



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição

**VALIDAÇÃO E CÁLCULO DA INCERTEZA DE MÉTODOS
CLÁSSICOS: TITULOMÉTRICOS E
ESPECTROFOTOMÉTRICOS UTILIZADOS NA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO**

Marlene Jerônimo

Araraquara

2012



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição**

**VALIDAÇÃO E CÁLCULO DA INCERTEZA DE MÉTODOS
CLÁSSICOS: TITULOMÉTRICOS E
ESPECTROFOTOMÉTRICOS UTILIZADOS NA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO**

Marlene Jerônimo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas para obtenção do grau de Doutora em Alimentos e Nutrição – Área de Ciências dos Alimentos.

Orientador: Dr. José Paschoal Batistuti

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

J56v Jerônimo, Marlene
Validação e cálculo da incerteza de métodos clássicos: titulométricos e espectrofotométricos utilizados na determinação de ácido ascórbico / Marlene Jerônimo. – Araraquara, 2012
194 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição
Orientador: José Paschoal Batistuti

1. Vitamina C. 2. Análise de fármacos. 3. Adequação para uso. I. Batistuti, José Paschoal, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

Comissão Examinadora

Prof. Dr. JOSE PASCHOAL BATISTUTI (FCFAR/UNESP)

Orientador

Prof. Dr. RUBENS MONTI (FCFAR/UNESP)

Prof^ª Dra. Célia Maria de Sylos (FCFAR/UNESP)

Prof. Dr. FERNANDO LUIS FERTONANI (IBILCE/UNESP)

Profa. Dra. SUELI CIABOTTI (IFTM/Uberaba)

***Dedico este trabalho ao Roberto,
pelo amor que me incentiva sempre,
pelos valores e sonhos compartilhados
e aos meus filhos, Breno e Yago.***

Agradecimentos Especiais

A Deus... pela vida e pelos dons da força, da garra, da coragem e da determinação... que me fizeram caminhar, mesmo pelos caminhos mais tortuosos!

Aos meus pais que me deram a vida...

Amo vocês!

Ao meu marido, que sempre acreditou no meu trabalho e me deu força em todos os momentos de nossas vidas com todo amor.

Aos meus filhos que são as joias da minha vida.

Agradeço em especial ao prof. Paschoal por ter acreditado em mim e ter me dado a chance de chegar até aqui.

Aos amigos da pós-graduação pelos momentos felizes juntos, em especial a Ozeni e Estelamar.

A Elizene pela ajuda, acolhimento, carinho e apoio na realização dos experimentos.

Serei eternamente grata ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da FCF – UNESP – Araraquara/SP, e a todos os profissionais que tive o prazer de conviver e receber conhecimentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Grata!

RESUMO

Os laboratórios de análise de alimentos e fármacos necessitam demonstrar competência técnica para garantia da qualidade dos ensaios que realizam, assegurando a confiabilidade e comparabilidade dos resultados que emitem que subsidiam tomadas de decisões relativas a aspectos econômicos, de saúde pública e defesa do consumidor. O presente trabalho apresenta uma abordagem metrológica de métodos clássicos e instrumental para a determinação do ácido ascórbico (AA). Os parâmetros de validação de todos os métodos de análise abordados neste trabalho e o cálculo da incerteza atenderam as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Os métodos clássicos validados foram: N-Bromosuccinamida (NBS), Iodo, Iodato de Potássio e Método do 2,6 diclorofenol-indofenol (DCFI). O método instrumental validado foi o espectrofotométrico, utilizando o reagente 2,6 diclorofenol-indofenol. Os parâmetros avaliados foram: a faixa linear de trabalho, seletividade, linearidade, precisão pela norma da American Society for Testing and Materials (ASTM E 691-99) (sn), precisão por repetição (sr), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), robustez (teste de Younden-Steiner) e incerteza genérica. A linearidade avaliada pela análise de resíduo (Y-Yo) mostra que a curva é linear em toda a sua extensão ensaiada em todos os métodos validados e eles foram precisos, robustos e exatos. A importância da validação de métodos analíticos está na obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.

Palavras-chave: vitamina C; análise de fármacos; adequação para uso.

ABSTRACT

The laboratory analysis of food and drugs need to demonstrate technical competence for quality assurance tests to perform, ensuring the reliability and comparability of results that give off that support decision making on economic, public health and consumer protection. This paper presents a metrological approach of classical methods and instrument for the determination of ascorbic acid (AA). The validation parameters of all methods of analysis in this paper and the calculation of uncertainty within the guidelines of ISO-IEC-17025-Guide and EURACHEM guides. The classical methods have been validated: N-Bromosuccinamida (NBS), Iodine, Potassium iodate method and 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPI). The instrumental method was validated spectrophotometric reagent using 2,6-dichlorophenol indophenol. The parameters evaluated were: the linear range of work, selectivity, linearity, accuracy in the standard American Society for Testing and Materials (ASTM E 691-99) (sn), by repetition accuracy (sr), limit of detection (LD), limit of quantification (LQ), robustness (test-Youden Steiner) and general uncertainty. Linearity was assessed by residual analysis (Y-Yo) shows that the curve is linear over its entire length in all tested methods validated and they were accurate and robust. The importance of validation of analytical methods is to obtain reliable results and suitable for intended use.

Keywords: vitamin C, analysis of drugs, fitness for use.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas do ácido ascórbico	24
Figura 2: Primeira ionização do ácido L-ascórbico	26
Figura 3: Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico	27
Figura 4: Diferentes níveis e ferramentas de garantia da qualidade na acreditação de sistemas de gestão de laboratórios	32
Figura 5: Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de feixe simples.....	57
CAPÍTULO 1	
Figura 1.1 - Curva analítica: método estequiométrico para determinação de AA empregando NBS como agente titulante	78
Figura 1.2 - Avaliação da linearidade a partir dos resíduos ($Y-Y_0$), obtidos a partir dos valores de mAA _{determinada} e dos valores de (Y_0) calculados a partir dos valores de mAA _{adicionada} empregando NBS como agente titulante	79
Figura 1.3 - Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho baseado na correlação (U/x)% x mAA para NBS	80
Figura 1.4 - Determinação da precisão por repetitividade para NBS ...	81
Figura 1.5 - Valores de s/s_r, (k), ($s_r=1,59$) calculados o para os diferentes valores de mAA _{determinada} para NBS	82
Figura 1.6 - Determinação da $U_{genérica}$ ($X_{média} - MR$) para NBS	85
Figura 1.7 - Percentagem de recuperação (R%) como função da massa de AA empregada na fortificação da amostra de suco para NBS	88
CAPÍTULO 2	
Figura 2.1 - Curva analítica do método estequiométrico para determinação de AA para lodo	104
Figura 2.2 - Avaliação da linearidade a partir dos resíduos ($Y-Y_0$), obtidos a partir dos valores de mAA _{determinada} e dos valores de (Y_0) calculados a partir dos valores de mAA _{adicionada} para método do lodo....	105
Figura 2.3 - Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho para lodo, baseado na correlação $\pm s/x$ x mAA	106
Figura 2.4 - Determinação da precisão por repetitividade para lodo..	107
Figura 2.5 - Valores de s/s_r ($s_r=0,56mg$) calculados o para os diferentes valores de mAA _{determinada} para lodo.....	108
Figura 2.6 - Representação da incerteza genérica ($I_{genérica}$) como função de p . Erro relativo < 1,3% para lodo	112
Figura 2.7 - Representação gráfica da percentagem de recuperação (R%) como função da massa de AA empregado na fortificação da amostra a) de suco; b) do branco para lodo.....	115
CAPÍTULO 3	
Figura 3.1 - Curva analítica: método estequiométrico para determinação de AA empregando Iodato de Potássio como agente titulante	131
Figura 3.2 - Avaliação da linearidade a partir dos resíduos ($Y-Y_0$),	

obtidos a partir dos valores de mAA _{determinada} e dos valores de (Y ₀) calculados a partir dos valores de mAA _{adicionada} para método do Iodato de Potássio	132
Figura 3.3 - Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho baseado na correlação (U/x)% x mAA para Iodato de Potássio.....	133
Figura 3.4 - Determinação da precisão por repetitividade , $\pm s$, n=10 para a de mAA de 59,736 mg e titulação com Iodato de Potássio	134
Figura 3.5 - Valores de s/s _r , (k), (s_r=1,59) calculados o para os diferentes valores de mAA _{determinada} para Iodato de Potássio	135
Figura 3.6 - Representação da incerteza genérica (I _{genérica}) como função de p . Erro relativo < 1,3% para Iodato de Potássio.....	138
Figura 3.7 - Percentagem de recuperação (R%) como função da massa de AA empregada na fortificação da amostra de suco para Iodato de Potássio.....	141
CAPÍTULO 4	
Figura 4.1 - Curva analítica : método estequiométrico para determinação de AA empregando DCFI como agente titulante	156
Figura 4.2 - Avaliação da linearidade a partir dos resíduos (Y-Y ₀), obtidos a partir dos valores de mAA _{determinada} e dos valores de (Y ₀) calculados a partir dos valores de mAA _{adicionada} para método do DCFI ...	157
Figura 4.3 - Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho baseado na correlação (U/x)% x mAA para DCFI.....	158
Figura 4.4 - Determinação da precisão por repetitividade , $\pm s$, n=10 para a de mAA de 7,012 mg e titulação com DCFI	159
Figura 4.5 - Valores de s/s _r , (k), (s_r=1,59) calculados o para os diferentes valores de mAA _{determinada} para DCFI	160
Figura 4.6 - Representação da incerteza genérica (I _{genérica}) para método do DCFI	163
Figura 4.7 - Representação gráfica da percentagem de recuperação (R%) como função da massa de AA empregada na fortificação da amostra de vitamina C do comprimido para DCFI.....	166
CAPÍTULO 5	
Figura 5.1 - Curva analítica : método espectrofotométrico para determinação de AA empregando DCFI	181
Figura 5.2 - Avaliação da linearidade a partir dos resíduos (Y-Y ₀), obtidos a partir dos valores de mAA _{determinada} e dos valores de (Y ₀) calculados a partir dos valores de mAA _{adicionada} para método instrumental espectrofotométrico	182
Figura 5.3 - Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho baseado na correlação (U/x)% x mAA método espectrofotométrico usando DCFI	182
Figura 5.4 - Determinação da precisão por repetitividade , $\pm s$, n=10 para a de mAA de 29,573 µg para método espectrofotométrico usando DCFI	183
Figura 5.5 - Valores de s/s _r , (k), (s_r=1,50) calculados o para os diferentes valores de mAA _{determinada} para método espectrofotométrico	

usando DCFI	184
Figura 5.6 - Valores da Incerteza Genérica ($I_{\text{genérica}}$) para método instrumental espectrofotométrico usando DCFI.....	187
Figura 5.7 - Representação gráfica da percentagem de recuperação (R%) como função da massa de AA empregada na fortificação da amostra de vitamina C do comprimido para método espectrofotométrico usando DCFI.....	190

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Elementos requeridos para validação de ensaios	36
Tabela 2 - Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	37
CAPÍTULO 1	
Tabela 1.1 – Matriz dos fatores para determinação da robustez.....	75
Tabela 1.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de robustez para NBS, empregando o método de Younden-Steiner.....	83
Tabela 1.3 - Valores médios de AA determinados (X_{médio}), precisão (±s), incerteza específica (±U/x), massas de AA adicionadas (mAA_{adicionada}), incerteza genérica (I_{genérica}) e recuperação do AA (R%) para NBS.....	84
Tabela 1.4: Dados (mAA_{adicionada} ; n=10) e resultados coletados (mAA_{determinada} ; n=10) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de suco industrializado de laranja (C_{nominal} = 46mg de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (40, 60, 80mg) para NBS.....	87
Tabela 1.5: - Recuperação do analito em função da concentração	88
CAPÍTULO 2	
Tabela 2.1 – Matriz dos fatores para determinação da robustez.....	101
Tabela 2.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de robustez para iodo, empregando o método de Younden-Steiner.....	109
Tabela 2.3 - Valores médios de AA determinados (X_{médio}), precisão por repetição (±s), desvio padrão relativo (±s/x), massas de AA adicionadas (mAA_{adicionada}), incerteza genérica (I_{genérica}) e recuperação do AA (R%) para Iodo	110
Tabela 2.4 - Dados (mAA_{adicionada} ; n=10) e resultados coletados (mAA_{determinada} ; n=10) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de suco industrializado de laranja (C_{nominal} = 46mg de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (40, 60, 80mg) para Iodo	113
Tabela 2.5: - Recuperação do analito em função da concentração	114
CAPÍTULO 3	
Tabela 3.1 – Matriz dos fatores para determinação da robustez.....	128
Tabela 3.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de robustez para iodato de Potássio, empregando o método de Younden-Steiner.....	136
Tabela 3.3 - Valores médios de AA determinados (X_{médio}), precisão (±s), incerteza específica (±U/x), massas de AA adicionadas (mAA_{adicionada}), incerteza genérica (I_{genérica}) e recuperação do AA (R%) para Iodato de Pótássio.....	137
Tabela 3.4 - Dados (mAA_{adicionada} ; n=10) e resultados coletados (mAA_{determinada} ; n=10) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de Vitamina C do comprimido(C_{nominal} = 34mg de AA)	

fortificados com diferentes massas nominais de AA (34 e 69mg) para iodato de Potássio	140
Tabela 3.5: - Recuperação do analito em função da concentração	141
CAPÍTULO 4	
Tabela 4.1 – Matriz dos fatores para determinação da robustez.....	153
Tabela 4.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de robustez empregando o método de Younden-Steiner para DCFI.....	161
Tabela 4.3 - Valores médios de AA determinados (X_{médio}), precisão (±s), incerteza específica (±U/x), massas de AA adicionadas (mAA_{adicionada}), incerteza genérica (I_{genérica}) e recuperação do AA (R%) para DCFI.....	162
Tabela 4.4 - Dados (mAA_{adicionada} ; n=10) e resultados coletados (mAA_{determinada} ; n=10) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de comprimido de Vitamina C (C_{nominal} = 0,38708mg de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (3,5, e 7,0mg) para DCFI.....	165
Tabela 4.5: - Recuperação do analito em função da concentração	166
CAPÍTULO 5	
Tabela 5.1 – Matriz dos fatores para determinação da robustez.....	178
Tabela 5.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de robustez empregando o método de Younden-Steiner para método espectrofotométrico usando DCFI.....	185
Tabela 5.3 - Valores médios de AA determinados (X_{médio}), precisão (±s), incerteza específica (±U/x), massas de AA adicionadas (mAA_{adicionada}), incerteza genérica (I_{genérica}) e recuperação do AA (R%) para método espectrofotométrico usando DCFI.....	186
Tabela 5.4 - Dados (mAA_{adicionada} ; n=10) e resultados coletados (mAA_{determinada} ; n=10) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de comprimido de Vitamina C (C_{nominal}) fortificados com diferentes massas nominais de AA (19,97 e 39,97µg) para método espectrofotométrico usando DCFI	188
Tabela 5.5: - Recuperação do analito em função da concentração	189

LISTA DE ABREVIATURAS

EAL	European Cooperation for Accreditation of Laboratories
AOAC	Association of Analytical Communities
EC	European Commission
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
AA	Ácido Ascórbico
CAS	Chemical Abstract Substance
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
pH	Potencial Hidrogeniônico
ISO	International Standard Organization
ICH	International Conference on Harmonization
USP	United States Pharmacopeia
FDA	Food and Drugs Administration
NATA	National Association of Testing Authorities
NBR	Norma Brasileira
IEC	International Electrotechnical Commission
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação do INMETRO
GMP	Good Manufacturing Practices
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
CITAC	Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry
WELAC	Western European Laboratory Accreditation Cooperation
ASTM	American Society for Testing and Materials
RDA	Recommended Dietary Allowance
NBS	N-Bromosuccinamida
DCF	Diclorofenol Indofenol
mg	miligrama
µg	micrograma
CV	Coeficiente de Variação
sr	Precisão por Repetitividade

sn	Precisão
r²	Coeficiente de Correlação
R%	Percentage de Recuperação
S	Sensibilidade
mAA	Massa de Ácido Ascórbico
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
u	Incerteza
nm	Nanômetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
	OBJETIVOS	22
	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1	HISTÓRICO E EVOLUÇÃO	23
2	PROPRIEDADES QUÍMICAS	25
3	VALIDAÇÃO	29
4	PRINCIPAIS PARÂMETROS EM PROCESSO DE VALIDAÇÃO....	38
4.1	Seletividade	39
4.2	Linearidade	41
4.3	Intervalo de trabalho	43
4.4	Exatidão	44
4.5	Precisão	45
4.5.1	Repetitividade	46
4.5.2	Precisão intermediária ou inter análise	47
4.5.3	Reprodutividade ou precisão interlaboratorial	48
4.6	Robustez	49
4.7	Incerteza	50
4.8	Limite de detecção / capacidade de detecção	50
4.9	Limite de determinação / limite de quantificação	51
5	PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO	51
6	Métodos titulométricos de determinação de ácido ascórbico..	52
6.1	Método da N-Bromosuccinamida (NBS)	52
6.2	Determinação do Ácido Ascórbico com Solução de Iodo	52
6.3	Determinação do Ácido Ascórbico com Iodato de Potássio....	54
6.4	Método do 2,6-Diclorofenol-Indofenol (DCFI)	55
7	MÉTODO INSTRUMENTAL DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO: Espectrofotométrico	56
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
	CAPÍTULO 1	
	VALIDAÇÃO DE MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO N- BROMOSUCCINAMIDA COMO AGENTE TITULANTE.....	66

	RESUMO	66
	ABSTRACT	67
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1	Material	69
2.2	Método	70
3	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5	CONCLUSÃO	89
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CAPÍTULO 2		
	VALIDAÇÃO DE MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO N- IODO COMO AGENTE TITULANTE.....	91
	RESUMO	91
	ABSTRACT	92
1	INTRODUÇÃO	93
2	MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1	Material	95
2.2	Método	96
3	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	97
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
5	CONCLUSÃO	116
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
CAPÍTULO 3		
	VALIDAÇÃO DE MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO IODATO DE POTÁSSIO COMO AGENTE TITULANTE.....	118
	RESUMO	118
	ABSTRACT	119
1	INTRODUÇÃO	120
2	MATERIAL E MÉTODOS	122
2.1	Material	122
2.2	Método	123

3	Parâmetros de Validação	124
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
5	CONCLUSÃO	142
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143

CAPÍTULO 4

	VALIDAÇÃO DE MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO 2,6 DICLOROFENOL-INDOFENOL COMO AGENTE TITULANTE.....	144
	RESUMO	144
	ABSTRACT	145
1	INTRODUÇÃO	146
2	MATERIAL E MÉTODOS	147
2.1	Material	147
2.2	Método	148
3	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	149
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	155
5	CONCLUSÃO	167
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168

CAPÍTULO 5

	VALIDAÇÃO DE MÉTODO INSTRUMENTAL ESPECTROFOTOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO 2,6 DICLOROFENOL-INDOFENOL COMO AGENTE TITULANTE.....	170
	RESUMO	170
	ABSTRACT	171
1	INTRODUÇÃO	172
2	MATERIAL E MÉTODOS	173
2.1	Material	173
2.2	Método	174
3	PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO	175
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	180
5	CONCLUSÃO	191
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	192
	APÊNDICE	193

INTRODUÇÃO

As vitaminas são substâncias orgânicas, essenciais sob o ponto de vista nutricional, estão presentes em alimentos, em pequenas quantidades. Após várias investigações dentro de duas áreas de pesquisa: a de necessidades nutricionais e a de patologia de doenças, tais como: escorbuto (doença causada pela falta de vitamina C, caracterizada por enfraquecimento geral, hemorragias diversas; mau hálito e sangria das gengivas) e beribéri (doença causada pela falta de vitamina B₁), foram conclusivamente, identificadas com substâncias essenciais ao metabolismo humano, e estritamente relacionadas com as doenças de cujas causas determinantes são suas deficiências nutricionais (BOURNE, 1935).

As vitaminas atuam em quantidades mínimas, em diversos processos metabólicos. São de origem endógena, pois são sintetizadas no interior das células vegetais e em numerosos organismos unicelulares, mas no homem necessitam serem ofertadas através dos alimentos, em sua quase totalidade. As vitaminas distinguem-se de outros constituintes alimentares, da nossa dieta alimentar cotidiana, por não representarem fonte de energia, nem desempenharem funções de reconstituir parte deformada do corpo humano (BOURNE; ALLEN, 1935).

Algumas vitaminas não necessitam serem administradas, através de alimentos, ao organismo humano, vide o exemplo da vitamina K, a qual é sintetizada por bactérias intestinais em quantidade que supre as necessidades corporais, e a vitamina D, que pode ser sintetizada por ação da luz solar a partir de um derivado do colesterol existente normalmente na pele (SILVA et al., 1995).

Considerando a propriedade de solubilidade, as vitaminas são divididas em dois grandes grupos: as hidrossolúveis, que são solúveis em água, e as lipossolúveis que são solúveis em óleos ou gorduras.

As hidrossolúveis funcionam, em sua maioria, como coenzimas que são enzimas que necessitam de uma molécula orgânica como um co-fator e se modificam quimicamente no curso das reações enzimáticas, e tem atuação metabólica bem esclarecida, são facilmente absorvidas, sendo que seu armazenamento corporal é limitado e devem ser ingeridas em intervalos curtos (SILVA et al., 1995).

As vitaminas lipossolúveis são absorvidas com as gorduras (o que exige presença de sais biliares no intestino), armazenam-se no fígado e sua ingestão pode ocorrer em intervalos de tempo mais longos que as hidrossolúveis. Suas ações fisiológicas, portanto, são pouco conhecidas (SILVA et al., 1995).

São exemplos de vitaminas hidrossolúveis: complexo vitamínico B, vitamina B₁, niacina e niacinamida, vitamina B₂, vitamina B₆, ácido pantotênico, vitamina B₁₂ e vitamina C (ácido ascórbico). Exemplos de vitaminas lipossolúveis: Vitamina A (Retinol), vitamina D e vitamina K (SILVA et al., 1995).

Por vários anos a vitamina C tem sido motivo de grandes controvérsias. A recomendação diária de vitamina C é de apenas 60 mg/dia, mas muitos cientistas têm discordado desses valores, incluindo Linus Pauling, cientista premiado com dois Prêmios Nobel e que recomendava 3g/dia (3000mg). É sabido que as 60mg recomendadas são necessárias para prevenção de escorbuto, mas não se sabe ainda o que seria a dosagem máxima ideal.

A utilização da vitamina C tem sido muito discutida, não apenas para a prevenção do resfriado comum, mas principalmente para prevenir a incidência do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias. A prevenção tem sido estendida à intoxicação por vários

agentes químicos e outros agressores, como substâncias orgânicas, fármacos, agentes físicos, etc.

Diariamente milhões de medições analíticas são feitas em vários laboratórios no mundo, dando suporte a decisões nos mais diversos segmentos da sociedade (EURACHEM, 1998). Com isso houve demanda de confiabilidade e comparabilidade dessas medições. Uma forte infraestrutura metrológica está sendo implementada, com foco no reconhecimento mútuo e na eliminação de barreiras técnicas entre os países.

A validação de métodos de ensaio tem recebido considerável atenção em literaturas científicas, comitês industriais e agências regulamentadoras, com grande procura por parte dos laboratórios e organismos acreditadores por protocolos para planejamento e controle destes processos. No entanto, a diversidade de áreas de aplicação, de parâmetros de desempenho a serem avaliados, bem como de terminologia e definições, tem dificultado a harmonização dos processos de validação em termos de determinação de indicadores de qualidade dos métodos de ensaio e das respectivas modalidades de cálculos associadas a estes indicadores (ANTIGNAC et al., 2003).

A maior parte das publicações que tratam sobre validações intralaboratoriais de métodos de ensaio limita-se às definições dos principais parâmetros genéricos de procedimentos de validação, provavelmente em decorrência da ampla diversidade de técnicas a áreas de aplicação (EAL, 1997; AOAC, 1998; EURACHEM, 1998; EC, 2002; INMETRO, 2010).

O desenvolvimento de um procedimento para validações intralaboratoriais embasado em fundamentos teóricos e contendo detalhamento necessário para uma avaliação segura e consistente de métodos de ensaio aplicados a área de alimentos e fármacos é o foco desse trabalho.

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a validação de métodos de análise do ácido ascórbico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Validar métodos clássicos, titulométricos de determinação do Ácido Ascórbico;
- 2 – Validar método instrumental espectrofotométrico de determinação do ácido ascórbico;
- 3 – Avaliar o grau de incerteza genérica dos métodos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. HISTÓRICO E EVOLUÇÃO

Por séculos, o escorbuto foi uma doença comum, principalmente entre os navegadores, que não dispunham de frutas cítricas ou verduras em suas viagens. Não era incomum perder grande parte de uma tripulação numa jornada marítima.

O escorbuto não afetou apenas as pessoas nos oceanos. De fato, a maioria dos povos do norte europeu, até ao final da Idade Média, sofriam de escorbuto subagudo durante os meses de inverno, porque não dispunham de alimento fresco, pois o ácido ascórbico pode ser decomposto por enzimas específicas (ácido ascórbico oxidase e fenolase) presentes no próprio vegetal, durante sua estocagem (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2003).

O estudo sistemático da relação entre a dieta e o escorbuto só foi iniciado em 1747, por James Lind, um médico da esquadra naval britânica que selecionou 12 homens, todos doentes com escorbuto, e os dividiu em pares. Seis tratamentos distintos foram propostos e o único par que mostrou melhoria significativa foi aquele que recebeu frutas cítricas (duas laranjas e um limão). Em 1753, Lind publicou seu famoso livro *Treatise of the scurvy*, recomendando vários procedimentos para cura do escorbuto (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2003).

O ácido ascórbico ou hexurônico, descoberto em 1928, por Albert Szent-György, mostrou propriedades notáveis, e fora posteriormente identificadas como sendo idêntico ao componente antiescorbuto presente nos limões e limas, sendo assim, denominado como ácido ascórbico (ROSE; CHOI, 1990; DABROWSKI et al., 1994).

Albert Szent-György postulou que o ácido ascórbico desempenhava uma importante função nos mecanismos oxidativos em todas as espécies animais e vegetais. Tem sido recentemente reconhecido que os radicais livres ou as moléculas que contêm oxigênio e que são altamente reativas atuam diretamente no desenvolvimento de doenças.

A hipótese levantada é de que os primeiros vertebrados que evoluíram antes do aumento do oxigênio atmosférico aos níveis atuais, e que viveram nas águas onde a pressão de oxigênio é muito menor que na superfície terrestre, não necessitariam do ácido ascórbico como necessitam as espécies terrestres, mais recentes evolutivamente que as primeiras (ROSE; CHOI, 1990).

A estrutura precisa de vitamina C foi determinada por Haworth, em 1933 e obtida a sua síntese química por Reichstein et al. (1933) alguns meses mais tarde, no entanto, é verdade que, somente nos últimos 25 anos que as numerosas funções biológicas do L-AA em animais e plantas foram elucidadas (Figura 1). Atualmente, é considerada a sua participação em funções específicas, como na síntese do colágeno, e conseqüentemente na formação e manutenção das cartilagens, ossos, gengivas, pele, dentes, e sistema imunológico.

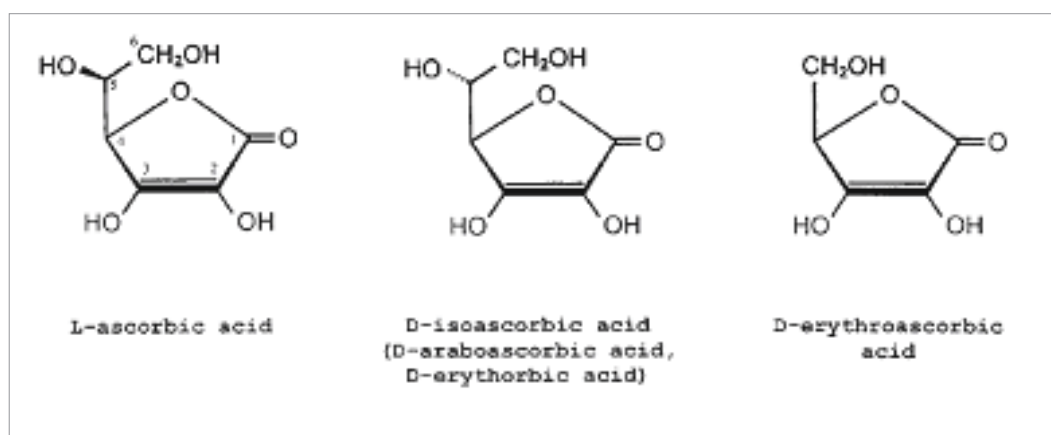


Figura 1 – Estruturas químicas do ácido ascórbico

O progresso, no campo da pesquisa, com plantas, somente houve significativo aumento quando a enzima L-ácido ascórbico peroxidase, fora isolada e identificada (GRODEN, et al. 1979), a qual tem na planta, a função específica, sobre L-AA.

A literatura tem-se referido à vitamina C com diferentes sinônimos, dentre os quais, destacamos: vitamina antiescorbútica, ácido L(+)-ascórbico, ácido L-treo-hexa-2-enônico gama-lactona, 3-ceto-L-gulofuranolactona, ácido L-3-cetotreo-hexurônico lactona, 3-oxo-L-gulofuranolactona e ácido L-xiloascórbico, cujo número do CAS é: 50-81-7.

O ácido ascórbico (vitamina C) tem a capacidade de promover numerosos processos bioquímicos e fisiológicos, tanto em animais, como em plantas. A maioria dos animais pode sintetizar esta vitamina em quantidades suficientes para prevenir os sinais clínicos de deficiência como o escorbuto. Entretanto, primatas, porcos da Índia, peixes, camarões, morcegos, pássaros e alguns insetos necessitam de uma fonte dietética de vitamina C para prevenir ou reverter os sintomas do escorbuto (O'KEEFE, 2001).

Além disso, é considerado um antioxidante, entre os mais eficazes e menos tóxicos, havendo, atualmente uma forte evidência de ligação do L-AA dietético com proteção contra vários efeitos relacionados com o estresse oxidativo e doenças, tais como: câncer, doenças cardiovasculares, envelhecimento e formação de catarata (DIPLOCK, et al. 1998).

2 - PROPRIEDADES QUÍMICAS

A vitamina C é um ácido que na sua estrutura contém um grupo hidróxi-enólico, tautômero da α -hidroxicetona, o que lhe fornece

não somente capacidade redutora, mas também um comportamento ácido (DAVIES et al., 1991). A natureza ácida em solução aquosa deriva da ionização do grupo enólico ligado ao C-3 (pK a = 4,25), em relação ao carbono da lactona (monoéster cíclico), como mostrado na Figura 2.

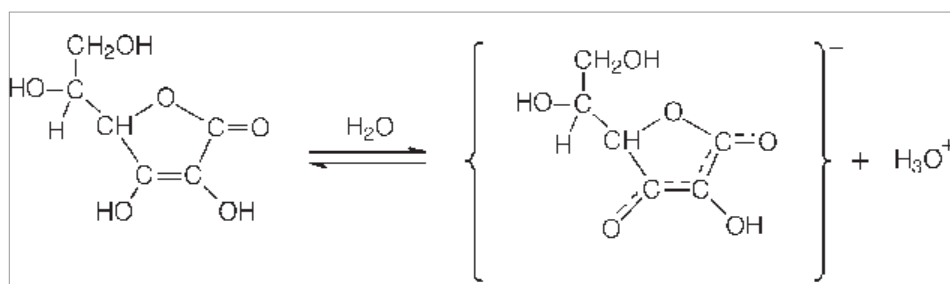


Figura 2: Primeira ionização do ácido L-ascórbico.

A vitamina C é instável e perde suas propriedades na presença de ar, calor, água ou luz, o que dificulta sua utilização em várias formulações. A grande revolução foi à possibilidade de estabilizar a vitamina C, para que possa ser usada em concentrações altas (5-10%).

O termo vitamina C é uma denominação genérica para todos os compostos que apresentam atividade biológica do ácido ascórbico. Dentre eles, o ácido ascórbico é o mais largamente encontrado nos alimentos e possui maior poder antioxidante. Os possíveis efeitos anticarcinogênicos da vitamina C estão relacionados com sua habilidade em detoxicar substâncias carcinogênicas e sua atividade antioxidante (STAHL; SIES, 1997).

Estudos relatam que a vitamina C pode inibir a formação de nitrosaminas *in vivo* a partir de nitratos e nitritos usados como conservantes, sendo adicionada a muitos produtos alimentares industrializados para prevenir a formação desses compostos reconhecidamente carcinogênicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). As maiores fontes de vitamina C são as frutas como acerola, caju e goiaba e vegetais como brócolis, couve e couve-flor.

Estudos epidemiológicos observacionais e estudos em modelos animais mostram que a combinação entre ácido ascórbico, α -tocoferol e β -caroteno pode exercer efeito protetor contra o câncer em populações saudáveis, uma vez que esses nutrientes podem interagir no ambiente celular e potencializar a defesa antioxidante, protegendo contra dano oxidativo no DNA (NIKI et al., 1995).

O poder antioxidante da vitamina C se dá, em solução aquosa, pelo impedimento da oxidação, isto é, da perda de elétrons. As moléculas do ácido ascórbico sofrem oxidação antes que outras moléculas se oxidem, impedindo e protegendo essas outras moléculas da oxidação. A primeira etapa de sua oxidação produz o ácido dehidroascórbico e essa reação é facilmente reversível conforme Figura 3 (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2003).

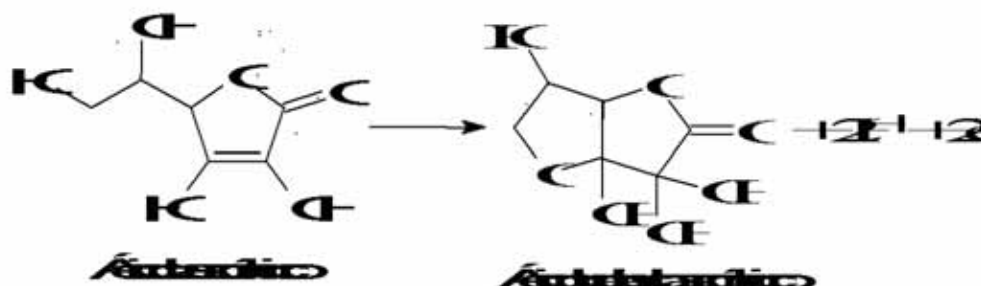


Figura 3: Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico

Na presença de oxigênio e um catalisador, o ácido ascórbico é oxidado ao ácido dehidroascórbico, que é bastante estável em pH menor que 4. O ácido dehidroascórbico apresenta 75-80% da atividade vitamínica do ácido ascórbico. Em pH maior que 4, o ácido dehidroascórbico sofre rearranjo irreversível a material biológico inativo. O ácido dehidroascórbico também é rapidamente convertido a ácido 2,3-dicetogulônico por um processo catalisado por íons de Cu e outros íons

de metais de transição. Portanto, a perda de ácido ascórbico presente em vegetais e frutas é acelerada quando esses alimentos são cozidos em recipientes de cobre ou de ferro (FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2003).

Do mesmo modo que a vitamina C aumenta a resistência do organismo às infecções protege a pele contra a ação dos radicais livres que são uma espécie química não carregada que possui elétron desemparelhado e causa o envelhecimento da pele.

