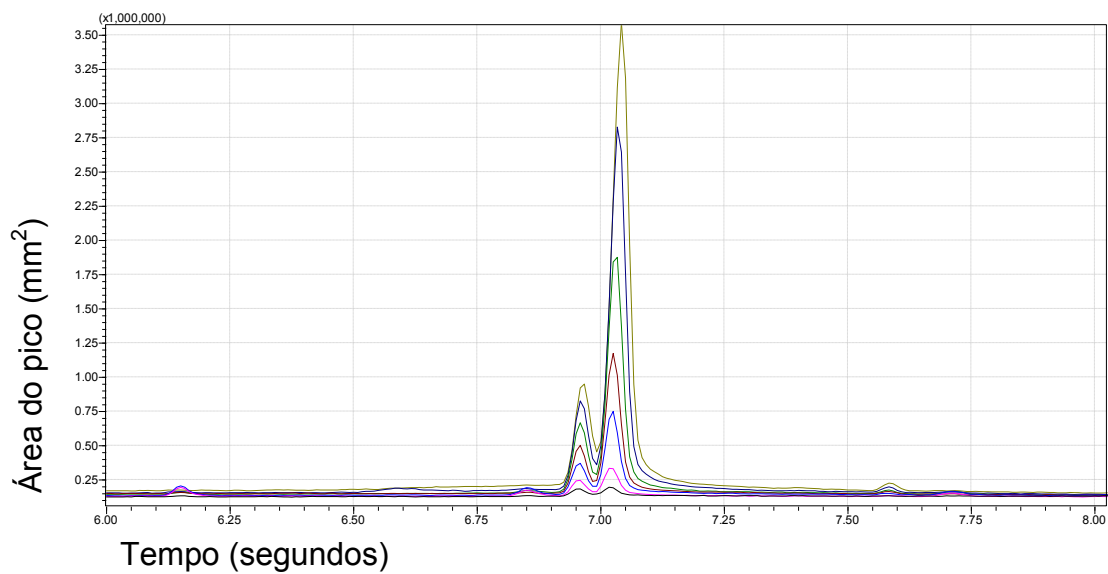
**Tabela 2: Área dos picos x concentrações em ppm referente ao figura 4. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



**Figura 6: Cromatograma com a curva de calibração no intervalo de 5 ppm a 100 ppm. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



**Figura 7: Cromatograma com a curva de calibração no intervalo de 5 ppm a 100 ppm duplicata. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



**Figura 8: Cromatograma com a curva de calibração no intervalo de 5 ppm a 100 ppm triplicata. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**

## 4.2 Validação

### 4.2.1. Especificidade e seletividade

Em se tratando de método cromatográfico com picos bem definidos e com tempo de retenção bastante preciso e detector de massas produzindo o espectro de massas da substância em questão, o método mostra-se bastante seletivo e específico, não sendo observado nenhum interferente nas amostras, tanto formuladas como no produto base.

#### **4.2.2. Linearidade**

A curva de calibração mostrou-se bastante linear, com coeficiente de correlação  $r=0,9997$  e coeficiente de determinação de  $r^2=0,9994$  no intervalo entre as concentrações de 5 a 100 ppm. Foram injetados sete pontos distintos em triplicata conforme a tabela 02.

Os cálculos da curva de calibração foram realizados pelo método dos mínimos quadrados. Para a efetuação dos cálculos foram usadas a inclinação da reta (y) e a intersecção dos eixos (x). Foram computadas nos cálculos todas as respectivas diluições.

As áreas dos picos foram integradas automaticamente pelo *software* do aparelho GC-MS (*Shimadzu GCsolution*).

#### **4.2.3. Intervalo**

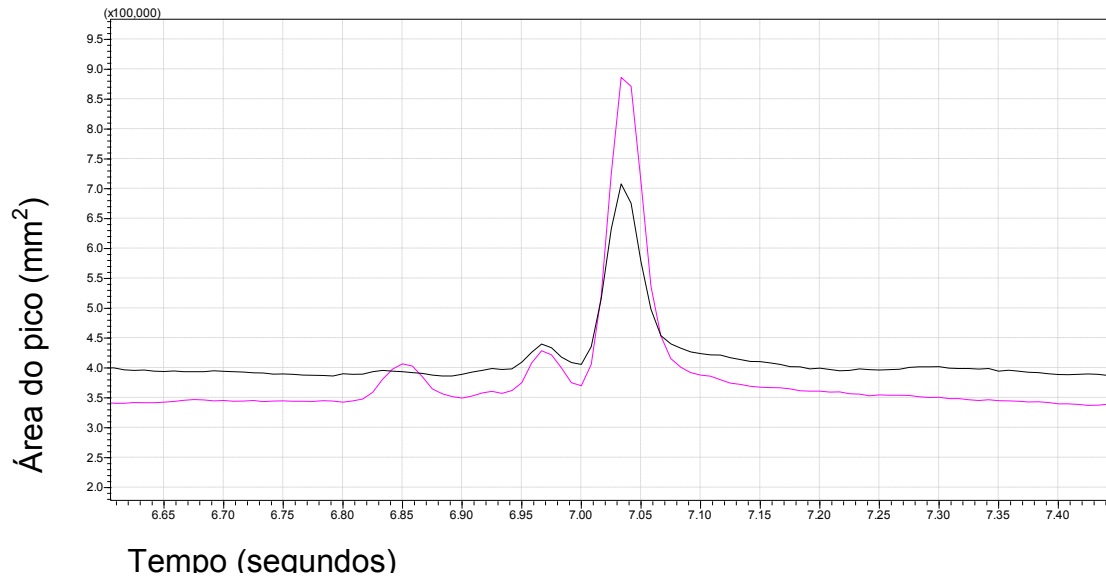
O intervalo de validação do método compreende a variação de concentração da curva de calibração (no mínimo 5 ppm e no máximo 100 ppm). Nessa faixa de concentração o método apresentou-se confiável.

#### **4.2.4. Precisão**

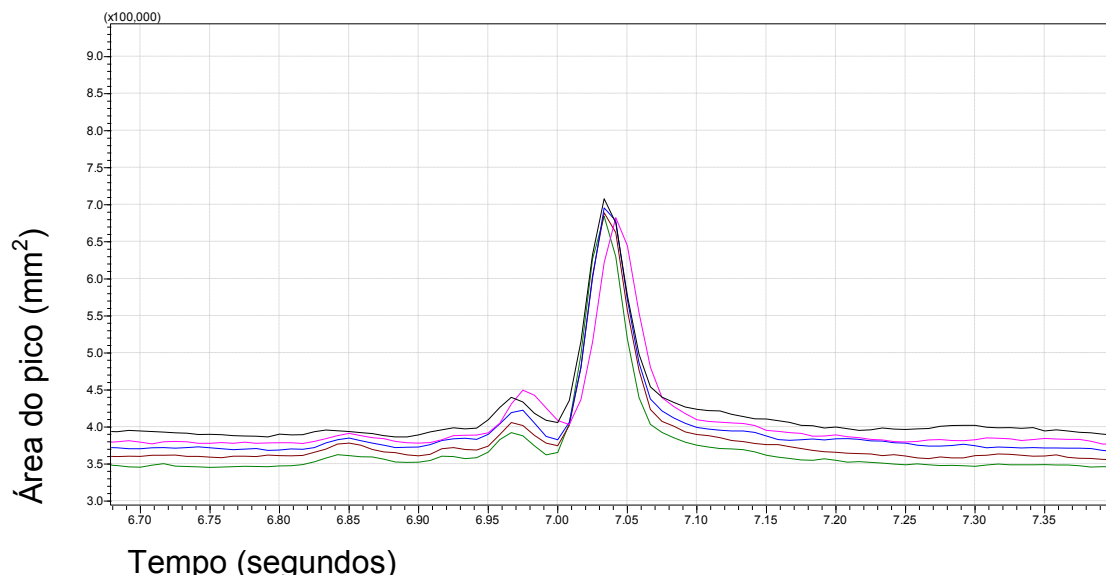
As amostras foram analisadas em cinco repetições e os resultados estão compilados na tabela 3. As imagens 9 a 14 mostram a comparação dos cromatogramas para cada amostra, tanto a área do pico da amostra pura como com adição padrão, quanto a comparação dos cromatogramas com as cinco repetições.

Amostra	Área do pico (mm <sup>2</sup> )	Concentração (ppm)	Amostra mais adição padrão	Área do pico (mm <sup>2</sup> )	Concentração (ppm)	Porcentagem de Recuperação (%)
Amostra 1-1	69,5411	9,89	Amostra 1-1+ 5ppm	120,4797	14,88	99,8
Amostra 1-2	73,2211	10,25	Amostra 1-2+ 5ppm	115,1808	14,36	82,2
Amostra 1-3	73,5681	10,28	Amostra 1-3+ 5ppm	123,3368	15,15	97,4
Amostra 1-4	71,4263	10,07	Amostra 1-4+ 5ppm	115,268	14,36	85,8
Amostra 1-5	71,4865	10,08	Amostra 1-5+ 5ppm	122,2292	15,05	99,4
	<b>Média:</b>	<b>10,1225</b>		<b>Média:</b>	<b>14,76</b>	<b>92,75</b>
Amostra 2-1	298,1564	32,27	Amostra 2-1+ 10ppm	388,2968	41,10	88,3
Amostra 2-2	301,7099	32,62	Amostra 2-2+ 10ppm	392,0897	41,46	88,4
Amostra 2-3	299,3212	32,38	Amostra 2-3+ 10ppm	387,5973	41,03	86,5
Amostra 2-4	302,2102	32,67	Amostra 2-4+ 10ppm	396,8959	41,94	92,7
Amostra 2-5	300,9470	32,54	Amostra 2-5+ 10ppm	399,4559	42,19	96,5
	<b>Média:</b>	<b>32,496</b>		<b>Média:</b>	<b>41,544</b>	<b>90,48</b>
Amostra 3-1	662,562	67,95	Amostra 1-1+ 20ppm	861,4656	87,42	97,35
Amostra 3-2	661,9307	67,88	Amostra 1-2+ 20ppm	856,7756	86,97	95,45
Amostra 3-3	652,0628	66,92	Amostra 1-3+ 20ppm	843,7231	85,68	93,8
Amostra 3-4	654,4186	67,15	Amostra 1-4+ 20ppm	866,2897	87,89	103,7
Amostra 3-5	655,7674	67,28	Amostra 1-5+ 20ppm	875,0156	88,74	107,3
	<b>Média:</b>	<b>67,436</b>		<b>Média:</b>	<b>87,34</b>	<b>99,52</b>

