UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FAMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ATRIBUTOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA BIOTINA EMPREGANDO A TÉCNICA POTENCIOMÉTRICA

Gabriela Soldi Gonçalves

Orientador: Profº. Dr. José Paschoal Batistuti

Araraquara
2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FAMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

ATRIBUTOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA BIOTINA EMPREGANDO A TÉCNICA POTENCIOMÉTRICA

GABRIELA SOLDI GONÇALVES

Orientador: Profº. Dr. José Paschoal Batistuti

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Pesquisa em Ciências dos Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências dos Alimentos.

Araraquara
2010

À minha família Maria Aparecida,
Darcio Gonçalves, José Roberto e Tiago Valentim
pelo amor, dedicação e agradável convivência.
Sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTO

A Deus por me conceder paciência, sabedoria e oportunidade de desenvolver este trabalho.

A minha amada e querida mãe Maria Aparecida por estar presente em todos os momentos importantes de minha vida. Muito obrigado pelo apoio e incentivo dedicados a mim dia-a-dia.

À Darcio Gonçalves grande homem e incentivador que muito contribuiu com suas palavras de apoio e ternura. Tato a você o meu muito obrigado.

A meu pai José Roberto que mesmo distante sempre se fez presente em minha vida, pelo incentivo, carinho e amor.

A meu noivo Tiago Valentim pelo companheirismo, paciência e compreensão em todos os momentos.

A meu orientador professor Dr. José Paschoal Batistuti pelos ensinamentos, apoio e amizade, sempre provocando iniciativas, mas não perdendo o objetivo do trabalho. Posso dizer que foi um privilégio ser sua aluna. Meu profundo agradecimento.

Aos professores Volnei Alves e Giseli Larosa pela amizade, carinho e maravilhosos conselhos.

As professoras do curso Técnico em Nutrição e Dietética da ETEC Profª. Anna de Oliveira Ferraz pelo agradável convívio e companheirismo durante este período e acima de tudo por acreditarem e incentivarem meu trabalho.

A Roseli de Almeida minha prima que durante esta jornada foi meu braço direito. Doce mulher muito obrigada.

A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, em especial o departamento de Alimentos e Nutrição pela oportunidade concedida.

Enfim a todos não citados, mas que de alguma maneira contribuíram para finalização desta pesquisa.

.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

(Chico Xavier)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

CAPITULO I

1 INTRODUÇÃO……15

2 OBJETIVOS……19

2.1 Objetivo Geral……..……19

2.2 Objetivo Específico……..19

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA……20

3.1 Importância da Metrologia…….....20

3.2 Conceitos Básicos do Processo de Validação.....25

3.2.1 Aspectos legais da validação …….....27

3.2.2 Parâmetros de Desempenho do Método….....30

3.2.2.1 Curva Analítica de Linearidade..…..……...30

3.2.2.2 Intervalos das Curvas de calibração….....31

3.2.2.3 Precisão……31

3.2.2.4 Exatidão……32

3.2.2.5 Sensibilidade……33

3.2.2.6 Seletividade…….....34

3.2.2.7 Limite de Quantificação…….....35

3.2.2.8 Limite de Detecção…….....36

3.2.2.9 Robustez……...37

3.2.2.10 Recuperação …….....37

3.3 Vitaminas …..……38

3.4 Validação e a Escolha do Método Analítico……45

3.5 Potenciometria……50

3.5.1 Vantagens……51
4 MATERIAIS E MÉTODOS……56
4.1 Materiais……56
4.2 Métodos……56
4.2.1 Padronização do HCl……57
4.2.2 Padronização do NaOH……58
4.3 Curva Analítica de Linearidade……59
4.4 Faixa Linear de Trabalho……60
4.5 Precisão……60
4.6 Exatidão……60
4.7 Sensibilidade……61
4.8 Seletividade……61
4.9 Limite de Quantificação……61
4.10 Limite de Detecção……62
4.11 Robustez……62
4.12 Recuperação……62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO……64
5.1 Determinação da concentração da biotina na matéria-prima e no padrão primário……65
5.2 Linearidade……66
5.3 Faixa Linear de Trabalho……70
5.4 Limite de Detecção e de Quantificação……72
5.5 Seletividade……74
5.6 Precisão……75
5.7 Exatidão……78
5.7.1 Recuperação……79
5.8 Robustez……81
6 CONCLUSÃO……84
7 REFERENCIAS……86
CAPITULO II..……93

Resumo……94
Abstract……95
1 INTRODUÇÃO……96
2 MATERIAIS E MÉTODOS……98
2.1 Materiais……98
2.2 Métodos……98
2.2.1 Padronização do HCl……98
2.2.2 Padronização do NaOH……99
2.3 Curva Analítica de Linearidade ……99
2.4 Faixa Linear de Trabalho……99
2.5 Precisão……99
2.6 Exatidão……99
2.7 Sensibilidade……100
2.8 Seletividade……100
2.9 Limite de Quantificação……100
2.10 Limite de Detecção……100
2.11 Robustez……100
2.12 Recuperação……101
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO……102
3.1 Determinação da concentração da biotina na matéria-prima e no padrão primário……102
3.2 Linearidade……103
3.3 Faixa Linear de Trabalho……106
3.4 Limite de Detecção e de Quantificação……108
3.5 Seletividade……109
3.6 Precisão……109
3.7 Exatidão……111
3.7.1 Recuperação……112
3.8 Robustez……114
4 CONCLUSÃO…… .116

5 REFERENCIAS…….....117

LISTA DE ABREVIATURAS

g = gramas

mg = miligramas

µg = microgramas

Λmax = comprimento de onda máximo

meq= miliequivalente

N= normalidade

M = molaridade

S = desvio-padrão

Y = massa determinada

Yo = massa adicionada

R^2 = coeficiente de correlação linear

SM = Sistema de Medição

ABNT= Associação Brasileira de Normas Técnicas

INMETRO = Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ANVISA = Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

LDE = Limite de Detecção do Equipamento

LDM = Limite de Detecção do Método

IPT = Instituto de Pesquisas Tecnológicas

ISO = International Standard Organization

SI = Sistema Internacional de Unidades

fem = Força eletromotriz

qsp = quantidade suficiente para

UE = União Européia

CNPq = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

BIPM = Bureau Internacional de Pesos e Medidas

CCQM = Comitê Consultivo de Quantidade da Matéria

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de testes aplicados aos ensaios de validação……..48

Tabela 2: Ensaios necessários para validação do método analítico segundo sua finalidade…….49

Tabela 3: Ensaio de recuperação por fortificação para avaliação da exatidão do método……79

Tabela 4: Ensaio de recuperação aplicado em massa adicionada de biotina à uma mistura de excipientes……..81

Tabela 5: Modelo de resultados experimentais para avaliação da robustez pelo método de Yunden-Steiner……..83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da biotina……37

Figura 2: Potenciometro automático……...52

Figura 3: Agitador magnético……...52

Figura 4: Relação massa de biotina adicionada e determinada do padrão……..65

Figura 5: Relação massa de biotina adicionada e determinada da matéria-prima…….66

Figura 6: Curva analítica de linearidade da biotina obtida pela titulação potenciométrica indireta…….....69

Figura 7: Determinação do intervalo de trabalho na curva analítica de linearidade……..…….....70

Figura 8: Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho……72

Figura 9: Repetitividade das massas adicionadas de biotina (10mg)……..77

Figura 10: Repetitividade das massas adicionadas de biotina (30mg)……..78

RESUMO

GONÇALVES, Gabriela Soldi, M.Sc., Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Setembro de 2010. **Atributos da validação do método analítico para quantificação da biotina empregando a técnica potenciométrica.** Orientador: José Paschoal Batistuti.