A vitamina C atua na formação do colágeno que é uma fibra que compõe 80% da derme e garante a firmeza da pele. A ação da tirosinase, que é uma enzima que catalisa a produção de melanina, é inibida pelo ácido ascórbico, por isso a ação clareadora desse ácido que ajuda a eliminar manchas (CHEFTEL, 1976).

Segundo Weber et al. (1996) a ingestão de 80 a 120 mg/dia pode reduzir o risco de doenças crônicas não infecciosas, incluindo o câncer, e que fumantes necessitam de um aporte mais elevado, de até 140 mg/dia. Blumberg (1995) sugere o consumo de cerca de 150 mg, ou seja, duas e meia vezes a dose diária recomendada para indivíduos adultos de acordo com a RDA (SILVA; NAVES, 1998), para se alcançar concentrações plasmáticas de vitamina C associada com um menor risco de doenças crônicas.

Ao contrário, o consumo de vitamina C em doses mais elevadas pode ser deletério para o organismo, conforme observado através do aumento de lesões potencialmente mutagênicas em indivíduos saudáveis suplementados com 500 mg/dia durante seis meses (PODMORE et al., 1998).

Existem várias formas de ácido ascórbico e a estabilidade da mesma tem sido testada, em rações processadas para peixes (SOLIMAN et al., 1986; SKELBAEK et al., 1990). Os trabalhos demonstram que as formas protegidas (ácido ascórbico-2-sulfato, ácido ascórbico-2-

monofosfato, ácido ascórbico-2-difosfato, ácido ascórbico-2-trifosfato) são as mais estáveis e resistentes ao processamento e armazenamento e podem desta forma, ser incorporada em menores quantidades na ração para animais em geral, (MATUSIEWICZ et al., 1995; O'KEEFE, 2001).

Em determinadas condições, o ácido ascórbico pode atuar como um pró-oxidante (KANEKO et al., 1997). Ambos os átomos de hidrogênio do grupo enediol (dois átomos de carbono duplamente ligado) (STEDMAN, 1996) podem dissociar nas posições C-2 e C-3 (SMITH et al., 1983), facilitando o transporte de hidrogênio dentro da célula animal (TACON, 1987), o que resulta na grande acidez desta vitamina ($pK_1=4,2$) (KANEKO et al., 1997).

Os enediois são excelentes agentes redutores, sendo que a reação de redução normalmente ocorre de um modo gradativo, com o ácido monodesidroascórbico como uma semiquinona (radical livre que resulta da remoção de um átomo de hidrogênio com seu elétron durante o processo de desidrogenação) intermediária (KANEKO et al., 1997; STEDMAN, 1996).

3 – VALIDAÇÃO

A cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo, milhões de medições analíticas são efetuados, havendo a necessidade de dados analíticos comparáveis e consistentes, para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Para atingir este processo de reconhecimento mútuo nos ensaios realizados em laboratórios em nível internacional, em que, uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, requisitos legais, de certificação e de credenciamento devem ser observados (BARROS, 2002).

Normas internacionais, nacionais (INMETRO e ANVISA) e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido (BARROS, 2002).

Existe vasta literatura, na área de medições químicas e recomendações publicadas por organizações, internacionais e nacionais (ISO/IEC 17025, 1999; ICH, 2005; USP 25, 2002; FDA, 2000; NATA, 1998; EURACHEM, 1998; NBR ISO/ IEC 17025, 2005; INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2010).

A qualidade dos dados analíticos representa um fator chave no sucesso de um programa de desenvolvimento de uma substância ou composto qualquer, sendo que o processo e a validação do método analítico apresentam impacto direto na qualidade desses dados. Assim, a metodologia analítica, que já envolvia a exatidão, precisão e especificidade, expandiu-se para as atividades industriais e está agora sob o enfoque da validação (MORETTO; SHIB, 2000).

O conceito do termo validação era utilizado em análises na Química Analítica Inorgânica, a fim de assegurar dados confiáveis de serem utilizados na descoberta, desenvolvimento e fabricação de produtos farmacêuticos. Atualmente, os dados analíticos também são usados na seleção de drogas em potencial, no desenvolvimento de sua síntese, nos estudos de formulações, no monitoramento da estabilidade de fármacos e nos testes de produtos acabados para liberação.

De acordo com Moretto e Shib (2000), o primeiro Good Manufacturing Practices - GMPs, as quais foram publicadas na *Food and Drug Administration* – FDA (1978), porém, somente em 1980, recebeu a seguinte definição: “Validação é o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado”.

Segundo a *United States Pharmacopeia* 24a ed – USP XXIV (2000), os analistas não são obrigados a validar a metodologia analítica, mas devem verificar se ela é adequada às suas condições de uso. Porém, se não houver um método ou série de métodos devidamente adequados para a avaliação da qualidade dos produtos, o programa de validação terá valor limitado (PASTEELNICK, 1993).

Espires (*apud* Garfield, 1994) relata que a validação de métodos pode ser definida como “o processo pelo qual atributos ou figuras de mérito são determinados e avaliados, sendo importantes parte de um programa de garantia de qualidade”. Portanto, o objetivo principal é assegurar que determinado procedimento analítico dê resultados reprodutíveis e confiáveis, que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado.

Todo método analítico, para merecer o nome, deve ser cientificamente respaldado e quando utilizado por diferentes operadores, com equipamento similar, em diferentes laboratórios deve ser capaz, dentro de certos limites, de fornecer resultados confiáveis. Em outras palavras, deve ter uma base racional e ser adequado para o propósito estabelecido. O processo que demonstra que tal método funciona é chamado de validação analítica ou validação de método analítico (SHARP, 2000).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2005).

O processo de validação deve fornecer evidências documentadas de que o método está apto para realizar aquilo para o qual é indicado (USP, 2002).

Documento publicado pelo INMETRO (2010) sobre validação de métodos destaca a necessidade de que os laboratórios estejam cientes

dos requisitos da norma ISO/IEC 17025 para seleção, desenvolvimento, utilização e validação de métodos.

A validação é parte integrante de sistemas de gestão laboratoriais e o uso de equipamentos dentro de especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados (fatores técnicos e instrumentais), assim como a condução dos estudos por pessoal competente (fatores humanos) e em condições ambientais adequadas (fatores ambientais), deve estar implícito nos procedimentos de validação de métodos (EAL, 1997; EURACHEM, 1998).

A Figura 4 ilustra a relação entre validação de métodos e outras ferramentas de garantia da qualidade na acreditação de sistemas de gestão de laboratórios.

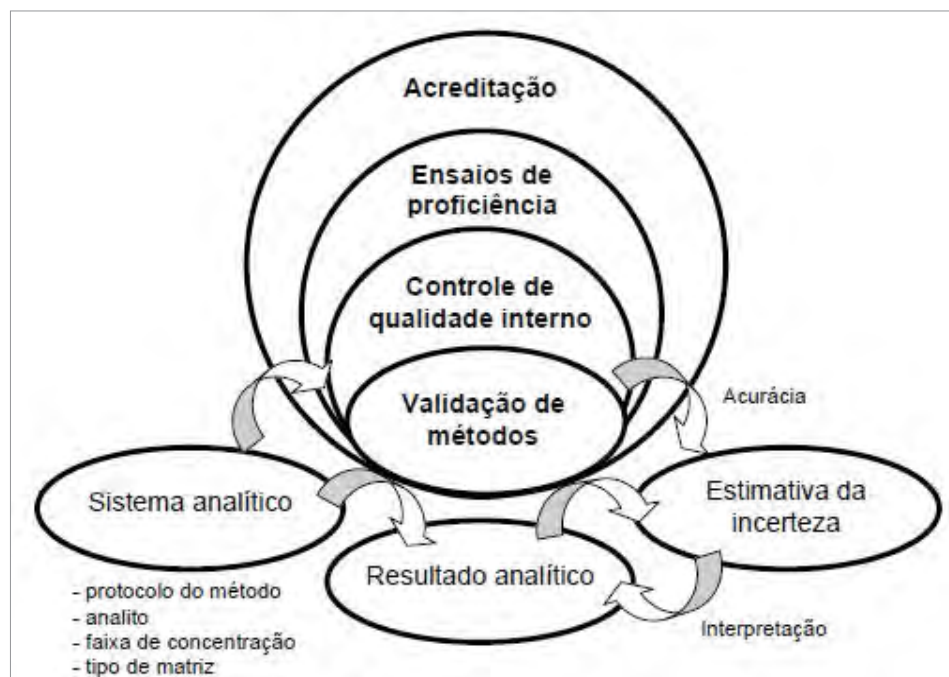


Figura 4: Diferentes níveis e ferramentas de garantia da qualidade na acreditação de sistemas de gestão de laboratórios (TAVERNIERS, DE LOOSE e VAN BOCKSTAELE, 2004 – adaptado).

A ISO/IEC 17025 (ISO, 2005) cita que as formas de validação ou verificação de desempenho de métodos de ensaio incluem: calibração

com uso de padrões ou materiais de referência; comparações com outros métodos; comparações interlaboratoriais; avaliação sistemática dos fatores que influenciam o resultado; e avaliação da incerteza dos resultados.

As diferentes formas de validação recomendadas, diretas ou comparativas, podem ser estruturadas em processos intra e interlaboratoriais.

Os diferentes processos de validação são complementares apesar de terem vantagens e desvantagens. Um estudo colaborativo (processo interlaboratorial) não pode ser conduzido sem que o método tenha sido previamente avaliado em ensaios de validação intralaboratoriais e métodos com parâmetros de desempenho adequados, avaliados em processos intralaboratoriais, não podem ser considerados como oficiais ou padrões sem estudos colaborativos complementares (TAVERNIERS, DE LOOSE e VAN BOCKSTAELE, 2004).

Estudos colaborativos ou interlaboratoriais de performance de métodos envolvem a análise de uma mesma amostra (ou amostras idênticas), pelo mesmo método de ensaio, em diferentes laboratórios, para determinar os parâmetros de desempenho de um método, cobrindo medidas em condições de repetitividade e reprodutibilidade (EC, 2002).

Reprodutibilidade é a precisão interlaboratorial, ou seja, o grau de concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos. Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial. A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade “R”, o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras

analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa.

Para minimizar os custos da validação, muitos laboratórios utilizam resultados obtidos de controles de qualidade internos e compilados na forma de cartas de controle como substitutos ou complementares ao processo de validação de seus métodos (HILL; REYNOLDS, 1999).

Como o processo de validação, na prática, não consegue incluir a totalidade de variáveis analíticas encontradas durante o uso do método, ferramentas de controle de qualidade interna são requeridas para fornecerem evidências do desempenho do método durante sua aplicação (HILL; REYNOLDS, 1999).

Validações intralaboratoriais correspondem a estudos analíticos que envolvem um único laboratório, utilizando um mesmo método, para analisar a mesma ou diferente amostra, sob diferentes condições, em um intervalo de tempo justificado (EC, 2002). Estes estudos permitem a avaliação do desempenho de métodos com um número considerável de experimentos, utilizando diferentes combinações de analitos, concentrações e matrizes, em um curto intervalo de tempo, facilmente adaptáveis a diferentes situações.

As validações intralaboratoriais atendem um importante nicho de processos de validação de métodos devido sua flexibilidade e habilidade em fornecer resultados rápidos para novos métodos (VAN DER VOET; VAN RHIJN; VAN DE WIEL, 1999).

Processos de validação intralaboratoriais permitem avaliar não somente a exatidão e a precisão de um método, mas também outros parâmetros de desempenho como linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade, efeitos de matriz, seletividade, limites de detecção e de quantificação (VAN DER VOET; VAN RHIJN; VAN DE WIEL, 1999).

Trabalhar isoladamente reduz a quantidade de dados obtidos, restringindo informações como, por exemplo, aquelas relativas a

comparabilidade interlaboratorial. De acordo com a Eurachem (1998) a impossibilidade de estudo do parâmetro reprodutibilidade nas validações intralaboratoriais, o que exigiria a execução de experimentos em diferentes laboratórios, esta informação nem sempre é necessária. Muitas vezes, estudos de reprodutibilidade parcial são suficientes (VAN DER VOET; VAN RHIJN; VAN DE WIEL, 1999).

Também é possível ter uma estimativa da comparabilidade de resultados de medição de qualquer método com outros métodos pelo ensaio de materiais de referência certificados ou pela comparação do método em estudo com outro para o qual a validação já tenha sido feita (EURACHEM, 1998).

A abrangência do processo da validação é função do tipo de método quantitativo ou qualitativo onde são considerados quantitativos aqueles métodos que determinam a quantidade de um determinado analito expressa na forma de um valor numérico com as unidades apropriadas. Métodos qualitativos são aqueles que permitem identificar um analito com base nas suas propriedades físicas, químicas ou biológicas (EC, 2002).

A ICH (Internation Conference on Harmonization) define quatro tipos de ensaios analíticos (ensaio de identificação, quantificação de impurezas, teste limite de impurezas e teste quantitativo de princípio ativo) e sugere os parâmetros a serem validados (Tabela 1) para cada um destes.

Tabela 1 – Elementos requeridos para validação de ensaios.

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

Fonte: ICH, 2005.

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

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

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

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

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

Fonte: ICH, 2005.

4 - PRINCIPAIS PARÂMETROS EM PROCESSOS DE VALIDAÇÃO

O processo de validação demanda uma decisão sobre quais parâmetros de desempenho precisam ser avaliados (EURACHEM, 1998). Jenke (1996) avaliou a frequência dos parâmetros de desempenho relacionados a processos de validação em publicações de métodos das áreas governamental, industrial e acadêmica. Os parâmetros mais freqüentes foram exatidão e precisão (repetitividade e reprodutividade), seguidos de seletividade, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e sensibilidade.

Para Thompson; Ellison; Wood, (2006), os parâmetros a serem analisados em uma validação são: a aplicabilidade, a seletividade, calibração, exatidão, precisão, faixa de trabalho, recuperação, limites de detecção e quantificação, sensibilidade e robustez.

Segundo a European Commission (2002) a linearidade, seletividade, exatidão, precisão, recuperação, limite de decisão, capacidade de detecção, aplicabilidade, estabilidade e robustez são os parâmetros a serem analisados. Para Inmetro (2010) os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, limite de detecção e quantificação, tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez.

A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico e as principais características de desempenho incluem: seletividade e

especificidade, faixa de medição, calibração e rastreabilidade, tendência, linearidade, limites de detecção e quantificação, robustez e precisão (EURACHEM, 2000).

A exclusão de parâmetros mais frequentemente aplicados nos protocolos de validação, como exatidão e precisão, implicaria na necessidade de justificativas pertinentes, enquanto a exclusão de parâmetros menos frequentes, como sensibilidade, seria menos controversa. A seleção de parâmetros de desempenho para um determinado processo de validação também está fortemente relacionada com a forma de validação adotada (JENKE, 1996).

A robustez é importante para fornecer informações sobre o efeito de parâmetros experimentais significativos para a estimativa da incerteza (EURACHEM/CITAC, 2000).

A estimativa da incerteza é um indicador chave tanto da adequação para uso de um método quanto da confiabilidade dos resultados analíticos obtidos em um laboratório. Este parâmetro cobre todas as fontes de erros do processo analítico, além daquelas obtidas nos processos de validação de métodos.

Na prática, embora os dados provenientes de validações intralaboratoriais de métodos e de estudos colaborativos constituam a base da estimativa da incerteza, estes dados representam somente uma parte desta, sugerindo que a estimativa da incerteza seja considerada como mais do que simplesmente um parâmetro de desempenho da validação de método (TAVERNIERS, DE LOOSE, VAN BOCKSTAELE, 2004).

4.1 – Seletividade

Seletividade de um método se refere à extensão até a qual ele pode determinar analito(s) específico(s) numa mistura complexa, sem

interferência dos outros componentes da mistura. (BRASIL, 2005), por tanto é uma medida do quanto o método é indiferente à presença, na amostra, de espécies que poderiam interferir na determinação do analito (LEITE, 2002).

Habilidade de um método medir somente o que é pretendido que seja medido (AOAC, 1998).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental (RIBANI et al., 2004).

Na literatura é comum encontrar os termos especificidade e seletividade como sinônimos, mas existem órgãos regulatórios que fazem claras distinções entre ambos os conceitos. Assim a Western European Laboratory Accreditation Cooperation (WELAC) define a seletividade como sendo a referência à extensão na qual o método é capaz de determinar certo analito em particular presente em uma mistura complexa sem interferentes dos componentes da mesma, já especificidade é definida como sendo a perfeição da seletividade para um analito ou grupo de analitos; O ICH não faz distinção entre ambas as definições, mas utiliza apenas o termo especificidade (VESSMAN, 1996).

As definições da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), não deixa lugar a dúvidas e coloca a especificidade como sendo o máximo da seletividade supondo então que nenhuma interferência possa ocorrer enquanto que seletividade determina a extensão em que outras substâncias presentes na matriz interferem na determinação do analito em questão (IUPAC, 2007).

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição e esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2010).

A seletividade de um método se refere à extensão até a qual ele pode determinar analito(s) específico(s) numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes na mistura. Um método, que seja seletivo para um analito ou grupo de analitos, é dito como sendo específico (EURACHEM, 2000).

Neste trabalho será utilizado o termo seletividade, por ser, segundo a definição da IUPAC, o mais apropriado para definir a interferência da matriz na determinação do analito de interesse.

4.2 – Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método obter resultados de ensaios proporcionais à concentração (AOAC, 1998), dentro de um intervalo especificado.

Para métodos quantitativos é determinada pela medição de amostras com concentrações de analito abrangendo a faixa reivindicada do método (BRASIL, 2005), está relacionada diretamente com o sistema de emissão analítica (LEITE, 2002).

Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico (sinal *versus* concentração), os resultados deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados, para determinação do coeficiente de correlação (r^2), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão e desvio padrão relativo.

Se não houver relação linear, deve ser realizada a transformação matemática. Valor igual ou superior a 0,99 é o mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r^2) (BRASIL, 2003). O ICH recomenda que para estabelecer a linearidade, um mínimo de cinco concentrações deve ser utilizado, realizando leituras em triplicata (ICH, 2005).

Segundo Inmetro (2010) a linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$Y = a + bx$$

Sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração;

a = interseção com o eixo y, quando x = 0;

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação, sendo necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica (INMETRO, 2010).

O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático. Um valor maior que 0,90 é, usualmente, requerido. O método pode ser considerado como livre de tendências (unbiased) se o corredor de confiança da reta de regressão linear contiver a origem.

A maioria dos equipamentos de medição quer sejam instrumentos de medida volumétricos (vidrarias), instrumentais, existentes deve-se estabelecer a sua faixa dinâmica linear. É necessário, entretanto, verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com a faixa dinâmica linear e assegurar que nenhum outro fenômeno tenha impacto indesejável na resposta.

Deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados, antes de fazer a regressão linear.

A verificação da ausência de valores discrepantes pode ser feita pelo teste de Grubbs (ISO 5725-3, 1994 e ISO 5725-2, 1994) ou de resíduo Jackknife (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) e a homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos pelo teste de Cochran (ISO 5725-3, 1994) ou teste de Levene (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) ou o teste de Brown-Forsythe (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Calcular o modelo através da regressão linear, os resíduos e o coeficiente de correlação linear (r).

Este é freqüentemente utilizado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático para o estudo de caso. Uma alternativa para avaliar a linearidade seria a realização da análise de variância (ANOVA) na regressão. Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função que modela a concentração do analito na amostra.

4.3 Intervalo de trabalho

O intervalo de aplicação de um método corresponde ao intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade (LANÇAS, 2004), normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003). Para testes de quantificação a USP 25 recomenda que seja avaliado entre 80 e 120% da concentração de teste (USP, 2002).

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito

ou valor da propriedade. A extensão desta faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

Para a análise quantitativa, a faixa de trabalho para um método é determinada pelo exame de amostras com diferentes concentrações de analito e determinação da faixa de concentrações para qual a incerteza admissível possa ser alcançada. A faixa operacional é geralmente mais extensa do que a faixa linear (EURACHEM, 2000).

4.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003), várias metodologias para determinação da exatidão estão disponíveis dependendo de sua aplicação (ICH, 2005).

Para matéria prima: Aplicando a metodologia proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência) ou pela comparação dos resultados obtidos, com aqueles resultantes de uma metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida. Para produto acabado: Pela análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou no caso em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, se aceita a análise pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento. É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração média nominal}} \times 100$$

Proximidade do valor determinado em relação ao valor verdadeiro. A diferença entre o valor médio e o valor verdadeiro, ou seja, erros sistemáticos ou tendências, expressos como porcentagem do valor verdadeiro (AOAC, 1998).

Proximidade de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados de ensaios e um valor de referência aceitável. É usualmente expressa como tendência ou erro sistemático (EC, 2002).

A exatidão é avaliada numericamente através da tendência. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (INMETRO, 2010).

4.5 Precisão

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes, é comumente expressa em termos de desvio padrão e é considerada em três níveis (BRASIL, 2005; USP, 2002).

Grau de concordância de medições sob condições específicas (AOAC, 1998). Proximidade de concordância entre resultados de ensaios independentes obtidos sob condições estipuladas (predeterminadas). A medida da precisão é expressa em termos de imprecisão e computada como desvio padrão do resultado do ensaio. Menor precisão é determinada por um elevado padrão (EC, 2002).

Normalmente a precisão é determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da

reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2010).

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma:

$$C.V. = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

Sendo:

DP = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada.

4.5.1 Repetitividade

É um tipo de precisão relacionada às medições feitas sob condições que podem ser repetidas, isto é: mesmo método; mesmo material; mesmo analista. Mesmo laboratório; curto período de tempo entre as medições (BRASIL, 2005). Em outras palavras é a maior diferença no nível de 95% de confiança entre dois resultados obtidos nas mesmas condições (CIENFUEGOS, 2005). Os documentos da ICH recomendam um mínimo de nove determinações, cobrindo todo o intervalo (triplicata de três concentrações diferentes) ou seis determinações a 100% da concentração de trabalho (ICH, 2005).

De acordo com EAL (1997) repetitividade é a proximidade de concordância entre resultados de medidas sucessivas de um mesmo mensurando, conduzidas sob as mesmas condições de medição. Condições de repetitividade incluem mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento de medição utilizado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curtos intervalos de tempo.

Componente da reprodutividade que pode ser determinado intralaboratorialmente (AOAC, 1998).

Precisão obtida sob condições em que resultados independentes são obtidos com o mesmo método, para amostras idênticas, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, utilizando o mesmo equipamento (EC, 2002).

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas utilizando mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local, e repetições no menor espaço de tempo possível. A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinado por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (INMETRO, 2010).

4.5.2 Precisão intermediária ou inter-análise

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou instrumentos diferentes (BRASIL, 2003).

Os documentos da ICH recomendam que as variáveis a ser estudadas sejam avaliadas conforme as circunstâncias em que o método será utilizado; as variáveis mais comuns incluem dias, analista, equipamento; não sendo necessária a avaliação destas variáveis de forma independente (ICH, 2005). A ANVISA recomenda um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2003).

A precisão intermediária, de acordo com a ISO 5725-3, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas

definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório (INMETRO, 2010).

4.5.3 - Reprodutibilidade ou precisão interlaboratorial

É um conceito de precisão relacionada a medições feitas sob condições que podem ser reproduzidas, isto é: mesmo método; operadores diferentes; laboratórios diferentes; equipamentos diferentes; longo período de tempo entre as medições (BRASIL, 2005).

Proximidade de concordância entre resultados de medidas de um mensurando, conduzidas sob condições modificadas de medição. As mudanças nas condições podem incluir princípio de medição, método de medição, observador, instrumento de medição, padrão de referência, local, condições de uso e tempo (EAL, 1997).

Idealmente, precisão pela performance entre laboratórios (AOAC, 1998).

Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial. A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade (R), o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores da duplicata das amostras analisadas sob condições de reprodutibilidade é significativa (INMETRO, 2010).

4.6 Robustez

É uma medida da capacidade de um método de não sofrer alteração em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (LANÇAS, 2004). Em trabalhos onde há mudança de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação dos métodos, sem alteração significativa nos resultados, pode se dizer que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças no ambiente de análise (RIBANI et al., 2004).

Susceptibilidade de um método de ensaio às alterações das condições experimentais, as quais podem ser expressas como tipos de amostras, analitos, condições de armazenamento, condições ambientais ou de preparo de amostra em que o método pode ser aplicado tal como apresentado ou com pequenas alterações específicas. Para todas as condições experimentais que possam na prática, estar sujeitas às flutuações (por exemplo: estabilidade de reagentes, composição da amostra, pH, temperatura) qualquer variação que puder alterar o resultado deve ser indicada (EC, 2002).

Quando diferentes laboratórios usam o mesmo método, eles introduzem inevitavelmente pequenas variações no procedimento, que pode ter ou não uma influência significativa sobre o desempenho do método (BRASIL, 2005).

Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de Younden. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (INMETRO, 2010).

4.7 Incerteza

Parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. O parâmetro pode se, por exemplo, desvio padrão (ou um múltiplo deste) ou intervalo de confiança (EAL, 1997).

A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores dentro da qual o valor deve se situar, com um nível de confiança especificado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado (EURACHEM, 2000).

Como exemplo de fatores que tornam qualquer resultado de medição analítica possível de se desviar do valor verdadeiro, temos: efeitos da temperatura nos equipamentos volumétricos, reflexão da luz em instrumentos espectroscópicos, variações de voltagem na rede elétrica, a interpretação dada por cada analista aos métodos especificados e recuperações de extrações incompletas, todas elas influenciam potencialmente o resultado. Tais erros precisam ser minimizados por controles externos ou explicitamente corrigidos, por exemplo: pela aplicação de um fator de correção adequado (EURACHEM, 2000).

4.8 Limite de detecção/Capacidade de detecção

Menor quantidade que pode ser medida com certeza estatística razoável (AOAC, 1998).

Menor quantidade de uma substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada numa amostra com uma probabilidade de erro beta. No caso de substâncias para as quais não haja limite

permitido estabelecido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa na qual o método é capaz de detectar amostras verdadeiramente contaminada com uma probabilidade de $(1-\beta)$. No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, a capacidade de detecção é a concentração na qual o método é capaz de detectar a concentração do limite permitido com uma probabilidade de $(1-\beta)$. Erro beta é a probabilidade de a amostra ensaiada ser não-conforme, apesar de ter obtido um resultado conforme (falsa decisão conforme) (EC, 2002).

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído (INMETRO, 2010).

4.9 Limite de determinação/limite de quantificação

Menor quantidade de analito, se realmente presente, que será detectada e que pode ser identificada (AOAC, 1998).

Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias. (INMETRO, 2010).

5 - PROCEDIMENTOS PARA AVALIAÇÃO

Alguns procedimentos são recomendados na literatura para avaliação da linearidade, efeitos de matriz, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Usualmente os procedimentos não são harmonizados em termos de delineamentos experimentais e ferramentas estatísticas para análises de dados, além

de serem descritos de forma superficial, com formas de cálculos esporadicamente detalhadas.

6- MÉTODOS TITULOMÉTRICOS DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

6.1- MÉTODO DA N-BROMOSUCCINAMIDA

Na década de 1960, a N-bromosuccinimida foi introduzida como um reagente para a determinação do ácido ascórbico usando amido como indicador. Compostos redutores, ácido redúctico e sais de ferro não interferem com a titulação, mas verificou-se que havia resultados insatisfatórios com as amostras de conservas de sucos contendo metabissulfito como conservante. No entanto, bissulfito pode estar associado à acetona (SARWAR et al., 1975), antes de efetuar a titulação. Chauhan e Singh, 1995 fizeram uso do N-bromosuccinamida para microdeterminação de ácido ascórbico em soluções de matérias-primas ou de preparações farmacêuticas.

A N-Bromosuccinimida (NBS) é um agente oxidante que na titulação oxida o ácido ascórbico na presença de iodeto de potássio e amido. Quando a NBS é adicionado em excesso, a reação é completa e o NBS libera o iodo do iodeto de potássio, o qual forma o complexo azul / preto com amido, indicando o ponto final da titulação.

6.2 - DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM SOLUÇÃO DE IODO

A titulometria de oxidação-redução envolve reações em que ocorre transferência de elétrons. A análise de ácido ascórbico normalmente é

realizada através de reação com um agente oxidante, a qual deve ser realizada o mais rapidamente possível, visto que o ácido é facilmente oxidado pelo próprio oxigênio do ar, formando ácido deidroascórbico.

Existem vários agentes oxidantes que podem ser empregados na determinação de vitamina C, sendo que um dos mais simples é o iodo. O iodo é um agente oxidante moderado capaz de oxidar quantitativamente apenas substância fortemente redutora.

O ácido ascórbico (vitamina C) reduz rapidamente iodo a iodeto, formando o ácido deidroascórbico. Quando um excesso de iodo (gerado pela reação de iodato com iodeto) é adicionado ao ácido ascórbico, o iodo que não reage (excesso) pode ser titulado com solução padrão de tiossulfato (iodimetria) (FREITAS, 2009).

A reação de redução do iodo é a seguinte:



No entanto, a titulação empregando solução de iodo como titulante apresenta algumas dificuldades: perda de iodo por volatilização, necessidade de padronização da solução e realização da análise o mais rápido possível.

O ponto final na iodimetria é detectado utilizando-se amido como indicador. A amilose do amido reage com o iodo, em presença de iodeto, formando um complexo azul escuro, observável em concentrações mínimas de iodo.



Este método utiliza suspensão de amido como indicador e, seu emprego, tem sido relatado em muitos trabalhos, mas fora observado que o amido não pode ser usado em tais titulações, uma vez que diminui a velocidade de reação entre o ácido ascórbico e iodo.

6.3 - DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO COM IODATO DE POTÁSSIO

No Brasil, para a quantificação de ácido ascórbico em medicamentos utiliza-se, como método oficial, a titulação com iodato de potássio (IAL, 1985).

A adição em excesso de íons iodeto à solução de iodo forma-se o triiodeto,



que é um agente oxidante:



Usando-se como titulante uma solução padrão de iodo contendo excesso de iodeto, a perda de iodo por volatilização decresce apreciavelmente, principalmente se a análise for realizada sob refrigeração, sendo que, o erro devido à alteração do título da solução padrão é tolerável.

Uma alternativa é gerar o iodo durante a titulação. Isto é possível empregando-se como titulante uma solução padrão de iodato de potássio (padrão primário) em presença de excesso de iodeto (iodatometria). Esta solução é estável e libera iodo em presença de ácido forte:



O iodo formado reage com a espécie redutora da amostra formando iodeto. No processo global, o número de oxidação do iodo varia de +5 (IO_3^-) para -1 (I^-), ou seja, são envolvidos 6 elétrons.

Como a titulação ocorre em meio ácido, o equilíbrio da reação de oxidação do ácido ascórbico a dehidroascórbico é deslocado no sentido da formação da vitamina C, o que diminui a oxidação da mesma pelo oxigênio do ar durante a titulação.

Método aplicado para a determinação de vitamina C ou ácido L-ascórbico, em alimentos *in natura* ou enriquecidos, quando a quantidade da referida vitamina for maior que 5mg e baseia-se na oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio (IAL, 1985), pela reação do íon iodeto em solução ácida.

6.4 - MÉTODO DO 2,6-DICLOROFENOL-INDOFENOL (DCFI)

Tillmans em 1927, citado por Aldrigue (1998), foi o responsável por desenvolver a metodologia colorimétrica mais empregada atualmente, na dosagem de ácido ascórbico, em alimentos. Trata-se de uma titulação utilizando o indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI). Neste método, o ácido ascórbico (AA) reduz o DCFI a uma solução incolor e, no ponto final da titulação, o excesso do indicador não reduzido confere à solução ácida uma coloração rosa, o que facilita a visualização do ponto final a olho nu, mas este também pode ser verificado eletrometricamente ou fotometricamente (ALDRIGUE, 1998).

Esta é uma técnica de fácil aplicação e baixo custo, principalmente quando comparada à técnica cromatográfica, por exemplo. O uso do DCFI é de grande frequência, tanto para a análise de produtos alimentícios quanto para produtos farmacêuticos, além de ser utilizado como base de comparação para novas metodologias. Esta técnica é ainda aquela indicada pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC, 1997) para a determinação da vitamina C em preparados e sucos de frutas.

O corante DCFI tem sido referido como "Reagente de Tillmans". Uma solução contendo cerca de 2mg de ácido ascórbico e 5 mL de uma mistura de ácido metafosfórico e ácido acético é titulado com uma solução padrão da DCFI. O método é aplicável apenas quando a

concentração de ácido deidroascórbico é baixa. A alcalinidade da amostra também dificulta a determinação (AOAC, 1997).

No Brasil, para a quantificação de ácido ascórbico em medicamentos utiliza-se, como método oficial, a titulação com iodato de potássio. Para sucos de frutas é mais utilizada a titulação pelo método de Tillmans, que se baseia na redução do corante 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C (IAL, 1985). O titulante age como indicador e o ácido ascórbico pode ser determinado pela medida do excesso do reagente.

Este método sofre interferência de ferro, estanho, cobre, sulfito e tiosulfato (AOAC, 1984). Além disso, apresenta como desvantagem a dificuldade de visualização do ponto final, quando se trabalha com amostras coloridas.

A aplicabilidade do método é restrita a apenas essas amostras de frutas cítricas e comprimidos multivitamínicos que não contenham sais minerais. Materiais que contêm corantes naturais ou adicionados tornam difícil para visualizar o ponto final. Por exemplo, corantes comestíveis como amarantho, indigotina e tartrazina presentes em preparações farmacêuticas, necessitam serem removidas ou por troca iônica ou através da adição de carvão vegetal.

7 - MÉTODO INSTRUMENTAL ESPECTROFOTOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Encontram-se na literatura vários procedimentos analíticos para a determinação do AA. A espectrofotometria é um processo de medida que basicamente, emprega as propriedades dos átomos e moléculas de absorver e/ou emitir energia eletromagnética em uma das regiões do espectro eletromagnético (CIENFUEGOS, 2000).

Tecnicamente dizemos que quando uma molécula absorve um fóton, a energia da molécula aumenta, ou seja, os elétrons são promovidos a um estado excitado. Se a molécula emite um fóton, a energia da molécula diminui. O estado de menor energia de uma molécula é chamado fundamental. A luz visível e a radiação ultravioleta causam a transferência de elétrons para orbitais de maior energia (HARRIS, 2005).

Quando a luz é absorvida por uma amostra, a energia radiante do feixe de luz diminui. A energia radiante, P , é a energia por segundo por unidade de área do feixe de luz. A figura 5 representa um esquema de um espectrofotômetro de feixe simples.

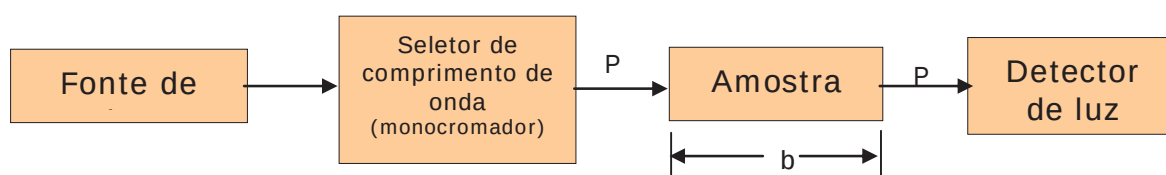


Figura 5 - Diagrama esquemático de um espectrofotômetro de feixe simples.