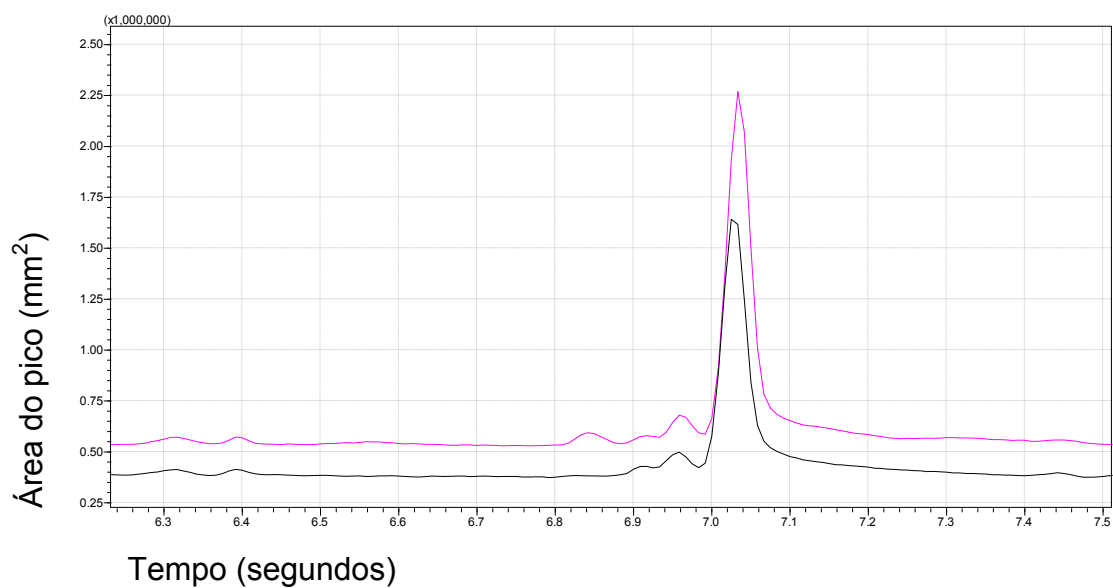
**Tabela 3: Concentrações das amostras e recuperação padrão. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



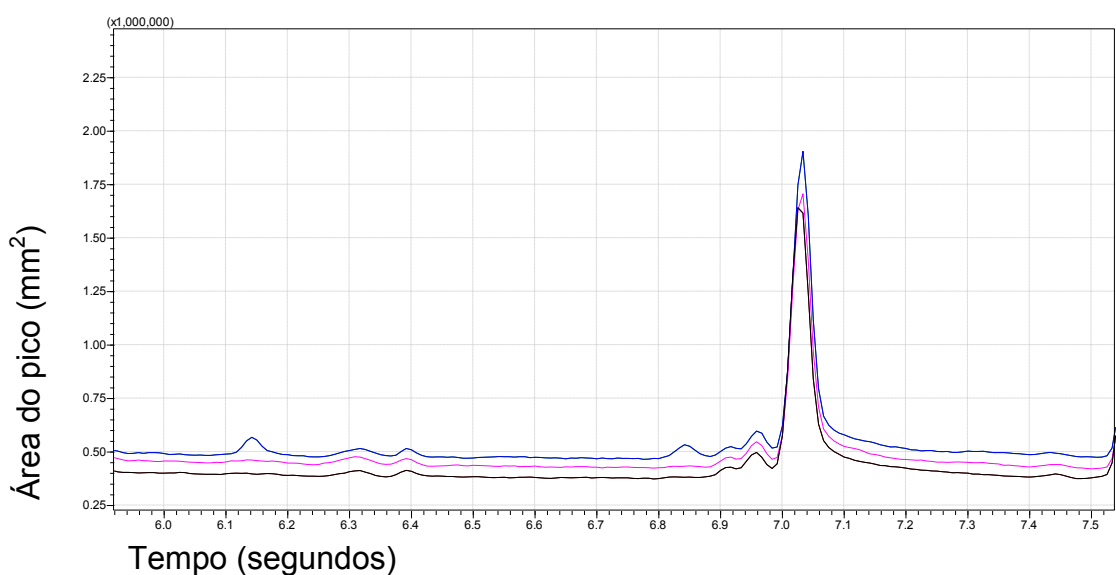
**Figura9:** Picos da amostra 01 onde o preto é a amostra pura e o rosa é a amostra com adição padrão de 5 ppm. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



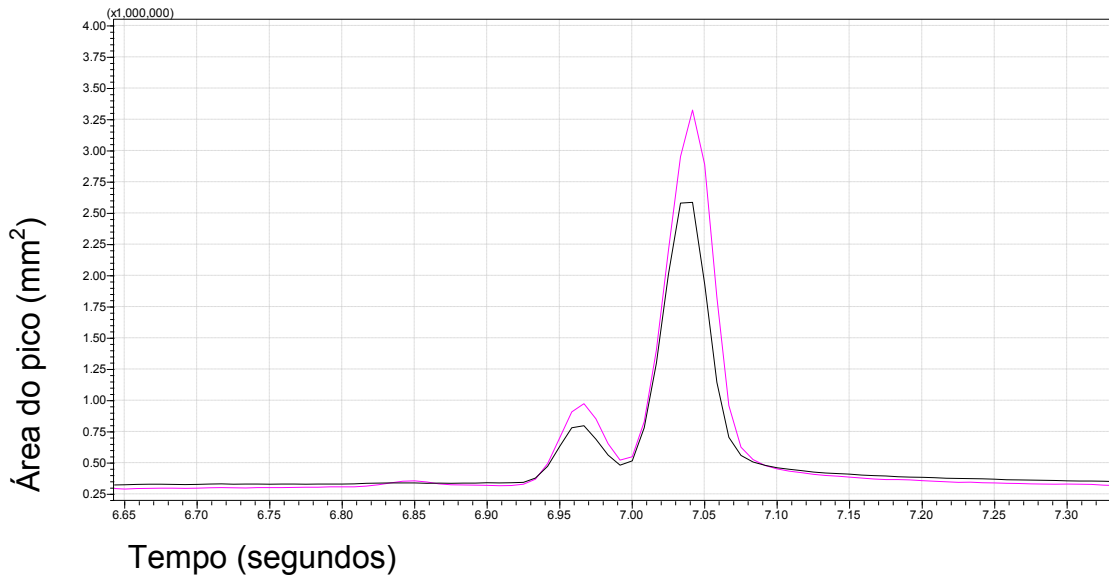
**Figura10:** Sobreposição dos picos da amostra 01. As cinco repetições (1-1 em preto, 1-2 em rosa, 1-3 em azul, 1-4 em vermelho, 1-5 em verde). As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



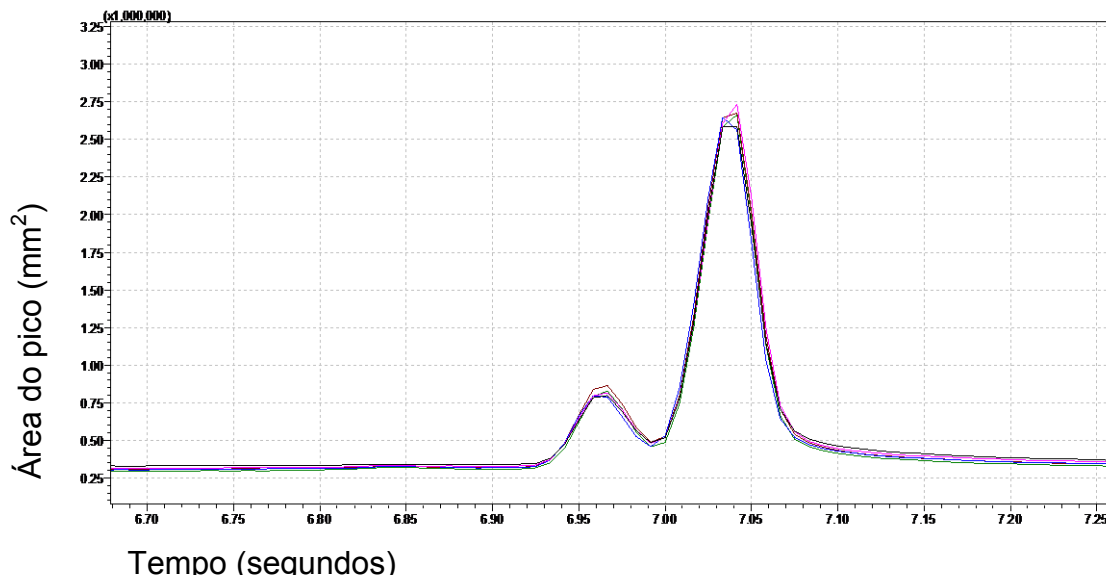
**Figura 11:** Picos da amostra 02 onde o preto é a amostra pura e o rosa é a amostra com adição padrão de 10 ppm. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 12:** Sobreposição dos picos da amostra 02. As cinco repetições (2-1 em preto, 2-2 em rosa, 2-3 em azul, 2-4 em vermelho, 2-5 em verde). O pico 2-4 em vermelho e o 2-5 em verde estão sobrepostos no pico 2-1 em preto. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 13: Picos da amostra 03 onde o preto é a amostra pura e o rosa é a amostra com adição padrão de 20 ppm. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



**Figura 14: Sobreposição dos picos da amostra 03. As cinco repetições (3-1 em preto, 3-2 em rosa, 3-3 em azul, 3-4 em vermelho, 3-5 em verde). As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



O desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%) ficaram abaixo do máximo permitido (5%, segundo o protocolo da ANVISA), como mostra na tabela 04.

Amostra	Média em ppm	Desvio Padrão	Coeficiente de Variação
01	10,12 ppm	0,1575	1,557%
02	32,50 ppm	0,1674	0,515%
03	67,44 ppm	0,4565	0,667%

**Tabela 4: Parâmetros de precisão exigidos pela ANVISA, com os cálculos de desvio padrão e coeficiente de variação**

#### **4.2.5. Limite de detecção**

O limite de detecção não é aplicado nesta validação de metodologia por se tratar de análise de princípio ativo (ANVISA).

#### **4.2.6. Limite de quantificação**

O limite de quantificação não é aplicado na validação desta metodologia (ANVISA).

#### **4.2.7. Exatidão**

As amostras apresentaram um resultado de exatidão satisfatório ficando abaixo do limite de erro relativo (5%, segundo o protocolo da ANVISA) como mostra na tabela 05.

**Cálculo da exatidão = conc. média experimental/conc. teórica x 100**

**Cálculo do erro relativo = (conc. méd. exp. – conc. teórica)/ conc. teórica x100**

Amostra	Concentração média experimental	Concentração teórica	Exatidão	Erro Relativo
01	10,12 ppm	10 ppm	101,23%	1,23%
02	32,50 ppm	32 ppm	101,55%	1,55%
03	67,44 ppm	70 ppm	96,34%	3,66%

**Tabela 5: Parâmetros necessários para a exatidão do método.**

#### **4.2.8. Robustez**

Devido às características do equipamento, as condições analíticas variam muito pouco, pois são controladas automaticamente por *software* e este gera advertências quando algum parâmetro foge do padrão estabelecido (volume e condições de injeção, controle de fluxo de gás, temperaturas, pressões, etc.).

## 5. Amostras analisadas para ajuste de processo na produção de iscas com hidrametilnona.

Para realizar essa análise, foi necessário confeccionar uma nova curva de calibração com o padrão de hidrametilnona.

A nova curva de calibração normalmente é feita quando o equipamento é utilizado em análises de outros analitos ou para realização de manutenção no cromatógrafo com espectrômetro de massas.