O presente trabalho consiste no desenvolvimento de um método analítico para determinação de biotina, utilizando-se a potenciometria indireta. O objetivo é apresentar a validação de método analítico como um processo que estime a eficiência do método proposto na rotina do laboratório para garantia da qualidade total. É um método que envolve equipamento simples e pouco dispendioso como o potenciômetro, que possibilita medir com precisão o valor da concentração de biotina. O doseamento quantitativo de biotina baseia-se no estudo das reações oscilantes do analito perante as análises da titulação indireta utilizando potenciômetro automático. A concentração de biotina foi determinada com massa adicionada conhecida numa matriz que simula uma cápsula, contendo aerosil (1%), estearato de magnésio (1%), celulose microcristalina (20%), amido (40%) e lactose q.s.p. Os resultados mostraram um valor médio de biotina (massa adicionada de aproximadamente 25 mg) determinada de 99,4% com desvio-padrão de 0,0345. As condições experimentais como temperatura, vidraria e concentração dos reagentes foram otimizadas. Os parâmetros investigados no processo de validação para demonstrar o desempenho do método foram: especificidade, linearidade, intervalo, precisão tanto repetitividade, quanto intermediária, exatidão e robustez. O tratamento estatístico dos dados da validação do método analítico envolveu a determinação da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação. Para obtenção da curva de calibração se fez necessária a determinação da equação da reta, regressão linear e coeficiente de correlação linear. Este método apresenta grande aplicabilidade em soluções turvas, fluorescentes, opacas ou coradas, ou quando não existem, ou não podem aplicar-se indicadores visuais apropriados. Há possibilidade de determinação de uma sucessão de pontos de equivalência na titulação de diversos componentes em uma mistura. A metodologia para determinação de biotina mostrou-se um procedimento eficiente, no qual a montagem do sistema pode ser reutilizada em outros estudos de validação de métodos analíticos apresentando baixo custo e pouca utilização de reagentes.

Palavra-chave: validação, titulação potenciométrica e biotina.

ABSTRACT

GONÇALVES, Gabriela Soldi, M.Sc., Universidade Estadual Paulista, Araraquara, September 2010**. Validation attributes of the analytic methodology of the quantity biotin through potentiometry.** Adviser: José Paschoal Batistuti.

The present work shows the development of an analytical method for the determination of biotin by using indirect potentiometry. The main goal is to present the validation of analytical methods as a process to estimate the efficiency of the proposed methodology in the laboratory routine for the guaranty of total quality. This method involves simple and low cost devices as the potentiometer, which allows the precise measurement of biotin concentration. The quantitative dosing of biotin is based on the study of the oscillating chemical reactions with the analyte by performing the analysis of the indirect titration with an automatic potentiometer. Biotin concentration was determined by adding a known mass to a matrix that simulates a capsule containing aerosol (1%), estearato de magnésio (1%), celulose microcristalina (20%), amido (40%) e lactose q.s.p. The results showed an average value for the determination of biotin (added mass was ca. 25 mg) of 99.4% with a standard deviation of 0.0345. The experimental conditions as temperature, glassware, and concentration of the chemicals were optimized. The investigated parameters of the validation procedure to demonstrate the performance of the method were: specificity, linearity, interval, precision (repeatability and intermediate), exactness and robustness. The statistical treatment of the data for the validation of the analytical method involved the determination of the average value, standard deviation, and the variation coefficient. In order to obtain the calibration curve, the line´s equation, the linear regression and the coefficient of linear correlation were determined. This method shows great applicability for turbid, fluorescent, opaque or color solutions, or if an appropriate visual indicator is not available or cannot be applied. The method also shows the possibility for the determination of a sequence of equivalence points on the titration of several components in a mixture. The methodology for the biotin determination showed to be an efficient procedure, and the system assembly can be reused in other validation studies of analytical methods with low costs and low consumption of chemicals.

Keywords: validation, potentiometric titration and biotin

CAPÍTULO I:

ATRIBUTOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA BIOTINA EMPREGANDO A TÉCNICA POTENCIOMETRICA

1 INTRODUÇÃO

A necessidade de se demonstrar a qualidade das medições químicas através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre o analito, ele deve ser a validado.

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação do método analítico e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (BRASIL, 2003; CODEX ALIMENTARIUS, 1995: ICH 1995; EC, 2000; EURACHEM WORKING GROUP, 1998; FDA, 1994, 2000; INMETRO, 2003; ISO/IEC 17025, 1999; SHABIR, 2003; ELLISON; THOMPSON; WOOD, 2002; WHO, 1992). Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos são adequados para o uso desejado (BRASIL, 2003).

As técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e eletroforese capilar (CE), vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos.

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência ou “performance” na rotina do laboratório, com evidências objetivas (BRITO et al, 2003). Várias definições estão descritas na literatura para a validação, tratando-se, portanto, de termo não-específico.

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Portanto, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Esta deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (WALSH, 1999). A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em métodos já validados, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos.

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos (AUDARN; BRESSOLLE; BROMET-PETIT, 1996; CAUSON, 1997; CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994; CURRIE; SVEHLA, 1994; FEINBERG; RAGUÈNÈS, 1999; FRANCOTTE; DAVATZ; RICHERT, 1996; HUBERT et al, 1999; McDONALD, 1999; PEREIRA et al, 2000; WIELING et al, 1996) e definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento. Dentre estes, muitos são das áreas biológica (AUDRAN; BRESSOLLE; BROMET-PETIT, 1996; CAUSON, 1997; HUBERT et al, 1999; WIELING et al, 1996), farmacêutica (AUDARN; BRESSOLLE; BROMET-PETIT, 1996; CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994; FRANCOTTE; DAVATZ;

RICHERT, 1996) e química (CURRIE; SVEHLA, 1994; FEINBERG; RAGUÈNÈS, 1999; McDONALD, 1999; PEREIRA et al, 2000). Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e de quantificação.

As aplicações da metrologia na área de química analítica e no controle de qualidade de alimentos são consideráveis para as necessidades humanas de ingerir alimentos que devem ter suas características nutricionais em conformidade às especificações regulamentadas e livres de componentes indesejáveis. Assim os exames laboratoriais devem ser conduzidos por métodos que permitam obter resultados confiáveis (ELLISON; THOMPSON; WOOD, 2002).

Dada a importância da metrologia o presente trabalho consiste em validar um método analítico pelo doseamento da biotina utilizando a titulometria potenciométrica ácido base.

A **biotina**, também conhecida como **vitamina H**, **vitamina B_7** ou **vitamina B_8**, é uma molécula da classe das vitaminas que funciona como cofator enzimático. Necessária no metabolismo das proteínas e dos carboidratos, ela age diretamente na formação da pele e indiretamente na utilização dos hidratos de carbono (açúcares e amido) e das proteínas. Tem como principal função neutralizar o colesterol (diretamente ligado à obesidade). É uma vitamina hidrossolúvel. A biotina tem a fórmula química $C_{10}H_{16}O_3N_2S$ e suas principais fontes alimentares são frutas, nozes, ovos, carnes, leites e leveduras. Também é produzida por bactérias intestinais. A carência de biotina no homem, apesar de rara, pode causar dermatite esfoliativa, conjuntivite,

descoloração da pele e mucosas, furunculose, seborréia do couro cabeludo e dores musculares (FRANCO, 2004).

A titulometria potenciométrica ácido base é um método eletroquímico alternativo que permite o uso da titulometria para determinar as propriedades químicas dos alimentos. Este é um método primário, de custo reduzido e sem geração de resíduos tóxicos que podem agredir o meio ambiente. Os equipamentos empregados na titulometria potenciométrica não necessitam de vultuosos investimentos para o controle de qualidade de matérias-primas ou produtos alimentares acabados.

Tendo em vista que a biotina é um ácido fraco, pelas propriedades químicas é possível determinar a sua concentração, a partir da titulação de neutralização. Para tanto foi proposto um método de titulação indireta, com auxílio de um titulador potenciométrico automático, para efetuar a validação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um método quantitativo para doseamento da biotina utilizando a titulação potenciométrica ácido base.