No espectrofotômetro de feixe simples luz monocromática, oriunda de uma fonte apropriada, com energia radiante P_0 , atinge uma amostra em uma cubeta de comprimento b . A energia radiante do feixe que sai do outro lado da amostra é P . Alguma quantidade de luz pode ser absorvida pela amostra, de forma que $P < P_0$ (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; HARRIS, 2005).

Os espectrofotômetros podem dispor de registradores gráficos que permitem a obtenção de espectros de absorção. As escalas dos espectrofotômetros são, com frequência, calibradas para a leitura em absorbância e, também, em porcentagem de transmitância (VOGEL, 2002).

A absorbância é diretamente proporcional à concentração, C, de espécies absorventes de luz na amostra. A relação entre absorbância e a concentração está representada pela equação 1, conhecida como a lei de Lambert-Beer, ou simplesmente lei de Beer (HARRIS, 2001).

$$A = \epsilon.b.C$$

Equação 1: onde A= absorbância indica a quantidade de luz absorvida em um determinado comprimento de onda;

ϵ (épsilon) = absortividade molar tem unidades de $\text{mol}^{-1}/\text{L cm}^{-1}$ para tornar o produto $\epsilon.b.C$ adimensional;

b = caminho óptico geralmente expresso em centímetros (cm);

C = concentração da amostra, geralmente dada em mol por litro (mol/L).

A lei de Beer é válida para radiação monocromática passando através de uma solução diluída, onde a espécie absorvente não está participando de um equilíbrio que seja dependente da concentração. Ela estabelece que a absorbância seja proporcional à concentração da espécie absorvente. Ela se aplica à maioria das substâncias quando a radiação é monocromática e as soluções a serem estudadas são suficientemente diluídas (menores ou iguais a 0,01M) (HARRIS, 2005).

Para a maioria das análises químicas, a resposta do procedimento analítico deve ser avaliada usando-se quantidades conhecidas do analito (os padrões), de forma que a resposta para uma quantidade desconhecida possa ser determinada. Por isso, normalmente faz-se uso de uma curva de calibração, que mostra a resposta de um método analítico em função de quantidades conhecidas do analito (HARRIS, 2005).

As medições espectrofotométricas na região do ultravioleta e visível em geral requerem a comparação da absorbância da solução da amostra, preparada na concentração especificada da metodologia analítica, com a absorbância de padrões de concentração conhecida.

Inicialmente se procede à leitura da solução padrão e, em seguida, à da amostra, com o menor intervalo de tempo possível entre as duas etapas e em condições experimentais idênticas (CIENFUEGOS, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

O importante é que cada substância tem um espectro característico e, desse modo, se quer identificar um material desconhecido, pode-se fazê-lo a partir de sua curva de absorção, comparando-a com curvas de substâncias conhecidas (CIENFUEGOS, 2000; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTIGNAC, J.P.; LE BIZEC, B.; MONTEAU, F.; ANDRE, F. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. **Anal. Chim. Acta**, v. 483, p. 325-334, 2003.

ALDRIGUE, M. L. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica, utilizando a CLAE, para determinação de vitamina C em frutas e seus principais produtos**. Campinas, 1998. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) **Official methods of analysis**. Washington , D.C., 1984. p. 844-845.

AOAC (Association Of Official Analytical Chemists) **Official methods of analysis of the AOAC**. Washington, D.C., 1997. v. 2, p. 16-17.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **AOAC Peer-verified methods program. Manual on policies and procedures**. Gaithersburg. Maryland: AOAC, 1998. 35 p.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. CPTI – Tecnologia & Desenvolvimento São Paulo – SP. **Biológico**, São Paulo, v.64, n.2, p.175-177, jul./dez., 2002

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BLUMBERG, J.B. Considerations of the scientific substantiation for antioxidant vitamins and - carotene in disease prevention. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, p.1521S-1526S, 1995. Supplement 6.

BOURNE, G.; ALLEN, R. Vitamin C in lower organisms. **Nature**, 136:185-186, 1935.

BOURNE, G. Synthesis of Vitamin C by Luteal Tissue. **Nature**, 135, 148-149, 1935.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para qualidade em química analítica**. Brasília: SENAI/DN, 2005. 46p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

CHEFTEL, J. C. CHEFTEL, H. **Introducion a la bioquimica y tecnologia de los alimentos**. v.1, Zaragoza: Acribia, 1976. 317p.

CHAUHAN, R.P.S.; SINGH, U.B. Ascorbic acid is of great medicinal importance. **J. Ind. Chem. Soc.** v. 72, p. 355, 1995.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 606 p.

CIENFUEGOS, F. **Estatística aplicada ao laboratório**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.

DABROWSKI, K.; MATUSIEWICZ, M.; BLOM, J.H. Hydrolysis, absorption and bioavailability of ascorbic acid esters in fish. **Aquaculture**, v.124, p.169-192, 1994.

DAVIES, M.B.; AUSTIN, J.; PARTRIDGE, D.A. Vitamin C: Its Chemistry and Bioquímica. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, UK, 1991

DIPLOCK, A. T. et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **Br. J. Nutr.**, v. 80, n. 1, p. 77-112, 1998.

EAL (European Cooperation for Accreditation of Laboratories). EAL-P11. **Validation of test methods: general principles and concepts.** Paris: EAL, 1997. 13p.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

EURACHEM. **The Fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics.** 1998.

EURACHEM, **Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories.** Eurachem Nederland Laboratory of the Government Chemist of United Kingdom, 2000. 46p.

EURACHEM/CITAC. **Quantifying uncertainty in analytical measurements.** Teddington: LGC, 2000. 120p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: **Atheneu**, parte I, 1988.

FDA's Draft Guidance for Industry. **Analytical procedures and methods validation.** 2000. (Center for Drug Evaluation and Research. CDER).

FIORUCCI, A.R.; SOARES, M.H.F.B., CAVALHEIRO, E.T.G. A importância da Vitamina C na sociedade através dos tempos. **Quím. Nova na Escola**. n.17, Maio de 2003.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION, U.S. – FDA. Rockville, MD, 1978.

FREITAS, S.S. **Roteiro para aula prática de química analítica quantitativa.** Departamento de Química - UFG – CAC, 2009.

GARFIELD F.M. Quality assurance principles for analytical laboratories. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International, 1994. 220 p.

GRODEN, D.; BECK, E. H₂O₂ destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts **Biochim. Biophys. Acta**, v. 546, p. 426-435, 1979.

HARRIS, D.C. **Análise química quantitativa.** 5. ed. São Paulo: LTC, 2001.

HARRIS, D.C. **Análise química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro. LTC, 2005. 876p.

HILL, A.R.C.; REYNOLDS, S.L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticides residues in food and animal feeds. **Analyst**, v. 124, p. 953-958, 1999.

ICH. **Text on Validation of Analytical Procedures Q2(R1)**. 2005. Disponível em <<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>> Acesso em: 8 jan. 2011.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. 2010. RJ. Brasil.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos para análise de alimentos** 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo (IMESP), 1985. 560 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. 2007. Disponível em: <<http://old.iupac.org/publications/compendium/S.html>>. Acesso em: 31 ago. 2010.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. 1999. International Organization for Standardization. ISO, Geneva. Switzerland.

ISO (International Standard Organization) 5725-2. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results**. Part 3: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; 1994.

ISO (International Standard Organization) 5725-3. **Accuracy (trueness and precision) of Measurements Methods and Results**. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurements methods; 1994.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. Geneva: ISO, 2005. 28 p.

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

KANEKO, J.J., HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic, 1997. p.932.

LANÇAS, F M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Paulo: Rima Ed., 2004.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4 ed. Campinas,SP: Átomo, 2002. 278p.

MATUSIEWICZ, M.; DABROWSKI, K.; VOLKER, L.; MATUSIEWICZ, K. Ascorbate polyphosphate is a bioavailable vitamin C source in juvenile rainbow trout: tissue saturation and compartmentalization model. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 125, p. 3055-3061, 1995.

MORETTO, L.D.; SHIB, M. A era da validação. **Pharm. Technol.**, São Paulo, v. 4, n. 4, p. 44-48, 2000.

NATA Technical Note 17. Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods. Austrália: National Association of Testing Authorities, 1998.

NBR ISO/IEC 17025. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração e de ensaios**. Rio de Janeiro: ABNT, 2001.

NIKI, E.; NOGUCHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.62, p.1322S-1326S, 1995. Supplement 6.

O'KEEFE, T. **Ascorbic acid and stable ascorbate esters as sources of vitamin C in aquaculture feeds**. Singapore: American Soybean Association – United Soybean Board, 2001. 8 p. (ASA Technical Bulletin Vol. AQ48-2001)

PASTEELNICK, L. A. Analytical methods validation. In: BERRY, I.R., NASH, R.A., eds. **Pharmaceutical process validation**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.411- 428.

PODMORE, I.D.; GRIFFITHS, H.R.; HERBERT, K.E.; MISTRY, N.; MISTRY, P.; LUNEC, J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature**, London, v.392, n.6676, p.559, 1998.

REICHSTEIN, T. et al. Synthese dert d-und l-ascorbinsäure (C-Vitamin). **Helv. Chim. Acta**, v.16, p.1019-1033, 1933.

RIBANI, M. et. al. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Quím. Nova**, vol. 27, n.5, p.5-20. out, 2004.

ROSE, R. C.; CHOI, J. L. Intestinal-absorption and metabolism of ascorbic-acid in rainbow-trout. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.258, n.5, p.R1238-R1241, part 2, may, 1990.

SARWAR, et al. 1975. Apud ARAYA, S.P.; MAHAJAN, M. Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C, **Analytica Chimica Acta**, 417 1-14, 200

SHARP, J. **Quality in the manufactured of medicines and other healthcare products**. 3rd. ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

SILVA, S.L.A.; FERREIRA, G.A.L.; SILVA, R.R. À procura da vitamina C. **Quím. Nova na Escola**, n. 2, p. 31-32, 1995.

SILVA, M.R., NAVES, M.M.V. (Org.) **Manual de nutrição e dietética**. 2. ed. rev. atual. Goiânia: UFG, 1998. cap. 2: Recomendações de energia e nutrientes, p. 21-34.

SKELBAEK, T.; ANDERSEN, N. G.; WINNING, M.; WESTERGAARD, S. Stability in fish feed and bioavailability to rainbow trout of two ascorbic acid forms. **Aquaculture**, Amsterdam, v.84, n.3-4, p.335-343, 1990.

SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P.; WHITE, A. **Principles of biochemistry**: Mammalian biochemistry. 7th. ed. New York: McGraw-Hill, 1983.

SOLIMAN, A.K.; JAUNCEY, K.; ROBERTS, R.J. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapias (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.52, p.1-10, 1986.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, **Anal. Chim. Acta**, v. 552, n. 1-2, November, p. 25-35, 2005

STEDMAN, T.L. **Dicionário médico**. 25.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

STHAL, W.; SIES, H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes**, New York, v.46, n.5, p.14S-18S, 1997. Supplement 2.

SVENT-GYORGI, A. SVIRBELY, J.L. CV. The Chemical Nature of Vitamin C. Institute of Medical Chemistry, University of Szeged. Hungary. **Biochem. J.**, v. 27, n. 3, p.865-870, 1932.

TACON, A.G.J. **The Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp – A Training Manual 1. The Essential Nutrients**. Food and Agriculture Organization of United Nations. Brasília, Brasil. Junho, 1987. 52p.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. **Pure Appl. Chem.**, v. 78, p. 145-196, 2006.

USP (United States Pharmacopeia). 24th. ed. Rockville, U.S.: Pharmacopeial Convention, 2000. p.2149-2163.

USP (United States Pharmacopeia). 25th. ed. Rockville: Pharmacopeia Convention, 2002. p. 1534-1535.

VAN DER VOET, H.; VAN RHIJN, J.A.; VAN DE WIEL, H.J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. **Anal. Chem. Acta**, v. 391, p. 159-171, 1999.

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

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

WEBER, P.; BENDICH, A.; SCHALCH, W. Vitamin C and human health: a review of recent data relevant to human requirements. **Int. J. Vit. Nutr. Res.**, Bern, v.66, n.1, p.19-30, 1996.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, p. 624-632, 1999.

CAPÍTULO 1

VALIDAÇÃO DO MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO N-BROMOSUCCINAMIDA COMO AGENTE TITULANTE

RESUMO

A validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de uma metodologia analítica, em vários setores onde a qualidade do produto fabricado é uma das principais razões da existência da empresa. O presente trabalho apresenta uma abordagem metrológica de método clássico para a determinação do ácido ascórbico (AA). Os parâmetros de validação do método de análise pela N- Bromosuccinamida (NBS) e o cálculo da incerteza atenderam as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Os resultados obtidos nas análises foram: 1- faixa linear: 2,5 a 125 mg de AA; 2- faixa de trabalho: 7,46 a 121,25 mg AA; 3- LD: 0,39 mg AA; 4- LQ: 1,30 mg AA; 5- precisão por repetitividade $s_r=11$: $\pm 0,17$ mg AA; 6- precisão pela norma ASTM 691-99 s_n : $\pm 0,11$ mg AA; 7- robustez (Younden-Steiner) forneceu uma precisão de $S_{global} = \pm 0,94$ mg AA; 8- a incerteza genérica apresentou o valor de 4,16. A linearidade avaliada pela análise de resíduo (Y-Yo) mostra que a curva é linear em toda a sua extensão ensaiada e o método validado foi preciso, robusto e exato. A validação é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos.

Palavras-chave: ferramenta da qualidade; resultados confiáveis; adequação para uso.

ABSTRACT

Validation is the appropriate tool to ensure the reliability of an analytical methodology in several sectors where the quality of the manufactured product is one of the main reasons for the existence of the company. This paper presents an approach to metrology classical method for the determination of ascorbic acid (AA). The validation parameters of the analysis method by N- Bromosuccinamida (NBS) and uncertainty calculation met the guidelines of ISO-IEC-17025- guide and EURACHEM guides. The results obtained in this study were: 1- linear range: 2.5 to 125 mg AA; 2- working range: 7.46 to 121.25 mg AA; 3- LD: 0.39 mg AA; 4- LQ: 1.39 mg AA; 5- precision repeatability $s_r = 11: \pm 0.7$ mg AA; 6- precision by ASTM 691-99, $s_n: \pm 0.11$ mg AA; 7- robustness (Younden-Steiner) provided an accuracy of $S_{global} = \pm 0.94$ mg = AA; 8- uncertainty determined generic was 4.16. Linearity was assessed by residual analysis (Y-Y0) shows that the curve is linear in its entirety tested and validated method was precise, robust and accurate. Validation is the confirmation, through provision of objective evidence that the requirements of a specified intended use are fulfilled.

Keywords: tool quality; reliable results; suitability for use.

1- INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, a seleção e o desenvolvimento de métodos de ensaio foram considerados assuntos de grande importância para os laboratórios, com frequente negligência sobre as condições de aplicação prática dos mesmos. Possivelmente, esta ênfase aconteceu devido ao fato de que a maioria das organizações, governamentais ou padronização, desenvolvia métodos e incorporava-os às legislações ou padrões internacionais, mas não utilizava nenhum mecanismo para verificar como os métodos estavam sendo aplicados. Felizmente, tal panorama tem sido suplantado pela necessidade de demonstração de sucesso na aplicação de métodos de ensaio (WOOD, 1999).

Em 1992, King considerou a existência de evidências de que cerca de 30% de todas as medidas químicas não estavam ajustadas aos seus propósitos de uso, o que demonstrava uma necessidade urgente em confirmar a integridade de métodos de ensaio para as diversas técnicas e áreas de aplicação (BRUCE, MINKKINEN, RIEKKOLA, 1998).

Esta confirmação, por exame e evidência objetiva, de que os requisitos para uso pretendido de um método são atendidos, denomina-se validação (ISO, 2005).

O efeito benéfico do AA como vitamina aliado ao seu emprego como aditivo em alimentos, leva-nos a desenvolver novos procedimentos analíticos para a determinação do AA em fármacos e em alimentos. Avaliar a quantidade de AA constitui um importante fator para o controle da qualidade de alimentos, bebidas e fármacos. Sua caracterização em frutos tropicais é relevante, pois pode contribuir para um aproveitamento mais racional dos recursos naturais gerando benefícios sociais e econômicos.

Os métodos químicos para a determinação de ácido ascórbico são baseados principalmente na redução de caracteres. Um deles, rápido e altamente viável, é utilizando como titulante a N-bromossuccinamida (NBS), que atua como um agente oxidante que provoca a conversão de álcoois secundários em cetonas dando origem ao ácido dehidroascórbico, que é reduzido irreversivelmente para succinamida, e brometo de hidrogênio.

A NBS é capaz de libertar o iodo, por reação com iodeto de potássio em solução ácida (ácido acético glacial), mas na presença de ácido ascórbico oxida-o primeiro. Quando a NBS é adicionada em excesso, a reação é completa e a NBS libera o iodo do iodeto de potássio, o qual forma o complexo azul / preto com amido, indicando o ponto final da titulação.

O objetivo desse trabalho foi a validação intralaboratorial de método quantitativo, titulométrico, utilizando a NBS como agente titulante na determinação de ácido ascórbico.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL

Todos os reagentes utilizados atendem à especificação grau analítico (PA). O ácido ascórbico foi obtido junto à empresa Sigma Aldrich, cujo número do CAS é: 50-81-7. Lote: 048k0069A5960.

O ácido acético glacial PA – ACS o Iodeto de Potássio (PA) e o amido (PA) foram obtidos pela empresa Qhemis.

As vidrarias usadas: bureta, balões volumétricos e pipetas foram calibradas e a água utilizada nas diluições foi ultra-pura.

Todas as análises foram feitas em 10 replicatas.

2.1.1 – Soluções

Preparo da solução de NBS: pesar 1,4 g NBS, dissolver em água, agitando até completa dissolução do reagente. Coloque em balão volumétrico de 200 mL e complete o volume com água.

Preparo da solução de Iodeto de Potássio a 4%: pesar 20g de Iodeto de Potássio, adicionar em um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água.

Preparo da solução-padrão de Ácido Ascórbico: pesar 1g de Ácido Ascórbico, adicionar água e agitar até completa dissolução. Colocar em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Preparo da solução de amido a 1%: pesar 1g de amido, colocar em um béquer, adicionar um pouco de água fazendo uma pasta. Verter no béquer 100 mL de água fervente. Agitar obtendo uma solução límpida.

2.2 – MÉTODO

Metodologia proposta por Sawar et al., 1975, utilizando NBS. A NBS é um agente oxidante que na titulação oxida o ácido ascórbico na presença de iodeto de potássio e amido. O ponto final da titulação é quando a NBS libera o iodo do iodeto de potássio formando um complexo azul/ preto com amido.

2.2.1 – Procedimentos

Em frascos Erlenmeyers de 250mL, adicionar as seguintes alíquotas da solução de ácido Ascórbico: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5; 11,0; e 12,5mL.

Adicionar em cada concentração de ácido ascórbico, 1 mL de Ácido Acético Glacial, 5 mL da solução de Iodeto de Potássio 4% e 1mL da solução de Amido 1%. Titular com solução de NBS até coloração azul/preto.

3- PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de desempenho dos métodos foram estabelecidos por procedimentos intralaboratoriais, atendendo as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e de quantificação experimentais e incerteza genérica foram os parâmetros estudados.

O nível de significância adotado nos testes foi de $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram feitos em planilhas comerciais, cujos resultados foram previamente validados frente aqueles obtidos softwares de análise estatística. Para cada parâmetro validado foram feitas dez replicatas.

3.1 – Curva Analítica:

Para a obtenção da curva analítica, foram feitas 10 curvas utilizando 17 alíquotas de AA, fazendo-se uma média das curvas.

Para levantamento da curva analítica de cada método, foi levado em consideração a massa de ácido ascórbico adicionada em

relação à massa de ácido ascórbico determinada que foi calculada de acordo com a equação da reta da bureta calibrada.

3.2 – Linearidade:

A linearidade é a habilidade do método de obter resultados de ensaios proporcionais à concentração do analito sendo verificada a partir da análise de dez curvas analíticas em 17 alíquotas de AA, na faixa de 0,1 a 12,5 mg. Foi determinada levando-se em consideração a massa de ácido ascórbico determinado em relação ao valor de $Y - Y_0$ onde Y = massa de ácido ascórbico determinado e Y_0 = massa de ácido ascórbico adicionado.

A linearidade foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

3.3 – Faixa Linear de Trabalho:

Faixa de concentração do analito, ou valores de propriedades, ao longo da qual o método pode ser aplicado. Intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade que foi calculado utilizando-se os valores da massa de ácido ascórbico determinado em relação aos valores obtidos em $U/x\%$, onde U = média dos desvios padrões de cada ponto da massa de ácido ascórbico determinado e $x\%$ = massa de ácido ascórbico determinado dado em porcentagem.

3.4 – Sensibilidade:

É a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito sendo, portanto, o coeficiente

angular da inclinação da reta. Foi calculada através da equação da reta $Y = a + bx$. A sensibilidade é o valor de b obtido na equação da reta.

3.5 – Limite de Detecção (LD):

Determinado pela análise repetida de uma porção de amostras de branco e a concentração do analito. É, portanto, a menor concentração do analito que pode ser confiavelmente detectada pelo método.

Analisar dez amostras brancas independentes, fortificadas na menor concentração aceitável (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado).

3.6 – Limite de Quantificação (LQ):

É a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. É normalmente o ponto mais baixo da curva de calibração, excluindo o branco. As alíquotas de amostras do branco foram fortificadas, em vários níveis de concentrações, próximas ao limite de detecção.

3.7 – Precisão por Repetição (sr)

É a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e normalmente expressa em termos de desvio-padrão e coeficiente de variação e depende da concentração do analito. Os cálculos foram feitos através da fórmula:

$$CV = \frac{DP}{X} \times 100$$

Onde: DP = desvio padrão e X = concentração média determinada.

A precisão foi determinada por análises em onze repetições na concentração nominal de 55,86 mg de AA.

3.8 – Precisão pela Norma da American Society for Testing and Materials de agosto de 1999 (ASTM E 691-99) (sn):

A precisão pela norma ASTM E 691-99 foi feita pelo número de pontos ensaiados pelo cálculo do s/sr onde s = desvio padrão dos pontos ensaiados e sr = raiz quadrada da soma de s ao quadrado dividido pelo número de pontos ensaiados (n). Verificou-se o K (valor crítico) na tabela t de student para $p=0,05\%$, $p=17$ (n^o . pontos ensaiados) e $n=10$ (replicatas).

3.9 – Robustez:

Pequenas variações no procedimento que pode ter ou não influencia significativamente sobre o desempenho do método. A robustez de um método foi testada pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das conseqüências. Utilizou-se o teste de Younden-Steiner que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for à robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Nesse método foram realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 7 diferentes etapas, no procedimento analítico. As oito medições foram realizadas numa ordem

aleatória, variando-se a temperatura do ambiente (31 e 26°C), concentração do ácido acético glacial (2 e 1N), volume do ácido usado (25 e 12,5 mL), agitação (N= normal e L= lenta), tempo de adição do titulante NBS (N= normal e L= lenta), volume do indicador amido (1 e 0,5 mL) e concentração do indicador (0,1 e 0,08N).

O efeito foi calculado, levando-se em conta a matriz dos fatores nominais denominados por letras maiúsculas, de **A** a **G** e a variação por letras minúsculas, de **a** a **g**, conforme Tabela 1.1:

Tabela 1.1: Matriz dos fatores para determinação da robustez

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	S	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF, 2005

Para determinar a variação de um fator, encontrar os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e as 4 minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de **C** para **c**, usar os resultados:

$$\frac{s + u + w + y}{4} \text{ e } \frac{t + v + x + z}{4}$$

O efeito do fator C/c será:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4}$$

Calcular todos os 7 pares para obter 7 diferenças, que podem ser ordenados para revelar aqueles com efeito significativo no resultado. Interpretar os resultados. Verificar o efeito e ver o critério que não pode ser maior que $2 \times s_{\text{global}}$ (desvio padrão global). Se for maior o método estará perdendo precisão.

3.10 – Recuperação:

Ou tendência é o erro sistemático do sistema de medição. A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de dez determinações sob condições de repetitividade o valor aceito como verdadeiro (MR: material de referência). Cálculo pela fórmula:

$$\%R = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

3.11 – Exatidão:

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi avaliada numericamente através da tendência (recuperação) por intermédio de análises dos ensaios aplicados a amostras de suco industrializado de laranja ($C_{\text{nominal}} = 46$ mg de AA) em três diferentes concentrações de ácido ascórbico determinado (39,30; 58,90 e 78,50 mg). Foi determinado e porcentagem de recuperação que foram calculados pela divisão dos valores médios da massa de ácido ascórbico determinado sobre os valores médios da massa de ácido ascórbico adicionado multiplicado por 100, segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração média nominal}} \times 100$$

3.12 – Incerteza Genérica:

Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Foi determinada subtraindo-se os valores médios da massa de ácido ascórbico determinado e massa de ácido ascórbico adicionado.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos parâmetros experimentais, propostos para validação do método titulométrico, utilizando-se N-bromosucinamida para determinação do ácido ascórbico, estão expostos, a seguir.

4.1 – Curva Analítica

Os pontos empregados para a construção da curva de analítica foram em número de $p = 17$, com repetição das medidas para $n = 10$. A média das curvas obtidas está apresentada nas Figuras 1.1.

Curva analítica

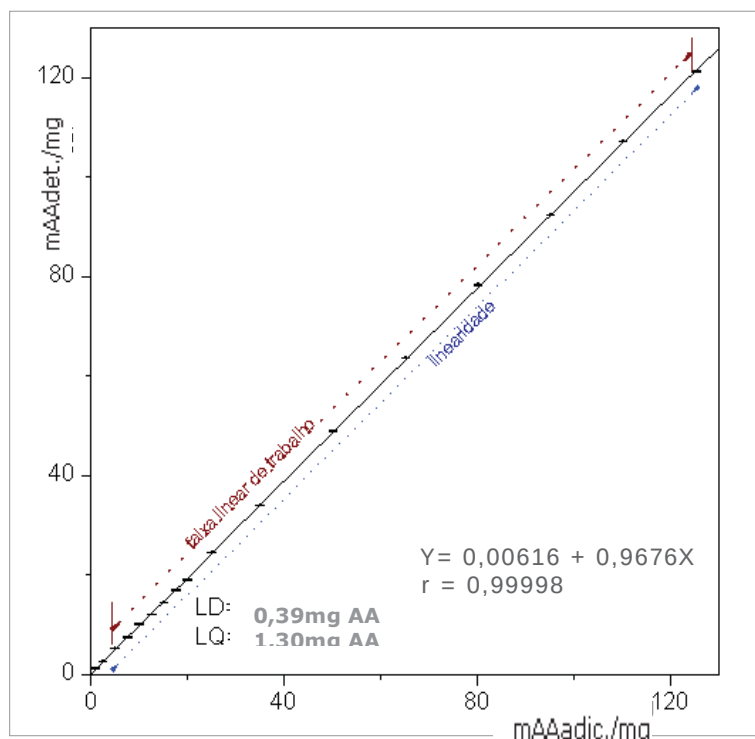


Figura 1.1 - Curva analítica: método estequiométrico para determinação de **AA** empregando **NBS** como agente titulante; parâmetros: **LD**; **LQ**; Linearidade; faixa linear de trabalho; sensibilidade: **S**= 0,9676; **r**= 0,99998.

A curva analítica ($Y = 0,00616 + 0,9676 X$), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99998, o que está em concordância com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (BRASIL, 2003) que é $r = 0,99$.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de quantificação é a menor concentração de analito, que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. Ele deve ser estabelecido usando-se uma amostra ou padrão de medida apropriado, isto é, ele é normalmente o ponto mais baixo na curva de calibração (excluindo o branco).

O limite de detecção e o limite de quantificação para o método em estudo foram de 0,39 mg AA e 1,30 mg AA, respectivamente.

O parâmetro investigado, apresentado na figura 1.2 fornece evidência objetiva da linearidade ($Y-Y_0$).

Linearidade

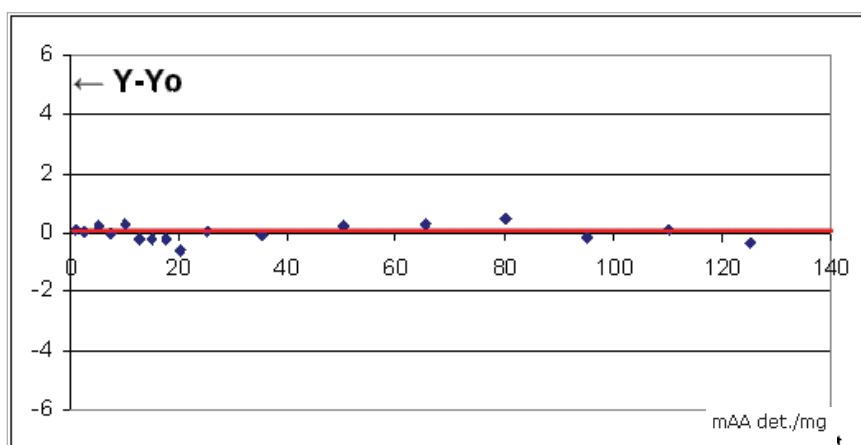


Figura 1.2 - Avaliação da **linearidade** a partir dos resíduos ($Y-Y_0$), obtidos a partir dos valores de $mAA_{determinada}$ e dos valores de (Y_0) calculados a partir dos valores de $mAA_{adicionada}$ empregando **NBS** como agente titulante.

A curva foi linear em toda a sua extensão, verificando-se ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade dos dados.

A faixa linear usado nesse ensaio foi de 2,5 a 125 mg de AA e a faixa linear de trabalho de 7,46 a 121,25 mg AA estão apresentadas na Figura 1. 3.

Faixa de Trabalho

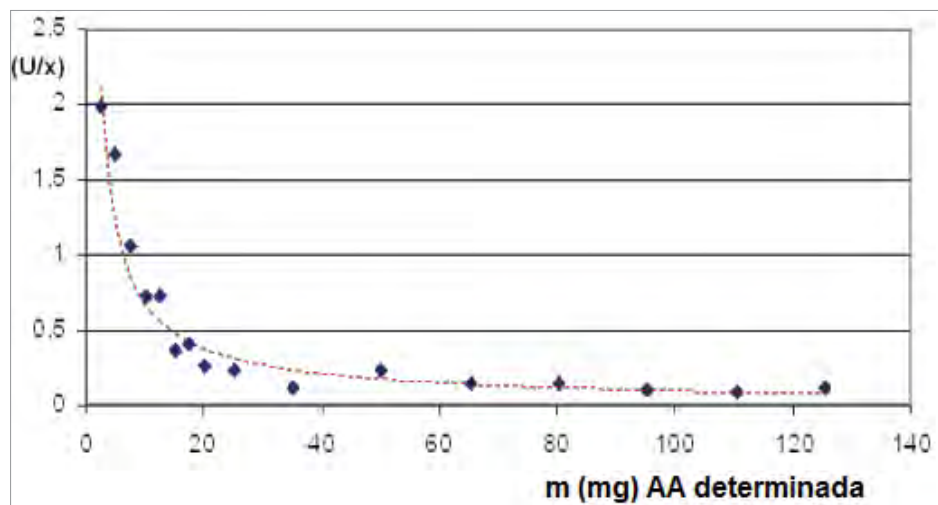


Figura 1.3 - Determinação do limite inferior da **faixa linear** de trabalho baseado na correlação $(U/x)\%$ x **mAA**, empregando **NBS** como agente titulante. Assumiu-se a precisão esperada para o método melhor do que 1,0%.

4.2 – Precisão

Precisão do método analítico é o grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes em uma amostra homogênea, sob condições pré-estabelecidas. Para definir os critérios de aceitação no estudo de precisão, pode ser usada a equação de Horwitz, que indica que a precisão decresce quando a concentração do analito decresce (HORWITZ, 1980).

A precisão do método, conceituada como repetitividade, foi estimada como sendo a concordância entre os resultados, dentro de um curto período de tempo e com o mesmo analista e mesma instrumentação, sendo expressa em termos de desvios padrão relativos obtidos para as replicatas de amostras adicionadas em cada nível de concentração. A repetitividade do método foi verificada por 11

determinações, contemplando o intervalo linear do método, estando representada na Figura 1.4.

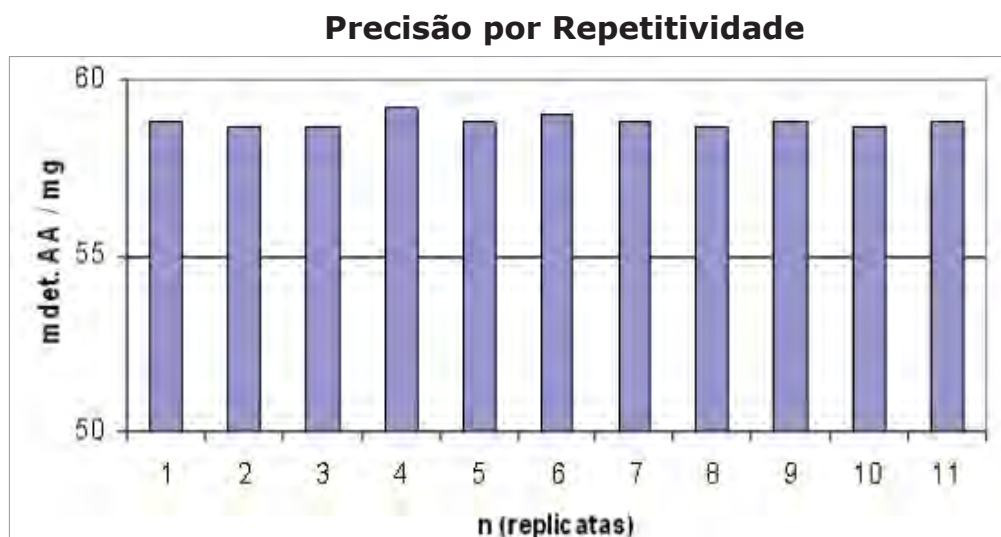


Figura 1.4 - Determinação da precisão por **repetitividade** empregando **NBS** como agente titulante, $\pm s$, $n=10$ para a de **mAA** de 55,86mg; $\pm sr=0,17$ mg.

O parâmetro investigado forneceu evidência objetiva da validação. A precisão por repetitividade, expressa em desvio padrão teve um desvio padrão de $\pm sr = 0,17$ mg e a precisão expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) foi: DPR = 0,30 mg AA.

A precisão intermediária pela Norma ASTM691-99 está representada na Figura 1.5.