Assim, a nova curva de calibração foi elaborada com oito pontos no intervalo de 0 a 100 ppm, como segue na figura 15 e 16 e na tabela 6 a baixo:

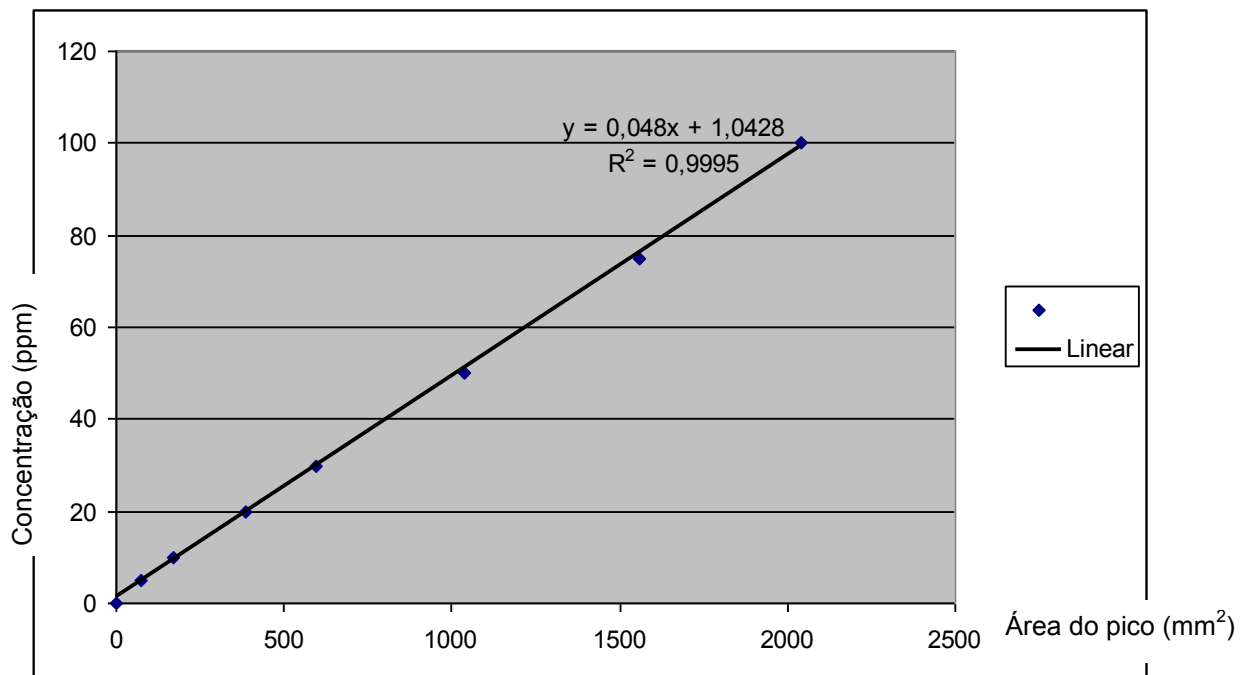
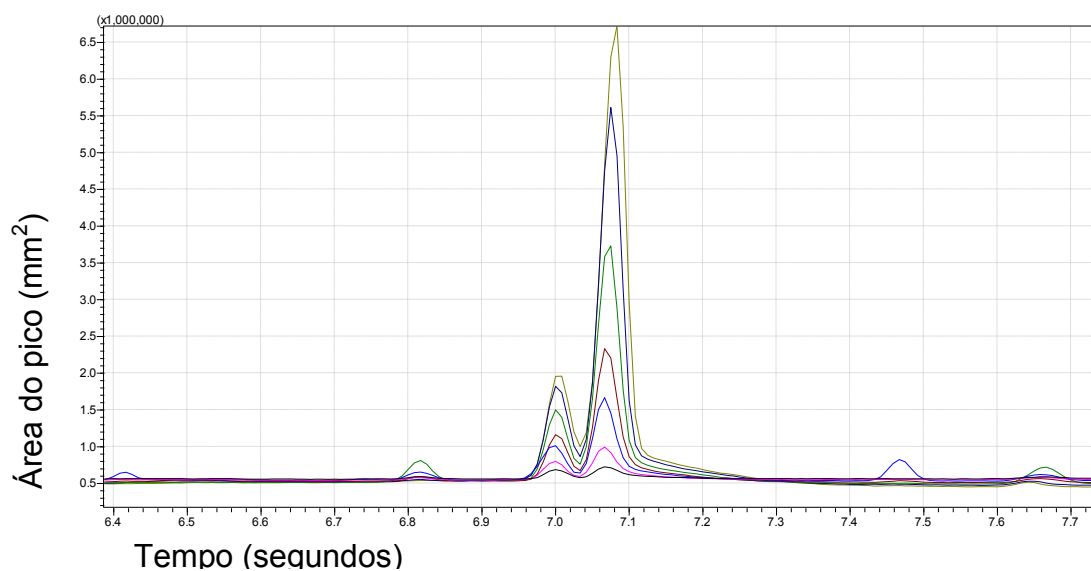


Figura 15: Todos os pontos plotados no gráfico.

Área do pico (mm <sup>2</sup> )	ppm
0	0
76,1615	5
168,9646	10
385,0407	20
596,5715	30
1036,117	50
1559,772	75
2042,613	100

**Tabela 6: Área dos picos x concentração em ppm referente a figura 15. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



**Figura 16: Cromatograma referente à nova curva de calibração. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**

Foram utilizados três produtos diferentes para o estudo do caso. Sendo o eles intitulados por KF, TAP 5K e TAP 5I.

Dos produtos KF foram utilizados 5 amostras (seringas) de partes diferentes do processo de produção, e cada amostra foi analisado em triplicata, sendo a primeira porção (01) referente ao início de cada tubo, a segunda porção (02) ao meio e a terceira porção (03) ao final de cada tubo.

Nas tabelas a baixo (tabelas 7, 8 e 9) seguem os valores obtidos e a sigla referente a cada amostra.

Forma de leitura das siglas:

Exemplo: KF 01 03

KF tipo do produto

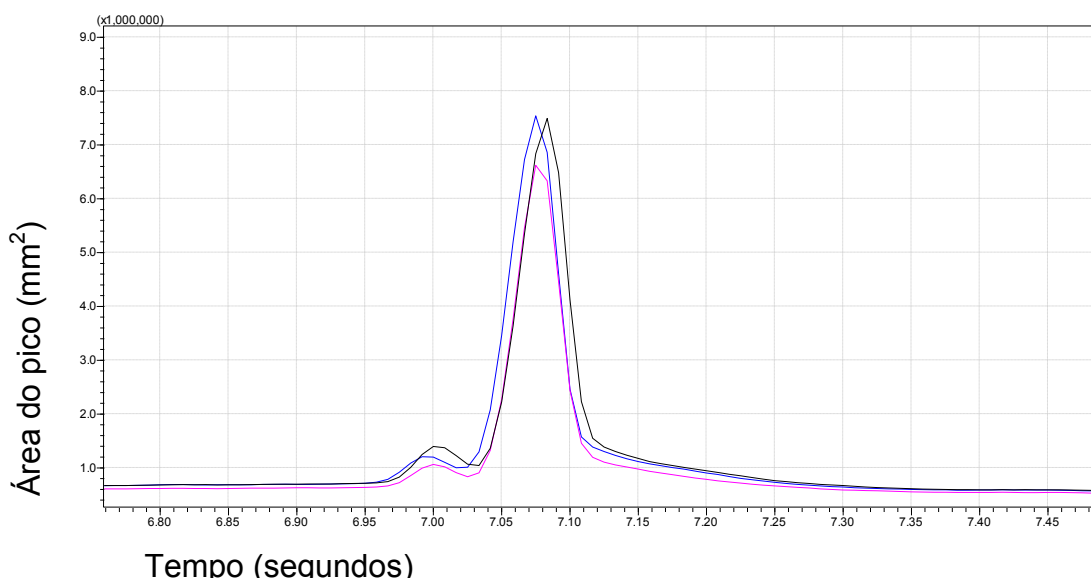
01 – amostra 01

03 – triplicata da amostra.

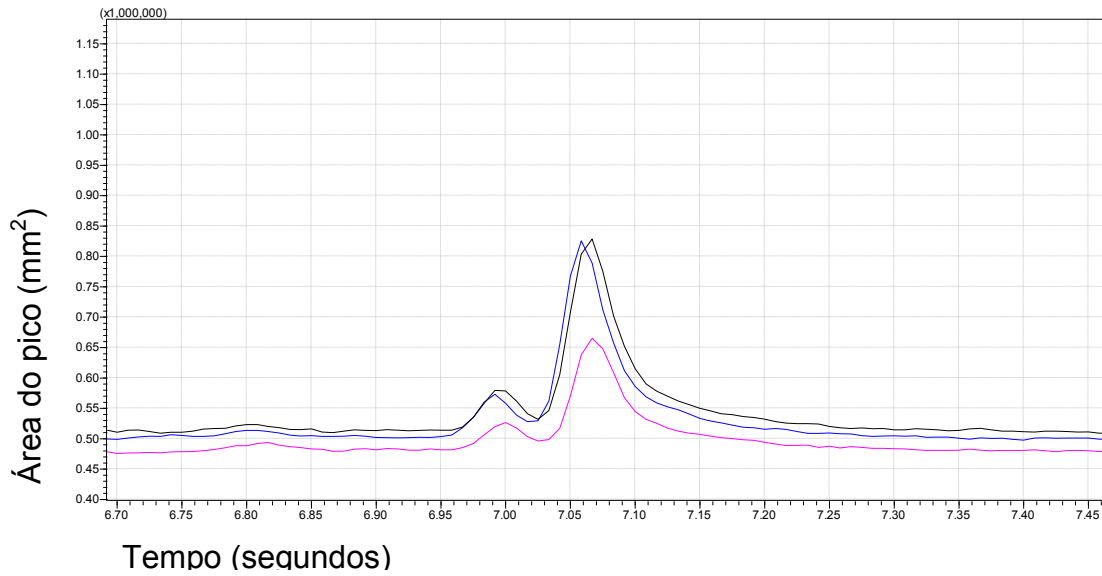
Com os cromatogramas das amostras (com as figuras 17, 18, 19, 20 e 21 referente às amostras da tabela 7; com as figuras 22, 23, 24, 25 e 26 referente às amostras da tabela 8 e com as figuras 27, 28, 29, 30 e 31 referentes às amostras da tabela 9), é possível comparar a quantidade do produto ativo em um mesmo tubo envasado com amostra, mas em porções diferentes como o início, meio e fim. Em todos os cromatogramas, o preto representa a porção 01 do início o rosa representa a porção 02 do meio e o azul à porção 03 do final.