2.2 Objetivo Específico

Investigar os parâmetros de performance do método para determinação da biotina por titulação potenciometria de neutralização, utilizando titulador automático.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância da Metrologia

A palavra “metrologia”, que vem do grego “metro” (medida), e “logos” (o estudo do), significa a ciência ou o estudo da medição. O conceito surgiu na antiguidade em estreita relação com a atividade humana e a partir da observação que o próprio homem fazia de si mesmo. Daí que se usem até hoje unidades como pés, palmos, polegadas, que estão ligadas a partes do corpo humano (ICH, 1995).

O mais antigo padrão de medida linear talvez tenha surgido no Egito, por volta de 3.000 a.C. O côvado era baseado no comprimento do braço, do cotovelo à ponta do dedo médio. Os agrimensores egípcios, também conhecidos por “estiradores de corda”, por causa do instrumento de medição que dispunham na época, podem ser considerados os primeiros metrologistas (ICH, 1995).

A ciência da medição vem se aperfeiçoando cada vez mais ao longo do tempo, sempre no intuito de melhorar a vida do homem e a qualidade dos produtos que este produz ou consome. Conforme Alexandre Sobral, o principal objetivo da metrologia é prover confiabilidade para as medições realizadas em diversas áreas como laboratórios, pesquisas científicas, indústrias, sistemas de medição utilizados em saúde, segurança e meio ambiente (US-FDA, 2000).

O desenvolvimento da Metrologia Química ocorreu, no âmbito mundial, a partir de 1993 com a criação do Comitê Consultivo para Quantidade de Matéria (CCQM), na França (RIBANI et al, 2004).

Reconhecendo essa área como de fundamental importância estratégica para a competitividade dos produtos e serviços brasileiros, o INMETRO criou em junho de 2000 a Divisão de Metrologia Química, que atua nos segmentos da Eletroquímica, Química Orgânica, Química Inorgânica, Química do Estado Gasoso, Motores a Combustão, Combustíveis e Lubrificantes (RIBANI et al, 2004).

Um conceito fundamental para a garantia da confiabilidade das medições é que um resultado possa ser comparado a outro resultado anterior, por exemplo, de um ano atrás, ou a um resultado qualquer obtido em qualquer outra parte do mundo, tendo sido estabelecido um grau de incerteza de medição que sempre permanece (ICH, 1995).

O perigo envolvido no crescimento das farmácias de manipulação, sem que haja o devido controle, foi tratado a partir de notícias de jornais que apresentam casos de morte ocorridos por erros na dosagem de medicamentos manipulados. Em um dos casos, um paciente morto, vítima de uma intoxicação, ao se fazer a análise dos comprimidos que havia tomado e que tinham sido manipulados, encontrou-se um teor 321,84 vezes maior do que o prescrito na receita (RIBANI et al, 2004).

A metrologia também se faz presente na questão dos biocombustíveis, apresentando papel fundamental para a garantia de aspectos socioambientais dos biocombustíveis e para contornar possíveis barreiras técnicas à sua exportação (LEITE, 2002).

Ainda de acordo com INMETRO (2003), os padrões de medição em metrologia química são denominados materiais de referência: soluções que são utilizadas para calibrar equipamentos (como os

cromatógrafos) capazes de detectar a substância que se quer medir num determinado produto. Os laboratórios de metrologia química do INMETRO pesquisam e desenvolvem materiais de referência a serem utilizados por outros laboratórios em suas análises. Além disto, o instituto realiza a implantação de métodos primários: aqueles como os métodos de medição de pH e de condutividade que possuem a mais alta qualidade metrológica e não precisam ser comparados a nenhum outro padrão (INMETRO, 2003).

A cada dia, no comércio mundial, as barreiras se tornam mais técnicas do que alfandegárias. Com o advento da nanotecnologia, se torna ainda mais importante uma medição mais eficaz. Por exemplo, um país desenvolvido pode proteger-se contra produtos de um país em desenvolvimento exigindo quantidades máximas nanométricas de certas substâncias. Se este país não tem a capacidade de medir nanometricamente, perde este mercado (LEITE, 2002).

O primeiro material de referência desenvolvido pela divisão de metrologia química do INMETRO foi a solução de etanol em água utilizada para calibrar os etilômetros (popularmente conhecidos como bafômetros). O Brasil importava esta solução de etanol em água que não tinha confiabilidade nenhuma. Qualquer um poderia contestar a medição. Agora, com a calibração a partir de um material de referência produzido pelo INMETRO, existe garantia na qualidade da medição (INMETRO, 2003).

As exportações brasileiras e dos demais países pertencem à Comunidade Européia. Atualmente deparam-se com as exigências de natureza metrológica, que em várias circunstâncias tem causado distinções jurídicas, dadas as metodologias (capacidade de medição),

ora utilizadas para medir substâncias de interesse comercial (LEITE, 2002).

Neste sentido, a garantia e a confiabilidade dos materiais de referência produzidos pelo INMETRO são decorrência do trabalho de intercomparações com outros institutos nacionais de metrologia que constituem uma cadeia de rastreabilidade. A partir de uma série de regulamentações e normas e das comparações entre os laboratórios, a cadeia permite rastrear a procedência do material, garantindo, assim, sua qualidade. O INMETRO, portanto, é rastreado internacionalmente e faz parte do Sistema Internacional de Unidades (SI) (INMETRO, 2003).

As associações de produtores e cooperativas agrícolas da União Européia (UE) tem solicitado a proibição da importação de uma série de produtos alimentares brasileiros. A alegação é a falta padrão de qualidade internacional. Em março deste ano, a UE suspendeu a importação do mel brasileiro alegando a presença de substâncias contaminantes proibidas (LEITE, 2002).

No Brasil, o INMETRO ocupa o topo da hierarquia metrológica. Ou seja, é ele quem pesquisa e desenvolve materiais de referência, certificados para medições a serem realizadas por outros laboratórios, públicos ou privados. Estes laboratórios também podem desenvolver materiais de referências secundários, respeitando a chamada cadeia de rastreabilidade. Na divisão de metrologia química, o INMETRO conta com cinco laboratórios localizados no Parque Tecnológico de Xerém, em Duque de Caxias, no Rio de Janeiro (INMETRO, 2003).

Diante da competitividade e dos embates políticos em torno da maior abertura dos mercados agrícolas e do fim dos subsídios dados pelos países ricos aos seus agricultores, o rigor das regras e dos

padrões de qualidade e segurança para produtos alimentares tornou-se um fator relevante na arena do comércio internacional. Nesse contexto, é que a metrologia se impõe, tornando-se uma área de pesquisa estratégica na medida em que, para exportar, os produtores brasileiros precisam respeitar normas de qualidade internacionais, através da certificação de seus produtos por laboratórios metrológicos de credibilidade reconhecida (LEITE, 2002).

O INMETRO está ligado ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior e o seu foco, portanto, é desenvolver padrões de medição que sejam estratégicos para o país.

Nesta direção, foi lançado em abril de 2002, em parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), um edital para seleção de projetos para o Programa de Capacitação Científica e Tecnológica do INMETRO (Prometro), de apoio à pesquisa tecnológica e de inovação em metrologia científica e industrial, com investimentos de R$ 7,6 milhões (INMETRO, 2003).

A divisão de metrologia química do INMETRO que integra a diretoria de metrologia científica e industrial foi criada em 2000. A preocupação com a confiabilidade das medições químicas, no mundo todo, é bastante recente e a química é uma área da metrologia que ainda está em expansão. Para se ter uma idéia, o Bureau Internacional de Pesos e Medidas (BIPM), que reúne todos os institutos nacionais de metrologia, foi criado em 1875. O Comitê Consultivo de Quantidade da Matéria (CCQM), relativo à metrologia química e que integra o BIPM foi criado somente em 1993 (INMETRO, 2003).