Precisão: ASTM E 691-99

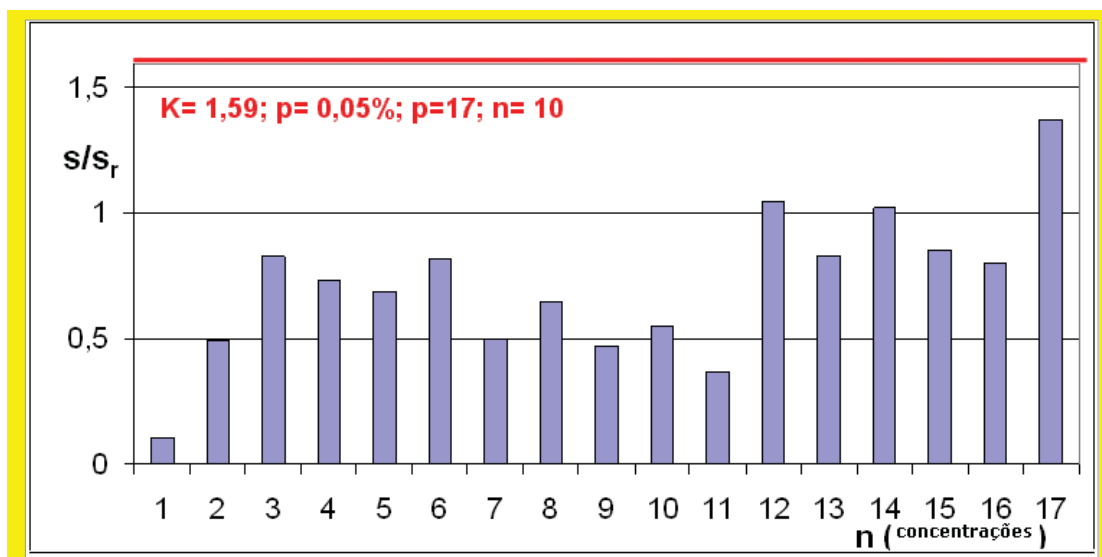


Figura 1.5 - Valores de s/s_r , (k), ($s_n=0,11$) calculados o para os diferentes valores de mAA_{det} empregando **NBS** como agente titulante. Em comparação com o **valor crítico** de " k ", obtido para $n=10$ e $p=17$, para nível de confiabilidade de 95%.

O valor do desvio padrão obtido foi de $s_n \pm 0,11$ mg AA. Para todas as concentrações determinadas, os valores de AA não ultrapassaram o limite do valor crítico de " k " o que se conclui que os ensaios foram realizados sem variações imprevisíveis de quantidades que influenciam o resultado. Estes efeitos aleatórios dão origem a variações em observações repetidas do mensurando.

4.3 – Robustez

A robustez corresponde à identificação dos estágios do método, os quais se não conduzidos com cuidado suficiente, irão causar severos efeitos no desempenho do método e podem até mesmo prejudicar seu bom funcionamento. A robustez ou solidez de um

método é testada, pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das consequências.

O ensaio de robustez foi levado a cabo empregando-se o método de Younden-Steiner, considerando-se 7 variáveis, tendo fornecido uma precisão de $s = \pm 0,943$ mg AA (Tabela 1.2).

Tabela 1.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de **robustez** para NBS, empregando o método de Younden-Steiner.

VARIÁVEIS	EXPERIMENTOS								VARIAÇÃO		
	1	2	3	4	5	6	7	8	nominal	variação	efeito
T°C	31	31	31	31	26	26	26	26	31	26	0,0223
Vol./mL C ₂ H ₄ O ₂	25	25	12,5	12,5	25	25	12,5	12,5	25	12,5	-0,0211
C. C ₂ H ₄ O ₂ /N	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	0,4461
Adição NBS	N	N	L	L	L	L	N	N	N	L	0,0211
Agitação	N	L	N	L	L	N	L	N	N	L	-0,0211
Vol./mL Amido	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	1	1	0,5	-0,0648
C. I ₂ /N	0,1	0,08	0,08	0,1	0,08	0,1	0,1	0,08	0,1	0,08	1,7648*
V NBS _{adit.} /mL	5,67	8,65	8,65	5,67	8,63	5,67	5,68	8,63			
mAA _{det.} mg	32,04	30,34	30,34	32,04	30,26	32,04	32,13	30,26		Média =	31,18mg
R%	107	101	101	107	101	107	107	101		sglobal =	0,94mg

N = Normal

L = Lenta

* Critério: se efeito < (2 x s global) → não considera-lo; efeito 1,7648 < 2 x 0,94 = 1,88

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. O protocolo de Younden trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

O efeito da concentração de 0,1 e 0,08 N para I₂, não foi considerado devido seu valor ser menor que 2 vezes o desvio global.

4.4 – Exatidão

A exatidão de um método analítico consubstancia-se na proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi calculada dividindo a concentração média detectada pelo valor do certificado e multiplicando por 100, para expressar em percentagem, conforme Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Valores médios de **AA** determinados ($\bar{X}_{\text{médio}}$), precisão ($\pm s$), incerteza específica ($\pm U/x$), massas de AA adicionadas ($m_{\text{AA adicionada}}$), incerteza genérica ($I_{\text{genérica}}$) e recuperação do AA (**R%**) empregando **NBS** como agente titulante.

X AA adic.	X AA determ.	$\pm s$	$(\pm U/x) * 100$	$I_{\text{genérica}}$	R%
1,10	1,27	0,012	0,92	0,17	116
2,60	2,68	0,053	1,98	0,078	103
5,11	5,29	0,088	1,67	0,18	104
7,61	7,46	0,079	1,06	-0,16	97,9
10,12	10,21	0,074	0,72	0,092	101
12,63	12,12	0,088	0,73	-0,50	96,0
15,13	14,54	0,054	0,37	-0,59	96,1
17,64	17,00	0,070	0,41	-0,64	96,4
20,15	19,04	0,050	0,26	-1,10	94,5
25,16	24,49	0,058	0,24	-0,67	97,3
35,18	34,10	0,040	0,12	-1,08	96,9
50,22	48,98	0,11	0,23	-1,24	97,5
65,26	63,64	0,088	0,14	-1,62	97,5
80,30	78,38	0,11	0,14	-1,92	97,6
95,34	92,31	0,092	0,099	-3,02	96,8
110,38	107,17	0,086	0,080	-3,21	97,1
125,42	121,25	0,15	0,13	-4,16	96,7

LD:0,39mg; **LQ:**1,30mg; **S:**0,9676; **Faixa linear de trabalho:** (7,46 ≤ $m_{\text{AA det}}$ ≤ 121,25mg)

A exatidão do método foi ensaiada em termos da recuperação sendo um critério que a recuperação média seja de 100% + 2% em cada nível de concentração na faixa de 80% a 120% a concentração alvo (GREEN, 1996). A mesma apresentou-se no intervalo: $97 \leq \%R \leq 105$, com $\%R_{\text{média}} = 98 \pm 2$, tendo sido aplicado o critério de aceitação de 95 a 105%; a considerar a natureza do método analítico.

4.5 – Incerteza Genérica

A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança especificado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Para que as medidas sejam de valor prático, é necessário ter algum conhecimento de sua confiabilidade ou incerteza. Uma declaração da incerteza associada a um resultado transmite ao cliente a qualidade do resultado.

O método para a determinação de AA foi validado e a incerteza genérica determinada, a partir da comparação com o AA, material de referência (MR) conforme Figura 1.6.

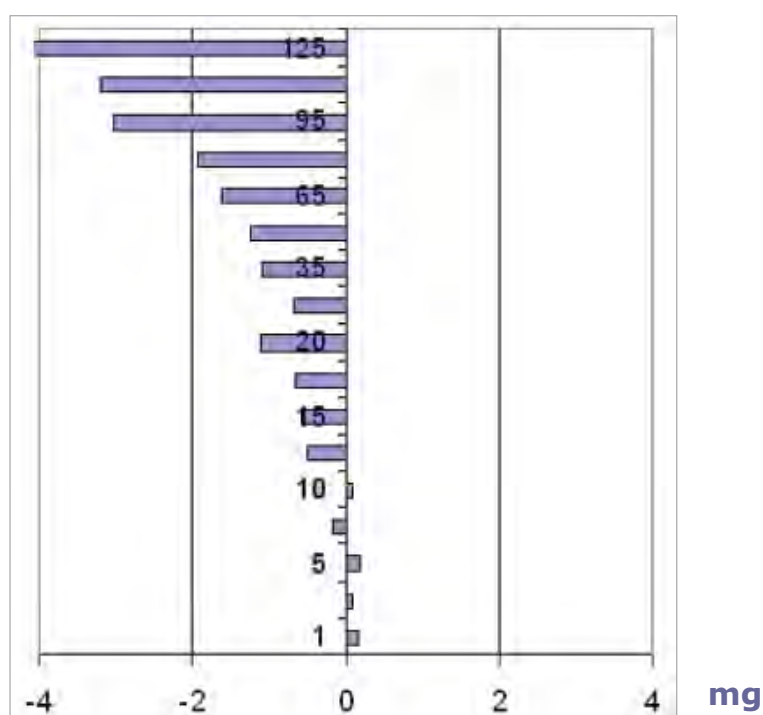


Figura 1.6 - Determinação da $U_{genérica}$ ($X_{média} - MR$) empregando **NBS** como agente titulante.

Os estudos de validação e o seu acompanhamento que deve ser feito de acordo com a rotina do laboratório, produzem dados de

desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina.

Através desses dados é possível calcular as variações sofridas pelo método e determinar a incerteza, ou seja, quanto o meu resultado vai variar para mais ou para menos numa determinada faixa de trabalho com uma determinada matriz.

A incerteza genérica é definida como a diferença entre a média dos valores determinados e o valor tido como verdadeiro. Para este método observamos que a incerteza é quase constante até cerca de 25 mg ensaiada, acima deste valor a incerteza da medicação aumenta.

4.6 – Recuperação

Para muitas análises, o principal problema pode ser adquirir um bom conhecimento da quantidade de analito na amostra original, relativamente ao resultado obtido ao final do processo de medição. Esta propensão pode ser devido a perdas no processamento, contaminação ou interferentes. A tendência, que algumas vezes é chamada de recuperação, de um método, é o erro sistemático desse sistema de medição.

Uma das estratégias disponíveis para determinar as tendências do método inclui a medição de brancos e amostras gravimetricamente fortificadas.

As taxas de recuperação para o método em estudo estão apresentadas na Tabela 1.4 e Figura 1.7.

Tabela 1.4 - Dados ($mAA_{adicionada}$; $n=10$) e resultados coletados ($mAA_{determinada}$; $n=10$) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de suco industrializado de laranja ($C_{nominal} = 46\text{mg}$ de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (40, 60, 80mg) para NBS.

X Vit.C _{adic.} 40mg	X AA _{determ.}	R%	Vit.C _{adic.} 60mg	XAA _{determ.}	R%	X Vit.C _{adic.} 80mg	X AA _{determ.}	R%
39,30*	40,19	99,66	58,90*	59,32	98,98	78,50*	78,97	99,28
	39,89	98,79		59,15	98,69		79,14	99,50
	40,02	99,23		59,32	98,98		79,15	99,50
	39,85	98,79		58,64	97,82		78,97	99,28
	40,19	99,66		59,15	98,69		79,14	99,50
	40,19	99,66		59,32	98,98		79,31	99,72
	40,02	99,23		59,32	98,98		79,24	99,63
	40,19	99,66		59,15	98,69		79,14	99,50
	40,02	99,23		59,32	98,98		78,97	99,28
	40,01	99,22		59,32	98,98		79,14	99,50
X _{médio}	40,05	99,31		59,20	98,77	X _{médio}	79,11	99,47
s	0,13	0,34		0,21	0,36	s	0,12	0,15
CV%	0,34	0,35		0,36	0,37	CV%	0,15	0,15

* massa adicionada efetiva

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que apresente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

Considerando os resultados obtidos na recuperação e segundo a Tabela 1.5, podemos concluir que o método é exato.

Tabela 1.5 - Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação Aceito (%)
> 10	98-102
> 1	97-103
> 0,1	95-105
> 0,01	90-107
> 0,001- > 0,00001	80-110
> 0,000001	60-115
> 0,0000001	40-120

Fonte: BRITO, 2001

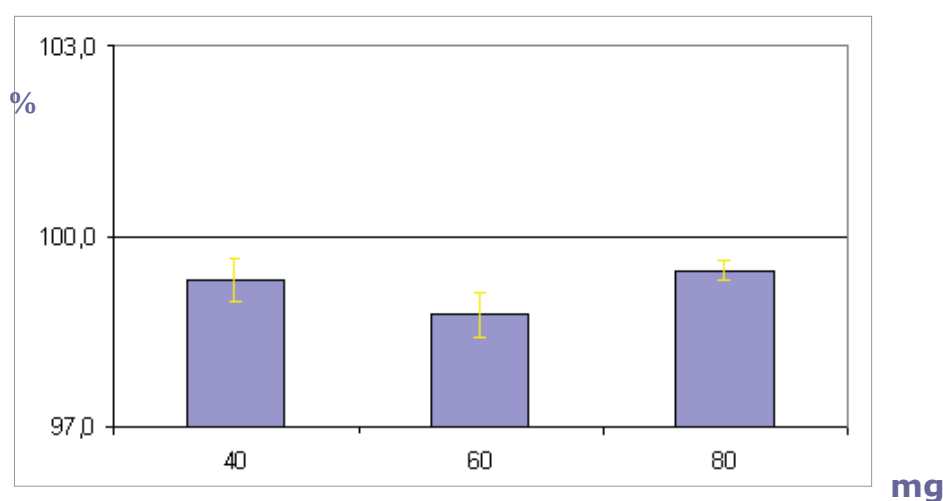


Figura 1.7 - Percentagem de **recuperação** (R%) como função da massa de **AA** empregada na fortificação da amostra de suco para NBS.

A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de 10 determinações, sob condições de repetitividade, e a valor aceito como verdadeiro (MR).

As fontes de incerteza foram levantadas e os valores individuais das incertezas genéricas determinados.

Os parâmetros investigados, listados a seguir fornecem evidência objetiva da validação:

- 1- linearidade (Y-Yo): a curva é linear em toda a sua extensão;
- 2- faixa linear: 2,5 a 125 mg de AA;
- 3- faixa linear de trabalho: 7,46 a 121,25 mg de AA;
- 4- Limite de detecção, LD: 0,39 mg AA;
- 5- Limite de quantificação, LQ: 1,30 mg AA;
- 6- precisão, $s_n=10$ (ASTM691-99): $\pm 0,40$ mg AA;
- 7- precisão por repetição, s_r : $\pm 0,11$ mg AA.

5 – CONCLUSÕES

A validação é essencial para definir se métodos desenvolvidos estão completamente adequados aos objetivos a que se destinam, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Desta forma, possibilita o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises.

Dependendo do propósito do método, alguns dos parâmetros apresentados podem deixar de ser avaliados. A exatidão e a precisão do método constituem parâmetros sempre estudados, independente do seu propósito, exceto para métodos com objetivo apenas qualitativo.

Deve-se ressaltar que o método pode ser considerado validado, mesmo que alguns parâmetros não se enquadrem nos limites estabelecidos na literatura, mas que sejam criteriosamente conhecidos e, portanto, adequados aos objetivos do estudo a ser realizado.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos afirmar que o método analítico titulométrico para determinação do ácido ascórbico, empregando solução de N-bromosucinamida como agente titulante, foi validado em todos os parâmetros preconizados pelo guia EURACHEM apresentando-se, portanto, sensível; linear em toda a faixa de massas de AA investigada; exato e robusto.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st Edition, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.

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

GREEN, J.M. A practical guide to analytical method validation. **Anal. Chem.**, v. 68, p.305A-309A, 1996.

HORWITZ, W. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.63, n.6, p.1344-1354, 1980.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos para análise de alimentos** 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo (IMESP), 1985. 560 p.

ISO (International Standard Organization). **ISO 9000. Quality management systems – Fundamentals and vocabulary**. Geneva: ISO, 2005. 30p.

SARWAR, et al. 1975. Apud ARAYA, S.P.; MAHAJAN, M. Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C, **Analytica Chimica Acta**, 417 1-14, 200

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, p. 624-632, 1999.

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DO MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO IODO COMO AGENTE TITULANTE

RESUMO

A vitamina C é um nutriente extremamente importante para a fisiologia humana. No Brasil o consumo de vitamina C sob a forma de concentrados vitamínicos ainda é bastante restrito devido aos altos preços, restando para a maioria da população o consumo via alimentos como frutas e vegetais. A dosagem de vitamina C em alimentos tem, então, um papel crucial no que diz respeito aos estudos pós-colheita para a conservação e a minimização das perdas deste nutriente tão sensível. O presente trabalho apresenta uma abordagem metrológica de método clássico para a determinação do ácido ascórbico (AA) utilizando iodo como agente titulante. Os parâmetros de validação do método de análise pelo iodo e o cálculo da incerteza atenderam as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Os resultados obtidos nas análises foram: 1- faixa linear: 1 a 125 mg de AA; 2- faixa de trabalho: 10,10 a 126,08 mg AA; 3- LD: 0,59 mg AA; 4- LQ: 1,31 mg AA; 5- precisão por repetitividade $s_r = 10$: $\pm 0,11$ mg AA; 6- precisão pela norma ASTM 691-99 sn: $\pm 0,11$ mg AA; 7- robustez (Younden-Steiner) forneceu uma precisão de $s_{global} = \pm 0,82$ mg AA; 8- a incerteza genérica foi de 0,976. A linearidade avaliada pela análise de resíduo (Y-Yo) mostra que a curva é linear em toda a sua extensão ensaiada e o método validado foi preciso, robusto e exato. A importância da validação de métodos analíticos está na obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.

Palavras-chave: exatidão; robustez; incerteza genérica.

ABSTRACT

Vitamin C is an essential nutrient human physiology. In Brazil, the consumption of vitamin C in the form of vitamin concentrates is still restrict due to high prices, leaving the majority of the population for consumption through foods such as fruits and vegetables. The dosage of vitamin C in foods is therefore a crucial role in respect of post-harvest to conserve and minimize losses of this highly sensitive nutrient. This paper presents an approach to metrology classical method for the determination of ascorbic acid (AA) using iodine as titrant agent. The validation parameters of the analysis method by iodine and uncertainty calculation met the guidelines of ISO-IEC-17025- guide and EURACHEM guides. The results obtained in this study were: 1- linear range: 1 to 125 mg AA; 2- working range: 10.10 to 126.08 mg AA; 3- LD: 0.59 mg AA; 4- LQ: 1.31 mg AA; 5- precision repeatability $s_r = 10: \pm 0.11$ mg AA; 6- precision by ASTM 691-99, $s_n: \pm 0.11$ mg AA; 7- robustness (Younden-Steiner) provided an accuracy of $S_{global} = \pm 0.82\text{mg} = \text{AA}$; 8- uncertainty determined generic was 0.976. Linearity was assessed by residual analysis (Y-Y0) shows that the curve is linear in its entirety tested and validated method was precise, robust and accurate. The importance of validation of analytical methods is to obtain reliable results and suitable for intended use.

Keywords: accuracy; robustness; generic uncertainty

2- INTRODUÇÃO

Validação de métodos consiste em checagens que devem ser realizadas para garantir que os parâmetros de desempenho de um método são conhecidos e demonstram que o método é cientificamente adequado nas condições em que é aplicado. Estabelece, por meio de um conjunto de estudos laboratoriais sistemáticos, que os parâmetros de desempenho do método atendem às especificações relacionadas com a intenção de uso dos resultados analíticos (NATA, 1998).

O guia para validação de métodos da EURACHEM (1998) indica a necessidade de avaliação dos parâmetros de desempenho para métodos normalizados. A validação deve ser realizada também no desenvolvimento de novos métodos, para métodos normalizados revisados, quando o controle de qualidade interna indicar alterações de um método com o tempo, para métodos normalizados utilizados em diferentes laboratórios, por diferentes analistas ou equipamentos e para demonstrar equivalência entre dois métodos.

Validação é a investigação do alcance do propósito analítico do método, o qual é obtido por resultados analíticos com um nível de incerteza aceitável (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

A comprovação, pelo fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido foram atendidos, é foco da validação (EAL, 1997; EC, 2002; ISO, 2005).

A vitamina C também é amplamente usada na indústria de alimentos como antioxidante para aromatizantes e gorduras em geral, para cura de carnes, e até em farinha para melhorar a textura das massas. Sua utilização no pão é bastante importante, principalmente depois da proibição do uso de bromato de potássio (LU; SEIB, 1998). O uso do ácido eritórbito ou D-isoascórbico vem sendo diminuído na

indústria de alimentos com a utilização crescente do ácido ascórbico devido ao valor nutricional deste, e também à queda dos preços com a entrada de indústrias chinesas no mercado, que sintetizam a vitamina C.

A determinação do ácido ascórbico em alimentos é bastante complexa em função dos baixos níveis em que este pode ser encontrado, além da presença de substâncias interferentes da matriz estudada que podem, inclusive, contribuir para a sua degradação. Desta forma, métodos empregados facilmente para misturas multivitamínicas ou alimentos enriquecidos são de difícil aplicação para dosar somente a vitamina C presente naturalmente nos alimentos.

Os métodos volumétricos que envolvem a oxidação de íons iodeto (iodometria) ou a redução de iodo (iodimetria) são baseados na semi-reação:



As substâncias que possuem potenciais de redução menores que o do sistema I_2/I^- são oxidados pelo iodo, e portanto podem ser titulados com uma solução padrão desta substância (BACCAN et al., 2001).

O objetivo desse trabalho foi a validação intralaboratorial de método quantitativo, titulométrico, utilizando iodo como agente titulante na determinação de ácido ascórbico.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL

Todos os reagentes utilizados atendem à especificação grau analítico (PA). O ácido ascórbico foi obtido junto à empresa Sigma Aldrich, cujo número do CAS é: 50-81-7. Lote: 048k0069A5960.

O ácido sulfúrico foi obtido pela Tyco, o amido (PA) foi obtido junto à empresa Chemis.

As vidrarias usadas: bureta, balões volumétricos e pipetas foram calibradas e a água utilizada nas diluições foi ultra-pura.

Todas as análises foram feitas em 10 replicatas.

2.1.1 – Soluções

Preparo da solução ácida: ácido Sulfúrico 2N: Colocar água em um balão volumétrico de 1000 mL, adicionar 54 mL de ácido sulfúrico concentrado com cuidado e completar o volume com água.

Preparo da solução de Iodo 0,1N: adicionar 12,7g de Iodo em béquer, dissolver com 250 mL de água, juntar 40 g de iodeto de potássio, agitando até completa dissolução. Coloque em balão volumétrico de 1000 mL e complete o volume com água.

Preparo da solução-padrão de Ácido Ascórbico: pesar 1g de Ácido Ascórbico, adicionar água e agitar até completa dissolução. Colocar em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Preparo da solução de amido a 1%: pesar 1g de amido, colocar em um béquer, adicionar um pouco de água fazendo uma pasta. Verter no béquer 100 mL de água fervente. Agitar obtendo uma solução límpida.

2.2 – MÉTODO

A metodologia empregada para a determinação do AA teve como princípio de quantificação a Titulometria de Óxido Redução (Iodimetria), empregando a solução de iodo como agente titulante. O ponto final na Iodimetria é detectado utilizando-se amido como indicador.

2.2.1 – Procedimentos

A solução de ácido ascórbico foi adicionada em bureta calibrada, com capacidade para 10 mL. A bureta foi mantida tampada com um béquer, na sua extremidade superior, as alíquotas ensaiadas foram: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5; 11,0; e 12,5 mL.

Após a alíquota coletada de ácido ascórbico em erlenmeyers de 250 mL, adicionou-se 25 mL de ácido sulfúrico 2N, e em seguida sob agitação magnética adicionou-se solução de Iodo 0,1N que também foi colocada em uma bureta calibrada de 10 mL.

Para alíquotas até 2,5 mL, a adição de 1mL da solução de Amido 1% foi realizada logo no início. Para os volumes maiores a adição foi realizada cerca de 2 mL antes do ponto final. Para volumes de ácido ascórbico, cuja titulação era necessário o enchimento de nova bureta de iodo, a adição ocorria até 10 mL. A agitação era interrompida, o erlenmeyer era tampado com vidro de relógio, durante o enchimento de nova bureta.

O ponto final da titulação era quando a coloração se mostrava azul intenso.

3- PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de desempenho dos métodos foram estabelecidos por procedimentos intralaboratoriais, atendendo as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e de quantificação experimentais e incerteza genérica foram os parâmetros estudados.

O nível de significância adotado nos testes foi de $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram feitos em planilhas comerciais, cujos resultados foram previamente validados frente aqueles obtidos softwares de análise estatística. Para cada parâmetro validado foram feitas dez replicatas.

3.1 – Curva Analítica:

Para a obtenção da curva analítica, foram feitas 10 curvas utilizando 17 alíquotas de AA, fazendo-se uma média das curvas.

Para levantamento da curva analítica de cada método, foi levado em consideração a massa de ácido ascórbico adicionada em relação à massa de ácido ascórbico determinada que foi calculada de acordo com a equação da reta da bureta calibrada.

3.2 – Linearidade:

A linearidade é a habilidade do método de obter resultados de ensaios proporcionais à concentração do analito sendo verificada a partir da análise de dez curvas analíticas em 17 alíquotas de AA, na faixa de 0,1 a 12,5 mg. Foi determinada levando-se em consideração a massa de ácido ascórbico determinado em relação ao valor de $Y - Y_0$ onde $Y =$

massa de ácido ascórbico determinado e Y_0 = massa de ácido ascórbico adicionado.

A linearidade foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

3.3 – Faixa Linear de Trabalho:

Faixa de concentração do analito, ou valores de propriedades, ao longo da qual o método pode ser aplicado. Intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade que foi calculado utilizando-se os valores da massa de ácido ascórbico determinado em relação aos valores obtidos em $U/x\%$, onde U = média dos desvios padrões de cada ponto da massa de ácido ascórbico determinado e $x\%$ = massa de ácido ascórbico determinado dado em porcentagem.

3.4 – Sensibilidade:

É a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito sendo, portanto, o coeficiente angular da inclinação da reta. Foi calculada através da equação da reta $Y = a + bx$. A sensibilidade é o valor de b obtido na equação da reta.

3.5 – Limite de Detecção (LD):

Determinado pela análise repetida de uma porção de amostras de branco e a concentração do analito. É, portanto, a menor concentração do analito que pode ser confiavelmente detectada pelo método.

Analisar dez amostras brancas independentes, fortificadas na menor concentração aceitável (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado).

3.6 – Limite de Quantificação (LQ):

É a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. É normalmente o ponto mais baixo da curva de calibração, excluindo o branco. As alíquotas de amostras do branco foram fortificadas, em vários níveis de concentrações, próximas ao limite de detecção.

3.7 – Precisão por Repetição (sr)

É a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e normalmente expressa em termos de desvio-padrão e coeficiente de variação e depende da concentração do analito. Os cálculos foram feitos através da fórmula:

$$CV = \frac{DP}{X} \times 100$$

Onde: DP = desvio padrão e X = concentração média determinada.

A precisão foi determinada por análises em dez repetições na concentração nominal de 60 mg de AA.

3.8 – Precisão pela Norma da American Society for Testing and Materials de agosto de 1999 (ASTM E 691-99) (sn):

A precisão pela norma ASTM E 691-99 foi feita pelo número de pontos ensaiados pelo cálculo do s/sr onde s = desvio padrão dos pontos ensaiados e sr = raiz quadrada da soma de s ao quadrado dividido pelo número de pontos ensaiados (n). Verificou-se o K (valor crítico) na tabela t de student para $p=0,05\%$, $p=17$ (n° . pontos ensaiados) e $n=10$ (replicatas).

3.9 – Robustez:

Pequenas variações no procedimento que pode ter ou não influencia significativamente sobre o desempenho do método. A robustez de um método foi testada pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das conseqüências. Utilizou-se o teste de Younden-Steiner que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for à robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Nesse método foram realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 7 diferentes etapas, no procedimento analítico. As oito medições foram realizadas numa ordem aleatória, variando-se a temperatura ambiente (31e 26°C), concentração do ácido sulfúrico (2 e 1N), volume do ácido usado (25 e 12,5 mL), agitação (N= normal e L= lenta), tempo de adição do titulante Iodo (N= normal e L= lenta), volume do indicador amido (1 e 0,5 mL) e concentração do Iodo usado (0,1 e 0,08N).

O efeito foi calculado, levando-se em conta a matriz dos fatores nominais denominados por letras maiúsculas, de **A** a **G** e a variação por letras minúsculas, de **a** a **g**, conforme Tabela 2.1:

Tabela 2.1 - Matriz dos fatores para determinação da robustez

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	S	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF, 2005

Para determinar a variação de um fator, encontrar os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e as 4 minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de **C** para **c**, usar os resultados:

$$\frac{s + u + w + y}{4} \text{ e } \frac{t + v + x + z}{4}$$

O efeito do fator C/c será:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4}$$

Calcular todos os 7 pares para obter 7 diferenças, que podem ser ordenados para revelar aqueles com efeito significativo no resultado. Interpretar os resultados. Verificar o efeito e ver o critério que não pode

ser maior que $2 \times s_{\text{global}}$ (desvio padrão global). Se for maior o método está perdendo precisão.

3.10 – Recuperação:

Ou tendência é o erro sistemático do sistema de medição. A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de dez determinações sob condições de repetitividade o valor aceito como verdadeiro (MR: material de referência). Cálculo pela fórmula:

$$\%R = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

3.11 – Exatidão:

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi avaliada numericamente através da tendência (recuperação) por intermédio de análises dos ensaios aplicados a amostras de suco industrializado de laranja ($C_{\text{nominal}} = 46 \text{ mg de AA}$) em três diferentes concentrações nominais de AA (40; 60 e 80 mg). Foi determinado e porcentagem de recuperação que foram calculados pela divisão dos valores médios da massa de ácido ascórbico determinado sobre os valores médios da massa de ácido ascórbico adicionado multiplicado por 100, segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração média nominal}} \times 100$$

3.12 – Incerteza Genérica:

Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Foi determinada subtraindo-se os valores médios da massa de ácido ascórbico determinado e massa de ácido ascórbico adicionado.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos parâmetros experimentais, propostos para validação do método titulométrico, utilizando-se Iodo para determinação do ácido ascórbico, estão expostos, a seguir. Entretanto, tais resultados configuram a parcialidade daquilo que experimentalmente foi realizado.

4.1 - Curva analítica de linearidade

Os pontos empregados para a construção da curva de analítica foram em número de $p = 17$, com repetição das medidas para $n = 10$. As médias das curvas analíticas obtidas estão apresentadas nas Figuras 2.1.

Curva analítica

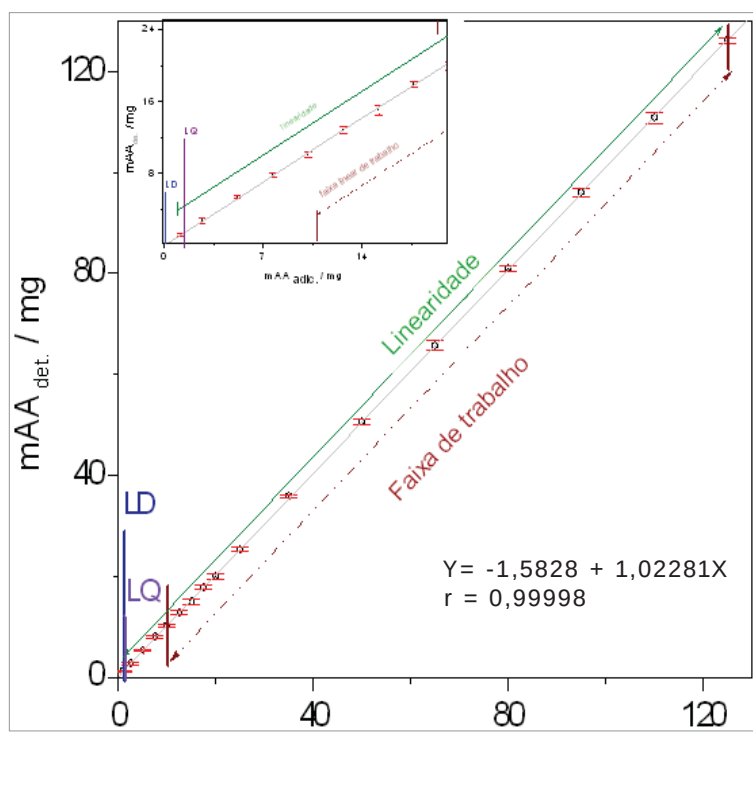


Figura 2.1 - Curva analítica do método estequiométrico para determinação de **AA** para lodo; parâmetros: **LD**; **LQ**; linearidade; faixa linear de trabalho; sensibilidade: **S**= 1,02281; **r**=0,99998.

A curva analítica ($Y = -1,5828 + 1,02281X$), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99998, o que está em concordância com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Brasil, 2003) que é $r = 0,99$.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de quantificação é a menor concentração de analito, que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. Ele deve ser estabelecido usando-se uma amostra ou padrão de medida apropriado, isto é, ele é normalmente o ponto mais baixo na curva de calibração (excluindo o branco).

O limite de detecção determinado por fortificação e o limite de quantificação foram de 0,59 mg AA e 1,31 mg AA, respectivamente.

O parâmetro investigado, apresentado na figura 2.2 fornece evidência objetiva da linearidade ($Y-Y_0$).

Linearidade

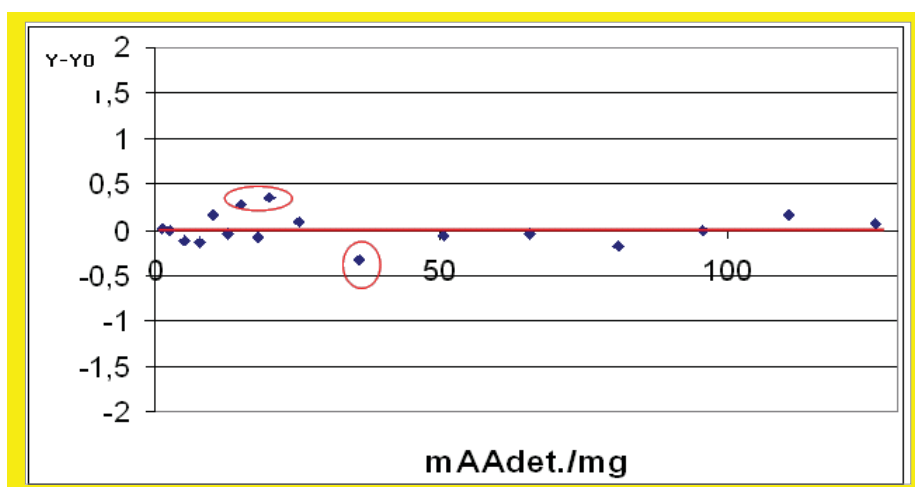


Figura 2.2 - Avaliação da **linearidade** a partir dos resíduos ($Y-Y_0$), obtidos a partir dos valores de $mAA_{\text{determinada}}$ e dos valores de (Y_0) calculados a partir dos valores de $mAA_{\text{adicionada}}$ para método do lodo

A curva foi linear em toda a sua extensão, verificando-se a presença de três pontos de valores discrepantes para as médias das massas de AA determinadas (15,10; 20,16 e 36,23 mg). Os testes usados para verificação desses pontos são: teste de Grubbs (ISO 5725-3, 1994 e ISO 5725-2, 1994) ou de resíduo Jackknife (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) e a homocedasticidade, isto é, homogeneidade da variância dos resíduos pelo teste de Cochran (ISO 5725-3, 1994) ou teste de Levene (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005) ou o teste de Brown-Forsythe (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A faixa linear usado nesse ensaio foi de 1,0 a 125 mg de AA e a faixa linear de trabalho de 7,46 a 121,25 mg AA estão apresentadas na Figura 2. 3.