AMOSTRA	Área do pico (mm <sup>2</sup> )	Equação da reta	ppm	Porcentagem Final (%)
KF 01 01	2160,3783	104,7409584	8306,182268	<b>0,831</b>
KF 01 02	1810,1828	87,9315744	5779,268774	<b>0,578</b>
KF 01 03	2245,4057	108,8222736	6243,389191	<b>0,624</b>
KF 02 01	118,4425	6,72804	474,4739069	<b>0,047</b>
KF 02 02	72,8432	4,5392736	383,2227607	<b>0,038</b>
KF 02 03	121,4942	6,8745216	467,4955185	<b>0,047</b>
KF 03 01	21,0743	2,0543664	148,8671304	<b>0,015</b>
KF 03 02	15,2443	1,7745264	116,0200327	<b>0,012</b>
KF 03 03	27,0318	2,3403264	161,4574957	<b>0,016</b>
KF 04 01	100,8827	5,8851696	483,3814867	<b>0,048</b>
KF 04 02	60,6026	3,9517248	367,7733644	<b>0,037</b>
KF 04 03	127,2719	7,1518512	553,3347157	<b>0,055</b>
KF 05 01	397,9601	20,1448848	1647,169648	<b>0,165</b>
KF 05 02	798,5015	39,370872	3892,325457	<b>0,389</b>
KF 05 03	1080,3975	52,90188	3341,874921	<b>0,334</b>

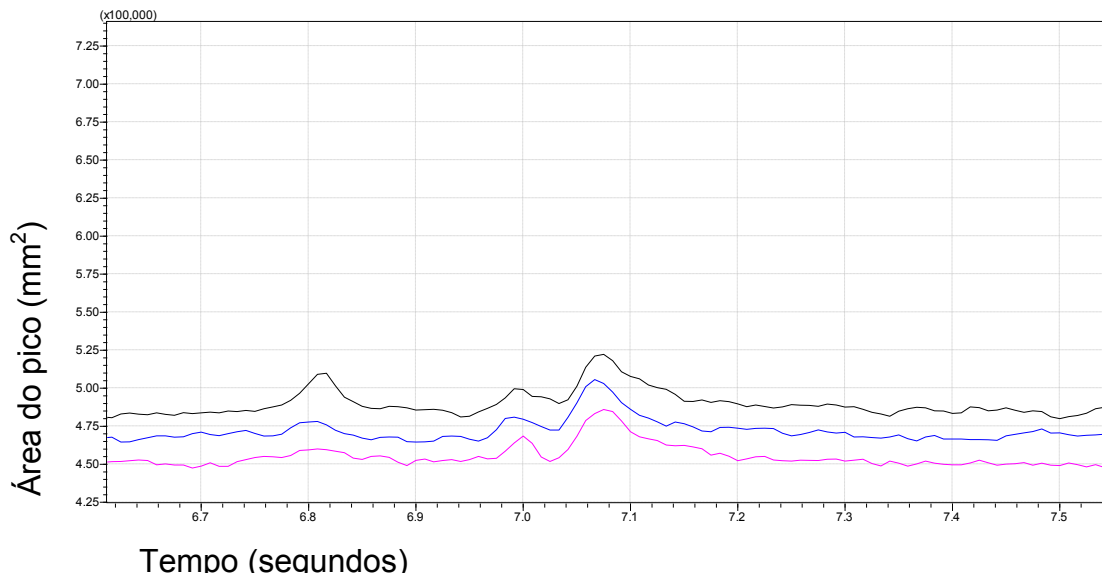
**Tabela 7: Resultados da amostra KF. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



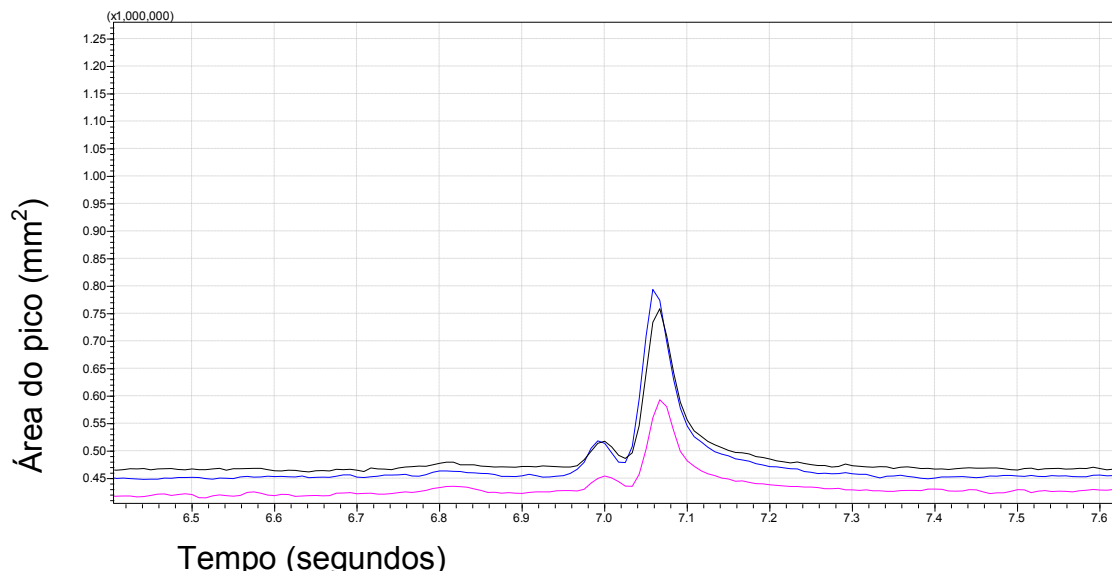
**Figura 17: Cromatograma das amostras KF 01 01 em preto, KF 01 02 em rosa e KF 01 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



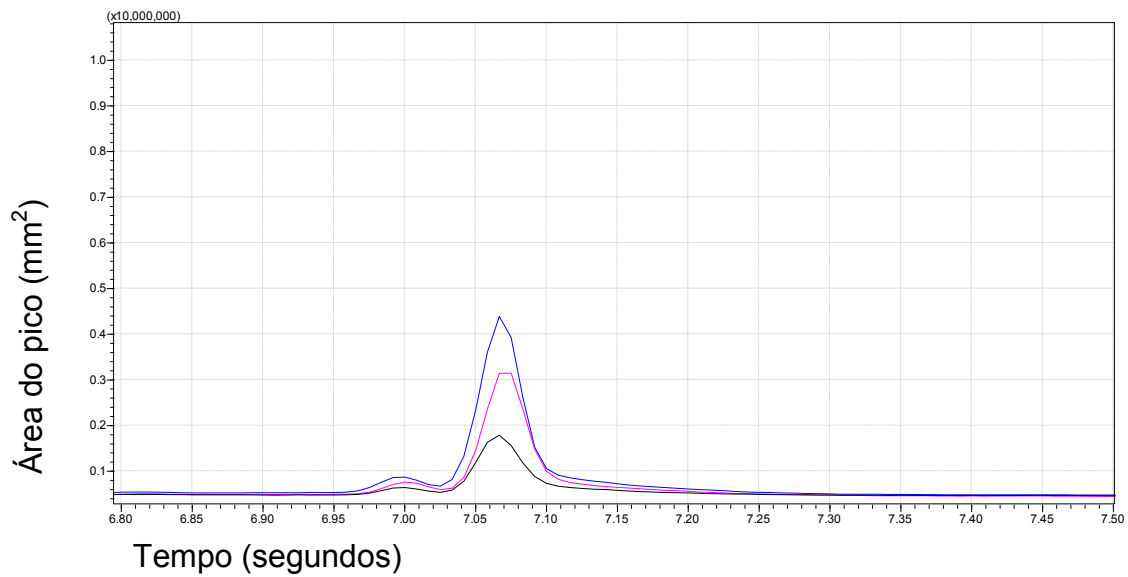
**Figura 18:** Cromatograma das amostras KF 02 01 em preto, KF 02 02 em rosa e KF 02 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 194:** Cromatograma das amostras KF 03 01 em preto, KF 03 02 em rosa e KF 03 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 20:** Cromatograma das amostras KF 04 01 em preto, KF 04 02 em rosa e KF 04 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.

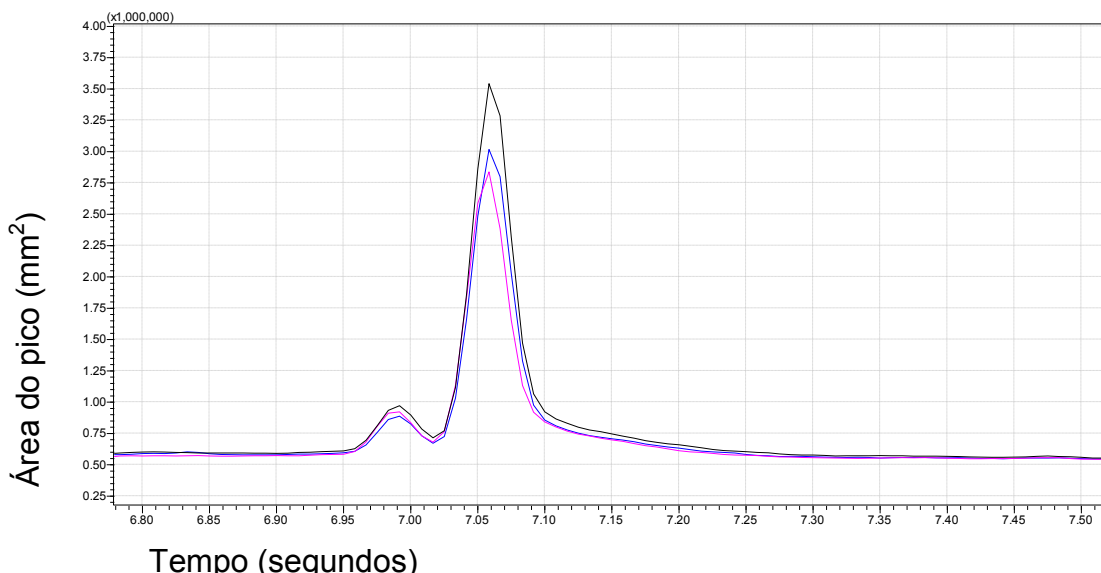


**Figura 21:** Cromatograma das amostras KF 05 01 em preto, KF 05 02 em rosa e KF 05 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.

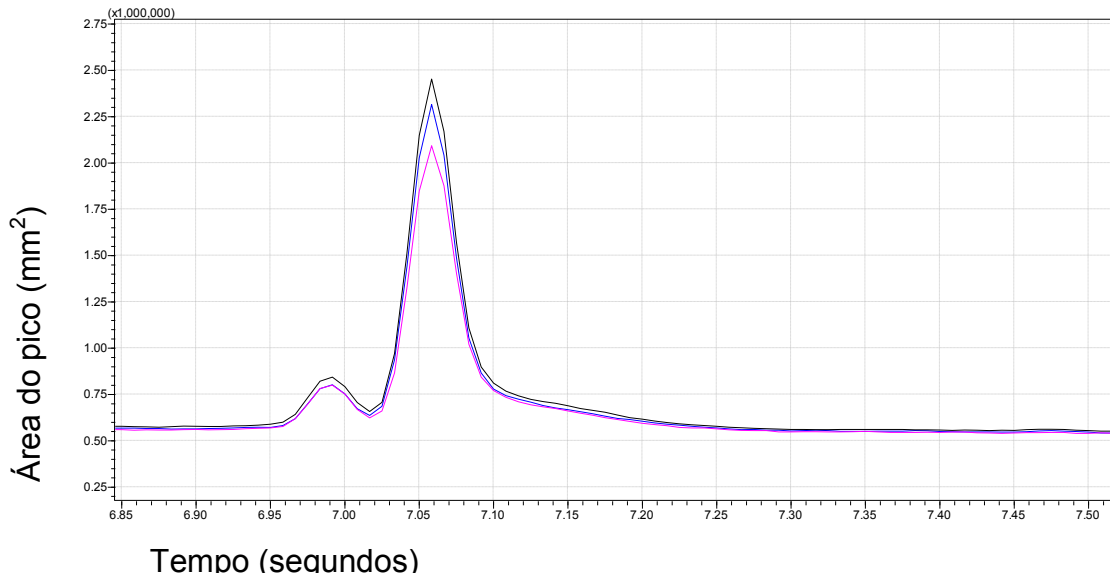


AMOSTRA	Área do pico (mm <sup>2</sup> )	Equação da reta	ppm	Porcentagem Final (%)
TAP 5K 46 01	844,2191	41,5653168	20782,6584	<b>2,078</b>
TAP 5K 46 02	678,1924	33,5960352	16798,0176	<b>1,680</b>
TAP 5K 46 03	703,4723	34,8094704	17063,46588	<b>1,706</b>
TAP 5K 47 01	556,7194	27,7653312	13664,04094	<b>1,366</b>
TAP 5K 47 02	470,8186	23,6420928	9773,49847	<b>0,977</b>
TAP 5K 47 03	518,5288	25,9321824	13005,10652	<b>1,301</b>
TAP 5K 48 01	655,4861	32,5061328	16084,18248	<b>1,608</b>
TAP 5K 48 02	924,6192	45,4245216	20856,07052	<b>2,086</b>
TAP 5K 48 03	842,8184	41,4980832	20442,40552	<b>2,044</b>
TAP 5K 49 01	923,0410	45,348768	18404,53247	<b>1,840</b>
TAP 5K 49 02	991,7585	48,647208	18560,55246	<b>1,856</b>
TAP 5K 49 03	773,7670	38,183616	18571,79767	<b>1,857</b>
TAP 5K 50 01	802,3716	39,5566368	16318,74455	<b>1,632</b>
TAP 5K 50 02	757,0273	37,3801104	18404,78109	<b>1,840</b>
TAP 5K 50 03	759,5774	37,5025152	17069,87492	<b>1,707</b>