O controle de qualidade, particularmente de vitaminas, tem recebido a sua devida atenção pelo INMETRO, quando os pesquisadores, estão voltadas para a busca de métodos validados a serem utilizados e que demonstrem confiabilidade, para alcançar novos mercados e manter a competitividade das empresas.

3.2 Conceitos Básicos do Processo de Validação

Vários autores definem validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo e estão constantemente sob consideração pelas agências reguladoras. Algumas definições podem ser transcritas:

• “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003).

• “Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer” (EURACHEM WORKING GROUP, 1998).

• “Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional” (ISO/IEC 17025, 1999).

• A validação de métodos assegura a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo

que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer" (US-FDA, 1999).

• "Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado" (WHO, 1992).

Vários artigos e revisões tem sido publicados a respeito de validação de métodos analíticos (ELLISON; THOMPSON; WOOD, 2002; SHABIR, 2003) os quais descrevem definições, procedimentos, parâmetros e estratégias de validação.

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos (HILL, 1999; MASSART, 1994; ELLISON; THOMPSON; WOOD, 2002; VAN DER VOET, 1999).

- O primeiro, chamado de validação no laboratório (in house validation), consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se um método adotado de outras fontes está bem aplicado. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento do método e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação do método, porém sem verificar a reprodutibilidade. Pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à validação completa (full validation) (ELLISON; THOMPSON; WOOD, 2002).

- O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho em um estudo interlaboratorial que é

utilizado para verificar como o método se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade do método e a incerteza expandida, associada ao método como um todo. Só assim o método pode ser aceito como um método oficial para uma determinada aplicação.

Protocolos internacionalmente aceitos tem sido estabelecidos para a validação completa, mais precisamente o Protocolo Harmonizado Internacional (HORWITZ, 1995) e o procedimento ISO (International Standard Organization) (ISO/IEC 17025, 1999).

Estes protocolos requerem um número mínimo de laboratórios e materiais testes para serem incluídos no estudo interlaboratorial para validação completa do método analítico. No Brasil os estudos de comparações interlaboratoriais são coordenados pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), através do Programa Brasileiro de Metrologia em Química.

3.2.1 Aspectos Legais da Validação

Existem razões legais, técnicas e comerciais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos de separação, apesar de não haver uma norma estabelecida de âmbito nacional ou internacional. Atualmente, para mostrar competência técnica, os laboratórios que executam as análises devem submeter-se a uma acreditação (accreditation) de um órgão vigente de âmbito nacional ou internacional.

No Brasil, a agência responsável pela acreditação e verificação da competência de laboratórios de ensaios é o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (INMETRO, 2003). Este órgão disponibiliza guias para o procedimento de validação de métodos analíticos como o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/200311. É importante esclarecer que resoluções são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidas e guias são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação.

Os guias são recomendações para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser utilizado (KRULL, 1998).

Os parâmetros para validação de métodos tem sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais.

Infelizmente algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. Uma tentativa para harmonizar estas diferenças foi feita para aplicações farmacêuticas, através da ICH (International Conference on Harmonization) (ICH, 1995), na qual representantes das indústrias e agências reguladoras dos EUA, Europa e Japão definiram parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para validação dos métodos analíticos.

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) também redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos que tem sido utilizado pela ISO10.

O guia internacional ISO/IEC 17025, é específico para laboratórios de ensaio e de calibração, apresenta a “validação de métodos” como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação (ISO/IEC 17025, 1999). O US-FDA (United States Food and Drug Administration) também tem proposto guias com respeito a validação de métodos (US-FDA, 1999).

Assim, órgãos como ICH, IUPAC, ISO, INMETRO e outros exigem o item validação de métodos analíticos como um requisito fundamental na acreditação para qualidade assegurada e demonstração de competência técnica (ELLISON; THOMPSON; WOOD, 2002; INMETRO, 2003).

O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação.

Como estes organismos são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaios é importante ressaltar que as diferentes terminologias e até algumas características de desempenho do método tem, em sua maior parte, o mesmo significado, porém descrito de uma maneira distinta, para aplicações diferentes.

3.2.2 Parâmetros de Desempenho do Método

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar linearidade, intervalo linear, precisão, exatidão, sensibilidade, seletividade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e recuperação adequados à análise. Deste modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (ICH, 1995).

3.2.2.1 Curva Analítica de Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática (equação da regressão linear) usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (BARROS, 2002).

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 (ICH, 1995).

Recomenda-se que sua determinação seja realizada através da análise do padrão utilizado, com massas de no mínimo 5 (cinco)

concentrações diferentes. Procedimentos alternativos devem ser justificados.

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

3.2.2.2 Intervalos das Curvas de Calibração

O intervalo da curva de calibração deriva do estudo de linearidade do método e depende do objetivo de sua aplicação. As amostras analisadas dentro do intervalo da curva de calibração devem apresentar linearidade, exatidão e precisão compatíveis.

3.2.2.3 Precisão

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaios mutuamente independentes e é normalmente expressa em termos de desvio-padrão. Ela é geralmente dependente da concentração do analito, e esta dependência deve ser determinada e documentada (BRASIL, 2005). Em outras palavras a precisão é descrita como a qualidade de ser definida ou afirmada de forma nítida, sendo indicada pelo número de dígitos significativos na medida. No sentido estatístico mais restrito, refere-se à redução do erro aleatório (GIBNEY; VORSTER; KOK, 2005).

A precisão deve ser determinada em um mesmo dia (precisão intra-dia) e em dias diferentes (precisão inter-dias).

Pode ser expressa como desvio padrão relativo, ou coeficiente de variação (CV%) conforme a seguinte equação:

$$CV\% = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Média}} \times 100$$

3.2.2.4 Exatidão

De acordo com Barros (2002), a exatidão de um método analítico é verificada quando são obtidos resultados muito próximos em relação ao valor aceito como verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor aceito como verdadeiro, acrescida dos intervalos de confiança.

De acordo com Brasil (2005), a exatidão deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. Os ensaios devem ser realizados num mesmo dia (exatidão intra-dia) e em dias diferentes (exatidão inter-dias).

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

A tendência implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. A determinação da tendência total em relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos.

A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). A tendência deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível, mas em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, dentre outros: uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação.

3.2.2.5 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da variação da concentração do analito. É a habilidade do método de detectar pequenas variações de uma dada matriz (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade conforme a equação abaixo:

$$S = \frac{dx}{dc}$$

Onde: S = sensibilidade

dx = variação da resposta

dc = variação da concentração

A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (INMETRO, 2003).

3.2.2.6 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto específico independente da matriz da amostra e de suas impurezas. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analito, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analito, contendo estruturas semelhantes.

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico para um único analito e a seletividade refere-se a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles (ICH, 1995).

Nos estudos de especificidade de métodos, procede-se analisando solução padrão do mesmo, em presença de quantidades conhecidas de possíveis interferentes (impurezas/excipientes/produtos de degradação), demonstrando-se que os resultados não são afetados pela presença de tais componentes. Para tanto, compara-se os resultados com aqueles obtidos a partir do ensaio de soluções semelhantes isentas do analito. Para testes de determinação de impurezas deve-se demonstrar, também, a separação individual dos interferentes relevantes.

Na ausência de padrão do produto de degradação, sub-produto ou impureza, a especificidade do método pode ser determinada comparando-se os resultados de análises de amostras contendo tais componentes com os resultados de análises de mesmas amostras utilizando-se outro método bem caracterizado e validado. Quando apropriado, nestes casos, deve-se submeter as amostras a condições de estresse: luz, calor, umidade, hidrólise e oxidação.

3.2.2.7 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Onde o limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

O Limite de Quantificação refere-se à concentração do analito correspondente ao valor da média das amostras em branco mais 5, 6

ou 10 desvios padrão ou pode corresponder ao padrão de calibração de menor concentração descontando o branco.