Faixa de Trabalho

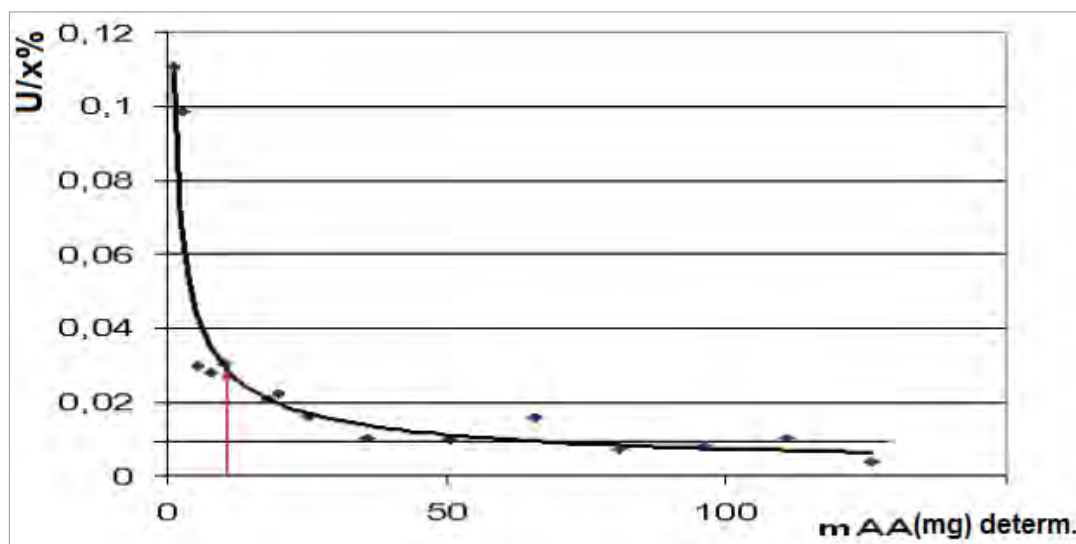


Figura 2.3- Determinação do limite inferior da **faixa linear** de trabalho para Iodo, baseado na correlação $\pm U\%/x \times mAA$. Assumiram-se a precisão esperada para o método de $s = 0,30\text{mg}$.

4.2 – Precisão

A precisão do método foi verificada por 10 determinações, contemplando o intervalo linear do método, estando representada na Figura 2.4.

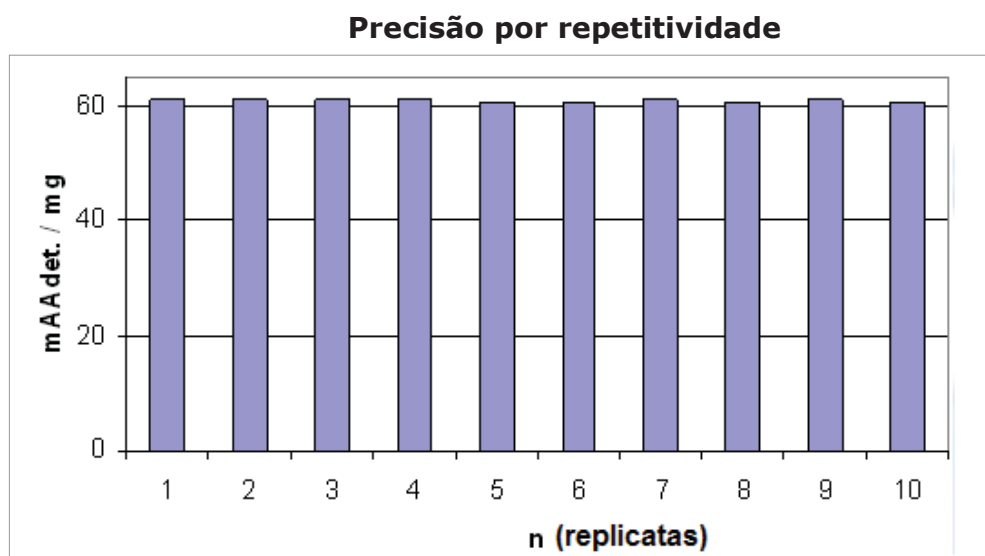


Figura 2.4 - Determinação da precisão por **repetitividade** para Iodo, $\pm s$, $n=10$ para a de **mAA** de 60mg. **sr=0,11mg**

O parâmetro investigado forneceu evidência objetiva da validação. A precisão por repetitividade, expressa em desvio padrão teve um desvio padrão de $\pm sr = 0,11\text{mg}$ e a precisão expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) foi: DPR = 0,183 mg AA.

A precisão intermediária pela Norma ASTM691-99 está representada na Figura 2.5.

Precisão: ASTM E 691-99

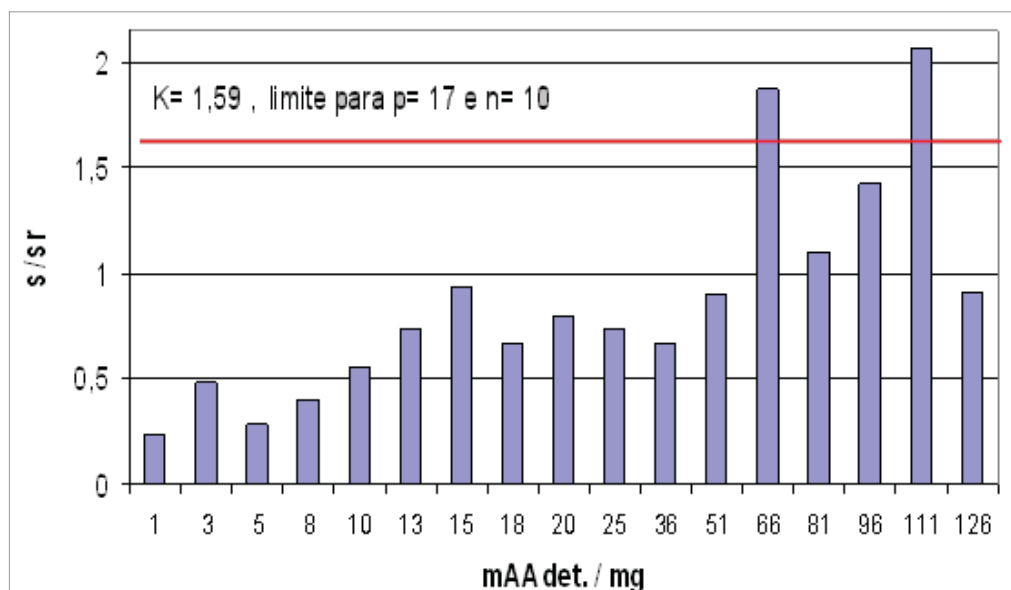


Figura 2.5 - Valores de s/s_r , (k), ($s_n=0,815$) calculados o para os diferentes valores de $mAA_{det.}$ para método do lodo. Em comparação com o valor tabelado de " k " (**8**), obtido para $n=10$ e $p=17$, para nível de confiabilidade de 95%.

O valor do desvio padrão obtido foi de $s_n \pm 0,815$ mg AA. Para a concentração determinada de 65,73 e 110,85 mg de AA verificou-se que ultrapassaram o limite do valor crítico de " k " o que pode ser explicado por algum erro sistemático ou ocasional durante esses ensaios.

Efeitos que variam sistematicamente de amplitude durante uma série de análises, causados, por exemplo, por controle inadequado das condições experimentais, dão origem a erros sistemáticos que não são constantes.

Os erros ocasionais, ou fortuitos são tipos de erros que invalidam uma medição e resultam, tipicamente, de falha humana ou mau funcionamento dos aparelhos. Troca de dígitos num número ao registrar dados ou contaminação acidental de amostras, são exemplos comuns deste tipo de erro.

Essa concentração deve ser analisada novamente para correção dos erros que foram detectados, pois erros como a transposição de dígitos pode ser corrigida particularmente se ocorrer nos dígitos de ordem superior, antes de serem rejeitados evitando incorporar os erros em qualquer análise estatística.

4.3 – Robustez

O ensaio de robustez foi levado a cabo empregando-se o método de Younden-Steiner, considerando 7 variáveis, tendo fornecido uma precisão de $s = \pm 0,815\text{mg AA}$ (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de **robustez** para iodo, empregando o método de Younden-Steiner.

VARIÁVEIS	EXPERIMENTOS								VARIAÇÃO		
	1	2	3	4	5	6	7	8	nominal	variação	efeito
T°C	31	31	31	31	26	26	26	26	31	26	0,03
Vol./mL H ₂ SO ₄	25	25	12,5	12,5	25	25	12,5	12,5	25	12,5	-0,02
C. H ₂ SO ₄ /N	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	-0,01
Adição I ₂	N	N	L	L	L	L	N	N	N	L	0,03
Agitação	N	L	N	L	L	N	L	N	N	L	0,03
Vol./mL Amido	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	1	1	0,5	-0,03
C. I ₂ /N	0,1	0,08	0,08	0,1	0,08	0,1	0,1	0,08	0,1	0,08	-2,15
V I ₂ adic./mL	7,17	9,39	9,34	7,20	9,29	7,15	7,22	9,31			
mAA _{det.} mg	59,23	61,15	60,82	59,44	60,50	59,02	59,64	60,66		Média =	60,21mg
R%	98,40	101,6	101,0	98,70	100,50	98,00	99,10	100,70		sglobal =	0,815mg

N= Normal

L= Lenta

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. O protocolo de Younden trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de

um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Verificou-se que os efeitos não foram maiores que o critério de aceitação, ou seja, 2 vezes o desvio global ($2 \times 0,815 = 1,63$), portanto o método não perdeu a precisão, sendo robusto. A concentração de iodo teve efeito na robustez.

4.4 – Exatidão

A exatidão de um método analítico consubstancia-se na proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi calculada dividindo a concentração média detectada pelo valor do certificado e multiplicando por 100, para expressar em porcentagem, conforme Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Valores médios de **AA** determinados (**$X_{\text{médio}}$**), precisão por repetição (**$\pm s$**), desvio padrão relativo (**$\pm s/x$**), massas de AA adicionadas (**$mAA_{\text{adic.}}$**), incerteza genérica (**$I_{\text{genérica}}$**) e recuperação do AA (**$R\%$**) para Iodo

X AA adic.	X AA determ.	$\pm s$	$\pm U/x$	$I_{\text{genérica}}$	R%
1,196	1,180	0,1308	0,1108	-0,01623	98,64
2,695	2,714	0,2676	0,09861	0,01848	100,68
5,194	5,342	0,1591	0,02978	0,1484	102,85
7,692	7,884	0,2223	0,02819	0,1923	102,50
10,190	10,103	0,3098	0,03067	-0,08657	99,15
12,688	12,818	0,4095	0,03195	0,1298	101,02
15,186	15,016	0,5219	0,03476	-0,1702	98,87
17,684	17,901	0,3741	0,02089	0,2164	101,22
20,182	19,992	0,4451	0,02226	-0,1902	99,05
25,179	25,291	0,4125	0,01631	0,1126	100,44
35,171	35,782	0,3725	0,01041	0,6105	101,73
50,160	50,625	0,5042	0,00996	0,4649	100,92
65,149	65,728	1,0452	0,01590	0,5786	100,88
80,138	80,978	0,6123	0,00756	0,8398	101,04
95,127	95,929	0,7928	0,00826	0,8021	100,84
110,115	110,85	1,1499	0,01037	0,7420	100,67
125,104	126,08	0,5067	0,00402	0,9775	100,78
LD: 0,59mg;	LQ: 1,31mg;	S: 1,02281;	(10,103 $\leq$ $mAA_{\text{det.}}$ $\leq$ 126,08)mg		

A exatidão do método foi ensaiada em termos da recuperação sendo um critério que a recuperação média seja de 100% + 2% em cada nível de concentração na faixa de 80% a 120% a concentração alvo (GREEN, 1996). A mesma apresentou-se no intervalo: $97 \leq \%R \leq 105$, com $\%R_{\text{média}} = 98 \pm 2$, tendo sido aplicado o critério de aceitação de 95 a 105%; a considerar a natureza do método analítico.

4.5 – Incerteza Genérica

A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança especificado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Para que as medidas sejam de valor prático, é necessário ter algum conhecimento de sua confiabilidade ou incerteza. Uma declaração da incerteza associada a um resultado transmite ao cliente a qualidade do resultado.

O método para a determinação de AA foi validado e a incerteza genérica determinada, a partir da comparação com o AA, material de referência (MR) conforme Figura 2.6.

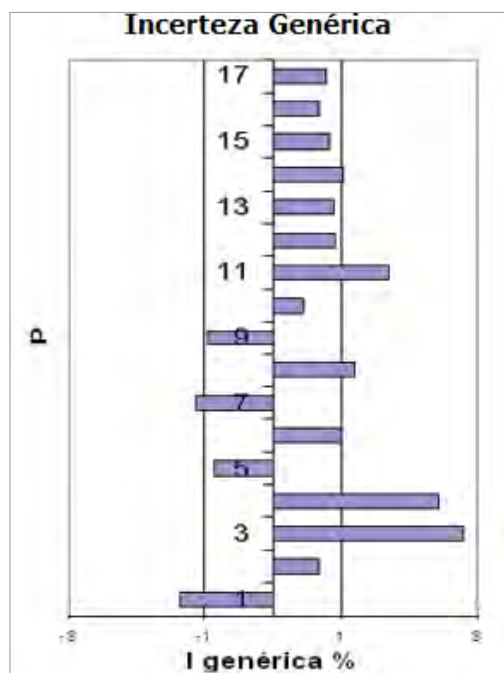


Figura 2.6 - Representação da **incerteza genérica** ($I_{\text{genérica}}$) como função de **p**. Erro relativo < 1,3% para método do Iodo.

Os estudos de validação e o seu acompanhamento que deve ser feito de acordo com a rotina do laboratório, produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina.

Através desses dados é possível calcular as variações sofridas pelo método e determinar a incerteza, ou seja, quanto o meu resultado vai variar para mais ou para menos numa determinada faixa de trabalho com uma determinada matriz.

A incerteza genérica é definida como a diferença entre a média dos valores determinados e o valor tido como verdadeiro. Para este método observamos que a incerteza é quase constante entre as concentrações de 50 a 125 mg ensaiadas e abaixo deste valor a incerteza da medicação não foi constante.

4.6 – Recuperação

Para muitas análises, o principal problema pode ser adquirir um bom conhecimento da quantidade de analito na amostra original, relativamente ao resultado obtido ao final do processo de medição. Esta propensão pode ser devido a perdas no processamento, contaminação ou interferentes. A tendência, que algumas vezes é chamada de recuperação, de um método, é o erro sistemático desse sistema de medição.

Uma das estratégias disponíveis para determinar as tendências do método inclui a medição de brancos e amostras gravimetricamente fortificadas. A exatidão do método foi ensaiada em termos da recuperação e a mesma apresentou-se no intervalo: $97 \leq \%R \leq 105$, com $\%R_{\text{média}} = 98 \pm 2$, tendo sido aplicado o critério de aceitação de 95 a 105%; a considerar a natureza do método analítico (Tabela 2.4 e Figura 2.7).

Tabela 2.4 - Dados ($mAA_{\text{adic.}}$; $n=10$) e resultados coletados ($mAA_{\text{det.}}$; $n=10$) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de suco industrializado de laranja ($C_{\text{nominal}} = 46\text{mg}$ de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (40, 60, 80mg) para método do lodo

X Vit.C adic. 40mg	X AA determ.	R%	X Vit.C adic. 60mg	X AA determ.	R%	X Vit.C adic. 80mg	X AA determ.	R%
40,00	46,99	99,50	60,60	69,49	102,80*	79,90	87,16	100,08*
40,20	46,86	98,66	63,00	71,60	102,22	80,60	87,58	99,73
40,70	47,62	99,31	60,10	68,23	101,55	81,20	88,43	100,03
41,20	48,04	99,13	61,70	69,70	101,31*	80,70	87,58	99,61
41,30	47,41	97,36*	62,30	70,76	102,02	80,50	87,37	99,60
41,40	48,49	99,66	63,40	72,02	102,24	80,90	87,37	99,10*
42,30	49,72	100,53	61,50	69,92	101,98	81,50	88,23	99,41
44,20	51,82	100,96*	61,70	70,12	101,99	82,30	89,06	99,46
44,40	51,40	99,56	60,70	69,28	102,28	81,60	88,85	100,06
45,60	52,67	99,71	60,40	68,86	102,09	81,80	89,06	100,07
Xmédio		99,43 (99,36)*	Xmédio		102,05 (102,05)	Xmédio		99,72 (99,75)*
s		0,98 (0,37)*	s		0,41 (0,23)*	s		0,34 (0,27)*
CV%		0,99 (0,37)*	CV%		0,40 (0,23)*	CV%		0,34 (0,27)*

*Dados escrutinizados; $n=8$

$R\%$ critério de aceitação: 80 a 120

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que apresenta na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

Considerando os resultados obtidos na recuperação e segundo a Tabela 2.5, podemos concluir que o método é exato.

Tabela 2.5 - Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação Aceito (%)
> 10	98-102
> 1	97-103
> 0,1	95-105
> 0,01	90-107
> 0,001- > 0,00001	80-110
> 0,000001	60-115
> 0,0000001	40-120

Fonte: BRITO, 2001

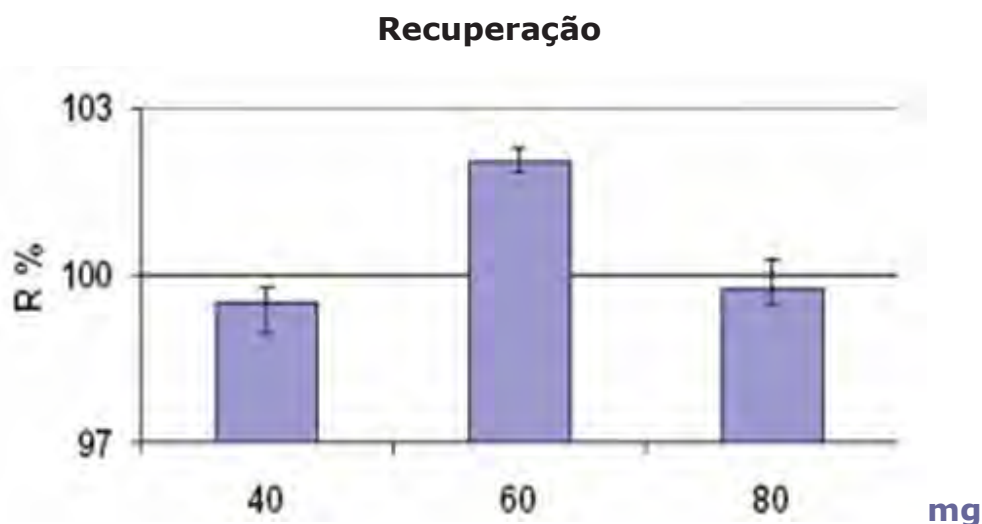


Figura 2.7 - Representação gráfica da percentagem de **recuperação (R%)** como função da massa de **AA** empregada na fortificação da amostra de suco

A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de 10 determinações, sob condições de repetitividade, e a valor aceito como verdadeiro (MR).

As fontes de incerteza foram levantadas e os valores individuais das incertezas genéricas determinados.

Os parâmetros investigados, listados a seguir fornecem evidência objetiva da validação:

- 1- linearidade (Y-Yo): a curva é linear em toda a sua extensão;
- 2- faixa linear: 1,0 a 125mg de AA;
- 3- faixa linear de trabalho: 10,103 a 126,08mg AA;
- 4- Limite de detecção, LD: 0,59mg AA;
- 5- Limite de quantificação, LQ: 1,31mg AA;
- 6- precisão, $s_n=10$ (ASTM691-99): $\pm 0,11$ mg AA;
- 7- precisão por repetição, s_r : $\pm 0,815$ mg AA.

5 – CONCLUSÕES

Validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância, rigorosamente, pré-estabelecidos.

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento do controle de qualidade de uma substância ativa ou forma farmacêutica.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos afirmar que o método analítico titulométrico para determinação do ácido ascórbico, empregando solução de iodo, foi validado em todos os parâmetros preconizados pelo guia EURACHEM apresentando-se, portanto, sensível; linear em toda a faixa de massas de AA investigada; exato e robusto.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st Edition, 2005.

BACCAN, et al. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 3.ed. São Paulo: Edgard Bluncher e Instituto Mauá de Tecnologia, p. 234;235;247 252, 2001.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.

EAL (European Cooperation for Accreditation of Laboratories). EAL-P11. **Validation of test methods: general principles and concepts**. Paris: EAL, 1997. 13p.

EC (European Commission). Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, 2002, L 221/8.

EURACHEM. **The Fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics**. 1998.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. **General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories**. Geneva: ISO, 2005. 28 p.

ISO (International Standard Organization) 5725-2. **Accuracy (trueness and precision) of Measurement Methods and Results**. Part 3: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; 1994.

ISO (International Standard Organization) 5725-3. **Accuracy (trueness and precision) of Measurements Methods and Results**. Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurements methods; 1994.

LU, X.; SEIB, P. A. Assay of dehydroascorbic acid in bread and dough added as a crystalline dimer. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 200-206, 1998.

NATA Technical Note 17. Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods. Austrália: National Association of Testing Authorities, 1998.

SOUZA, S.V.C.; JUNQUEIRA, R.G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method, **Anal. Chim. Acta**, v. 552, n. 1-2, November, p. 25-35, 2005

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends Anal. Chem.**, v. 23, p. 535-552, 2004.

CAPÍTULO 3

VALIDAÇÃO DO MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO IODATO DE POTÁSSIO COMO AGENTE TITULANTE

RESUMO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas está sendo cada vez mais exigida e reconhecida, através da sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. O presente trabalho apresenta uma abordagem metrológica de método clássico para a determinação do ácido ascórbico (AA). Os parâmetros de validação do método de análise pelo Iodato de potássio e o cálculo da incerteza atenderam as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Os resultados obtidos nas análises foram: 1- faixa linear: 1 a 125 mg de AA; 2- faixa de trabalho: 10,02 a 125,53 mg AA; 3- LD: 0,52 mg AA; 4- LQ: 1,56 mg AA; 5- precisão por repetitividade $s_r = 10$: $\pm 0,228$ mg AA; 6- precisão pela norma ASTM 691-99 sn: $\pm 0,043$ mg AA; 7- robustez (Younden-Steiner) forneceu uma precisão de $s_{global} = \pm 0,36$ mg AA; 8- a incerteza genérica determinada foi de 1,31. A linearidade avaliada pela análise de resíduo (Y-Yo) mostra que a curva é linear em toda a sua extensão ensaiada e o método validado foi preciso, robusto e exato. A importância da validação de métodos analíticos está na obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido. Resultados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis.

Palavras-chave: abordagem metrológica; confiabilidade; incerteza genérica.

ABSTRACT

The need to show the quality of chemical measurements is being increasingly recognized and required by their comparability, traceability and reliability. This paper presents an approach to metrology classical method for the determination of ascorbic acid (AA). The validation parameters of the analysis method by potassium iodate and uncertainty calculation met the guidelines of ISO-IEC-17025- guide and EURACHEM guides. The results obtained in this study were: 1- linear range: 1-125 mg AA; 2- working range: 10.02 to 125.53 mg AA; 3- LD: 0.52 mg AA; 4- LQ: 1.56 mg AA; 5- precision repeatability $s_r = 10$: ± 0.288 mg AA; 6- precision by ASTM 691-99, s_n : ± 0.043 mg AA; 7- robustness (Younden-Steiner) provided an accuracy of $\pm S_{\text{global}}$ 0.36mg = AA; 8- uncertainty determined generic was 1.31. Linearity was assessed by residual analysis (Y-Y0) shows that the curve is linear in its entirety tested and validated method was precise, robust and accurate. The importance of validation of analytical methods is to obtain reliable results and suitable for intended use. Unreliable analytical results can lead to disastrous decisions and irreparable financial damage.

Keywords: metrology approach; reliability; general uncertainty

1- INTRODUÇÃO

A atividade vitamínica do ácido ascórbico é a ação antiescorbútica. O escorbuto é uma doença que pode levar à morte e é causada pela deficiência nutricional de vitamina C. Seus principais sintomas são: o aparecimento de lesões na mucosa intestinal, hemorragias digestivas, vermelhidão nas gengivas, enfraquecimento dos dentes (redução na ossificação), dores agudas e inchaço nos membros superiores e inferiores além de deficiência no processo de cicatrização e hemorragia capilar (BASU; SCHORAH, 1982).

A necessidade de ingestão desta vitamina é vital para a saúde e até mesmo para a sobrevivência do homem, pois o ácido ascórbico participa de inúmeras atividades fisiológicas. A dose diária média de vitamina C necessária para prevenir o escorbuto é de 46 mg (ARONSON, 2001). No Brasil, a Ingestão Diária Recomendada (IDR) é de 60 mg (BRASIL, 1998). Estes níveis são facilmente atingidos com o consumo de frutas e vegetais frescos.

O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e validados. Do mesmo modo, o operador que realiza os estudos deve ser competente na área de estudo e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo (INMETRO, 2007).

O laboratório deve estar ciente dos requisitos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 para a seleção de métodos de ensaios, desenvolvimento de métodos de ensaio pelo laboratório, utilização de métodos não normalizados e validação de métodos. Quando o

laboratório utilizar métodos normalizados, será necessário verificar se os dados de desempenho declarados são adequados ao propósito do ensaio e, se necessário, fazer declaração de competência (INMETRO, 2007).

Os métodos volumétricos que envolvem a oxidação de íons iodeto (iodometria) são métodos normalizados, baseados na semi-reação:



Os íons iodeto exercem uma ação redutora sobre sistemas fortemente oxidantes, com a formação de quantidade equivalente de iodo. O iodo liberado é então titulado com uma solução padrão de tiossulfato de sódio (BACCAN, 2001).

Dois métodos iodométricos são frequentemente utilizados, método direto e o método indireto. O método direto faz uso de uma solução padrão de iodo (I_2), preparada mediante dissolução do iodo em solução aquosa de iodeto de potássio (KI). Neste método, o iodo é usado diretamente na titulação como oxidante. O método indireto consiste na dosagem de espécies oxidante pela adição de um excesso de iodeto (I^-). O iodeto é oxidado a iodo e posteriormente este é titulado com uma solução padrão de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$). Ao se adicionar iodeto de potássio (KI) à solução, poderemos dosar o iodo liberado, usando goma de amido como indicador (VOGEL, 2002).

O objetivo desse trabalho foi a validação intralaboratorial de método quantitativo, titulométrico, utilizando Iodato de Potássio como agente titulante na determinação de ácido ascórbico.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL

Todos os reagentes utilizados atendem à especificação grau analítico (PA). O ácido ascórbico foi obtido junto à empresa Sigma Aldrich, cujo número do CAS é: 50-81-7. Lote: 048k0069A5960.

O Iodato de Potássio (grau analítico 99,4-100,4%), o Iodeto de Potássio (PA) e o amido (PA) foram obtidos pela empresa Chemis. O ácido sulfúrico foi obtido pela Tyco.

As vidrarias usadas: bureta, balões volumétricos e pipetas foram calibrados e a água utilizada nas diluições foi ultra-pura.

Todas as análises foram feitas em 10 replicatas.

2.1.1 – Soluções

Preparo da solução ácida: preparar a solução de ácido sulfúrico 20%, colocando água em um balão volumétrico de 100 mL, adicionar cuidadosamente 200 mL de ácido sulfúrico e completar o volume com água.

Preparo da solução de Iodato de Potássio: secar o KIO_3 a 105°C por 2h em estufa, esfriar e pesar 3,5668 g, dissolver em água agitando até completa dissolução. Coloque em balão volumétrico de 1000mL e complete o volume com água.

Preparo da solução de Iodeto de Potássio a 10%: pesar 50g de Iodeto de Potássio dissolver em água agitando até completa dissolução. Colocar em um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água.

Preparo da solução-padrão de Ácido Ascórbico: pesar 1g de Ácido Ascórbico, adicionar água e agitar até completa dissolução.

Colocar em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água.

Preparo da solução de amido a 1%: pesar 1g de amido, colocar em um béquer, adicionar um pouco de água fazendo uma pasta. Verter no béquer 100mL de água fervente. Agitar obtendo uma solução límpida.

2.2 – MÉTODO

Metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985) que consiste em gerar o iodo na presença do AA pela reação do íon iodeto e iodato em solução ácida.

2.2.1 – Procedimentos

A solução de ácido ascórbico foi adicionada em bureta calibrada, com capacidade para 10 mL. A bureta foi mantida tampada com um béquer, na sua extremidade superior, as alíquotas ensaiadas foram: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5; 11,0; e 12,5 mL.

Após a alíquota coletada de ácido ascórbico em erlenmeyers de 250mL, adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico 20%, 1 mL de Iodeto de Potássio 10%, 1 mL de solução de amido 1%. Em seguida sob agitação magnética adicionou-se solução de Iodato de Potássio que também foi colocada em uma bureta calibrada de 10 mL.

Para alíquotas até 2,5 mL, a adição de 1 mL da solução de Amido 1% foi realizada logo no início.

Para os volumes maiores a adição foi realizada cerca de 2 mL antes do ponto final. Para volumes de ácido ascórbico, cuja titulação era

necessário o enchimento de nova bureta de Iodato de Pótássio, a adição ocorria até 10 mL. A agitação era interrompida, o erlenmeyer era tampado com vidro de relógio, durante o enchimento de nova bureta.

O ponto final da titulação era quando a coloração passava para azul persistente por 30 segundos.

3- PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de desempenho dos métodos foram estabelecidos por procedimentos intralaboratoriais, atendendo as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e de quantificação experimentais e incerteza genérica foram os parâmetros estudados.

O nível de significância adotado nos testes foi de $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram feitos em planilhas comerciais, cujos resultados foram previamente validados frente aqueles obtidos softwares de análise estatística. Para cada parâmetro validado foram feitas dez replicatas.

3.1 – Curva Analítica:

Para a obtenção da curva analítica, foram feitas 10 curvas utilizando 17 alíquotas de AA, fazendo-se uma média das curvas.

Para levantamento da curva analítica de cada método, foi levado em consideração a massa de ácido ascórbico adicionada em relação à massa de ácido ascórbico determinada que foi calculada de acordo com a equação da reta da bureta calibrada.

3.2 – Linearidade:

A linearidade é a habilidade do método de obter resultados de ensaios proporcionais à concentração do analito sendo verificada a partir da análise de dez curvas analíticas em 17 alíquotas de AA, na faixa de 0,1 a 12,5 mg. Foi determinada levando-se em consideração a massa de ácido ascórbico determinado em relação ao valor de $Y - Y_0$ onde Y = massa de ácido ascórbico determinado e Y_0 = massa de ácido ascórbico adicionado.

A linearidade foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

3.3 – Faixa Linear de Trabalho:

Faixa de concentração do analito, ou valores de propriedades, ao longo da qual o método pode ser aplicado. Intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade que foi calculado utilizando-se os valores da massa de ácido ascórbico determinado em relação aos valores obtidos em $U/x\%$, onde U = média dos desvios padrões de cada ponto da massa de ácido ascórbico determinado e $x\%$ = massa de ácido ascórbico determinado dado em porcentagem.

3.4 – Sensibilidade:

É a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito sendo, portanto, o coeficiente angular da inclinação da reta. Foi calculada através da equação da reta $Y = a + bx$. A sensibilidade é o valor de b obtido na equação da reta.

3.5 – Limite de Detecção (LD):

Determinado pela análise repetida de uma porção de amostras de branco e a concentração do analito. É, portanto, a menor concentração do analito que pode ser confiavelmente detectada pelo método.

Analisar dez amostras brancas independentes, fortificadas na menor concentração aceitável (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado).

3.6 – Limite de Quantificação (LQ):

É a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. É normalmente o ponto mais baixo da curva de calibração, excluindo o branco. As alíquotas de amostras do branco foram fortificadas, em vários níveis de concentrações, próximas ao limite de detecção.

3.7 – Precisão por Repetição (sr)

É a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e normalmente expressa em termos de desvio-padrão e coeficiente de variação e depende da concentração do analito. Os cálculos foram feitos através da fórmula:

$$CV = \frac{DP}{X} \times 100$$

Onde: DP = desvio padrão e X = concentração média determinada.

A precisão foi determinada por análises em dez repetições na concentração nominal de 59,73 mg de AA.

3.8 – Precisão pela Norma da American Society for Testing and Materials de agosto de 1999 (ASTM E 691-99) (sn):

A precisão pela norma ASTM E 691-99 foi feita pelo número de pontos ensaiados pelo cálculo do s/sr onde s = desvio padrão dos pontos ensaiados e sr = raiz quadrada da soma de s ao quadrado dividido pelo número de pontos ensaiados (n). Verificou-se o K (valor crítico) na tabela t de student para $p=0,05\%$, $p=17$ (n° . pontos ensaiados) e $n=10$ (replicatas).

3.9 – Robustez:

Pequenas variações no procedimento que pode ter ou não influencia significativamente sobre o desempenho do método. A robustez de um método foi testada pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das consequências. Utilizou-se o teste de Younden-Steiner que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for à robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Nesse método foram realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 6 diferentes etapas, no procedimento analítico. As oito medições foram realizadas numa ordem aleatória, variando-se a concentração do ácido sulfúrico (20 e 10N),

volume do ácido usado (10 e 5 mL), agitação (N= normal e L= lenta), tempo de adição do titulante Iodato de Potássio (N= normal e L= lenta), volume do indicador amido (1 e 0,5 mL) e concentração do indicador usado (0,1 e 0,08N).

O efeito foi calculado, levando-se em conta a matriz dos fatores nominais denominados por letras maiúsculas, de **A** a **F** e a variação por letras minúsculas, de **a** a **f**, conforme Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Matriz dos fatores para determinação da robustez

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	a	A	a	A	a	A	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	C	c	c	c	c	C	C
D ou d	D	d	D	d	d	D	d	D
E ou e	E	e	e	E	E	e	e	E
F ou f	F	f	f	F	f	F	F	f
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF, 2005

Para determinar a variação de um fator, encontrar os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e as 4 minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de **A** para **a**, usar os resultados:

$$\frac{s + u + w + y}{4} \text{ e } \frac{t + v + x + z}{4}$$

O efeito do fator A/a será:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + u + w + y}{4} - \frac{t + v + x + z}{4}$$

Calcular todos os 6 pares para obter 6 diferenças, que podem ser ordenados para revelar aqueles com efeito significativo no resultado.

Interpretar os resultados. Verificar o efeito e ver o critério que não pode ser maior que $2 \times s_{\text{global}}$ (desvio padrão global). Se for maior o método estará perdendo precisão.

3.10 – Recuperação:

Ou tendência é o erro sistemático do sistema de medição. A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de dez determinações sob condições de repetitividade o valor aceito como verdadeiro (MR: material de referência). Cálculo pela fórmula:

$$\%R = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

3.11 – Exatidão:

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi avaliada numericamente através da tendência (recuperação) por intermédio de análises dos ensaios aplicados a amostras de suco industrializado de laranja ($C_{\text{nominal}} = 34 \text{ mg de AA}$) em duas diferentes concentrações de ácido ascórbico determinado (34,86 e 69,66 mg). Foi determinado e porcentagem de recuperação que foram calculados pela divisão dos valores médios da massa de ácido ascórbico determinado sobre os valores médios da massa de ácido ascórbico adicionado multiplicado por 100, segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração média nominal}} \times 100$$

3.12 – Incerteza Genérica:

Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Foi determinada subtraindo-se os valores médios da massa de ácido ascórbico determinado e massa de ácido ascórbico adicionado.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos parâmetros experimentais, propostos para validação do método titulométrico, utilizando-se Iodato de Potássio para determinação do ácido ascórbico, estão expostos, a seguir.