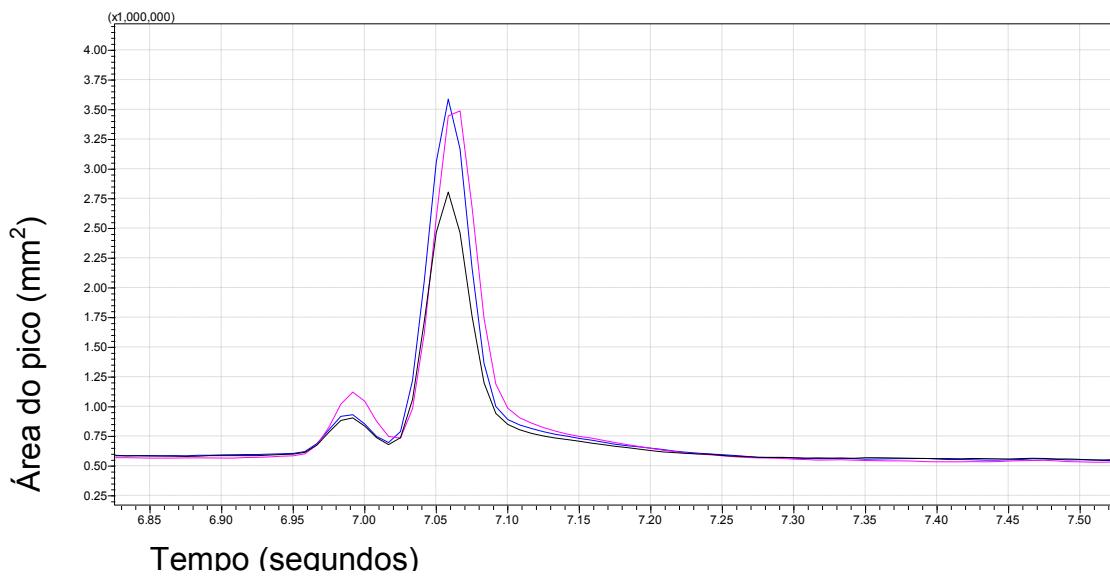
**Tabela 8: Resultados da amostra TAP 5K. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



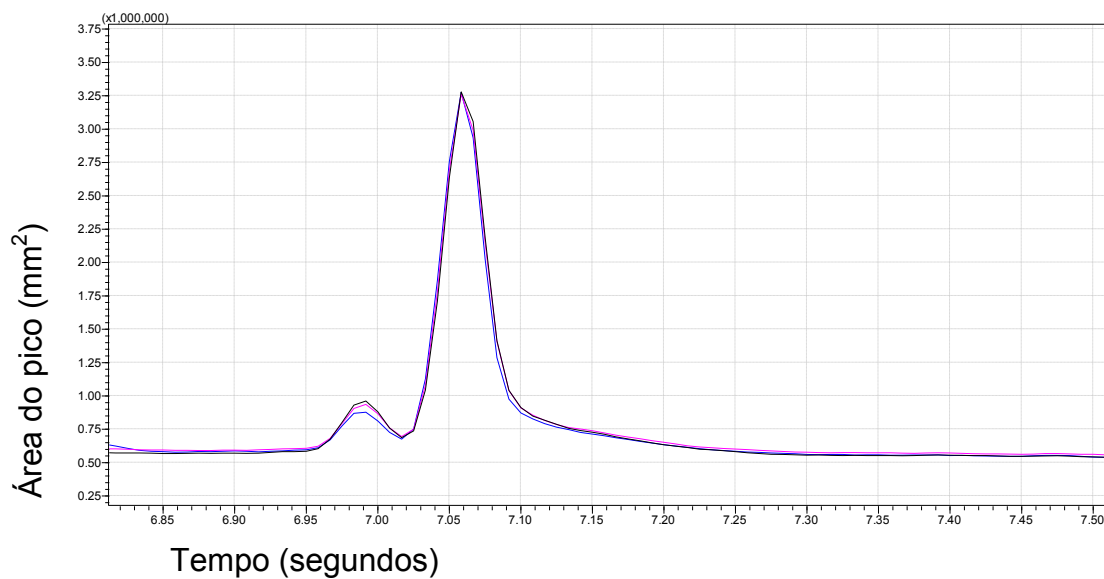
**Figura 22: Cromatograma das amostras TAP 5K 46 01 em preto, TAP 5K 46 02 em rosa e TAP 5K 46 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



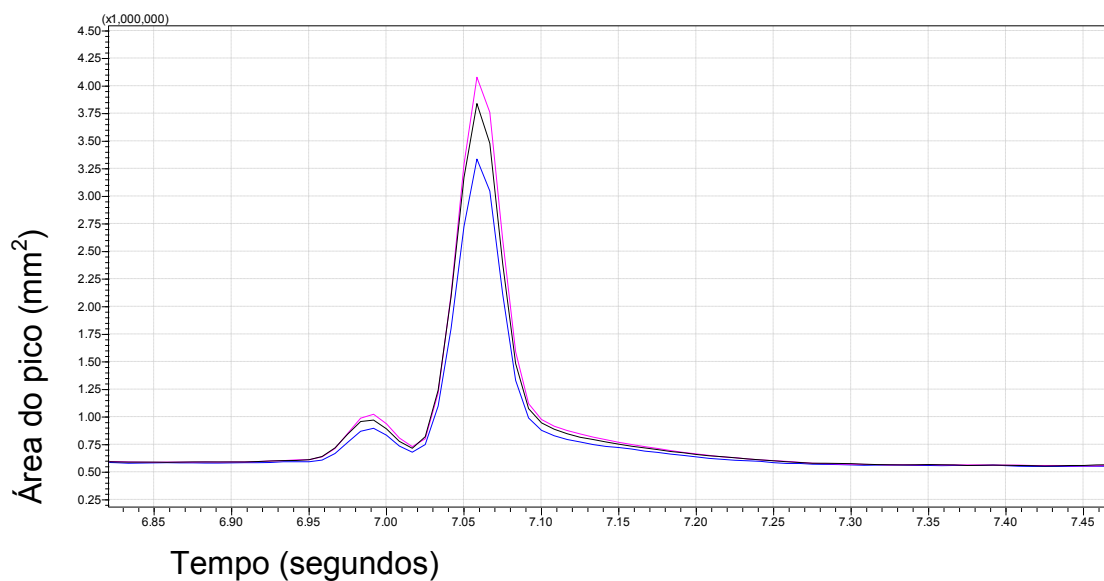
**Figura 23:** Cromatograma das amostras TAP 5K 47 01 em preto, TAP 5K 47 02 em rosa e TAP 5K 47 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 24:** Cromatograma das amostras TAP 5K 48 01 em preto, TAP 5K 48 02 em rosa e TAP 5K 48 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



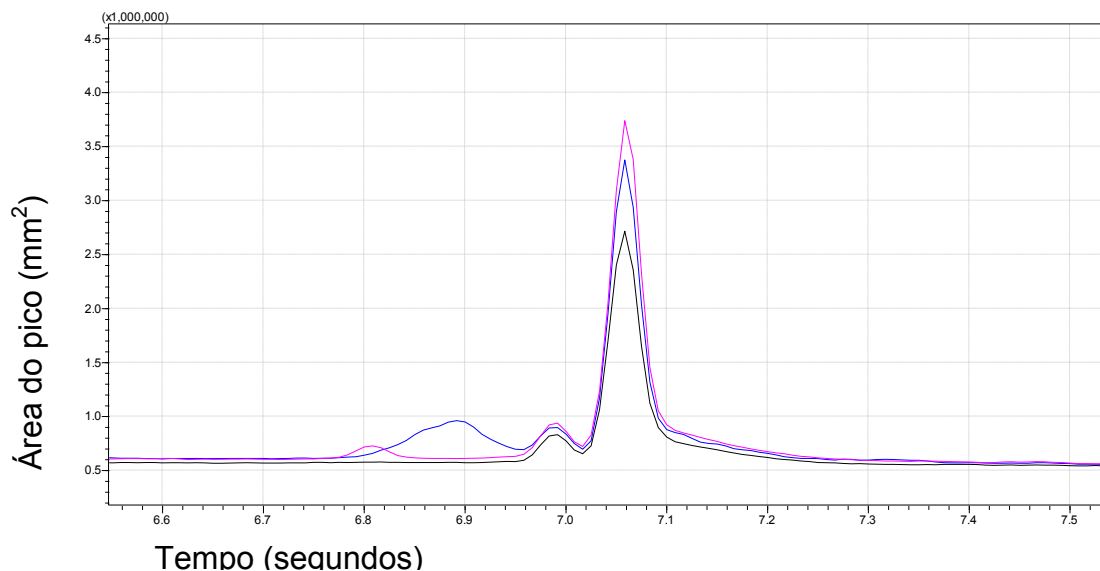
**Figura 25:** Cromatograma das amostras TAP 5K 49 01 em preto, TAP 5K 49 02 em rosa e TAP 5K 49 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



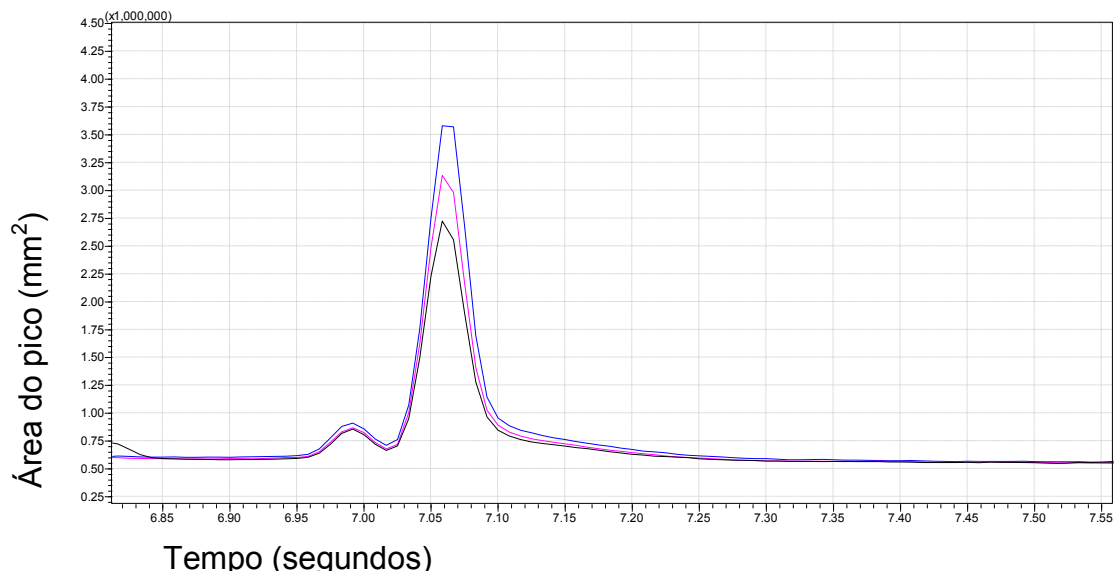
**Figura 26:** Cromatograma das amostras TAP 5K 50 01 em preto, TAP 5K 50 02 em rosa e TAP 5K 50 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.