3.2.2.8 Limite de Detecção (LD)

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

No caso de métodos não instrumentais (Cromatografia em Camada Delgada (CCD), titulação, comparação de cor), a determinação pode ser feita visualmente, sabendo que o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc).

O limite de detecção é estabelecido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do fármaco, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. Pode ser expresso pela equação:

$$LD = DP \times 3{,}3\ ic$$

onde: DP = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

O desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da análise de um apropriado número de amostras do branco; ic = inclinação da curva de calibração.

3.2.2.9 Robustez

A robustez refere-se à sensibilidade do método apresentada nas mínimas variações que possam ocorrer quando este está sendo executado (QUINETE, 2005).

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Ainda de acordo com Barros (2002), constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser adequadamente controladas ou precauções devem ser incluídas no procedimento.

Exemplo de variações:

- Estabilidade das soluções analíticas
- Tempo de extração

3.2.2.10 Recuperação

A recuperação mede a eficiência de um procedimento específico ou geral do método analítico dentro de um limite de variação. Moreno (2003), aponta que porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém admite-se valores menores, por exemplo, de 50 a 60%, desde que a recuperação seja precisa e exata. Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta) com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

3.3 Vitaminas

Vitaminas são substâncias essenciais ao metabolismo dos seres vivos, sendo requeridas em quantidades diminutas e não são sintetizadas pelos mesmos.

As vitaminas constituem um grupo de substâncias orgânicas de composição química e funções biológicas diversas, que são fornecidas em pequenas quantidades na dieta para síntese pelos tecidos. Diversas reações metabólicas são controladas por enzimas e coenzimas, algumas das quais consistem em uma vitamina (grupo ativo) e um componente prostético como veículo (FRANCO, 2004).

Dependendo da solubilidade, as vitaminas são classificadas em hidrossolúveis e lipossolúveis. As vitaminas hidrossolúveis são aquelas que se dissolvem em água, mas não em lipídios; algumas delas, porém, são levemente solúveis em certos solventes orgânicos. Dentre as vitaminas hidrossolúveis tem-se o ácido ascórbico (vitamina C), ácido nicotínico, biotina, riboflavina (vitamina B2), tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6), ácido pantotênico, cianocobalamina (vitamina B12) e ácido fólico (ANICETO et al, 2000).

De acordo com Franco (2004), as vitaminas são agentes essenciais ativos para manutenção das funções biológicas, podendo ocorrer na natureza como tal, ou sob a forma de precursores, provitaminas, que são ingeridas através dos alimentos.

A carência destas vitaminas pode ser originada tanto pela falta de alimentos (populações carentes) ou por uma dieta mal equilibrada. No caso dos países ditos desenvolvidos uma grande maioria também

padece deste mal devido à alimentação inadequada provocada, dentre outros fatores, pelo ritmo estressante da vida moderna e também devido à ingestão de doses excessivas de medicamentos que inibem a ação das vitaminas no organismo (ANICETO et al, 2000).

Atualmente inúmeros trabalhos evidenciam a importância das vitaminas do complexo B e em especial a Biotina, também conhecida por vitamina B7, vitamina H, coenzima R, fator X, fator W e vitamina Bw, conforme a função biológica apresentada (RODOVALHO, 2008).

A biotina é solúvel em água e álcool, estável ao calor e instável à oxidação, luz e radiação. Além disto é utilizada como componente das formulações farmacológicas, no tratamento de doenças de pele, na elaboração de cosméticos, adicionada à ração animal atuando como agente de crescimento.

A biotina é um ativo ácido orgânico, sendo sua forma ativa a d-isômero. Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 1.

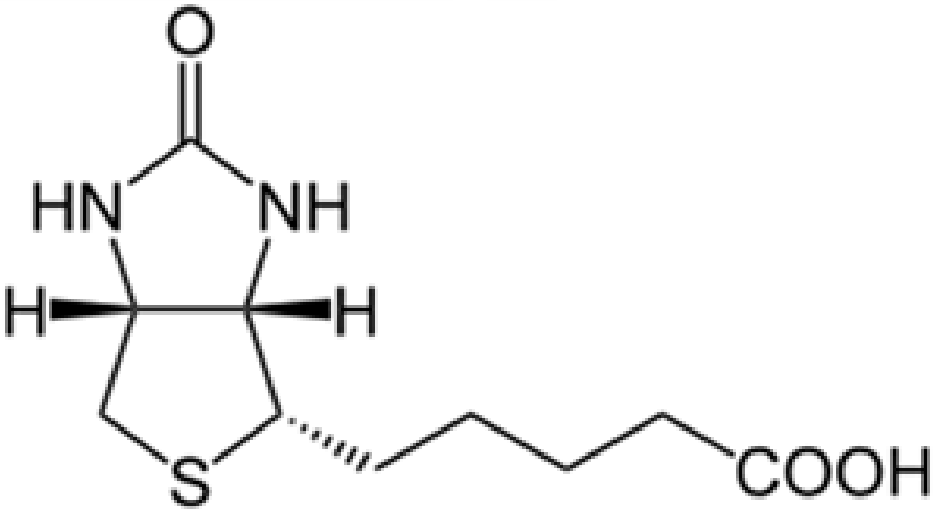


Figura 1 - Estrutura química da biotina

Pesquisas recentes indicam que a biotina tem papel na expressão dos genes, podendo atuar na replicação do DNA. Atua em todas as células vivas, promovendo o crescimento de bactérias, leveduras e ainda pode ser sintetizada por bactérias intestinais. A sintese intestinal da biotina pode ser inibida pela administração de substâncias de ação antimicrobiana (FRANCO, 2004).

Neste sentido a absorção de biotina é alterada em indivíduos que apresentam ressecção gástrica, produção insuficiente de suco gástrico e acloridria (ausência de HCl no suco gástrico). Em alguns casos é indicada terapia biotínica. A biotina apresenta forte ligação funcional com a piridoxina, niacina, riboflavina e tiamina (FRANCO, 2004).

Ainda é considerada um co-fator responsável pela transferência de dióxido de carbono em várias enzimas carboxilases, está envolvida na biossíntese de ácidos graxos, gliconeogênese, produção de energia e metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada (ZERZANOVA et al, 2007).

A vitamina H amplamente está distribuída em muitos alimentos e suas principais fontes são carnes vermelhas, em especial fígado bovino, gema de ovo e o levedo. Ainda pequenas concentrações de biotina podem ser encontradas em cereais, castanha e hortaliças. Todavia segundo Rodovalho (2008), a vitamina H pode ser encontrada em vários microrganismos, algas, animais e plantas na sua forma livre ou ligada a uma proteína.

A deficiência de biotina está associada a manifestações neurológicas, erupção na pele, perda de cabelo e distúrbios metabólicos. Apesar destes dados destacarem a importância da biotina

como um nutriente essencial, o papel desta em células permanece incompreendido (GRAVEL; NARANG, 2005).

Estudos recentes sobre a atuação da biotina em células podem mudar a perspectiva sobre o consumo ideal na alimentação e do significado por trás dos sintomas de indivíduos com a deficiência de biotina, genética ou adquirida (GRAVEL; NARANG, 2005).

A biotinidase é uma enzima hidrolase de fundamental importância no metabolismo da biotina. Sua função é liberar a biotina ligada covalentemente à proteína (dieta) ou aos peptídeos (biocitina - substrato natural) contribuindo favoravelmente para absorção de biotina e evitando possíveis deficiências (HEALY et al, 2009). Por outro lado estão alguns tipos de proteínas (avidina) que se comportam como antagonistas da vitamina H de forma irreversível, impedindo sua absorção pelo organismo (FRANCO, 2004).

Segundo Zerzanova et al (2007), a dose diária de ingestão definida para biotina é cerca de 30 a 100 µg /dia, suficiente para manter o cabelo saudável, a pele, glândulas, tecido nervoso e ossos. De acordo com Franco (2004), crianças de seis meses de idade e adultos excretam mais biotina nas fezes e na urina do que a quantidade ingerida.