4.1 - Curva analítica de linearidade

Os pontos empregados para a construção da curva de analítica foram em número de $p = 17$, com repetição das medidas para $n = 10$. A média das curvas obtidas está apresentada na Figura 3.1.

Curva analítica

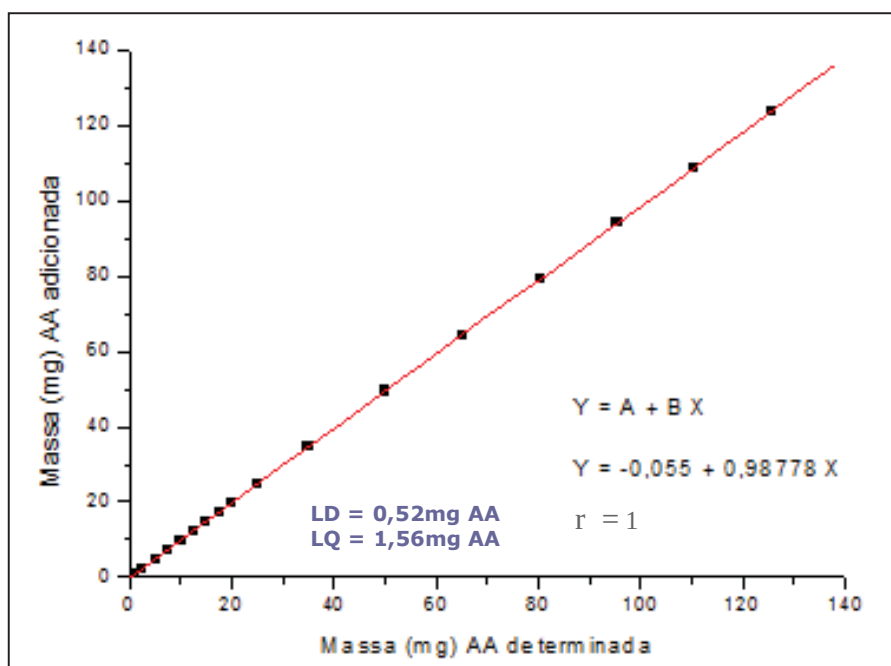


Figura 3.1 - Curva analítica: método estequiométrico para determinação de **AA** empregando **Iodato de Potássio** como agente titulante; parâmetros: **LD**; **LQ**; Linearidade; faixa linear de trabalho; sensibilidade: **S**= 0,98778; **r** = 1.

A curva analítica ($y = -0,055 + 0,98778 X$), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 1,0, o que está em concordância com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Brasil, 2003) que é $r = 0,99$.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de quantificação é a menor concentração de analito, que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. Ele deve ser estabelecido usando-se uma amostra ou padrão de medida apropriado, isto é, ele é normalmente o ponto mais baixo na curva de calibração (excluindo o branco).

O limite de detecção e o limite de quantificação foram de 0,52 mg AA e 1,56 mg AA, respectivamente.

O parâmetro investigado, apresentado na Figura 3.2 fornece evidência objetiva da linearidade, através da análise de resíduos ($Y - Y_0$).

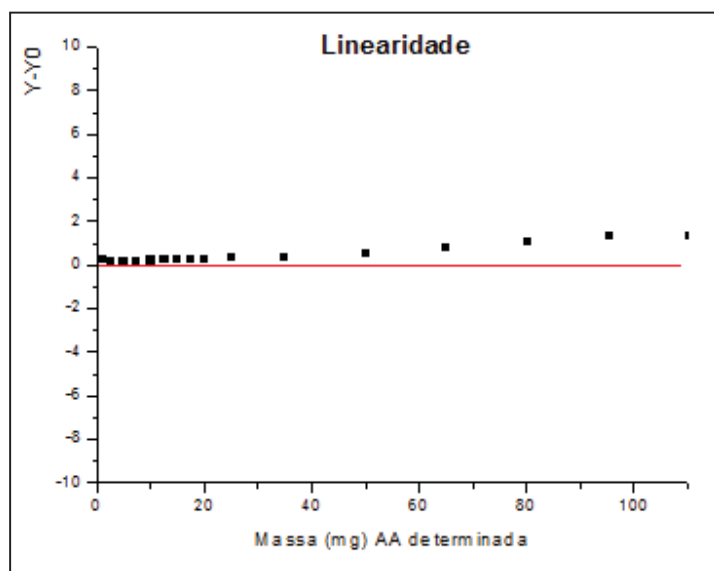


Figura 3.2 - Avaliação da **linearidade** a partir dos resíduos ($Y - Y_0$), obtidos a partir dos valores de $mAA_{determinada}$ e dos valores de (Y_0) calculados a partir dos valores de $mAA_{adicionada}$ para método do Iodato de Potássio

A faixa linear usado nesse ensaio foi de 1,0 a 125 mg de AA. A curva foi linear, verificando-se ausência de valores discrepantes para os níveis de concentração de AA entre a faixa de 1,1 a 25,03 mg havendo homocedasticidade dos dados. Para os demais pontos observa-se um maior desvio padrão à medida que as concentrações de AA aumentam. Para esse estudo, deve-se fazer a regressão linear quadrática, analisando esses intervalos de dados separadamente. A faixa linear de trabalho de 10,02 a 125,53 mg AA, está apresentada na Figura 3.3.

Faixa de Trabalho

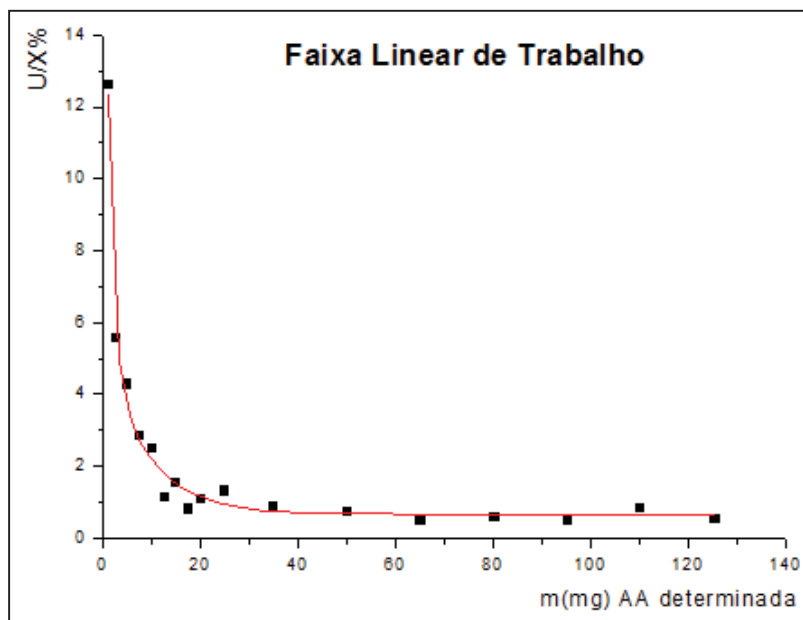


Figura 3.3 - Determinação do limite inferior da **faixa linear** de trabalho baseado na correlação $(U/x)\% \times m\text{AA}$ para Iodato de Potássio. Assumiu-se a precisão esperada para o método melhor do que 1,0%

4.2 – Precisão

A repetitividade do método foi verificada por 10 determinações, contemplando o intervalo linear do método, estando representada na Figura 3.4.

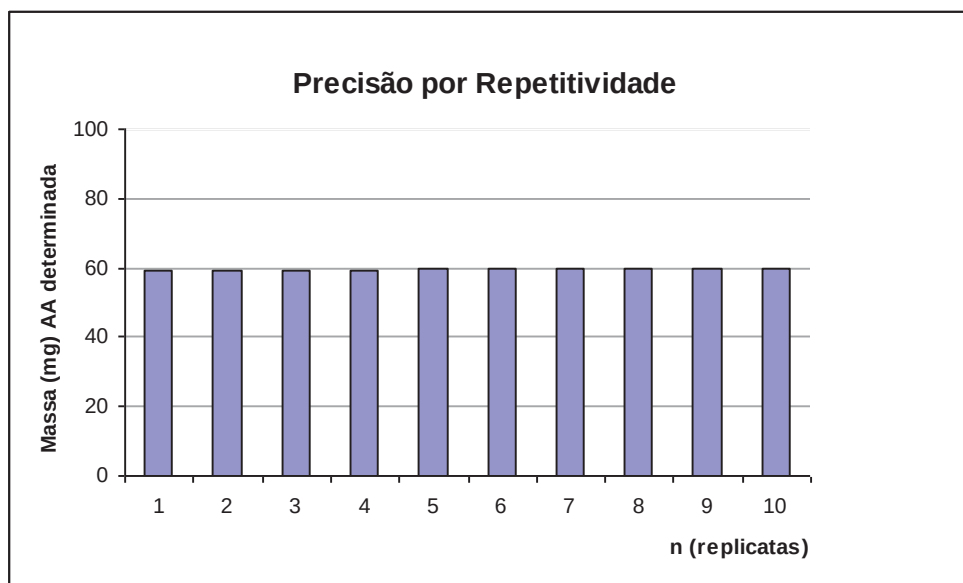


Figura 3.4 - Determinação da precisão por **repetitividade**, $\pm s$, $n=10$ para a de **mAA** de 59,736 mg e titulação com Iodato de Potássio; $\pm sr=0,228mg$.

O parâmetro investigado forneceu evidência objetiva da validação. A precisão por repetitividade, expressa em desvio padrão teve um desvio padrão de $\pm sr=0,228mg$ e a precisão expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) foi: DPR = 0,382%.

A precisão intermediária pela Norma ASTM691-99 está representada na Figura 3.5.

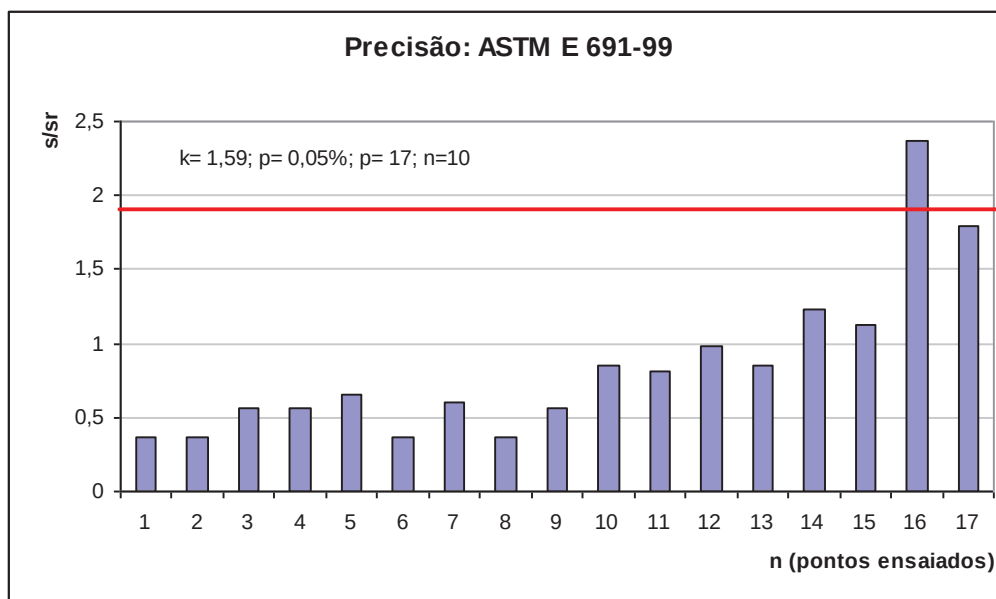


Figura 3.5 - Valores de s/s_r , (k), ($s_n=0,043$) calculados o para os diferentes valores de mAA_{det} para Iodato de Potássio. Em comparação com o **valor crítico** de “ k ”, obtido para $n=10$ e $p=17$, para nível de confiabilidade de 95%.

O valor do desvio padrão obtido foi de $s_n \pm 0,043$ mg AA. Para a concentração determinada de 110,26 mg de AA verificou-se que ultrapassou o limite do valor crítico de “ k ” o que pode ser explicado por algum erro sistemático ou ocasional durante esse ensaio.

Efeitos que variam sistematicamente de amplitude durante uma série de análises, causados, por exemplo, por controle inadequado das condições experimentais, dão origem a erros sistemáticos que não são constantes.

Os erros ocasionais, ou fortuitos são tipos de erros que invalidam uma medição e resultam, tipicamente, de falha humana ou mau funcionamento dos aparelhos. Troca de dígitos num número ao registrar dados ou contaminação acidental de amostras, são exemplos comuns deste tipo de erro.

Essa concentração deve ser analisada novamente para correção dos erros que foram detectados, pois erros como a transposição de

dígitos pode ser corrigida particularmente se ocorrer nos dígitos de ordem superior, antes de serem rejeitados evitando incorporar os erros em qualquer análise estatística.

4.3 – Robustez

O ensaio de robustez foi levado a cabo empregando-se o método de Younden-Steiner, considerando-se 6 variáveis, tendo fornecido uma precisão de $s = \pm 0,361$ mg AA (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de **robustez** para iodato de Potássio, empregando o método de Younden-Steiner.

VARIÁVEIS	EXPERIMENTOS								VARIAÇÃO		
	1	2	3	4	5	6	7	8	nominal	variação	efeito
C ác. Sulfúrico/N	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	-0,265
Vol. Ác. Sulf./mL	10	10	5	5	10	10	5	5	10	5	-0,309
Ad. Iodato de K	N	N	L	L	L	L	N	N	N	L	0,266
Agitação	N	L	N	L	L	N	L	N	N	L	-0,132
Vol. Indic./mL	1	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	1	1	0,5	-0,132
C Iodato de K/N	0,1	0,08	0,08	0,1	0,08	0,1	0,1	0,08	0,1	0,08	-0,496
V gasto de KIO ₃	6,75	8,55	8,5	6,8	8,5	6,8	6,85	8,6			
mAA adic. mg	59,4	59,4	59,4	59,4	59,4	59,4	59,4	59,4			
mAA determ. mg	59,4707	60,3007	59,947	59,9125	59,947	59,9125	60,3545	60,6543	Média=	60,06mg	
R%	100,119	101,516	100,921	100,862	100,921	100,862	101,607	102,111	Sglobal=	0,361mg	

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. O protocolo de Younden trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

4.3.4 – Exatidão

A exatidão de um método analítico consubstancia-se na proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi calculada dividindo a concentração média detectada pelo valor do certificado e multiplicando por 100, para expressar em percentagem, conforme Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Valores médios de **AA** determinados (**X_{médio}**), precisão (**±s**), incerteza específica (**±U/x**), massas de AA adicionadas (**mAA_{adic.}**), incerteza genérica (**I_{genérica}**) e recuperação do AA (**R%**) para Iodato de Pótássio.

X AA _{adic.}	X AA _{determ.}	±s	(±U/x)*100	I _{genérica}	R%
0,90	1,11	0,1396	12,62	0,21	122,96
2,39	2,52	0,1396	5,54	0,13	105,54
4,86	4,99	0,2132	4,27	0,13	102,58
7,34	7,46	0,2132	2,86	0,12	101,63
9,82	10,02	0,2506	2,50	0,20	102,05
12,30	12,58	0,1396	1,11	0,28	102,30
14,78	15,01	0,2279	1,52	0,23	101,57
17,25	17,53	0,1396	0,80	0,27	101,57
19,73	20,00	0,2132	1,07	0,26	101,34
24,69	25,03	0,3257	1,30	0,34	101,37
34,60	34,96	0,3086	0,88	0,36	101,03
49,47	49,97	0,3722	0,74	0,50	101,00
64,34	65,11	0,3257	0,50	0,77	101,19
79,21	80,29	0,4676	0,58	1,08	101,37
94,08	95,38	0,4289	0,45	1,31	101,39
108,94	110,26	0,9021	0,82	1,31	101,21
123,81	125,53	0,6838	0,54	1,72	101,39

LD:0,52mg; **LQ:**1,56mg; **S:**0,98778; **Faixa linear de trabalho:** (10,02 ≤ **mAA_{det}** ≤ 125,53) mg

A exatidão do método foi ensaiada em termos da recuperação e a mesma apresentou-se no intervalo: $97 \leq \%R \leq 105$, com $\%R_{\text{média}} = 98 \pm 2$, tendo sido aplicado o critério de aceitação de 95 a 105%, a considerar a natureza do método analítico.

4.5 – Incerteza Genérica

A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança especificado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Para que as medidas sejam de valor prático, é necessário ter algum conhecimento de sua confiabilidade ou incerteza. Uma declaração da incerteza associada a um resultado transmite ao cliente a qualidade do resultado.

O método para a determinação de AA foi validado e a incerteza genérica determinada, a partir da comparação com o AA, material de referência (MR) conforme Figura 3.6.

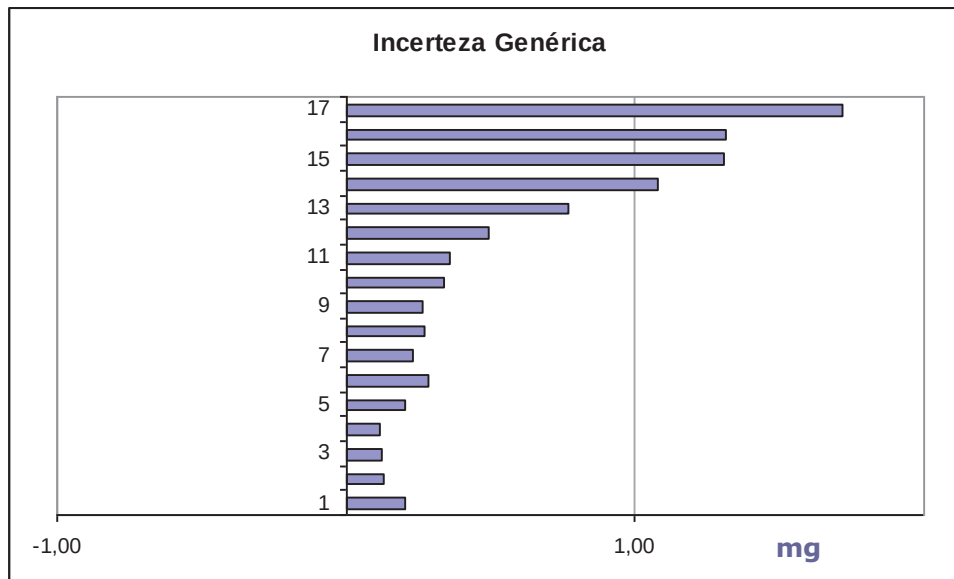


Figura 3.6 - Representação da incerteza genérica ($I_{\text{genérica}}$) como função de p. Erro relativo < 1,3% para Iodato de Potássio.

Os estudos de validação e o seu acompanhamento que deve ser feito de acordo com a rotina do laboratório, produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina.

Através desses dados é possível calcular as variações sofridas pelo método e determinar a incerteza, ou seja, quanto o meu resultado vai variar para mais ou para menos numa determinada faixa de trabalho com uma determinada matriz.

A incerteza genérica é definida como a diferença entre a média dos valores determinados e o valor tido como verdadeiro. Para este método observamos que a incerteza é quase constante até cerca de 34 mg ensaiada, acima deste valor a incerteza da medicação aumenta.

4.6 – Recuperação

Para muitas análises, o principal problema pode ser adquirir um bom conhecimento da quantidade de analito na amostra original, relativamente ao resultado obtido ao final do processo de medição. Esta propensão pode ser devido a perdas no processamento, contaminação ou interferentes. A tendência, que algumas vezes é chamada de recuperação, de um método, é o erro sistemático desse sistema de medição.

Uma das estratégias disponíveis para determinar as tendências do método inclui a medição de brancos e amostras gravimetricamente fortificadas.

As taxas de recuperação para o método em estudo estão apresentadas na Tabela 3.4 e Figura 3.7.

Tabela 3.4 - Dados ($mAA_{adic.}$; $n=10$) e resultados coletados ($mAA_{det.}$; $n=10$) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de Vitamina C do comprimido ($C_{nominal} = 34\text{mg}$ de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (34 e 69mg) para iodato de Potássio.

X AA adic.(mg)	X AA determ.	R%	X AA adic.(mg)	X AA determ.	R%
34,8651	31,4892	110,7208	69,6587	67,0729	103,8551
	31,4007	111,0329		66,8074	104,2679
	31,4892	110,7208		66,8959	104,1300
	31,5777	110,4104		66,9844	103,9924
	31,5777	110,4104		66,8959	104,1300
	31,5777	110,4104		66,8959	104,1300
	31,5777	110,4104		66,8959	104,1300
	31,4892	110,7208		66,8074	104,2679
	31,5777	110,4104		66,8959	104,1300
	31,5777	110,4104		66,8959	104,1300
Xmédio	31,5335	110,5658		66,9048	104,1163
s	0,0626	0,2199		0,0775	0,1205
CV%	0,1985	0,1989		0,1158	0,1157

R%_{critério de aceitação}: 80 a 120

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que apresente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

Considerando os resultados obtidos na recuperação e segundo a Tabela 3.5, podemos concluir que o método é exato.

Tabela 3.5 - Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação Aceito (%)
> 10	98-102
> 1	97-103
> 0,1	95-105
> 0,01	90-107
> 0,001- > 0,00001	80-110
> 0,000001	60-115
> 0,0000001	40-120

Fonte: BRITO, 2001

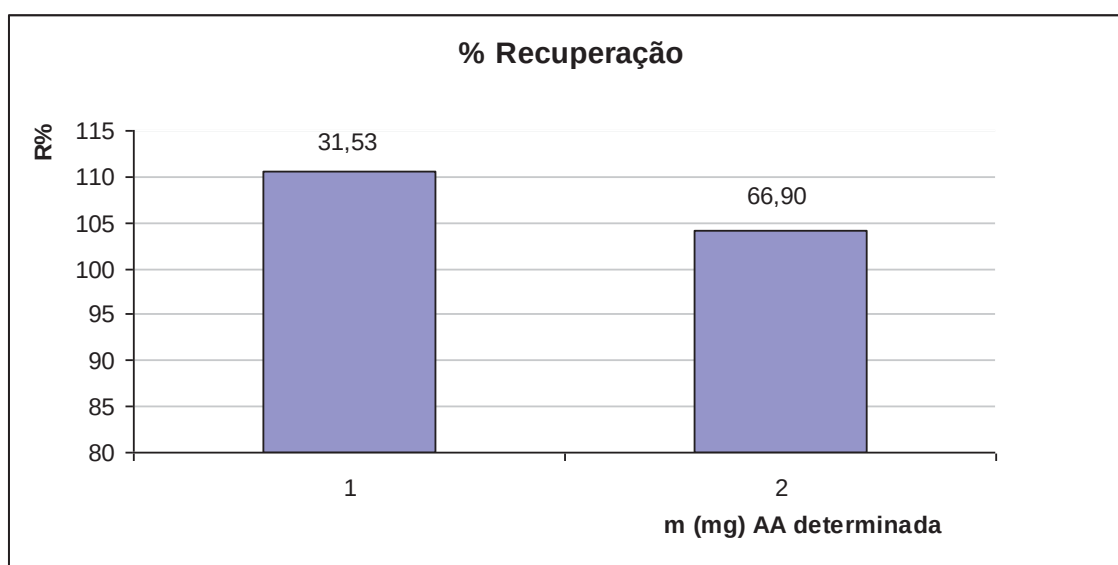


Figura 3.7 - Percentagem de **recuperação** (R%) como função da massa de **AA** empregada na fortificação da amostra de suco para iodato de Potássio.

A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de 10 determinações, sob condições de repetitividade, e a valor aceito como verdadeiro (MR).

As fontes de incerteza foram levantadas e os valores individuais das incertezas genéricas determinados.

Os parâmetros investigados, listados a seguir fornecem evidência objetiva da validação:

- 1- linearidade (Y-Yo): a curva é linear em toda a sua extensão;
- 2- faixa linear: 1,0 a 125 mg de AA;
- 3- faixa linear de trabalho: 10,02 a 125,53 mg AA;
- 4- Limite de detecção, LD: 0,52 mg AA;
- 5- Limite de quantificação, LQ: 1,56 mg AA;
- 6- precisão, $s_n=10$ (ASTM691-99): $\pm 0,382$ mg AA;
- 7- precisão por repetição, $s_r \pm 0,043$ mg AA.

5 – CONCLUSÕES

Através dos ensaios analíticos realizados, constatou-se que a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação de um processo produtivo, de equipamento e, inclusive de metodologia analítica, nos diversos setores onde a qualidade do produto fabricado seja uma das principais razões da existência da empresa.

Ao se validar um método analítico, não significa que este possa ser aplicado sem restrições para diferentes medicamentos com o mesmo princípio ativo. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais evidentes que garantam a funcionalidade do método, bem como, do tratamento analítico adequado, da avaliação estatística dos resultados e da definição dos critérios de aceitação.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos afirmar que o método analítico titulométrico para determinação do ácido ascórbico, empregando solução de Iodato de Potássio, foi validado em todos os parâmetros preconizados pelo guia EURACHEM apresentando-se, portanto, sensível; linear em toda a faixa de massas de AA investigada; exato, preciso e robusto.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 41 de 14 de janeiro de 1998**, anexo A. Regulamento técnico para rotulagem nutricional de alimentos embalados. Brasília, DF, 14 de janeiro de 1998.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st Edition, 2005.

ARONSON, J. K. Forbidden fruit. **Nature Medicine**, v. 7, n. 1, p. 29-30, 2001.

BACCAN, et al. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 3.ed. São Paulo: Edgard Bluncher e Instituto Mauá de Tecnologia, p. 234;235;247 252, 2001.

BASU, T. K.; SCHORAH, C. J. **Vitamin c in health and disease**. Londres: AVI Pub. Co., 1982. 152 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **DOQ-CGCRE-008 Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. 2007. RJ. Brasil.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos para análise de alimentos** 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo (IMESP), 1985. 560 p.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

CAPÍTULO 4

VALIDAÇÃO DO MÉTODO TITULOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO 2,6 DICLOROFENOL-INDOFENOL COMO AGENTE TITULANTE

RESUMO

Validação de método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido sendo um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e tem recebido considerável atenção na literatura. O presente trabalho apresenta uma abordagem metrológica de método clássico para a determinação do ácido ascórbico (AA). Os parâmetros de validação do método de análise pelo 2,6 diclorofenol-indofenol e o cálculo da incerteza atenderam as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Os resultados obtidos nas análises foram: 1- faixa linear: 1 a 14 mg de AA; 2- faixa de trabalho: 1,11 a 13,5 mg AA; 3- LD: 0,022 mg AA; 4- LQ: 0,066 mg AA; 5- precisão por repetitividade $s_r = 10$: $\pm 0,015$ mg AA; 6- precisão pela norma ASTM 691-99, s_n : $\pm 0,062$ mg AA; 7- robustez (Younden-Steiner) forneceu uma precisão de $s_{global} = \pm 0,037$ mg AA; 8- a incerteza genérica determinada foi de 1,11. A linearidade avaliada pela análise de resíduo (Y-Yo) mostra que a curva é linear em toda a sua extensão ensaiada e o método validado foi preciso, robusto e exato. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidência objetiva de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido.

Palavras-chave: parâmetros de validação; qualidade assegurada; Eurachem.

ABSTRACT

Validation of analytical method is the process of demonstrating that the method is suitable for their intended use is a vital aspect of analytical quality assurance and has received considerable attention in the literature. This paper presents an approach to metrology classical method for the determination of ascorbic acid (AA). The validation parameters of the analysis method by 2,6-dichlorophenol-indophenol and uncertainty calculation met the guidelines of ISO-IEC-17025- guide and EURACHEM guides. The results obtained in this study were: 1- linear range: 1-14 mg AA; 2- working range: 1.11 to 13.5 mg AA; 3- LD: 0.022 mg AA; 4- LQ: 0.066 mg AA; 5- precision repeatability $s_r = 10: \pm 0.015$ mg AA; 6- precision by ASTM 691-99, $s_n: \pm 0.062$ mg AA; 7- robustness (Youden-Steiner) provided an accuracy of ± 0.037 mg $s_{global} = AA$; 8- uncertainty determined generic was 1.11. Linearity was assessed by residual analysis (Y-Y0) shows that the curve is linear in its entirety tested and validated method was precise, robust and accurate. A validation procedure well established and documented provides evidence that the objective system and method are suitable for the intended use.

Keywords: validation parameters; quality assurance; Eurachem

1- INTRODUÇÃO

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000). Eles podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (RICE-EVANS, 1996).

Compostos antioxidantes estão naturalmente presentes em frutas, sendo que algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos (ARABBI, 2004). A acerola, por exemplo, apresenta grandes concentrações de ácido ascórbico.

Nos últimos anos, a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade vêm sendo cada vez mais reconhecidas e exigidas (PAULA; SENA, 2007).

Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, a metodologia deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI et al., 2004).

A validação de um método assegura a especificidade, exatidão e precisão de um ensaio analítico, tendo como objetivo garantir que o procedimento analítico forneça resultados reprodutíveis, confiáveis e que sejam adequados aos fins para os quais tenha sido planejado (LAVRA et al., 2008).

A determinação de vitamina C pelo método de Tillmans é usada para amostras com baixo teor de vitamina C, por exemplo, sucos de frutas. Baseia-se na redução do corante sal sódico de 2,6-diclorofenol-indofenol por uma solução ácida de vitamina C (IAL, 1985). O titulante age como indicador e o ácido ascórbico pode ser determinado pela medida do excesso do reagente.

Os íons Fe^{2+} , Sn^{2+} e Cu^{2+} presentes na amostra a ser analisada, interferem na determinação de vitamina C pelo método de Tillmans. Nestes casos, previamente à determinação da vitamina C deve-se verificar a presença dos interferentes (IAL, 1985). Além disso, apresenta como desvantagem a dificuldade de visualização do ponto final, quando se trabalha com amostras coloridas.

O objetivo desse trabalho foi a validação intralaboratorial de método quantitativo, titulométrico, utilizando a 2,6 diclorofenol-indofenol como agente titulante na determinação de ácido ascórbico.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL

Todos os reagentes utilizados atendem à especificação grau analítico (PA). O ácido ascórbico foi obtido junto à empresa Sigma Aldrich, cujo número do CAS é: 50-81-7. Lote: 048k0069A5960. O bicarbonato de sódio PA foi obtido da empresa Synth, o 2,6 diclorofenol-indofenol da empresa Sigma Aldrich.

As vidrarias usadas: bureta, balões volumétricos e pipetas foram calibradas e a água utilizada nas diluições foi ultra-pura.

Todas as análises foram feitas em 10 replicatas.

2.1.1 – Soluções

Preparo da solução ácida (ácido metafosfórico 1%): pesar 5g de ácido metafosfórico, dissolver bem em água ultra pura, colocar em um balão volumétrico de 500 mL e completar o volume.

Preparo da solução de Tillmans – Dissolva 40 mg de bicarbonato de sódio mais 100 mg de 2,6-diclorofenol indofenol em 200 mL de água em balão volumétrico. Agite até a dissolução do corante.

Preparo da solução-padrão de Ácido Ascórbico: pesar 0,1g de Ácido Ascórbico, adicionar água e agitar até completa dissolução. Colocar em balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água ultra pura.

2.2 – MÉTODO

Metodologia de Tillmans, (Método oficial da AOAC), modificada por Benassi e Antunes (1988) utilizando na titulação do AA (reação de oxi-redução) uma solução de 2,6-DCFI (0,01%) e solução de ácido metafosfórico (1%).

2.2.1 – Procedimentos

Em frascos Erlenmeyers de 250 mL, adicionar as seguintes alíquotas da solução de ácido Ascórbico: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 2,5; 3,5; 5,0; 6,5; 8,0; 9,5; 11,0; e 12,5 mL.

Adicionar em cada concentração de ácido ascórbico, 50 mL da solução de Ácido Metafosfórico 1%. Titule com solução de Tillmans até obter uma coloração ligeiramente rosada e estável por 15 segundos.

3- PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de desempenho dos métodos foram estabelecidos por procedimentos intralaboratoriais, atendendo as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e de quantificação experimentais e incerteza genérica foram os parâmetros estudados.

O nível de significância adotado nos testes foi de $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram feitos em planilhas comerciais, cujos resultados foram previamente validados frente aqueles obtidos softwares de análise estatística. Para cada parâmetro validado foram feitas dez replicatas.

3.1 – Curva Analítica:

Para a obtenção da curva analítica, foram feitas 10 curvas utilizando 17 alíquotas de AA, fazendo-se uma média das curvas.

Para levantamento da curva analítica de cada método, foi levado em consideração a massa de ácido ascórbico adicionada em relação à massa de ácido ascórbico determinada que foi calculada de acordo com a equação da reta da bureta calibrada.

3.2 – Linearidade:

A linearidade é a habilidade do método de obter resultados de ensaios proporcionais à concentração do analito sendo verificada a partir da análise de dez curvas analíticas em 17 alíquotas de AA, na faixa de 0,1 a 12,5 mg. Foi determinada levando-se em consideração a massa de ácido ascórbico determinado em relação ao valor de $Y-Y_0$ onde $Y =$

massa de ácido ascórbico determinado e Y_0 = massa de ácido ascórbico adicionado.

A linearidade foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

3.3 – Faixa Linear de Trabalho:

Faixa de concentração do analito, ou valores de propriedades, ao longo da qual o método pode ser aplicado. Intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade que foi calculado utilizando-se os valores da massa de ácido ascórbico determinado em relação aos valores obtidos em $U/x\%$, onde U = média dos desvios padrões de cada ponto da massa de ácido ascórbico determinado e $x\%$ = massa de ácido ascórbico determinado dado em porcentagem.

3.4 – Sensibilidade:

É a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito sendo, portanto, o coeficiente angular da inclinação da reta. Foi calculada através da equação da reta $Y = a + bx$. A sensibilidade é o valor de b obtido na equação da reta.

3.5 – Limite de Detecção (LD):

Determinado pela análise repetida de uma porção de amostras de branco e a concentração do analito. É, portanto, a menor concentração do analito que pode ser confiavelmente detectada pelo método.

Analisar dez amostras brancas independentes, fortificadas na menor concentração aceitável (concentração mais baixa para a qual um grau aceitável de incerteza pode ser alcançado).

3.6 – Limite de Quantificação (LQ):

É a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. É normalmente o ponto mais baixo da curva de calibração, excluindo o branco. As alíquotas de amostras do branco foram fortificadas, em vários níveis de concentrações, próximas ao limite de detecção.

3.7 – Precisão por Repetição (sr)

É a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e normalmente expressa em termos de desvio-padrão e coeficiente de variação e depende da concentração do analito. Os cálculos foram feitos através da fórmula:

$$CV = \frac{DP}{X} \times 100$$

Onde: DP = desvio padrão e X = concentração média determinada.

A precisão foi determinada por análises em dez repetições na concentração nominal de 7,012 mg de AA.

3.8 – Precisão pela Norma da American Society for Testing and Materials de agosto de 1999 (ASTM E 691-99) (sn):

A precisão pela norma ASTM E 691-99 foi feita pelo número de pontos ensaiados pelo cálculo do s/sr onde s = desvio padrão dos pontos ensaiados e sr = raiz quadrada da soma de s ao quadrado dividido pelo número de pontos ensaiados (n). Verificou-se o K (valor crítico) na tabela t de student para $p=0,05\%$, $p=17$ (n^o . pontos ensaiados) e $n=10$ (replicatas).