AMOSTRA	Área do pico (mm <sup>2</sup> )	Equação da reta	ppm	Porcentagem Final (%)
TAP 5I 0071 01	619,2541	30,7669968	14913,71634	<b>1,491</b>
TAP 5I 0071 02	876,3720	43,108656	17523,8439	<b>1,752</b>
TAP 5I 0071 03	685,3617	33,9401616	14254,58278	<b>1,425</b>
TAP 5I 0072 01	629,3107	31,2497136	16191,56145	<b>1,619</b>
TAP 5I 0072 02	717,4089	35,4784272	16703,59096	<b>1,670</b>
TAP 5I 0072 03	872,7328	42,9339744	16513,06708	<b>1,651</b>
TAP 5I 0073 01	1047,9188	51,3429024	17252,31935	<b>1,725</b>
TAP 5I 0073 02	1136,9229	55,6150992	19020,21176	<b>1,902</b>
TAP 5I 0073 03	917,9908	45,1063584	18724,10062	<b>1,872</b>
TAP 5I 0074 01	680,3202	33,6981696	15673,56726	<b>1,567</b>
TAP 5I 0074 02	1396,3241	68,0663568	19227,78441	<b>1,923</b>
TAP 5I 0074 03	927,8778	45,5809344	21520,74334	<b>2,152</b>
TAP 5I 0075 01	1266,9102	61,8544896	19371,90404	<b>1,937</b>
TAP 5I 0075 02	985,2490	48,334752	21529,95635	<b>2,153</b>
TAP 5I 0075 03	1160,6392	56,7534816	21620,37394	<b>2,162</b>

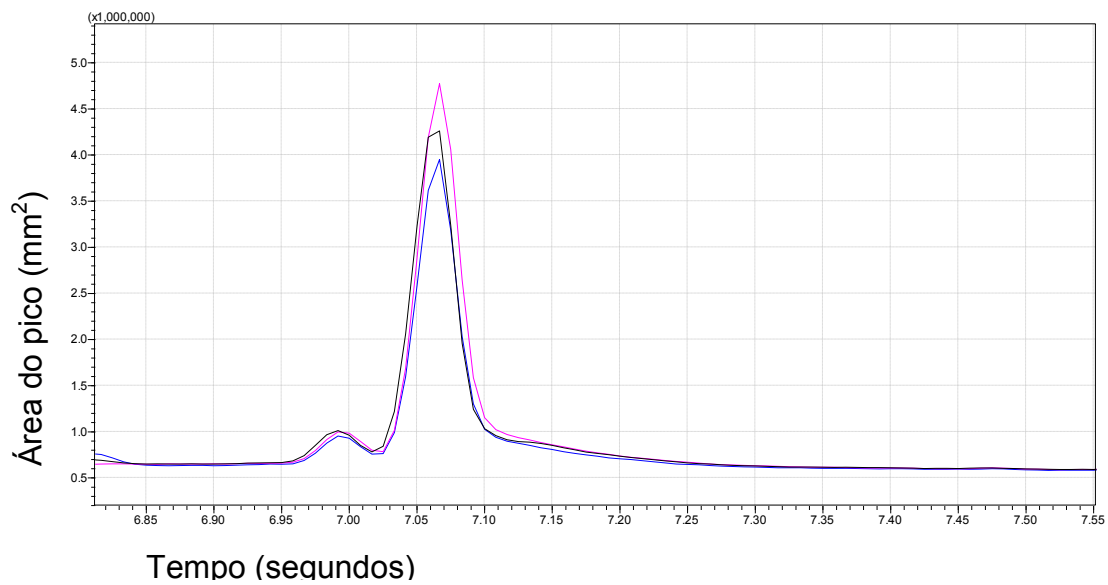
**Tabela 9: Resultados da amostra TAP 5I. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



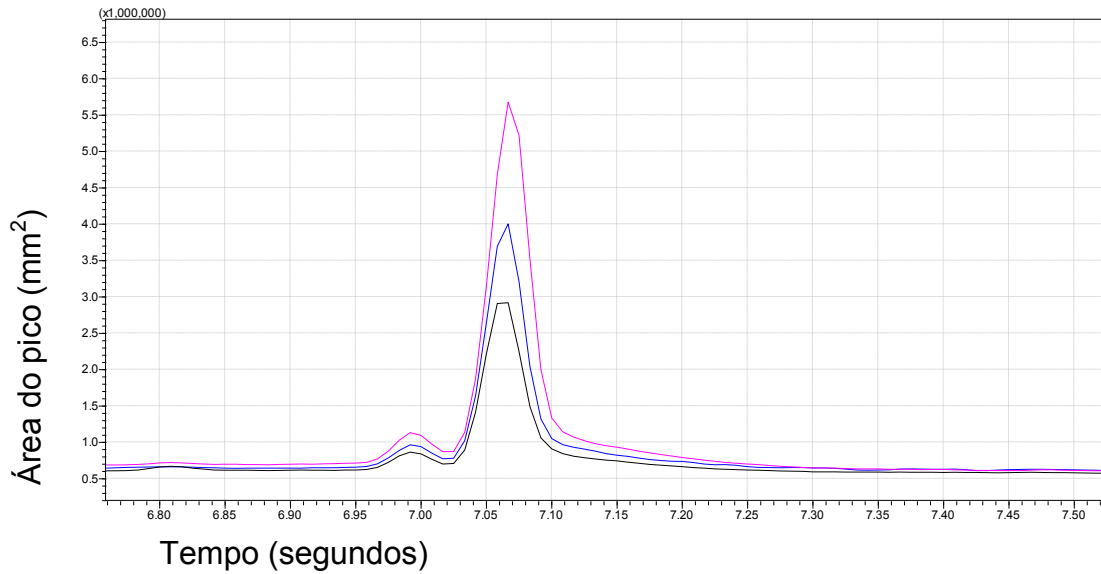
**Figura 27: Cromatograma das amostras TAP 5I 0071 01 em preto, TAP 5I 0071 02 em rosa e TAP 5I 0071 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.**



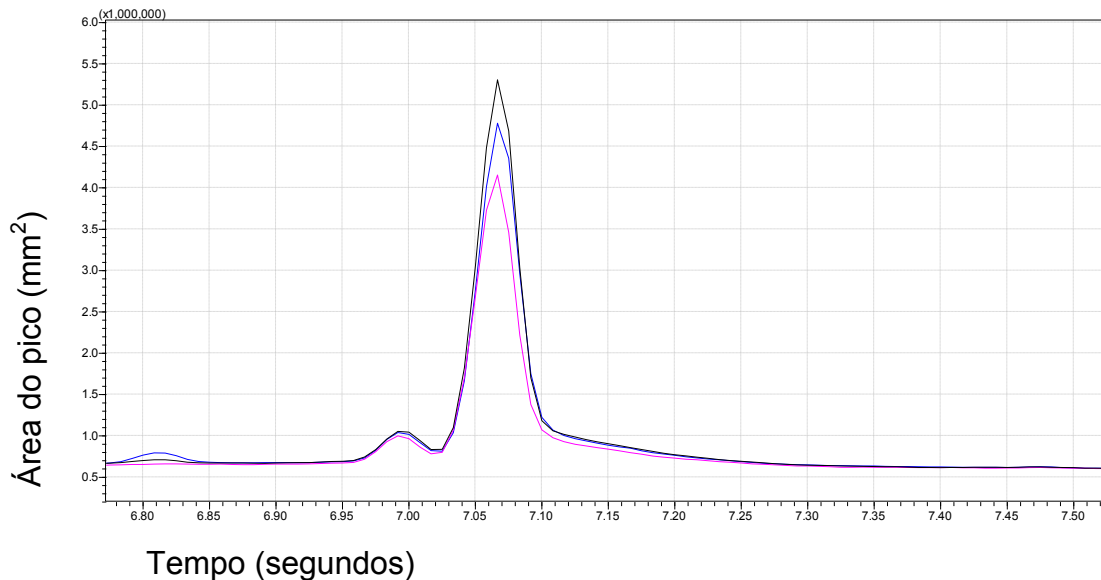
**Figura 28:** Cromatograma das amostras TAP 5I 0072 01 em preto, TAP 5I 0072 02 em rosa e TAP 5I 0072 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 29:** Cromatograma das amostras TAP 5I 0073 01 em preto, TAP 5I 0073 02 em rosa e TAP 5I 0073 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 30:** Cromatograma das amostras TAP 5I 0074 01 em preto, TAP 5I 0074 02 em rosa e TAP 5I 0074 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.



**Figura 31:** Cromatograma das amostras TAP 5I 0075 01 em preto, TAP 5I 0075 02 em rosa e TAP 5I 0075 03 em azul. As análises foram feitas de acordo com as condições descritas em materiais e métodos.

Com essa metodologia proposta aplicada aos produtos de processo de produção, foi possível detectar uma necessidade maior de homogeneização da amostra após a inserção do produto ativo. Pois como o produto ativo é diluído em

óleo e adicionado à massa (compostos atrativos para formiga como farelo de peixe, farelo de bagaço de laranja), se não houver uma efetiva homogeneização o óleo pode se desprender dessa mistura comprometendo a eficácia do produto em relação à concentração do composto ativo quando embalado.

Na tabela 7 a primeira amostra retirada do processo de produção KF 01 é possível observar que após envasado, o óleo se desprende um pouco da mistura e desce para o início da seringa (embalagem ao qual a amostra é comercializada), assim, a porção inicial KF 01 01 apresenta uma porcentagem do princípio ativo maior que a porção do meio KF 01 02 e a porção do final KF 01 0. A figura 17 mostra os cromatogramas comparativos entre essas três amostras.

Relacionado ao mesmo produto KF, a amostra 03 (referente à amostra KF 03 01, KF 03 02, KF 03 03) apresentou teores do princípio ativo muito baixos em relação às outras amostras, mas manteve-se com pouca variação em relação à porcentagem final dos três (KF 03 01 com 0,015%, KF 03 02 com 0,012%, KF 03 03 com 0,016%).

No produto TAP 5K, os teores do princípio ativo encontraram-se em porcentagens finais muito maiores em relação ao produto KF.

Na amostra TAP 5K 46, é possível observar claramente as diferenças nas concentrações da porcentagem final do princípio ativo tanto na tabela 8 como na figura 22, onde a porção inicial TAP 5K 46 01 apresentou teores de 2,078% e na figura do cromatograma está representado em preto, sendo o pico de maior área. A porção final, TAP 5K 46 03, apresentou teores inferiores em relação à porção inicial, 1,706% e está representado em azul na figura do cromatograma com a segunda maior área, e a porção mediana TAP 5K 46 02 apresentou os teores menores, de 1,680%, em relação aos descritos anteriormente desta amostra e está representado em rosa no cromatograma com a menor área dos três.