As técnicas analíticas para a determinação da biotina podem ser divididas em quatro categorias principais (ZERZANOVA et al, 2007):

1 - Métodos microbiológicos, com base no crescimento de microrganismos em presença de biotina, muito sensível, demorado e apresenta baixa especificidade. Este método é utilizado para

determinar biotina em baixas concentrações. O microrganismo requer biotina para o seu crescimento e reprodução. Este é incubado junto a diluição de amostras. O consequente aumento de turbidez do extrato é medido e correlaciona-se com o conteúdo de biotina da amostra. Porém pode haver algumas interferencias na determinação de biotina pois os microrganismos podem ser inibidos por certos antibióticos e metais pesados.

2 - Técnicas biológicas baseadas no desenvolvimento animal. Estas são usadas principalmente para a determinação de biotina em gêneros alimentícios.

3 - Ensaios de ligação: fazem uso da formação de complexos proteicos como por exemplo avidina específica ou estreptavidina que quando associada a biotina pode reduzir sua disponibilidade e provocar complicações na investigação do analito.

4 - O último grupo inclui todos os métodos físico-químicos tais como: titulação potenciométrica, espectrofotometria, polarografia, cromatografia em camada fina, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e zona eletroforese (ZERZANOVA et at, 2007).

De acordo com as técnicas analiticas mensuradas acima, para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra testada, este deve sofrer uma avaliação denominada validação (ROCA et al, 2007).

No entanto, a necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irrecuperáveis (RIBANI et al,

2004). A validação é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência (RIBANI et al, 2004).

Quando se trata de medicamento, por exemplo, qualquer falha mínima no processo pode trazer prejuízos à saúde de consumidores e ao nome da indústria no mercado. Atualmente, grande ênfase se tem dado à validação, certificação e qualificação de instalação, equipamento, processo e metodologia analítica, porém a falta de uma padronização de linguagem do setor dificulta o entendimento total dos termos (VALENTINI, 2002).

Paralelamente à validação de métodos, a validação de um processo pode ser definido como “confirmação por análise e obtenção de evidência objetiva de que os requisitos particulares de uma aplicação específica podem ser consistentemente conseguidos” (BASQUES, 2007).

Neste sentido, o termo “validade” refere-se ao grau com que um instrumento representa bem um objeto medido (SLATER et al, 2003).

A validação é o grau de inferência que pode ser tirado de um estudo, a representatividade da amostra do estudo e a natureza de sua população fonte. Esta pode ser dividida em interna e externa.

- A validação interna refere-se a indivíduos ou elementos ou quaisquer substâncias que realmente integram a amostra.

- A validação externa refere-se à extensão dos achados de uma amostra para uma população alvo (GIBNEY; VORSTER; KOK, 2005).

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. A frequência com que o método será utilizado (muitas vezes em um dia, uma vez em um dia para um estudo rápido, uma vez em um mês, etc) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário.

Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. O objetivo do método pode incluir também os diferentes tipos de equipamentos e os lugares em que será utilizado, ou seja, se o método é desenvolvido para ser utilizado em instrumento e laboratório específico, não há necessidade de usar instrumentos de outras marcas ou incluir outros laboratórios nos experimentos de validação. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário (RIBANI et al, 2004).

Para tanto, é de fundamental importância estabelecer um bom procedimento de validação que requer habilidade em validar rápido, e com um número adequado de análises, sem perder a qualidade das estimativas, o que é um desafio na rotina de um laboratório devido às restrições de tempo, custo e potencial instrumental (RIBEIRO et al, 2008).

Para otimização dos resultados se faz necessário o uso de parâmetros estatísticos adequados, indicado para demonstração de evidência objetiva da validade do método (BARROS, 2002). Diz-se,

então, que uma medição é validada quando está livre de erros sistemáticos.

O procedimento de validação descreve a identificação dos erros de medição e não o método do qual se derivam as medidas (SLATER et al, 2003).

Porém é importante esclarecer que os conceitos de validação de métodos continuam a evoluir e estão sempre sob consideração. Correlacionando-se o desenvolvimento, otimização e validação de métodos de uma maneira lógica e organizada, os laboratórios podem gerar resultados bastante eficientes e produtivos. Este é um processo tedioso, mas a qualidade dos resultados gerados está diretamente relacionada com a qualidade deste processo.

Portanto, este trabalho pretende abordar de forma sistemática considerações metodológicas para a realização de estudos de validação da biotina que será determinada pela titulação potenciométrica.

3.4 Validação e a Escolha do Método Analítico

A pesquisa é um processo detalhado para descobrir fatos novos ou antigos examinados e conferidos pelo estudo científico de uma determinada substância ou através de uma pesquisa crítica (GIBNEY; VORSTER; KOK, 2005). Então se faz necessária a utilização de métodos confiáveis e aplicáveis para realização das pesquisas.

Verificações precisam ser realizadas para garantir que as características de desempenho de um método sejam entendidas e para demonstrar que o método seja cientificamente coerente, sob as

condições nas quais ele deve ser aplicado (BRASIL, 2005). Neste trabalho estas verificações referem-se à validação de métodos analíticos, que consiste num processo dinâmico e constante com início nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais, pessoal e continua na fase de experimentos e transferência do método.

De acordo com a ABNT (2001), recomenda-se que os métodos desenvolvidos internamente sejam descritos em procedimentos documentados, que contenham:

- identificação adequada do procedimento
- escopo
- descrição do tipo de item a ser ensaiado ou calibrado
- parâmetros ou grandezas e faixas a serem determinadas
- referência a equipamentos (incluindo os requisitos de desempenho técnico)
- referência a uso de padrões de referência e materiais de referência
- determinação das condições ambientais requeridas e período de estabilização necessário
- descrição de todas as etapas do ensaio/calibração, critério e requisitos para aprovação ou rejeição.
- menção aos dados a serem registrados e ao método de análise
- apresentação dos resultados e referência ao procedimento para determinação da incerteza de medição.

Além disto, se faz necessário alguns pré-requisitos para garantir a confiabilidade dos resultados, entre eles: pessoal qualificado, reagentes analíticos de grau PA (pureza analítica), padrões

certificados, vidrarias classe A calibradas, amostragem representativa e ferramentas estatísticas.

É de extrema importância identificar o tipo de método analítico que apresenta melhor desempenho para elaboração dos experimentos; tais como: método normalizado ou método não normalizado.

- O método normalizado refere-se a organizações que elaboram normatizações, cujos métodos são aceitos pelo setor técnico em questão, como exemplo podemos citar ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

- O método não normalizado é desenvolvido pelo próprio laboratório ou adaptado a partir de métodos normalizados e validados, como exemplo métodos publicados em revistas técnicas (INMETRO, 2003).

A validação de um padrão ou método colaborativamente testado não deve ser considerada implícita, a despeito de quão impecável seja a origem do método. O laboratório deve se certificar de que o grau de validação de um método específico é adequado ao fim proposto, e que o próprio laboratório é capaz de verificar quaisquer critérios de desempenho declarados (BRASIL, 2005).

Métodos desenvolvidos internamente devem ser adequadamente validados, documentados e autorizados antes do uso. Onde eles estiverem disponíveis, materiais de referência com matrizes combinadas devem ser usados para determinar qualquer tendência, ou quando isto não for possível, os resultados devem ser comparados com outras técnicas, de preferência baseadas em diferentes princípios de medição.

A medição da recuperação de analito fortificado, gravimetricamente adicionado, medição dos brancos e o estudo de interferências e efeitos matriciais podem ser também usados para verificação da tendência ou recuperação imperfeita. A estimativa da incerteza deve fazer parte deste processo de validação e, além de cobrir os fatores acima, deve abordar questões, tais como a homogeneidade e estabilidade das amostras (BRASIL, 2005).