3.9 – Robustez:

Pequenas variações no procedimento que pode ter ou não influencia significativamente sobre o desempenho do método. A robustez de um método foi testada pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das consequências. Utilizou-se o teste de Younden-Steiner que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for à robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Nesse método foram realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 5 diferentes etapas, no procedimento analítico. As oito medições foram realizadas numa ordem aleatória, variando-se a concentração do ácido metafosfórico (1 e 0,5%), volume do ácido usado (50 e 25 mL), agitação (N = normal e L = lenta), concentração do titulante 2,6 diclorofenol-indofenol (0,1 e 0,08%) e tempo de adição do titulante (normal e L = lenta).

O efeito foi calculado, levando-se em conta a matriz dos fatores nominais denominados por letras maiúsculas, de **A** a **E** e a variação por letras minúsculas, de **a** a **e**, conforme tabela 4.1:

Tabela 4.1 - Matriz dos fatores para determinação da robustez

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	a	a	A	A	a	a
B ou b	B	b	b	B	b	B	B	b
C ou c	C	c	c	C	c	C	C	c
D ou d	D	d	D	d	d	D	d	D
E ou e	E	E	e	e	e	e	E	E
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF, 2005

Para determinar a variação de um fator, encontrar os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e as 4 minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de **C** para **c**, usar os resultados:

$$\frac{s + v + x + y}{4} \quad \text{e} \quad \frac{t + u + w + z}{4}$$

O efeito do fator C/c será:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + v + x + y}{4} - \frac{t + u + w + z}{4}$$

Calcular todos os 5 pares para obter 5 diferenças, que podem ser ordenados para revelar aqueles com efeito significativo no resultado. Interpretar os resultados. Verificar o efeito e ver o critério que não pode ser maior que $2 \times s_{\text{global}}$ (desvio padrão global). Se for maior o método estará perdendo precisão.

3.10 – Recuperação:

Ou tendência é o erro sistemático do sistema de medição. A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de dez determinações sob condições de repetitividade o valor aceito como verdadeiro (MR: material de referência). Cálculo pela fórmula:

$$\%R = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

3.11 – Exatidão:

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi avaliada numericamente através da tendência (recuperação) por intermédio de análises dos ensaios aplicados a amostras de suco industrializado de laranja ($C_{\text{nominal}} = 0,38 \text{ mg de AA}$) em duas diferentes concentrações de ácido ascórbico determinado (3,51 e 7,02 mg). Foi determinado e porcentagem de recuperação que foram calculados pela divisão dos valores médios da massa de ácido ascórbico determinado sobre os valores médios da massa de ácido ascórbico adicionado multiplicado por 100, segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração média nominal}} \times 100$$

3.12 – Incerteza Genérica:

Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Foi determinada subtraindo-se os valores médios da massa de ácido ascórbico determinado e massa de ácido ascórbico adicionado.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos parâmetros experimentais, propostos para validação do método titulométrico, utilizando-se DDFI para determinação do ácido ascórbico, estão expostos, a seguir.

4.1 - Curva analítica de linearidade

Os pontos empregados para a construção da curva de analítica foram em número de $p = 17$, com repetição das medidas para $n = 10$. A média das curvas obtidas está apresentada na Figura 4.1.

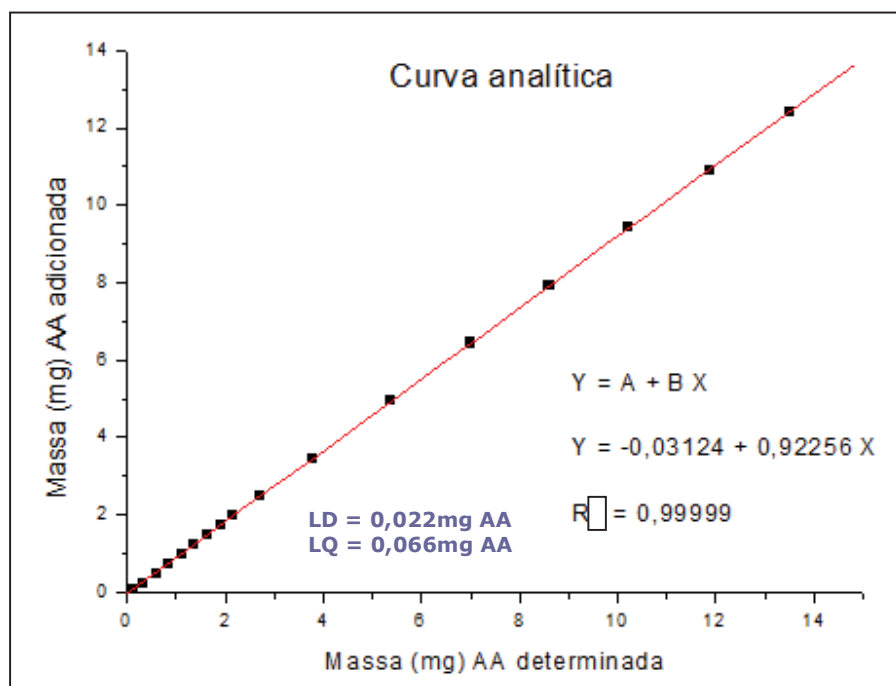


Figura 4.1 - Curva analítica: método estequiométrico para determinação de **AA** empregando **DCFI** como agente titulante; parâmetros: **LD**; **LQ**; Linearidade; faixa linear de trabalho; sensibilidade: **S**= 0,92256. **r**= 0,99999

A curva analítica ($y = -0,03124 + 0,92256X$), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99999, o que está em concordância com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Brasil, 2003) que é $r = 0,99$.

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método. O limite de quantificação é a menor concentração de analito, que pode ser determinada com um nível de incerteza aceitável. Ele deve ser estabelecido usando-se uma amostra ou padrão de medida apropriado, isto é, ele é normalmente o ponto mais baixo na curva de calibração (excluindo o branco).

O limite de detecção e o limite de quantificação foram de 0,022 mg AA e 0,066 mg AA, respectivamente.

O parâmetro investigado, apresentado na Figura 4.2 fornece evidência objetiva da linearidade ($Y-Y_0$)

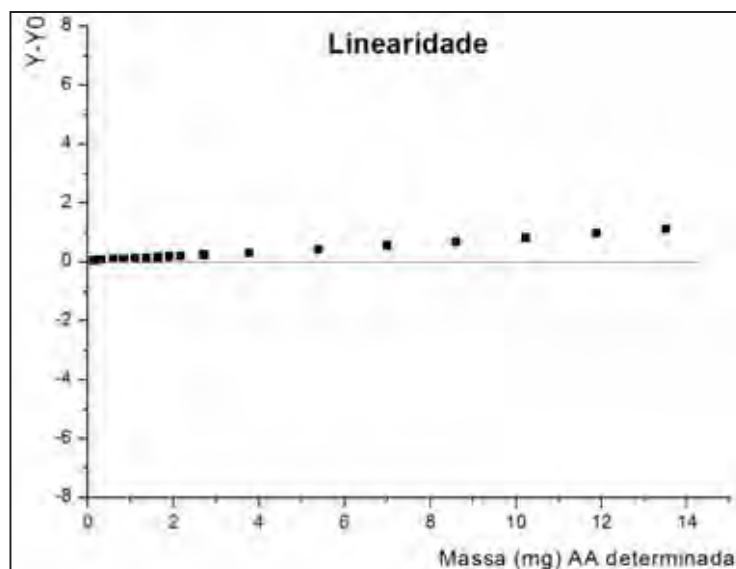


Figura 4.2 - Avaliação da **linearidade** a partir dos resíduos ($Y-Y_0$), obtidos a partir dos valores de $m_{AA\text{ determinada}}$ e dos valores de (Y_0) calculados a partir dos valores de $m_{AA\text{ adicionada}}$ para método do DCFI

A faixa linear usado nesse ensaio foi de 1,0 a 14 mg de AA. A curva foi linear, verificando-se ausência de valores discrepantes para os níveis de concentração de AA entre a faixa de 0,14 a 2,16 mg havendo homocedasticidade dos dados. Para os demais pontos observa-se um maior desvio padrão à medida que as concentrações de AA aumentam. Para esse estudo, deve-se fazer a regressão linear quadrática, analisando esses intervalos de dados separadamente. A faixa linear de trabalho de 1,11 a 13,5 mg AA, está apresentada na Figura 4.3.

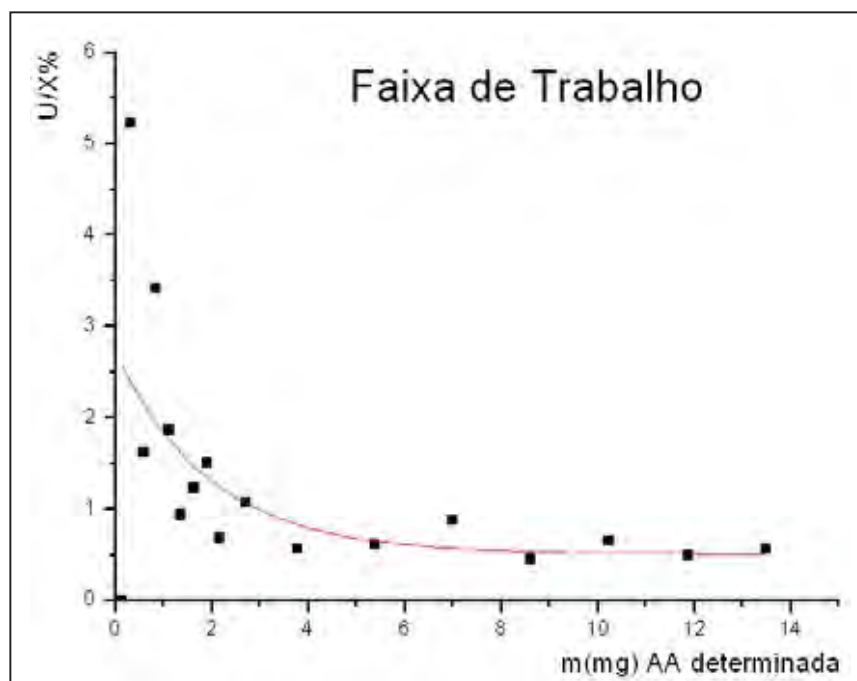


Figura 4.3 - Determinação do limite inferior da **faixa linear** de trabalho baseado na correlação $(U/x)\%$ x **mAA** para DCFI. Assumiu-se a precisão esperada para o método melhor do que 1,0%

4.2 – Precisão

A repetitividade do método foi verificada por 10 determinações, contemplando o intervalo linear do método, estando representada na Figura 4.4.



Figura 4.4 - Determinação da precisão por **repetitividade**, $\pm s$, $n=10$ para a **mAA** de 7,012 mg e titulação com DCFI; $\pm sr=0,0157mg$

O parâmetro investigado forneceu evidência objetiva da validação. A precisão por repetitividade, expressa em desvio padrão teve um desvio padrão de $\pm sr= 0,0157$ mg AA e a precisão expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) foi: DPR = 0,224%.

A precisão intermediária pela Norma ASTM691-99 está representada na Figura 4.5.

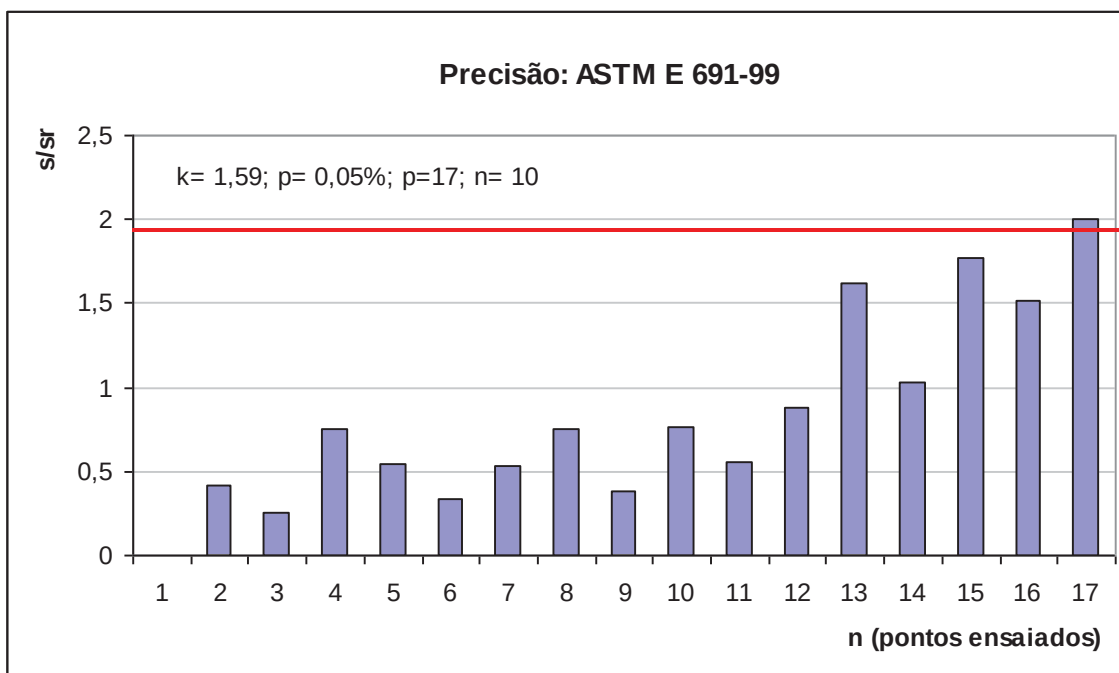


Figura 4.5 - Valores de s/s_r , (k), ($sn = 0,062$) calculados o para os diferentes valores de mAA_{det} para DCFI. Em comparação com o **valor crítico** de “ k ”, obtido para $n=10$ e $p=17$, para nível de confiabilidade de 95%.

O valor obtido do desvio padrão foi de $sn \pm 0,062$ mg AA. Para a concentração determinada de 13,50 mg de AA verificou-se que ultrapassou o limite do valor crítico de “ k ” o que pode ser explicado por algum erro sistemático ou ocasional durante esse ensaio.

Efeitos que variam sistematicamente de amplitude durante uma série de análises, causados, por exemplo, por controle inadequado das condições experimentais, dão origem a erros sistemáticos que não são constantes.

Os erros ocasionais, ou fortuitos são tipos de erros que invalidam uma medição e resultam, tipicamente, de falha humana ou mau funcionamento dos aparelhos. Troca de dígitos num número ao registrar dados ou contaminação acidental de amostras, são exemplos comuns deste tipo de erro.

Essa concentração deve ser analisada novamente para correção dos erros que foram detectados, pois erros como a transposição de dígitos pode ser corrigida particularmente se ocorrer nos dígitos de ordem superior, antes de serem rejeitados evitando incorporar os erros em qualquer análise estatística.

4.4.3 – Robustez

O ensaio de robustez foi levado a cabo empregando-se o método de Younden-Steiner, considerando-se 5 variáveis, tendo fornecido uma precisão de $s = \pm 0,0373 \text{mg AA}$ (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de **robustez** empregando o método de Younden-Steiner para DCFI.

VARIÁVEIS	EXPERIMENTOS								VARIAÇÃO		
	1	2	3	4	5	6	7	8	nominal	variação	efeito
Ác Metafosf. (mL)	50	50	25	25	50	50	25	25	50mL	25	0,00
C áç Metafosf. (%)	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1%	0,50%	0,025
C. DCFI (%)	0,1	0,08	0,08	0,1	0,08	0,1	0,1	0,08	0,10%	0,08%	-3,00
Agitação	N	L	N	L	L	N	L	N	N	L	0,00
Adição DCFI	N	N	L	L	L	L	N	N	N	L	0,025
V DCFI/mL	11,55	14,5	14,5	11,5	14,55	11,5	11,55	14,55			
mAA adic. mg	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40			
mAA det. mg	7,02	7,06	7,06	6,99	7,08	6,99	7,02	7,08	Média=	7,039mg	
R%	109,75	110,27	110,27	109,28	110,65	109,28	109,75	110,65	Sglobal=	0,0373	

N= Normal

L= lenta

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. O protocolo de Younden trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de

um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

4.4 – Exatidão

A exatidão de um método analítico consubstancia-se na proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi calculada dividindo a concentração média detectada pelo valor do certificado e multiplicando por 100, para expressar em porcentagem, conforme Tabela 4.3.

A exatidão do método foi ensaiada em termos da recuperação e a mesma apresentou-se no intervalo: $97 \leq \%R \leq 105$, com $\%R_{\text{média}} = 114,42 \pm 2$, tendo sido aplicado o critério de aceitação de 95 a 105%; a considerar a natureza do método analítico.

Tabela 4.3 - Valores médios de **AA** determinados ($X_{\text{médio}}$), precisão ($\pm s$), incerteza específica ($\pm U/x$), massas de AA adicionadas ($mAA_{\text{adic.}}$), incerteza genérica ($I_{\text{genérica}}$) e recuperação do AA (**R%**) para DCFI.

X AA _{adic.}	X AA _{determ.}	$\pm s$	$(\pm U/x) * 100$	$I_{\text{genérica}}$	R%
0,09	0,14	0,00	0,00	0,05	155,83
0,24	0,31	0,02	5,22	0,07	128,86
0,49	0,59	0,01	1,62	0,11	122,00
0,74	0,84	0,03	3,42	0,11	114,39
0,98	1,11	0,02	1,86	0,12	112,48
1,23	1,36	0,01	0,94	0,13	110,84
1,48	1,63	0,02	1,24	0,15	110,37
1,73	1,91	0,03	1,51	0,18	110,39
1,98	2,16	0,01	0,68	0,18	109,32
2,47	2,71	0,03	1,07	0,24	109,56
3,46	3,78	0,02	0,56	0,31	109,03
4,95	5,38	0,03	0,62	0,42	108,55
6,44	6,99	0,06	0,88	0,55	108,53
7,93	8,60	0,04	0,46	0,67	108,51
9,42	10,23	0,07	0,66	0,81	108,63
10,91	11,88	0,06	0,49	0,97	108,91
12,40	13,50	0,08	0,56	1,11	108,93

LD: 0,022mg; **LQ:** 0,066mg; **S:** 0,92256; **Faixa linear de trabalho:** $(1,11 \leq mAA_{\text{det}} \leq 13,50 \text{ mg})$

4.5 – Incerteza Genérica

A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança especificado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Para que as medidas sejam de valor prático, é necessário ter algum conhecimento de sua confiabilidade ou incerteza. Uma declaração da incerteza associada a um resultado transmite ao cliente a qualidade do resultado.

O método para a determinação de AA foi validado e a incerteza genérica determinada, a partir da comparação com o AA, material de referência (MR) conforme Figura 4.6.

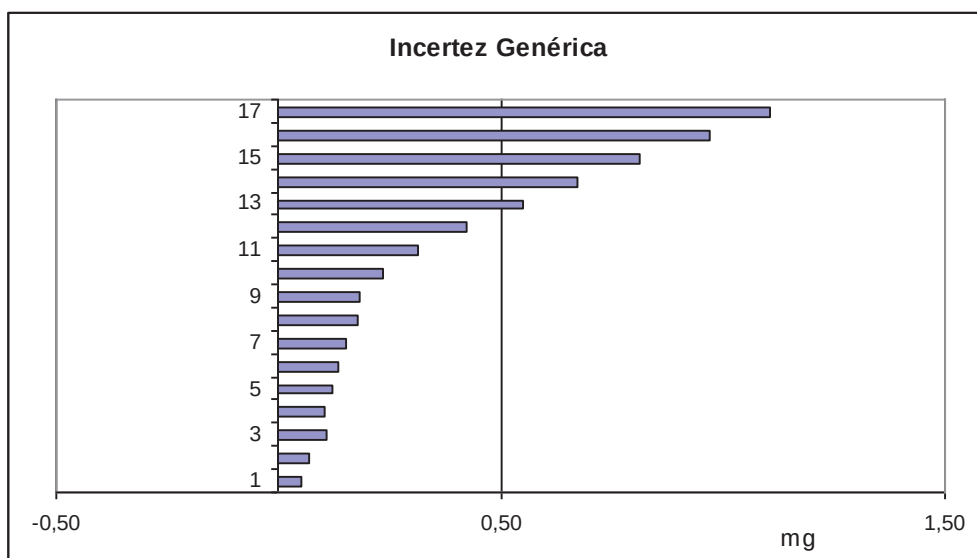


Figura 4.6 - Incerteza genérica para método do DCFI.

Os estudos de validação e o seu acompanhamento que deve ser feito de acordo com a rotina do laboratório, produzem dados de

desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina.

Através desses dados é possível calcular as variações sofridas pelo método e determinar a incerteza, ou seja, quanto o meu resultado vai variar para mais ou para menos numa determinada faixa de trabalho com uma determinada matriz.

A incerteza genérica é definida como a diferença entre a média dos valores determinados e o valor tido como verdadeiro. Para este método observamos que a incerteza é quase constante até cerca de 2,4 mg ensaiada, acima deste valor a incerteza da medicação aumenta.

4.6 – Recuperação

Para muitas análises, o principal problema pode ser adquirir um bom conhecimento da quantidade de analito na amostra original, relativamente ao resultado obtido ao final do processo de medição. Esta propensão pode ser devido a perdas no processamento, contaminação ou interferentes. A tendência, que algumas vezes é chamada de recuperação, de um método, é o erro sistemático desse sistema de medição.

Uma das estratégias disponíveis para determinar as tendências do método inclui a medição de brancos e amostras gravimetricamente fortificadas.

As taxas de recuperação para o método em estudo estão apresentadas na Tabela 4.4 e Figura 4.7.

Tabela 4.4 - Dados ($mAA_{adic.}$; $n=10$) e resultados coletados ($mAA_{det.}$; $n=10$) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de comprimido de Vitamina C ($C_{nominal} = 0,38708\text{mg}$ de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (3,5, e 7,0mg) para DCFI.

X AA adic.(mg)	X AA determ.	R%	X AA adic.(mg)	X AA determ.	R%
3,514	3,9737	113,0811	7,0193	8,1684	116,3710
	3,9737	113,0811		8,0465	114,6338
	3,9798	113,2546		8,0465	114,6338
	3,9798	113,2546		8,0160	114,1995
	3,9737	113,0811		8,0160	114,1995
	3,9737	113,0811		8,0160	114,1995
	3,9737	113,0811		8,2294	117,2396
	3,9737	113,0811		8,1989	116,8053
	3,9737	113,0811		8,1379	115,9367
	3,9798	113,2546		8,0770	115,0681
Xmédio	3,9755	113,1331		8,0953	115,3287
s	0,0029	0,0838		0,0815	1,1618
CV%	0,0741	0,0741		1,0073	1,0073

R%_{critério de aceitação}: 80 a 120

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que apresente na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

Considerando os resultados obtidos na recuperação e segundo a Tabela 4.5, podemos concluir que o método é exato.

Tabela 4.5 - Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação Aceito (%)
> 10	98-102
> 1	97-103
> 0,1	95-105
> 0,01	90-107
> 0,001- > 0,00001	80-110
> 0,000001	60-115
> 0,0000001	40-120

Fonte: BRITO, 2001

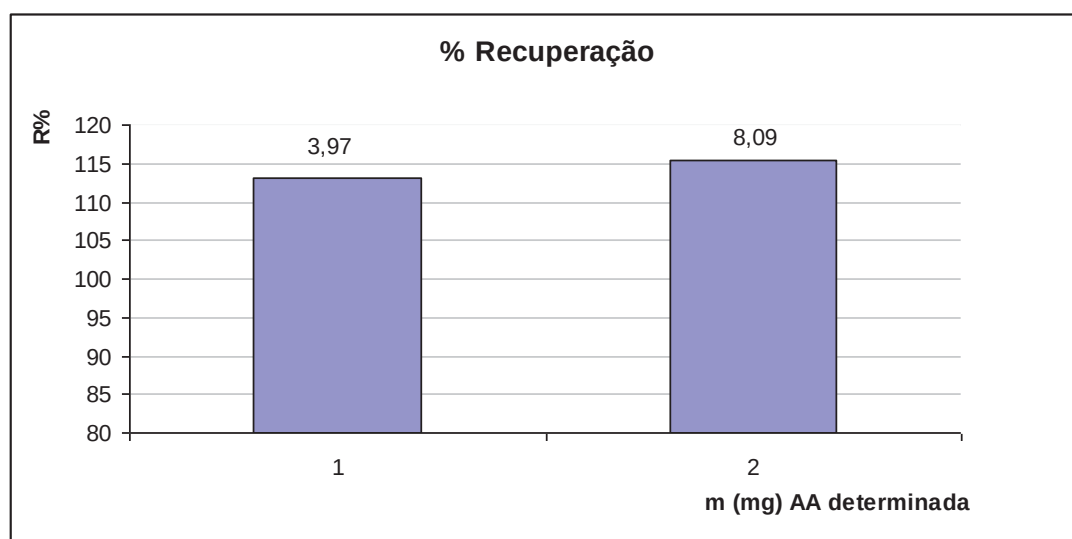


Figura 4.7 - Representação gráfica da percentagem de **recuperação (R%)** como função da massa de AA empregada na fortificação da amostra de vitamina C do comprimido para DCFI.

A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de 10 determinações, sob condições de repetitividade, e a valor aceito como verdadeiro (MR).

As fontes de incerteza foram levantadas e os valores individuais das incertezas genéricas determinados.

Os parâmetros investigados, listados a seguir fornecem evidência objetiva da validação:

- 1- linearidade (Y-Yo): a curva é linear em toda a sua extensão;
- 2- faixa linear: 1,0 a 14 mg de AA;
- 3- faixa linear de trabalho: 1,11 a 13,50 mg AA;
- 4- Limite de detecção, LD: 0,022 mg AA;
- 5- Limite de quantificação, LQ: 0,066 mg AA;
- 6- precisão, $s_n=10$: $\pm 0,224$ mg AA;
- 7- precisão por repetição, s_r (ASTM691-99): $\pm 0,062$ mg AA.

5 – CONCLUSÕES

O modelo proposto de validação da metodologia analítica possibilita: melhorar o entendimento do processo; conhecer o potencial de falhas e adotar medidas preventivas. Com estas características alcançadas, pode-se assegurar o cumprimento das normas regulatórias. Quando os resultados dos métodos são conclusivos e concretos, aumenta-se a credibilidade do departamento do controle de qualidade, da produção e da garantia da qualidade.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos afirmar que o método analítico titulométrico para determinação do ácido ascórbico, empregando solução de 2,6 diclorofenol-indofenol, foi validado em todos os parâmetros preconizados pelo guia EURACHEM apresentando-se, portanto, sensível; linear em toda a faixa de massas de AA investigada; exato preciso e robusto.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st Edition, 2005.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated by the Brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 1.124-1.131, 2004.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A comparison of metaphosphoric and oxalic acids as extractants solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 31, n. 4, p. 507-513, 1988.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos para análise de alimentos** 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo (IMESP), 1985. 560 p.

LAVRA, Z.M.M. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de lamivudina, zidovudina e nevirapina em comprimidos dose-fixa combinada por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím Nova** 2008; 31(5):969-74.

PAULA, N.K.; SENA, M.M. Validação de metodologia analítica para o doseamento simultâneo de mebendazol e tiabendazol por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím Nova** 2007; 30(5):1359-61.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1.035-1.042, 2000.

RIBANI, M; BOTTOLI, C.B.G; COLLINS, C.H; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím Nova** 2004; 27(5):771-80.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Struc-ture-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, New york, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

CAPÍTULO 5

VALIDAÇÃO DO MÉTODO INSTRUMENTAL ESPECTROFOTOMÉTRICO DE DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO 2,6 DICLOROFENOL-INDOFENOL COMO AGENTE TITULANTE

RESUMO

A análise dos principais atributos da validação de metodologia analítica de um fármaco assegura tanto a implantação da metodologia como a confiabilidade dos resultados analíticos. O presente trabalho apresenta uma abordagem metrológica de método instrumental espectrofotométrico para a determinação do ácido ascórbico (AA). Os parâmetros de validação do método de análise pelo método espectrofotométrico e o cálculo da incerteza atenderam as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Os resultados obtidos nas análises foram 1- faixa linear: 10 a 50 µg de AA; 2- faixa de trabalho: 19,98 a 50,47 µg AA; 3- precisão por repetitividade $s_r = 10: \pm 0,261 \mu\text{g AA}$; 4 - precisão pela norma ASTM 691-99 $s_n: \pm 0,004 \mu\text{g AA}$; 5- robustez (Younden-Steiner) forneceu uma precisão de $s_{\text{global}} = \pm 1,37 \mu\text{g AA}$; 8- a incerteza genérica determinada foi de 0,18. A linearidade avaliada pela análise de resíduo (Y-Yo) mostra que a curva é linear em toda a sua extensão ensaiada e o método validado foi preciso, robusto e exato. A qualidade dos dados analíticos representa um fator chave no sucesso de um programa de desenvolvimento de um fármaco, e o processo do desenvolvimento e a validação do método, tem impacto direto na qualidade desses dados.

Palavras-chave: linearidade; faixa de trabalho; análise de fármacos

ABSTRACT

The analysis of the key attributes of the validation of analytical methodology of a drug not only ensures the implementation methodology and reliability of analytical results. This paper presents an approach to metrology instrumental method for the spectrophotometric determination of ascorbic acid (AA). The validation parameters of the method of analysis by the spectrophotometric method and calculation of uncertainty met the guidelines of ISO-IEC-17025 guide and EURACHEM guides. The results obtained in this study were 1- linear range: 10 to 50 g of AA; 2- working range: 19.98 to 50.47 μg AA; 3– precision repeatability $s_r = 10$: ± 0.2613 μg AA; 4- accuracy by ASTM 691-99 sn: ± 0.004 μg AA; 5– robustness (Younden-Steiner) provided an accuracy of ± 1.37 mg $s_{\text{global}} = \text{AA}$; 6- generic uncertainty determined was 0.18. Linearity was assessed by residual analysis (Y-Yo) shows that the curve is linear in its entirety tested and validated method was precise, robust and accurate. The quality of analytical data is a key factor in the success of a program to develop a drug, and the process of development and validation of the method, has a direct impact on data quality.

Keywords: linearity; working range; the analysis of drugs

1- INTRODUÇÃO

A vitamina C é hidrossolúvel e indispensável para o funcionamento normal do organismo e manutenção da saúde, atuando na produção do colágeno, estando envolvida, portanto, nos processos de cicatrização, está envolvida na atividade imunológica, e no processo de reação inflamatória (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

A deficiência de ácido ascórbico causa escorbuto, cujos sintomas são hiperqueratose folicular, inflamação das gengivas, perda de cabelo, e distúrbios neuróticos. Além disso, a vitamina atua como um excelente antioxidante no organismo, em razão da sua capacidade de doar elétrons a radicais livres, como moléculas do oxigênio, peróxidos e radicais hidroxilas (PADAYATTY; LEVINE, 2000).

A qualidade dos dados analíticos representa um fator chave no sucesso de um programa de desenvolvimento de uma droga. O processo do desenvolvimento e validação do método tem impacto direto na qualidade desses dados. Assim, a metodologia analítica que já envolvia a exatidão, precisão e especificidade, se expandiu para as atividades industriais e está agora sob o enfoque da validação (MORETTO, SHIB, 2000)

O fato de validar uma metodologia, não significa que esta possa ser usada indiscriminadamente, como por exemplo, na determinação de um mesmo princípio ativo em diferentes apresentações de diferentes laboratórios. Para cada caso há necessidade de resultados experimentais e respectivas análises estatísticas, assim como o estabelecimento de aceitação para garantir o emprego seguro da metodologia em questão (GARFIELD, 1994).

Encontram-se na literatura procedimentos analíticos utilizando como técnicas de detecção de ácido ascórbico por espectrofotometria de

absorção molecular (BURNS et al., 1991) amperometria (FOGG et al., 1985), quimiluminescência (ALWARTHAN, 1993). Os métodos espectrofotométricos são os mais utilizados, e têm sido empregados para uma grande variedade de amostras: urina, sangue, alimentos, sucos de frutas e fármacos (BURNS et al., 1991).

O objetivo desse trabalho foi a validação intralaboratorial de método instrumental espectrofotométrico, utilizando o reagente 2,6 diclorofenol-indofenol na determinação de ácido ascórbico.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – MATERIAL

Todos os reagentes utilizados atendem à especificação grau analítico (PA). O ácido ascórbico foi obtido junto à empresa Sigma Aldrich, cujo número do CAS é: 50-81-7. Lote: 048k0069A5960.

O ácido oxálico PA - ACS e bicarbonato de sódio PA foram obtidos da empresa Synth, o 2,6 diclorofenol-indofenol da empresa Sigma Aldrich e a acetona de grau PA – ACS da empresa Chemis.

O equipamento usado foi espectrofotômetro Beckmann detector UV/visível configurado a 520nm.

As vidrarias usadas: bureta, balões volumétricos e pipetas foram calibradas e a água utilizada nas diluições foi ultra-pura.

Todas as análises foram feitas em 10 replicatas.

2.1.1 – Soluções

Preparo da solução ácida: Ácido Oxálico 04%: pesar 4g de ácido oxálico, adicionar 20% de acetona (200 mL), completar o

volume com água em um balão volumétrico de 1000 mL. Agitar bem e ajustar o pH da solução para 1,1 utilizando ácido sulfúrico.

Preparo da solução-padrão de Ácido Ascórbico: pesar 0,1g de Ácido Ascórbico, adicionar ácido oxálico 0,4% e agitar até completa dissolução. Colocar em balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com ácido oxálico 0,4%.

Preparo das soluções de Ácido Ascórbico nas concentrações de 10; 20; 30; 40 e 50 µg: pegar 1, 2, 3, 4 e 5 mL da solução-padrão de ácido ascórbico e colocar cada alíquota em balões volumétricos de 100 mL. Completar o volume com ácido oxálico 0,4%.

Preparo da solução de 2,6 diclorofenol-indofenol (DCFI) 1:10: pesar 100mg de DCFI, adicionar 100mL água morna mais 84mg de bicarbonato de sódio. Dissolver em água, colocar em um balão volumétrico de 500mL e completando o volume. Filtrar e guardar essa solução em frasco âmbar. Para o preparo do DCFI 1:10, pegar 20 mL dessa solução pré-preparada e adicionar 180 mL de água.

2.2 – MÉTODO

Método validado baseado em procedimentos previamente descritos por Loeffler e Ponting (1942), adaptado por Egoville et al. (1988) utilizando espectrofotômetro UV/visível fazendo a leitura a 520nm.

2.2.1 – Procedimentos

Preparo do branco: para cada análise foi preparado um branco, adicionando-se em tubos de ensaio com tampa, 1 mL de ácido oxálico 0,4% e 9mL de solução de DCFI 1:10.

Preparo das amostras: em tubos de ensaio com tampa, adicionar 1 mL da solução de ácido ascórbico para as seguintes concentrações: 10, 20, 30, 40, e 50 µg. Adicionar em cada concentração, 9mL da solução de DCFI 1:10. Agitar os tubos por 46 segundos e fazer a leitura em espectrofotômetro UV/visível a 520nm.

3- PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO

Os parâmetros de desempenho dos métodos foram estabelecidos por procedimentos intralaboratoriais, atendendo as diretrizes da ISO-Guia-IEC-17025 e dos guias EURACHEM. Linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, robustez e incerteza genérica foram os parâmetros estudados.

O nível de significância adotado nos testes foi de $\alpha = 0,05$. Os cálculos foram feitos em planilhas comerciais, cujos resultados foram previamente validados frente aqueles obtidos softwares de análise estatística. Para cada parâmetro validado foram feitas dez replicatas.