Na amostra TAP 5K 49, é possível observar tanto na tabela 8 como na figura 25 que a porcentagem final do princípio ativo mantiveram-se praticamente iguais, com TAP 5K 49 01 com 1,840% e representado de preto na figura do cromatograma, TAP 5K 49 02 com 1,856% representado de rosa na figura e TAP 5K 49 03 com 1,857% e representado de azul na figura. Se observar a figura 25, por essa proximidade nas concentrações, não é possível distinguir na imagem a diferenças dos picos porque eles se sobrepõem.

Essa proximidade também se encontra na amostra TAP 5I 0072 como observado na tabela 9, no entanto, ela não é tão acentuada como encontrado na amostra TAP 5K 49. Assim, se observar os dados da tabela 8 (TAP 5I 0072 01 com 1,619%, TAP 5I 0072 02 com 1,670% e TAP 5I 0072 03 com 1,651%) e comparar com a figura 28 do cromatograma, pode-se observar a diferença na intensidade dos

picos e nas suas respectivas áreas. O pico referente à porção TAP 5I 0072 01 está representado em preto e apresenta a menor área, o pico referente ao TAP 5I 0072 02 representado em rosa apresenta uma área e intensidade intermediária e a porção TAP 5I 0072 03 representado em azul, apresenta uma maior área e intensidade.



## **6. Conclusão**

O método desenvolvido neste trabalho mostrou-se bastante eficaz na qualificação e quantificação do ativo hidrametilnona e apresenta vantagens como rapidez, baixo custo e mínima geração de resíduos.

O método proposto demonstrou atender as exigências da ANVISA para produtos comerciais (que apresentam uma quantidade significativa do princípio ativo), portanto passível de ser validado.

## 7. Referencias Bibliográficas

1. CAETANO, M. Recorde, venda de defensivo no país em 2013 atingiu US\$11,5 bi. **Valor Econômico**, São Paulo, 26 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.seagri.ba.gov.br/noticias/2014/06/26/recorde-venda-de-defensivo-no-pa%C3%ADs-em-2013-atingiu-us-115-bi>>. Acesso em: 04 agosto. 2015.
2. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5281875, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281875> (accessed Aug. 4, 2015).
3. USEPA Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Science Information Management Branch: "Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential" (April 26, 2006)
4. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, Revisão 04 – JUL/2011.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº. 899*, de 29/05/2003. Disponível em < [http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs\\_leis/vm/vm1.pdf](http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf)> Acesso em: 16 Março. 2016.
6. J. B. Lovell. **Amidinohydrazones-A new class of insecticides**, Proc. Brit. Crop Prof. Conf Pests Dis. 2, 575 (1979).
7. Unger, Thomas **A. Pesticide synthesis handbook**. William Andrew, 1996.
8. Hollingshaus, J.G., 1987. **Inhibition of mitochondrial electron transport by hydramethylnon: a new amidinohydrazone insecticide**. Pesticide Biochemistry and Physiology 27:61-70.
9. **Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry as a Tool to Investigate Pesticides and Their Degradation Products**. Medana, Claudio; Calza, Paola; Baiocchi, Claudio; Pelizzetti, Ezio. Current Organic Chemistry, Volume 9, Number 9, June 2005, pp. 859-873(15)
10. Reizer, M.L.; Brodbelt, J.S. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 436, 11-20.
11. American Cynamid Company Agricultural Reserach Division Human and Enviromeltal Safety. P.O. BOX 400. **Recommended Method of Analysis – M 2266**.

**AMBRO (CL 217,300): HPLC Method for the Determination of CL 217,300 Residues in Soil.** Princeton, New Jersey.1992.

## 8. Anexo I

### **Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003**

D.O.U. 02/06/2003

O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição, que lhe confere a Portaria n.º 238, de 31 de março de 2003, considerando o disposto no art.111, inciso II, alínea "a" § 3º do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000, considerando que a matéria foi submetida à apreciação da Diretoria Colegiada, que a aprovou em reunião realizada em 6 de março de 2003, resolve:

Art. 1º Determinar a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" anexo

Art. 2º Fica revogada a Resolução RE no 475, de 19 de março de 2002.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

*DAVI RUMEL*

## **ANEXO**

### GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS

#### MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 1. Considerações gerais

1.1. As informações contidas nesse Anexo apresentam as características a serem consideradas durante a validação de procedimentos analíticos. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

1.2. Essas informações aplicam-se a:

1.2.1. técnicas analíticas que façam uso de métodos de cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

1.2.2. métodos não-cromatográficos, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável (por ex. titulometria, espectrofotometria UV-VIS);

1.2.3. testes imunológicos ou microbiológicos, desde que observado o grau de variabilidade usualmente associado a estas técnicas.

1.3. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise.

1.4. Deve-se utilizar substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, será admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados.

1.5. Para efeito desse guia, considera-se corrida analítica as medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas nas mesmas condições: método, analista, instrumentação, local, condições de utilização e em intervalo de tempo curto entre as medições.

1.6. No caso de metodologia analítica descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada.

1.7. No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados a seguir, conforme especificado nas Tabelas 1 e 2.

1.7.1. Especificidade e Seletividade

1.7.2. Linearidade

1.7.3. Intervalo

1.7.4. Precisão

1.7.5. Limite de detecção (sensibilidade)

1.7.6. Limite de quantificação

1.7.7. Exatidão

1.7.8. Robustez

1.8. No caso da transferência de metodologias da matriz para suas subsidiárias no Brasil e/ou das empresas nacionais para os centro de estudos de equivalência farmacêutica, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros de precisão, especificidade e linearidade. Cópia de toda a documentação original da validação da metodologia deverá ser anexada, como prova de que a metodologia foi originalmente validada e deverá conter, no mínimo, todos os parâmetros relacionados no item 1.7.

1.9. Para a garantia da qualidade analítica dos resultados, todos os equipamentos utilizados na validação devem estar devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

1.10. Os testes são classificados em 4 categorias, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade:

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

1.11. Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade:

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II Quantitativo</b>	<b>Categoria II - Ensaio limite</b>	<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
<b>Especificidade</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>Sim</b>
<b>Linearidade</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Intervalo</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Precisão - Repetibilidade</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>Precisão - Intermediária</b>	<b>**</b>	<b>**</b>	<b>Não</b>	<b>**</b>	<b>Não</b>
<b>Limite de Detecção</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Limite de Quantificação</b>	<b>Não</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Exatidão</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>*</b>	<b>*</b>	<b>Não</b>
<b>Robustez</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Sim</b>	<b>Não</b>	<b>Não</b>

1.12. metodologia analítica deverá ser revalidada nas seguintes circunstâncias:

1.12.1. mudanças na síntese da substância ativa;

1.12.2. mudanças na composição do produto acabado;

1.12.3. mudanças no procedimento analítico.

Determinadas outras mudanças podem requerer validação também, dependendo da natureza das mudanças.

## 2. Metodologia

### 2.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

2.1.1. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes.

2.1.2. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopeia ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por ex. luz, calor umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação).

2.1.3. Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente.

## 2.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.



2.2.1. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os intervalos da Tabela 3.

2.2.2. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática.

2.2.3. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ( $r$ ) deve ser = 0,99.

2.2.4. Deve-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático).

### 2.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Tabela 3. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados
	Os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas

Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo,
	o alcance do método deve incluir $-20\%$ sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

## 2.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

2.4.1. Repetibilidade (precisão intra-corrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste;

2.4.2. Precisão intermediária (precisão inter-corrídas): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

2.4.3. Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$DPR = (DP \times 100) / CMD$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

## 2.5. Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas.

2.5.1. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável;

2.5.2. No caso de métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor), esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc).

2.5.3. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação,

$$LD = (DP_a \times 3) / IC$$

em que: DP<sub>a</sub> é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

## 2.6. Limite de Quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra.

2.6.1. O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação,

$$LD = (DP_a \times 10) / IC$$

em que:  $DP_a$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco; IC é a inclinação da curva de calibração.

2.6.2. Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

## 2.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

### 2.7.1. Fármaco

2.7.1.1. aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência);

2.7.1.2. comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida;

## 2.7.2. Forma Farmacêutica

2.7.2.1. na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado);

2.7.2.2. nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.

## 2.7.3. Impurezas

2.7.3.1. análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco;

2.7.3.2. no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado).

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração média experimental}/\text{concentração teórica}) * 100$$

## 2.8. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

A Tabela 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método.

Tabela 4. Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico.

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

## MÉTODOS BIOANALÍTICOS

### 1. Definições

Amostra – termo geral que abrange: controles, brancos, amostras processadas e desconhecidas.

Amostra branco – amostra de uma matriz biológica na qual nenhum analito foi adicionado, utilizada para avaliar a especificidade do método bioanalítico.

Amostra de Controle de Qualidade (CQ) – amostra de matriz biológica adicionada do analito, usada para monitorar o desempenho de um método bioanalítico e para avaliar a integridade e validade dos resultados das amostras desconhecidas analisadas numa corrida individual.

Amostra processada – extrato final (anterior à análise instrumental) de uma amostra que foi submetida a várias manipulações (ex.: diluição, extração, concentração).

Amostra desconhecida – amostra biológica que é objeto de análise.

Analito – composto químico específico a ser mensurado, podendo ser o fármaco não-transformado, biomolécula ou seu derivado, metabólito ou produto de degradação em uma matriz biológica.

Corrida analítica (ou lote) – conjunto completo de amostras em estudo, com um número apropriado de padrões e CQs para sua validação e que tem sua análise completa nas mesmas condições.

Especificidade – habilidade do método bioanalítico de medir e diferenciar o analito de componentes que possam estar presentes na amostra, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz.

Estabilidade – parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo.

Exatidão – representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência.

Faixa de quantificação – corresponde a uma faixa de concentração, incluindo o LSQ e o LIQ, que pode ser confiável e reprodutivelmente quantificada com exatidão e precisão, por meio da relação concentração-resposta.

Limite de Detecção (LD) – menor concentração de um analito que o procedimento bioanalítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo.

Limite Inferior de Quantificação (LIQ) – menor quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão aceitáveis.

Limite Superior de Quantificação (LSQ) – maior quantidade de um analito numa amostra que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão.

Linearidade – corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame (analito).

Matriz biológica – material distinto de origem biológica, que pode ser amostrado e processado de modo reprodutível.

Método – descrição compreensível de todos os procedimentos usados em análises de amostras.

Padrão de calibração – matriz biológica a qual foi adicionada uma quantidade conhecida de analito. Os padrões de calibração são usados para construir a curva de calibração, com a qual são determinadas as concentrações do analito nos CQs e nas amostras desconhecidas em estudo.

Padrão Interno (PI) – composto, geralmente com características estruturais similares ao analito, adicionado aos padrões de calibração e amostras em concentrações conhecidas e constantes, para facilitar a determinação do analito.

Precisão – representa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais, quando o procedimento é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio.

Recuperação – eficiência de extração de um método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras branco acrescidas de padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de soluções padrão não extraídas.

Reprodutibilidade – precisão entre dois laboratórios. Também representa a precisão do método sob as mesmas condições operacionais, num curto período de tempo.



Validação parcial – modificação no método bioanalítico validado que não requer a necessidade de uma revalidação total.

Validação total – estabelecimento de todos os parâmetros de validação de um método bioanalítico, aplicáveis à análise das amostras.

## 2. Considerações gerais

2.1. As informações contidas neste guia aplicam-se a métodos bioanalíticos, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e estas combinadas com espectrometria de massa (MS) tais como LC-MS, LC-MS-MS, CG-MS, CG-MS-MS, utilizados na determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina. Também se aplica a outras técnicas analíticas, tais como métodos microbiológicos e imunológicos, ou para outras matrizes biológicas, embora, nestes casos, pode-se observar um alto grau de variabilidade.