Segundo Brasil (2003), para realização da validação de métodos analíticos pode-se utilizar quatro categorias e seus respectivos ensaios como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Tipos de testes aplicados aos ensaios de validação

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para determinação de substância ativa em produtos farmacêuticos ou matéria-prima
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para 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

(BRASIL, 2003).

O presente trabalho se enquadra na categoria I.

Para cada tipo de método analítico desenvolvido (categoria), um conjunto de testes é exigido como mostra a 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		
Seletividade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão					
Repetitividade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

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

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

Fonte: BRASIL, 2003.

Portanto de acordo com a Tabela 2, as principais características investigadas no processo de validação para demonstrar o desempenho do método são: seletividade, linearidade, intervalo, precisão por repetitividade, exatidão e robustez.

3.5 Potenciometria

Os métodos potenciométricos são baseados na medida do potencial de células eletroquímicas na presença de correntes, utilizando sistemas eletrônicos de alta resistência de entrada (TAVARES, 2002).

De acordo com Baliza (2006), a definição da técnica potenciométrica pode ser expressa como “conjunto de técnicas instrumentais que visam as determinações de concentrações e atividades de espécie iônicas em solução”. Para realizar tais determinações se faz necessário a utilização de dois eletrodos para os quais se mede a diferença de potenciais (E) entre eles.

Ambos eletrodos devem estar imersos na solução em estudo, sendo um conhecido como eletrodo indicador, que é seletivo para um determinado íon, tornando possível a obtenção da concentração desse íon através do valor do potencial medido e outro conhecido como eletrodo de referência.

Moreno (2003), ressalta que na titulação potenciométrica monitora-se as variações da fem (força eletromotriz) de uma célula eletroquímica, à medida que se vai adicionando um reagente de concentração exatamente conhecida à solução sob ensaio. O método pode aplicar-se a qualquer reação titulométrica, para qual se disponha de um eletrodo indicador, que permita seguir as variações da atividade de uma, pelo menos, das substâncias intervenientes. Não é, neste caso, essencial que se atinja um equilíbrio reprodutível, da mesma forma, tem pouca importância as características dos eletrodos de

referência, e apenas é necessário que a resposta de um dos eletrodos do par seja substancialmente maior ou mais rápida que a do outro.

Além de permitir estabelecer o ponto de equivalência de uma reação, o método pode, ainda, fornecer informações acerca da amostra e suas reações, a partir do registro da curva de titulação potenciométrica (MORENO, 2003).

3.5.1 Vantagens

Entre as vantagens da potenciometria, incluem-se a simplicidade, rapidez, precisão e facilidade de automação e controle por microcomputadores, possibilitando o armazenamento de uma maior quantidade de dados gerados nas análises. O equipamento utilizado para os métodos potenciométricos é simples e de baixo custo.

Os equipamentos utilizados neste trabalho são apresentados nas Figuras 2 e 3. Os principais componentes na potenciometria são os eletrodos, pois são eles os responsáveis pela conversão da atividade iônica em potencial de cela (BALIZA, 2006).

Figura 2 - Potenciometro automático

Figura 3 - Agitador magnético

O método apresenta ainda, grande aplicabilidade a soluções turvas, fluorescente, opacas ou coradas, ou quando não existem, ou não podem aplicar-se, indicadores visuais apropriados. Possibilidade de determinação de uma sucessão de pontos de equivalência, na titulação de diversos componentes em uma mistura (MORENO, 2003).

Comparadas com os métodos potenciométricos diretos, as titulações potenciométricas oferecem, geralmente, maior rigor, à custa, no entanto, de maior complexidade e perda de tempo. O rigor aumenta porque os potenciais medidos se utilizam para detectar as rápidas variações da atividade, que ocorrem próximas ao ponto de equivalência, e esse ritmo da variação da força eletromotriz é, em geral, consideravelmente maior do que a variação do coeficiente angular, que limita a precisão da potenciometria direta. Na verdade, o que interessa não é o valor absoluto da fem, e sim a sua variação, em função do volume do reagente titulante adicionado (QUINETE, 2005).

Desta forma, é praticamente desprezível o efeito dos potenciais de junção e dos coeficientes da atividade.

Em qualquer titulação, o problema maior consiste em identificar o ponto exato em que as espécies que reagem encontram-se presentes em quantidades equivalentes, ou seja localizar o ponto de equivalência. Pode-se traçar a curva de titulação tomando em ordenadas os sucessivos valores da fem da célula, em função do volume do reagente titulante adicionado (VALENTINI, 2002).

Ao longo da maior parte da zona de titulação, a fem da célula varia gradualmente, mas, próximo do ponto de equivalência, sofre

variação brusca ao mesmo tempo que o logaritmo da concentração. O problema reside em detectar exatamente esta brusca variação da fem.

O exame da curva no ponto de inflexão permite determinar este termo, representado pelo ponto a que corresponde a variação máxima da fem por unidade de volume do reagente titulante adicionado. A nitidez do ponto de equivalência aumenta à medida que a respectiva reação se torna mais completamente quantitativa (MORENO, 2003).

Na imediata vizinhança do ponto de equivalência, a concentração do produto em análise torna-se muito pequena, a tal ponto que o íon ou íons presentes ficam impossibilitados de condicionar o potencial do eletrodo.

A fem da célula torna-se mais instável e mal definida, porque o eletrodo indicador deixa de estar equilibrado, isto é, não é rodeado por quantidades suficientes das espécies eletroativas do sistema redox desejado. Se aquelas espécies não se encontram demasiadamente diluídas, bastará uma gota ou duas do reagente titulante para ultrapassar o ponto de equivalência e atingir a região estabilizada pelas espécies eletroativas deste reagente (BARROS, 2002).

A posição do máximo, na curva da “primeira derivada” corresponde ao ponto de inflexão, na curva normal de titulação. No entanto pode-se ainda obter o ponto de equivalência de forma mais precisa à custa da “segunda derivada”, cuja curva é traçada tomando em ordenadas o quociente entre a razão dos incrementos da fem e volume e o incremento do volume, contra o volume de titulante adicionado, em abcissas (FARINELLI, 2008).

A titulação potenciométrica quando realizada manualmente, seja para obter uma curva de titulação pormenorizada, seja para localizar com rigor o ponto de equivalência, constitui uma operação fastidiosa e demorada, e, no trabalho de rotina, não apresenta rapidez e simplicidade. Com o advento dos tituladores automáticos estes inconvenientes foram completamente sanados, dotando a titulação potenciométrica de rapidez e simplicidade necessárias nas análises de rotina (MORENO, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As determinações foram realizadas com auxílio de vidraria calibrada e titulador potenciométrico automático (Metrohm 848 Titrino).

Biotina, padrão primário, obtido junto à empresa Sigma Aldrich.

A matéria-prima utilizada foi biotina manipulada obtida junto a uma drogaria na cidade de Araraquara/SP.

Os reagentes utilizados foram Ácido clorídrico (HCl) 0,1N e Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N ambos de grau P.A.

4.2 Métodos

A determinação da concentração da biotina em solução foi realizada com auxílio da potenciometria, com eletrodo de vidro para titulação ácido-base.

Este tipo de titulação potenciométrica requer o controle constante das diversas etapas, anotando o volume de reagente dosado e o respectivo potencial. Os dados obtidos foram utilizados para construção da curva de titulação, na qual é calculado o volume de reagente gasto até o ponto de equivalência e a concentração da espécie analisada**.** Alíquotas de biotina foram diluídas em meio alcalino com 15mL de NaOH **0,1 N**, sob constante agitação por trinta segundos onde posteriormente a solução foi titulada com ácido clorídrico **0,1 N** – devidamente fatorado – e o ponto de equivalência da reação determinado pela máxima variação da diferença de potencial apresentada, através do monitoramento com potenciômetro.