As concentrações da solução de ácido ascórbico para todos os ensaios foram de 10, 20, 30, 40, e 50 µg.

3.1 – Curva Analítica:

Para a obtenção da curva analítica, foram feitas 10 curvas utilizando as cinco concentrações de AA, fazendo-se uma média das curvas.

Para levantamento da curva analítica, foi levado em consideração a massa de ácido ascórbico adicionada em relação à massa de ácido ascórbico determinada que foi calculada de acordo com a equação da reta da bureta calibrada.

3.2 – Linearidade:

A linearidade é a habilidade do método de obter resultados de ensaios proporcionais à concentração do analito sendo verificada a partir da análise de dez curvas analíticas em 5 níveis de concentrações na faixa de 10 a 50 µg de AA. Foi determinada levando-se em consideração a massa de ácido ascórbico determinado em relação ao valor de $Y - Y_0$ onde Y = massa de ácido ascórbico determinado e Y_0 = massa de ácido ascórbico adicionada.

A linearidade foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

3.3 – Faixa Linear de Trabalho:

Faixa de concentração do analito, ou valores de propriedades, ao longo da qual o método pode ser aplicado. Intervalo no qual o procedimento se revelou satisfatório do ponto de vista de exatidão, precisão e linearidade que foi calculado utilizando-se os valores da massa de ácido ascórbico determinado em relação aos valores obtidos em $U/x\%$, onde U = média dos desvios padrões de cada ponto da massa de ácido ascórbico determinado e $x\%$ = massa de ácido ascórbico determinado dado em porcentagem.

3.4 – Sensibilidade:

É a alteração na resposta do instrumento que corresponde a uma mudança na concentração do analito sendo, portanto, o coeficiente angular da inclinação da reta. Foi calculada através da equação da reta $Y = a + bx$. A sensibilidade é o valor de b obtido na equação da reta.

3.5 – Precisão por Repetição (sr)

É a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaio mutuamente independentes e normalmente expressa em termos de desvio-padrão e coeficiente de variação e depende da concentração do analito. Os cálculos foram feitos através da fórmula:

$$CV = \frac{DP}{X} \times 100$$

Onde: DP = desvio padrão e X = concentração média determinada.

A precisão foi determinada por análises em dez repetições na concentração nominal de 29,57 µg de AA.

3.6 – Precisão pela Norma da American Society for Testing and Materials de agosto de 1999 (ASTM E 691-99) (sn):

A precisão pela norma ASTM E 691-99 foi feita pelo número de pontos ensaiados pelo cálculo do s/sr onde s = desvio padrão dos pontos ensaiados e sr = raiz quadrada da soma de s ao quadrado dividido pelo número de pontos ensaiados (n). Verificou-se o K (valor crítico) na tabela t de student para p=0,05%, p=17 (nº. pontos ensaiados) e n=10 (replicatas).

3.7 – Robustez:

Pequenas variações no procedimento que pode ter ou não influencia significativamente sobre o desempenho do método. A robustez de um método foi testada pela introdução deliberada de pequenas alterações no método e exame das consequências. Utilizou-se

o teste de Younden-Steiner que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for à robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

Nesse método foram realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 4 diferentes etapas, no procedimento analítico. As oito medições foram realizadas numa ordem aleatória, variando-se a concentração do ácido oxálico (0,4 e 0,35%), agitação dos tubos de ensaio (N= agitação normal por 46 segundos e M=modificada por 30 segundos), volume do titulante 2,6 diclorofenol-indofenol 1:10 (9 e 8 mL) e temperatura ambiente (30° e 25°C).

O efeito foi calculado, levando-se em conta a matriz dos fatores nominais denominados por letras maiúsculas, de **A** a **D** e a variação por letras minúsculas, de **a** a **d**, conforme Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Matriz dos fatores para determinação da robustez

Valor do fator	Combinação ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	a	a	A	A	a	a
B ou b	B	b	B	b	B	b	B	b
C ou c	C	C	C	C	c	c	c	c
D ou d	D	D	d	d	D	d	d	D
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Fonte: APHA, AWWA, WEF, 2005

Para determinar a variação de um fator, encontrar os 4 valores correspondentes às letras maiúsculas e as 4 minúsculas e comparar as médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as alterações de **C** para **c**, usar os resultados:

$$\frac{s + t + u + v}{4} \text{ e } \frac{w + x + y + z}{4}$$

O efeito do fator C/c será:

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4}$$

Calcular todos os 4 pares para obter 4 diferenças, que podem ser ordenados para revelar aqueles com efeito significativo no resultado. Interpretar os resultados. Verificar o efeito e ver o critério que não pode ser maior que $2 \times S_{\text{global}}$ (desvio padrão global). Se for maior o método estará perdendo precisão.

3.8 – Recuperação:

Ou tendência é o erro sistemático do sistema de medição. A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de dez determinações sob condições de repetitividade o valor aceito como verdadeiro (MR: material de referência). Cálculo pela fórmula:

$$\%R = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100$$

3.9 – Exatidão:

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi avaliada numericamente através da tendência (recuperação) por intermédio de análises dos ensaios aplicados a amostras de suco industrializado de laranja ($C_{\text{nominal}} = 0,387 \mu\text{g de AA}$) em duas diferentes concentrações de ácido ascórbico determinado (19,97 e 39,97 μg). Foi determinado e

porcentagem de recuperação que foram calculados pela divisão dos valores médios da massa de ácido ascórbico determinado sobre os valores médios da massa de ácido ascórbico adicionado multiplicado por 100, segundo a fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração média nominal}} \times 100$$

3.10 – Incerteza Genérica:

Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Foi determinada subtraindo-se os valores médios da massa de ácido ascórbico determinado e massa de ácido ascórbico adicionado.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos parâmetros experimentais, propostos para validação do método titulométrico, utilizando-se o método instrumental espectrofotométrico para determinação do ácido ascórbico, estão expostos, a seguir.

4.1 - Curva analítica de linearidade

Os pontos empregados para a construção da curva de analítica foram em número de p= 5, com repetição das medidas para n=10. A média das curvas obtidas está apresentada nas Figuras 5.1.

Curva analítica de linearidade

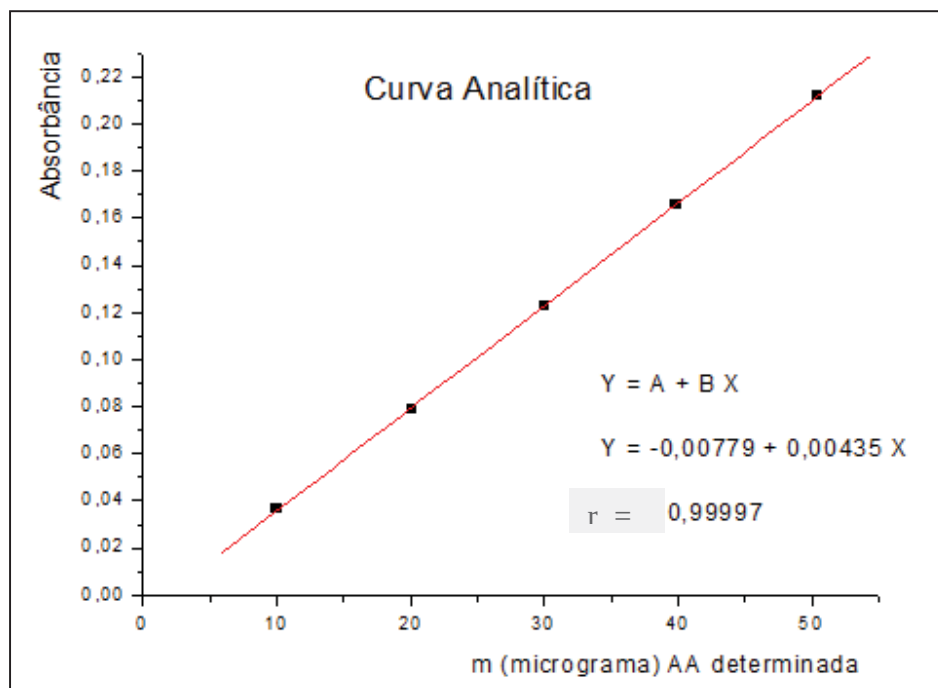


Figura 5.1 - Curva analítica: método espectrofotométrico para determinação de **AA** empregando **DCF1**; parâmetros: Linearidade; faixa linear de trabalho; sensibilidade: **S**= 0,00435; **r** = 0,99997

A curva analítica ($y = -0,00779 + 0,00435X$), obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentou um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99997, o que está em concordância com o critério mínimo aceitável pela ANVISA (Brasil, 2003) que é $r = 0,99$.

O parâmetro investigado, apresentado na figura 5.2 fornece evidência objetiva da linearidade ($Y - Y_0$).

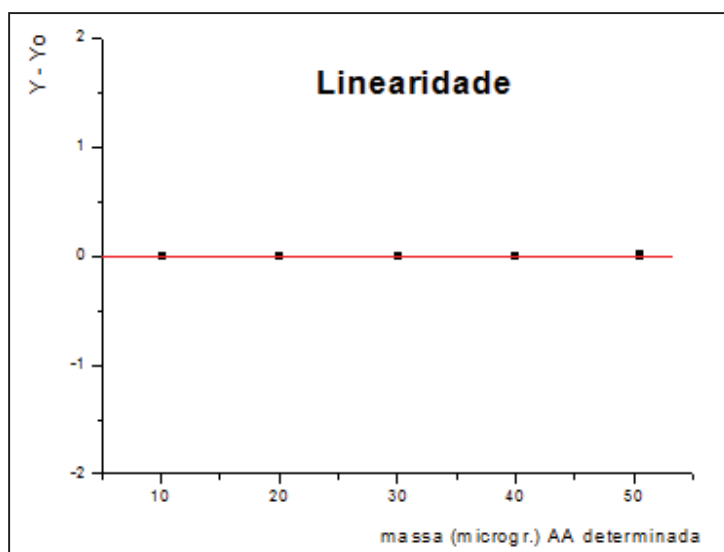


Figura 5.2 - Avaliação da **linearidade** a partir dos resíduos ($Y - Y_0$), obtidos a partir dos valores de $mAA_{determinada}$ e dos valores de (Y_0) calculados a partir dos valores de $mAA_{adicionada}$ para método instrumental espectrofotométrico.

A curva é linear em toda a sua extensão, sendo a faixa linear de 10 a 50 μg de AA e a faixa linear de trabalho de 19,98 a 50,47 μg AA. A média das curvas estão apresentadas na Figura 5. 3.

Faixa de Trabalho

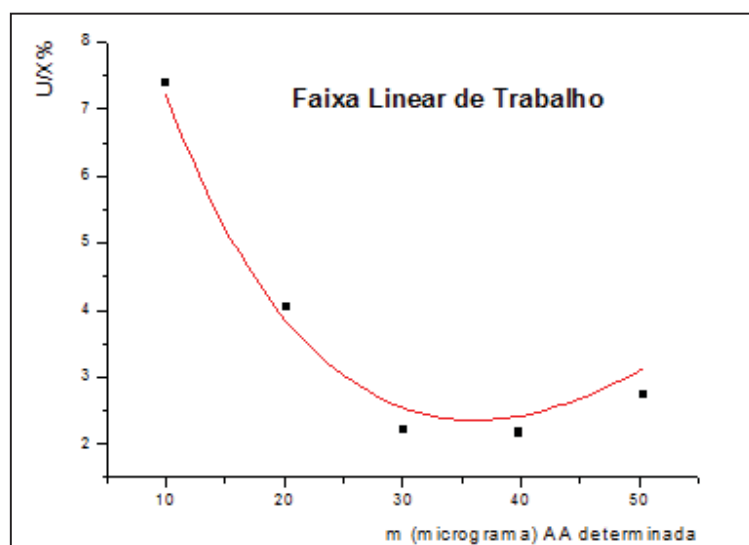


Figura 5.3 - Determinação do limite inferior da **faixa linear** de trabalho baseado na correlação $(U/x)\%$ x **mAA** método espectrofotométrico usando DCFI. Assumiu-se a precisão esperada para o método melhor do que 1,0%

4.2 – Precisão

A precisão por repetitividade foi verificada por 10 determinações, contemplando o intervalo linear do método estando representada na Figura 5.4.



Figura 5.4 - Determinação da **precisão por repetitividade**, $\pm s$, $n=10$ para a **mAA** de 29,573 μg para método espectrofotométrico usando DCFI; $\pm sr=0,2613 \mu\text{g}$

O parâmetro investigado forneceu evidência objetiva da validação. A precisão por repetitividade, expressa em desvio padrão teve um desvio padrão de $\pm sr= 0,2613$ e a precisão expressa em desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) foi de: DPR = 0,884%.

A precisão intermediária pela Norma ASTM691-99 está representada na Figura 5.5.

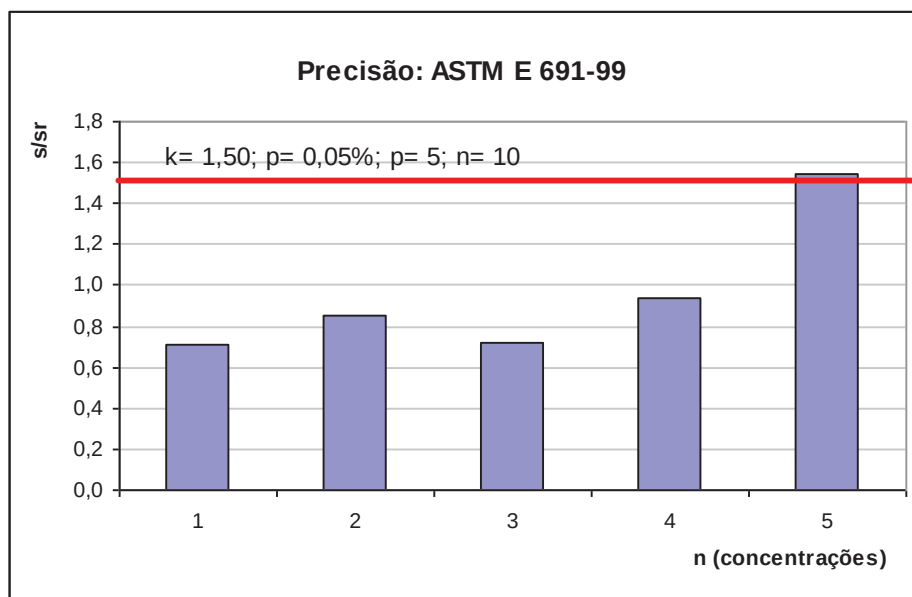


Figura 5.5 - Valores de s/s_r , (k), ($s_n = 0,004$) calculados para os diferentes valores de mAA_{det} para método espectrofotométrico usando DCFI. Em comparação com o **valor crítico** de " k ", obtido para $n= 10$ e $p= 5$, para nível de confiabilidade de 95%

O valor obtido do desvio padrão foi de $s_n \pm 0,004 \mu g$ AA. Para a concentração determinada de $50,47 \mu g$ de AA verificou-se que ultrapassou o limite do valor crítico de " k " o que pode ser explicado por algum erro sistemático ou ocasional durante esse ensaio.

Efeitos que variam sistematicamente de amplitude durante uma série de análises, causados, por exemplo, por controle inadequado das condições experimentais, dão origem a erros sistemáticos que não são constantes.

Os erros ocasionais, ou fortuitos são tipos de erros que invalidam uma medição e resultam, tipicamente, de falha humana ou mau funcionamento dos aparelhos. Troca de dígitos num número ao registrar dados, uma bolha de ar numa célula de fluxo de um espectrofotômetro, ou contaminação acidental de amostras, são exemplos comuns deste tipo de erro.

Essa concentração deve ser analisada novamente para correção dos erros que foram detectados, pois erros como a transposição de dígitos pode ser corrigida particularmente se ocorrer nos dígitos de ordem superior, antes de serem rejeitados evitando incorporar os erros em qualquer análise estatística.

4.3 – Robustez

O ensaio de robustez foi levado a cabo empregando-se o método de Younden-Steiner, considerando-se 4 variáveis, tendo fornecido uma precisão de $s = \pm 1,374 \mu\text{g AA}$ (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Modelo e resultados experimentais para o teste de **robustez** empregando o método de Younden-Steiner para método espectrofotométrico usando DCFI.

VARIÁVEIS	EXPERIMENTOS								VARIAÇÃO		
	1	2	3	4	5	6	7	8	nominal	variação	efeito
C ác. Oxálico(%)	0,4	0,4	0,35	0,35	0,4	0,4	0,35	0,35	0,4	0,35	-1,195
DCFI (1:10) mL	9	8,5	9	8,5	9	8,5	9	8,5	9	8,5	0,808
T°C	30	30	30	30	25	25	25	25	30	25	-0,320
Agitação tubos	N	N	M	M	M	N	M	N	N	L	-2,353
Abs média	0,1116	0,1193	0,1279	0,125	0,1269	0,1184	0,1272	0,1169			
m(μg.)AA									Média	= 30,105	
determ.	27,438	29,208	31,202	30,530	30,972	29,009	31,023	28,656		μgAA	
R%	91,142	97,022	103,645	101,413	102,881	96,360	103,052	95,189	sglobal	= 1,374	

N= agitação por 46seg.

M= agitação modificada para 30seg.

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. O protocolo de Younden trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de

um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão.

4.4 – Exatidão

A exatidão de um método analítico consubstancia-se na proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão foi calculada dividindo a concentração média detectada pelo valor do certificado e multiplicando por 100, para expressar em porcentagem, conforme Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Valores médios de **AA** determinados (**X_{médio}**), precisão (**±s**), incerteza específica (**±U/x**), massas de AA adicionadas (**mAA_{adic.}**), incerteza genérica (**I_{genérica}**) e recuperação do AA (**R%**) para método espectrofotométrico usando DCFI.

X (microgr.) AA _{adic.}	X (microgr.) AA _{determ.}	±s	(±U/x)*100	I _{genérica}	R%
10,01	10,19	0,003	0,03	0,18	101,83
20,12	19,98	0,003	0,02	-0,15	99,28
30,06	30,02	0,003	0,01	-0,04	99,88
39,86	39,93	0,004	0,01	0,07	100,17
50,36	50,47	0,006	0,01	0,11	100,23

A exatidão do método foi ensaiada em termos da recuperação e a mesma apresentou-se no intervalo: $97 \leq \%R \leq 105$, com $\%R_{\text{média}} = 100,28 \pm 2$, tendo sido aplicado o critério de aceitação de 95 a 105%; a considerar a natureza do método analítico.

4.5.5 – Incerteza Genérica

A incerteza de medição caracteriza a faixa de valores dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança especificado. Cada medida possui uma incerteza a ela associada, resultante de erros originados dos vários estágios de amostragem e análise, e do conhecimento imperfeito de fatores afetando o resultado. Para que as

medidas sejam de valor prático, é necessário ter algum conhecimento de sua confiabilidade ou incerteza. Uma declaração da incerteza associada a um resultado transmite ao cliente a qualidade do resultado.

O método para a determinação de AA foi validado e a incerteza genérica determinada, a partir da comparação com o AA, material de referência (MR) conforme Figura 5.6.

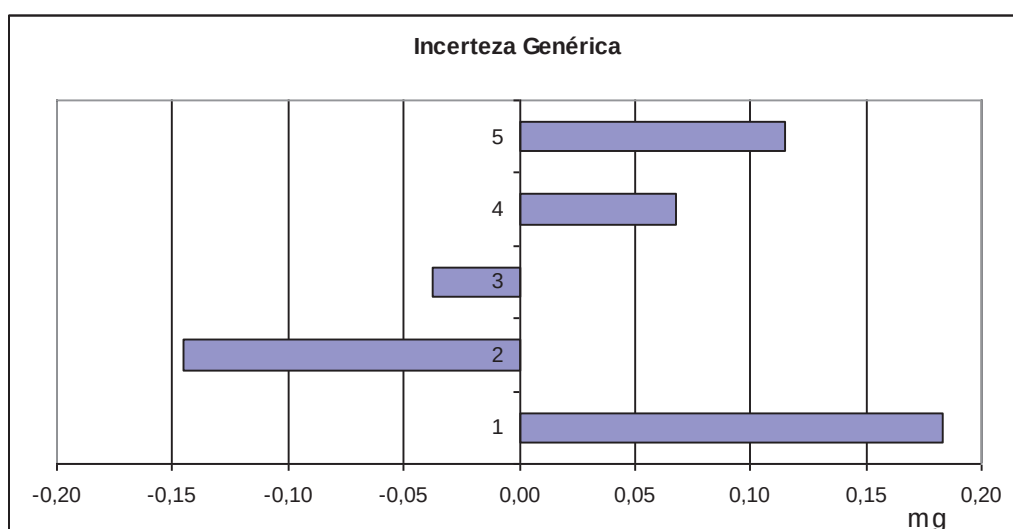


Figura 5.6 - Valores da Incerteza Genérica para método instrumental espectrofotométrico usando DCFI.

Os estudos de validação e o seu acompanhamento que deve ser feito de acordo com a rotina do laboratório, produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza associada aos resultados do método em rotina.

Através desses dados é possível calcular as variações sofridas pelo método e determinar a incerteza, ou seja, quanto o meu resultado vai variar para mais ou para menos numa determinada faixa de trabalho com uma determinada matriz.

A incerteza genérica é definida como a diferença entre a média dos valores determinados e o valor tido como verdadeiro. Para este

método observamos que a incerteza não se manteve constante nas concentrações ensaiadas.

4.6 – Recuperação

Para muitas análises, o principal problema pode ser adquirir um bom conhecimento da quantidade de analito na amostra original, relativamente ao resultado obtido ao final do processo de medição. Esta propensão pode ser devido a perdas no processamento, contaminação ou interferentes. A tendência, que algumas vezes é chamada de recuperação, de um método, é o erro sistemático desse sistema de medição.

Uma das estratégias disponíveis para determinar as tendências do método inclui a medição de brancos e amostras gravimetricamente fortificadas. As taxas de recuperação para o método em estudo estão apresentadas na Tabela 5.4 e Figura 5.7.

Tabela 5.4 - Dados ($mAA_{adicionada}$; $n=10$) e resultados coletados ($mAA_{determinada}$; $n=10$) dos ensaios de recuperação aplicados a amostras de comprimido de Vitamina C ($C_{nominal} = 0,38708\mu g$ de AA) fortificados com diferentes massas nominais de AA (19,97 e 39,97 μg) para método espectrofotométrico usando DCFI.

X Vit.C adic. (micrograma)	X AA determ.	R%	X AA + Vit.C adic. (micrograma)	X AA determ.	R%
19,97	18,3655	91,9655	39,97	41,4613	103,7311
	18,6720	93,5004		42,4728	106,2617**
	18,5954	93,1167		41,5533	103,9611
	17,7448	88,8574		41,3464	103,4435
	17,7372	88,8191		41,3847	103,5393
	17,6299*	88,2818*		41,2161	103,1176
	17,9900	90,0853		41,3234	103,3860
	17,6682*	88,4737*		41,0475	102,6958
	17,5533*	87,8981*		40,9939	102,5616
	18,2582	91,4283		40,8636	102,2357
Xmédio	18,1947*	91,1104	Xmédio	41,3663	103,1857**
s	0,3819*	1,9125	s	0,4455	0,5774**
CV%	2,0991*	2,0991	CV%	1,0770	0,5596**

*Dados escrutinizados; $n = 7$

**Dados escrutinizados; $n = 9$

R%_{critério de aceitação} 80 a 120%

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do mesmo (spike). As amostras podem ser adicionadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que apresenta na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação.

Considerando os resultados obtidos na recuperação e segundo a Tabela 5.5, podemos concluir que o método é exato.

Tabela 5.5 - Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação Aceito (%)
> 10	98-102
> 1	97-103
> 0,1	95-105
> 0,01	90-107
> 0,001- > 0,00001	80-110
> 0,000001	60-115
> 0,0000001	40-120

Fonte: BRITO, 2001

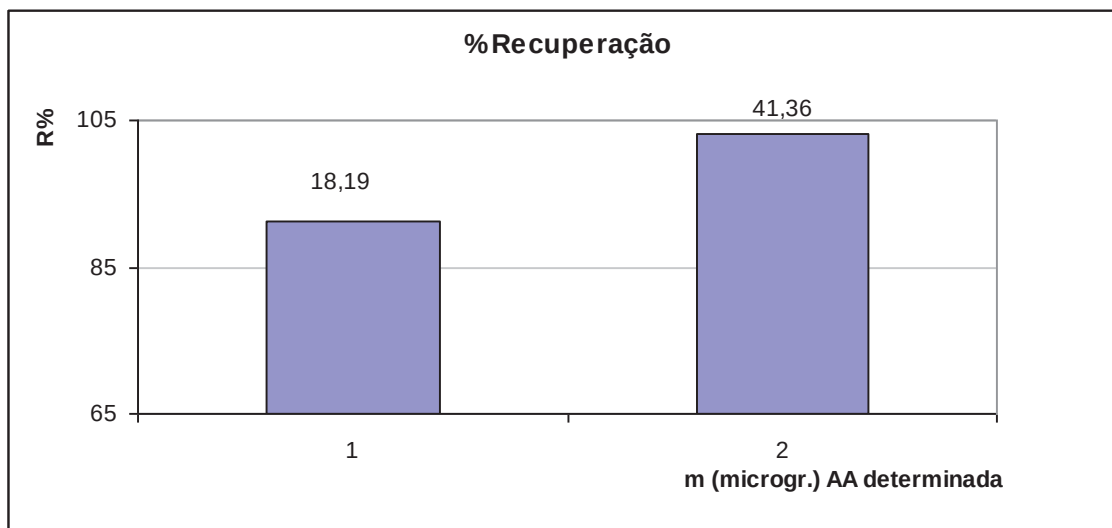


Figura 5.7 - Representação gráfica da percentagem de **recuperação (R%)** como função da massa de **AA** empregada na fortificação da amostra de vitamina C do comprimido para método espectrofotométrico usando DCFI.

A tendência (bias) do método analítico foi ensaiada a partir da diferença entre o valor médio de 10 determinações, sob condições de repetitividade, e a valor aceito como verdadeiro (MR).

As fontes de incerteza foram levantadas e os valores individuais das incertezas genéricas determinados.

Os parâmetros investigados, listados a seguir fornecem evidência objetiva da validação:

- 1- linearidade (Y-Yo): a curva é linear em toda a sua extensão;
- 2- faixa linear: 10 a 50 µg de AA;
- 3- faixa linear de trabalho: 19,98 a 50,47 µg AA;
- 4- precisão, sn=10: $\pm 0,884 \mu\text{g AA}$;
- 5- precisão por repetição, sr (ASTM691-99): $\pm 0,004 \mu\text{g AA}$.

5 – CONCLUSÕES

A análise dos principais atributos da validação de metodologia analítica de um fármaco ou alimento assegura tanto a implantação da metodologia como a confiabilidade dos resultados analíticos.

A qualidade dos dados analíticos representa um fator chave no sucesso de um programa de desenvolvimento de uma droga e o processo do desenvolvimento e validação do método tem impacto direto na qualidade desses dados.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, podemos afirmar que o método analítico para determinação do ácido ascórbico, através do método instrumental por espectroscopia do UV/visível foi validado em todos os parâmetros preconizados pelo guia EURACHEM apresentando-se, portanto, sensível; linear em toda a faixa de massas de AA investigada; exato e robusto.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALWARTHAN, A.A.; **Analyst** 1993, 118, 639.

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21st Edition, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.

BRITO, N. M. **Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação**. São Paulo, 2001. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista.

BURNS, D.T. et al.; **Anal. Chim. Acta** 1991, 243, 187.

EGOVILLE, M.J. et al. Ascorbic acid determination in processed potatoes. **Am. J. Potato Res.**, v. 65, n. 2, 91-97, 1988.

FOGG, A.G.; SUMMAN, A.M.; FERNANDEZ-ARCINIEGA, M.A.; **Analyst**, 1985, 110, 341.

GARFIELD, F.M. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International; 1994. p.220.

LOEFFLER, H.J.; J.D. PONTING. Ascorbic acid. Rapid determination in fresh, frozen, or dehydrated fruits and vegetables. **Ind. Eng. Chem. Anal.** Ed 14:846. 1942.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Vitaminas. 24. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11. ed. São Paulo: Rocca, 2005. p. 77-122.

MORETTO, L.D.; SHIB, M. A era da validação. **Pharmaceutical Technology**. 2000;4:4-48.

PADAYATTY, S.J.; LEVINE, M. Vitamin C and 28. myocardial infarction: the heart of the matter. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 1027-1028, 2000.

Apêndice

Comparação dos parâmetros avaliados entre os métodos validados para determinação de vitamina C

	Robustez	Concentr.	Recuperação	IG	Precisão
NBS	0,94	30mg	3%	4,16	0,17
I ₂	0,82	60mg	3%	0,976	0,11
KIO ₃	0,36	60mg	3%	1,31	0,228
DCFI titulação	0,037	7mg	2%	1,11	0,015
DCFI espectro	1,37	30µg	2%	0,18	0,261

No ensaio da Robustez, o método de determinação de Vitamina C que mostrou melhor Robustez foi o método de 2,6 Diclorofenol indofenol por titulação.

Para o parâmetro de recuperação os métodos utilizando o 2,6 Diclorofenol indofenol por titulação e por espectrofotometria tiveram os mesmos resultados, apresentando-se melhores.

A melhor incerteza genérica foi para o método utilizando o 2,6 Diclorofenol indofenol por espectrofotometria.

A melhor precisão foi do método utilizando o 2,6 Diclorofenol indofenol por titulação, que apresentou menor desvio padrão.

DADOS DA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO PELO MÉTODO UTILIZANDO IODATO DE POTÁSSIO COMO AGENTE
TITULANTE: Valores corrigidos pela equação da reta das buretas calibradas.

1ª curva		2ª curva		3ª curva		4ª curva		5ª curva		6ª curva		7ª curva		8ª curva		9ª curva		10ª curva	
massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)	massa adic. AA (mg)	massa det. AA (mg)
0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	1,15	0,90	0,71
2,39	2,47	2,39	2,92	2,39	2,47	2,39	2,47	2,39	2,47	2,39	2,47	2,39	2,47	2,39	2,47	2,39	2,47	2,39	2,47
4,86	5,12	4,86	5,12	4,87	4,68	4,87	4,68	4,86	5,12	4,86	5,12	4,87	5,12	4,86	4,68	4,86	5,12	4,86	5,12
7,34	7,33	7,34	7,33	7,34	7,33	7,34	7,77	7,34	7,77	7,34	7,77	7,34	7,33	7,34	7,33	7,34	7,33	7,34	7,33
9,82	10,42	9,82	10,42	9,82	9,54	9,82	9,98	9,82	9,98	9,82	9,98	9,82	9,98	9,82	9,98	9,82	9,98	9,82	9,98
12,30	12,63	12,30	12,18	12,30	12,63	12,30	12,63	12,30	12,63	12,30	12,63	12,30	12,63	12,30	12,63	12,30	12,63	12,29	12,63
14,77	14,83	14,77	15,27	14,78	14,83	14,78	14,83	14,78	15,27	14,77	14,83	14,78	15,27	14,78	14,83	14,78	14,83	14,77	15,27
17,25	17,48	17,25	17,48	17,26	17,48	17,26	17,48	17,25	17,48	17,25	17,48	17,26	17,48	17,25	17,48	17,25	17,48	17,25	17,92
19,73	20,13	19,73	19,69	19,74	19,69	19,74	20,13	19,73	20,13	19,73	20,13	19,74	19,69	19,73	20,13	19,73	20,13	19,73	20,13
24,69	24,98	24,69	24,98	24,70	24,98	24,70	24,98	24,69	24,98	24,69	24,98	24,69	24,54	24,69	24,98	24,69	24,98	24,68	25,87
34,60	35,14	34,60	35,14	34,61	34,69	34,61	34,69	34,60	35,58	34,60	35,14	34,61	34,69	34,60	34,69	34,60	35,14	34,59	34,69
49,46	50,58	49,46	49,70	49,49	50,14	49,48	50,14	49,47	50,14	49,46	50,14	49,48	49,70	49,47	50,14	49,47	49,70	49,45	49,26
64,33	65,15	64,33	64,71	64,36	65,15	64,36	65,15	64,34	65,59	64,33	65,59	64,35	64,71	64,34	65,15	64,34	65,15	64,32	64,71
79,20	80,16	79,20	79,27	79,24	80,60	79,23	80,60	79,20	80,60	79,20	79,71	79,22	80,60	79,20	80,60	79,20	80,60	79,18	80,16
94,06	95,16	94,06	94,72	94,11	96,05	94,10	95,60	94,07	96,05	94,06	95,60	94,09	95,16	94,07	95,16	94,07	95,16	94,04	95,16
108,93	109,73	108,93	109,29	108,98	111,05	108,97	111,05	108,94	111,93	108,93	110,17	108,96	110,17	108,94	110,17	108,94	110,17	108,91	108,85
123,80	124,73	123,80	125,18	123,86	126,06	123,85	126,06	123,81	126,94	123,80	125,62	123,83	125,18	123,81	125,18	123,81	125,62	123,77	124,73

Média AA adic. (mg)	Desvio Padrão	Média AA det. (mg)	Desvio Padrão	Média Y-Y0	U/x*100	Igenérica	R%	Repetitividade	
0,89941	0,000179196	1,10587	0,139551313	0,20646	12,6232	0,20649	122,9584	massa AA adic. (mg)	massa AA det. (mg)
2,38619	0,000502107	2,51833	0,139551313	0,13214	5,543422	0,13211	105,5364	59,4	59,4704
4,86449	0,001018114	4,98998	0,213216457	0,12549	4,272545	0,12551	102,5801	59,4	59,4704
7,34181	0,001577938	7,46172	0,213216457	0,11991	2,857258	0,11989	101,633	59,4	59,4704
9,8201	0,002110819	10,02164	0,250559038	0,20154	2,500599	0,2015	102,0519	59,4	59,4704
12,2984	0,002626785	12,58166	0,139582936	0,28326	1,109548	0,2833	102,3036	59,4	59,9125
14,77674	0,00314685	15,00916	0,22793798	0,23242	1,518402	0,23246	101,5731	59,4	59,9125
17,25404	0,003667939	17,52504	0,139582936	0,271	0,796576	0,27096	101,5704	59,4	59,9125
19,73237	0,004179062	19,99668	0,213216457	0,26431	1,066176	0,26433	101,3396	59,4	59,9125
24,68895	0,005277047	25,02835	0,325676954	0,3394	1,301322	0,33945	101,3749	59,4	59,9125
34,60119	0,007350049	34,95929	0,308581811	0,3581	0,882741	0,35811	101,035	59,4	59,9125
49,47001	0,010536756	49,96598	0,372176364	0,49597	0,744907	0,49599	101,0026	média	59,7357
64,33789	0,013682466	65,10514	0,32566039	0,76725	0,500268	0,76721	101,1925	devio padrão	0,2283
79,20671	0,016869199	80,28836	0,467552997	1,08165	0,5824	1,08169	101,3657	CV%	0,3822
94,07555	0,020052778	95,38338	0,428929395	1,30783	0,449659	1,30785	101,3902		
108,9434	0,023219006	110,25767	0,902134935	1,31427	0,818174	1,3143	101,2064		
123,81225	0,026385234	125,52921	0,683790989	1,71696	0,544734	1,71695	101,3867		