2.2. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados.

2.3. Deve-se utilizar substâncias químicas de referência e /ou padrões biológicos oficializados pela Farmacopeia Brasileira ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente. Serão admitidos estudos utilizando padrões secundários desde que seja comprovada sua certificação, na ausência de substâncias químicas de referência e/ou padrões biológicos farmacopeicos.

2.4. Para os estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência deve-se utilizar padrão interno, sempre que métodos cromatográficos forem utilizados. Deve-se justificar a impossibilidade de sua utilização.

2.5. Deve ser realizada validação total antes da implementação de um método bioanalítico para a quantificação de um fármaco e/ou metabólitos.

2.6. Devem ser realizadas validações parciais quando ocorrerem modificações no método bioanalítico já validado. Os ensaios de validação parcial podem ser desde uma pequena determinação, como a determinação da exatidão e precisão intra-ensaio, até próximo de uma validação total. As mudanças típicas que podem requerer uma validação parcial incluem, entre outras:

2.6.1. transferências de métodos entre laboratórios e analistas;

2.6.2. mudanças na metodologia analítica, por exemplo, substituição do sistema de detecção;

2.6.3. mudança de anticoagulante na coleta das amostras;

2.6.4. mudança de matriz, por exemplo, de plasma para urina;

2.6.5. mudança no procedimento de preparação da amostra;

2.6.6. mudanças relevantes na faixa de concentração;

2.6.7. mudanças de instrumentos e/ou “softwares”;

2.6.8. demonstração de seletividade do analito na presença de medicações concomitantes;

2.6.9. demonstração de seletividade do analito na presença de metabólitos específicos.

2.7. A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser adequadamente controladas ou precauções deverão ser incluídas no procedimento. Exemplos de variações:

2.7.1. estabilidade das soluções analíticas.

2.7.2. tempo de extração.

Variações típicas em cromatografia líquida:

2.7.3. influência da variação de pH da fase móvel.

2.7.4. influência da variação da composição da fase móvel.

2.7.5. diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes).

2.7.6. temperatura.

2.7.7. velocidade de fluxo.

Variações típicas em cromatografia gasosa:

2.7.8. diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes);

2.7.9. temperatura;

2.7.10. velocidade de fluxo.

3. Validação pré – estudo

3.1. Especificidade

3.1.1. Deve-se analisar amostras da matriz biológica (sangue, plasma, soro, urina, ou outra) obtidas de seis indivíduos, sendo quatro amostras normais, uma lipêmica e uma hemolisada, sob condições controladas referentes ao tempo, alimentação e outros fatores importantes para o estudo. Cada amostra branco deve ser testada utilizando o procedimento e as condições cromatográficas propostas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos com solução aquosa do analito, em concentração próxima ao LIQ.

3.1.2. Qualquer amostra branco que apresentar interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, metabólito ou padrão interno, deve ser rejeitada. Caso uma ou mais das amostras analisadas apresentarem tal interferência, novas amostras de outros seis indivíduos devem ser testadas. Caso uma ou mais das amostras deste grupo apresentarem interferência significativa no tempo de retenção do fármaco, o método deve ser alterado visando eliminá-la.

3.1.3. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao

estudo. A interferência da nicotina, cafeína, produtos de venda isenta de prescrição e metabólitos deve ser considerada sempre que necessário.

3.1.4. Caso o método seja destinado à quantificação de mais de um fármaco, cada um deve ser injetado separadamente para determinar os tempos de retenção individuais e assegurar que impurezas de um fármaco não interfiram na análise do outro.

3.1.5. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco deve ser inferior a 20% da resposta do LIQ. As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do fármaco e do padrão interno devem ser inferiores, respectivamente, a 20% e 5% da resposta na concentração utilizada.

### 3.2. Curva de calibração/linearidade

3.2.1. A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito. Deve-se gerar uma curva de calibração para cada fármaco e corrida analítica, a qual será usada para calcular a concentração do fármaco nas amostras, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A curva de calibração deve incluir a análise da amostra branco (matriz biológica isenta de padrão do fármaco e do padrão interno), da amostra zero (matriz biológica mais o padrão interno) e de, no mínimo, 6 (seis) amostras contendo padrão do fármaco e padrão interno, contemplando o limite de variação esperado, do LIQ até 120% da concentração mais alta que se pretende analisar.

3.2.2. Para a determinação da curva de calibração, deve-se analisar amostras extraídas da matriz apropriada, no mínimo 6 (seis) concentrações diferentes. Procedimentos alternativos devem ser justificados, como na obtenção de uma correlação não-linear, em que um maior número de concentrações de padrões serão necessários.

3.2.3. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Deve-se apresentar as curvas obtidas (experimental e a resultante do tratamento matemático), o coeficiente de correlação linear, o coeficiente angular e o intercepto da reta.

#### 3.2.4. Critérios de aceitação da curva de calibração:

3.2.4.1. desvio menor ou igual a 20% (vinte por cento) em relação a concentração nominal para o LIQ;

3.2.4.2. desvio menor ou igual a 15 % (quinze por cento) em relação à concentração nominal para as outras concentrações da curva de calibração;

3.2.4.3. no mínimo quatro de seis concentrações da curva de calibração devem cumprir com os critérios anteriores, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração;

3.2.4.4. o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,98.

#### 3.3. Precisão

3.3.1. A repetibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração.

3.3.2. A precisão deve ser determinada em uma mesma corrida (precisão intra-corrída) e em corridas diferentes (precisão inter-corrídas).

3.3.3. Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o LIQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%, segundo a fórmula:

$$DPR = (DP/CMD)*100$$

onde, D P é o desvio padrão e C M D, a concentração média determinada.

#### 3.4. Exatidão

3.4.1. A exatidão do método deve ser determinada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração.

3.4.2. A exatidão deve ser determinada em uma mesma corrida analítica (exatidão intra-corrída) e em corridas diferentes (exatidão inter-corrídas).

3.4.3. O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

3.4.4. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração média experimental}/\text{concentração teórica}) * 100$$

3.5. Limite inferior de quantificação (LIQ)

3.5.1. Estabelecido por meio da análise de matriz biológica contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis.

3.5.2. Pode-se, também, utilizar a razão de 5:1 entre o sinal e o ruído da linha de base, devendo-se especificar o método utilizado para determinação do LIQ.

3.5.3. O LIQ deve ser, no mínimo, cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do fármaco.

3.5.4. O pico de resposta do fármaco no LIQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% (vinte por cento) e exatidão de 80 – 120 % (oitenta a cento e vinte por cento), através da análise de, no mínimo, 5 (cinco) amostras de padrões.

3.6. Limite de detecção (LD)

Estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

3.7. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém, admite-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

3.7.1. Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta),

contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

3.7.2. O cálculo da recuperação deve ser feito em função da relação de área do padrão extraído e não extraído, tanto para o analito quanto para o padrão interno separadamente.

### 3.8. Controle de qualidade (CQ)

3.8.1. CQ do limite inferior de quantificação (CQ-LIQ): mesma concentração de LIQ.

3.8.2. CQ de baixa concentração (CQB): menor ou igual 3 x LIQ.

3.8.3. CQ de média concentração (CQM): aproximadamente a média entre CQB e CQA

3.8.4. CQ de alta concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

### 3.9. Estudo de estabilidade do fármaco em líquidos biológicos:

#### 3.9.1. Considerações específicas relevantes

Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, limite de variação e robustez, previamente validados.

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do

analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas.

As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência.

### 3.9.2. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Deve-se testar a estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento, por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém preparadas.

### 3.9.3. Estabilidade de curta duração

Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Cada uma delas deverá permanecer à temperatura ambiente de 4 (quatro) a 24 (vinte e quatro) horas (baseado no tempo em que as amostras do estudo serão mantidas à temperatura ambiente) e analisadas. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém preparadas.

### 3.9.4. Estabilidade de longa duração

3.9.4.1. O tempo de armazenamento para o estudo de estabilidade de longa duração deve exceder o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, de acordo com o cronograma apresentado no protocolo de estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.



3.9.4.2. A temperatura utilizada no ensaio deve reproduzir a recomendada para armazenamento das amostras, normalmente igual a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

3.9.4.3. Para verificação dessa estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. As concentrações de todas as amostras de estabilidade devem ser comparadas com a média dos valores anteriormente calculados para as amostras do primeiro dia do teste.

### 3.9.5. Estabilidade pós-processamento

Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, deve-se realizar estudo de estabilidade do fármaco, na amostra processada para análise, incluindo o padrão interno, na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração da corrida analítica.

Utiliza-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

### 3.9.6. Estabilidade das soluções-padrão

3.9.6.1. Deve ser avaliada a estabilidade das soluções-padrão do fármaco e do padrão interno, mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 6 (seis) horas após preparação.

3.9.6.2. Em caso de tais soluções serem armazenadas sob refrigeração ou congelamento, a estabilidade também deve ser avaliada, contemplando a temperatura e o período de armazenamento das mesmas.

3.9.6.3. Os resultados desse teste devem ser comparados com aqueles obtidos utilizando-se soluções recentemente preparadas do fármaco e do padrão interno.

### 3.9.7. Análise dos resultados

As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o

qual se aceita desvio de até 20%. Qualquer que seja o método estatístico utilizado para avaliar os resultados dos estudos de estabilidade, este deverá estar descrito claramente no procedimento operacional padrão (POP).

#### 4. Critérios de aplicação do método bioanalítico validado

4.1. A análise de todas as amostras de um analito em matriz biológica deve ser concluída dentro do período de tempo para o qual a estabilidade tenha sido determinada.

4.2. Uma corrida analítica deve conter: amostras de CQ, padrões de calibração e amostras desconhecidas de um ou mais voluntários do estudo. É preferível que todas as amostras de um mesmo voluntário sejam analisadas numa única corrida.

4.3. Não é permitido estimar a concentração das amostras através de extrapolação da curva de calibração abaixo do LIQ ou acima do maior padrão. Em vez disso, a curva deve ser redefinida ou as amostras de concentrações superiores devem ser diluídas e re-analisadas.

4.4. No uso rotineiro do método analítico validado, sua precisão e exatidão devem ser monitoradas regularmente para assegurar a continuidade do desempenho satisfatório. Para atingir este objetivo, amostras de CQ devem ser analisadas juntamente com as demais amostras, em cada corrida analítica.

4.5. As amostras de CQ devem ser incorporadas em intervalos adequados, dependendo do número total de amostras da corrida, sempre em igual número de replicatas de cada concentração (CQB, CQM e CQA).

4.6. O número de amostras de CQ (em múltiplos de três) a ser incorporado em cada corrida analítica não deve ser inferior a 5% (cinco por cento) do número de amostras desconhecidas. Para corridas analíticas constituídas de até 120 amostras, pelo menos 6 (seis) CQs (uma duplicata de cada concentração) devem estar presentes.

4.7. Os resultados das amostras de CQ servirão de base para aceitação ou rejeição da corrida analítica. No mínimo, 67% (quatro de seis) das amostras de CQ devem estar dentro de mais ou menos 15% dos seus respectivos valores nominais, exceto para o LIQ, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%; 33% (duas de

seis) amostras de CQ podem estar fora destes limites, mas não para a mesma concentração.

---

Marcela Paula Silva

---

Orientador: Osmar Malaspina