4.2.1 Padronização do HCl

Para padronizar o ácido clorídrico (HCl) utilizou-se um padrão primário, carbonato de sódio (Na_2CO_3), de valor conhecido, considerando sua massa molecular 105,99 g/mol e valência 2, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$N \times V = \frac{m1}{mm/Valência}$$

Onde: N = normalidade
V = volume de HCl gasto na titulação
m_1 = massa de Na_2CO_3
mm = massa molecular de Na_2CO_3
Valência = 2

Colocou-se o padrão primário (Na_2CO_3) por duas horas em estufa previamente aquecida a 105 ºC para a retirada de umidade. Após a retirada da estufa, armazenou-se em dessecador e posteriormente pesou-se.

Adicionou-se ao carbonato de sódio, água recém destilada e 6 gotas de vermelho de metila. Em seguida foi realizada titulação com HCl, anotando o volume gasto deste reagente até obter uma coloração amarelo-vermelho identificada pelo ponto de viragem. Para calcular a Normalidade do carbonato de sódio, as análises foram realizadas em triplicata empregando a fórmula a seguir:

$$N = \frac{m}{mm/Valência \times V}$$

O Fator de Correção (FC) foi calculado utilizando 0,1N pela seguinte fórmula:

$$FC = \frac{N/real}{N/aparente}$$

Onde: FC = fator de correção
N/real = normalidade real
N/aparente = normalidade desejada

4.2.2 Padronização do NaOH

Para padronizar o hidróxido de sódio (NaOH) utilizou-se um padrão primário, biftalato de potássio ($KC_8H_5O_4$), de valor conhecido, considerando sua massa molecular de 204,22 g/mol.

Colocou-se o padrão primário ($KC_8H_5O_4$) por duas horas em estufa previamente aquecida a 105 ºC para a retirada de umidade. Após a retirada da estufa, armazenou-se em dessecador e posteriormente pesou-se.

Adicionou-se ao biftalato de potássio, água recém destilada e 6 gotas de fenolftaleína. Em seguida foi realizada titulação com NaOH, anotando o volume gasto deste reagente até obter uma coloração rósea identificada pelo ponto de viragem.

Para calcular a Normalidade do hidróxido de sódio, as análises foram realizadas em triplicata empregando a fórmula a seguir:

$$N = \frac{m}{mm/Valência \times V}$$

Onde: N = normalidade
m = massa de $KC_8H_5O_4$
mm = massa molecular de $KC_8H_5O_4$
V = volume de NaOH gasto na titulação

O Fator de Correção (FC) foi calculado utilizando 0,1N pela seguinte fórmula:

$$FC = \frac{N/real}{N/aparente}$$

Onde: FC = fator de correção
N/real = normalidade real
N/aparente = normalidade desejada

4.3 Curva Analítica de Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A curva analítica de linearidade foi ensaiada com 10 repetições para cada concentração de biotina no intervalo entre 5 a 35mg.

4.4 Faixa linear de trabalho

O intervalo linear de trabalho da curva de calibração deriva do estudo de linearidade do método o qual foi calculado relacionando a diferença entre a massa determinada e adicionada de biotina (Y-Yo).

4.5 Precisão

A precisão de um método é a declaração da proximidade da concordância entre resultados de ensaios mutuamente independentes e é normalmente expressa em termos de desvio-padrão. Ela foi determinada através da repetitividade de três massas diferentes, sendo cada uma delas submetida a 10 repetições, no mesmo dia, com mesmo operador.

4.6 Exatidão

De acordo com Barros (2002), a exatidão de um método analítico é verificada quando são obtidos resultados muito próximos em relação ao valor verdadeiro, a exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A partir de 10 repetições de massas de biotina, adicionada à matriz (Aerosil 1%, estearato de magnésio 1%, celulose microcristalina 20%, amido 40% e lactose q.s.p.), em três diferentes concentrações, e após obtenção dos resultados, calculou-se a sua exatidão.

4.7 Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da variação da concentração do analito. É a habilidade do método de detectar pequenas e deliberadas variações de uma dada matriz (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração.

4.8 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto específico independente da matriz da amostra e de suas impurezas. Para tanto, efetuaram-se 10 repetições de uma determinada concentração de biotina, adicionada a matriz descrita nos itens 4.6 e 5.5, calculando a massa determinada na presença desta matriz.

4.9 Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação corresponde à massa determinada com uma incerteza conhecida. No presente trabalho calculou-se a massa com incerteza determinada em 10 repetições.

4.10 Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. No trabalho determinou-se o limite de detecção do equipamento pela razão ruído/sinal apresentado pelo equipamento de acordo com a concentração de analito presente na amostra.

4.11 Robustez

A robustez refere-se à sensibilidade do método apresentada nas mínimas variações que possam ocorrer quando este está sendo executado.

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Experimentalmente um protocolo fatorial proposto por Yuden-Steiner, foi utilizado para avaliar a robustez, cujas variáveis foram; concentração de NaOH, velocidade de agitação, velocidade de adição do titulante, temperatura (EURACHEM WORKING GROUP, 1998).

4.12 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis. Este parâmetro deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras

extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta). Neste trabalho realizaram-se 10 repetições para os ensaios experimentais.

O ensaio de recuperação foi realizado por fortificação para avaliação da exatidão do método. Para tanto, massas de biotina foram determinadas previamente nas concentrações de 5mg, 15mg, 25mg e 35mg. Para massa de biotina na concentração de 5mg adicionou-se concentrações de 10mg, 20mg e 30mg de biotina respectivamente.

Para massa de 15mg de biotina foi adicionada 15mg de biotina para o ensaio de recuperação do método. Em 25mg de biotina determinada previamente foi adicionada 25mg de biotina para verificar a porcentagem de recuperação. Para 30mg de biotina determinada previamente foi adicionada 30mg de biotina. Visualizar Tabelas 3 e 4.

Para calcular a porcentagem de Recuperação considerou-se a concentração de biotina determinada na amostra fortificada menos a concentração de biotina determinada na amostra não fortificada dividido pela concentração de biotina adicionada e multiplicada por 100. Posteriormente calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação, obtendo-se ótima porcentagem de recuperação de biotina próxima a 100%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na constante busca pela satisfação dos clientes, internos e externos, destacam-se as empresas voltadas para o programa de Qualidade Total, cuja qualidade do processo é uma das características de destaque. Para que o processo possa resultar em produto ou serviço que corresponda a uma necessidade, utilização ou aplicação que satisfaça o cliente, este deve atender as especificações, estar disponível e proporcionar lucro. Desta forma, foi definido como objetivo geral deste trabalho desenvolver e validar um método quantitativo para doseamento da biotina utilizando a titulação potenciométrica.

Neste sentido, a análise dos principais atributos da validação de metodologia analítica da Biotina pode assegurar tanto a implantação como a confiabilidade dos resultados analíticos.

A validação é um dos principais instrumentos da garantia da qualidade, tornando-se ultrapassado o conceito de apenas controlá-la. Com este intuito, este trabalho proporcionou condições para se ter uma visão mais ampla da validação, em particular da validação de método analítico, bem como sua importância para diversos setores de uma empresa.

Através da revisão bibliográfica, constatou-se que a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de um processo produtivo, de equipamento e, inclusive de método analítico, nos diversos setores onde a qualidade do produto fabricado seja uma das principais razões da existência da empresa.

O modelo proposto e realizado através da parte experimental, possibilitou atingir o objetivo específico do trabalho, definido como determinação da biotina por titulação potenciometrica de neutralização, investigando os parâmetros da validação de métodos analíticos. Com

estas características alcançadas, pode-se assegurar o cumprimento das normas regulatórias.

5.1 Determinação da concentração da biotina na matéria-prima e no padrão primário.

As Figuras 4 e 5 mostram os resultados obtidos para a determinação da concentração de biotina contida na matéria-prima, que foi utilizada para validar os parâmetros do método, comparando com a concentração obtida da biotina no padrão primário. Para determinar a sua concentração de biotina na matéria prima, calculou-se a relação entre os coeficientes angulares de equações da reta obtida na titulação potenciométrica.

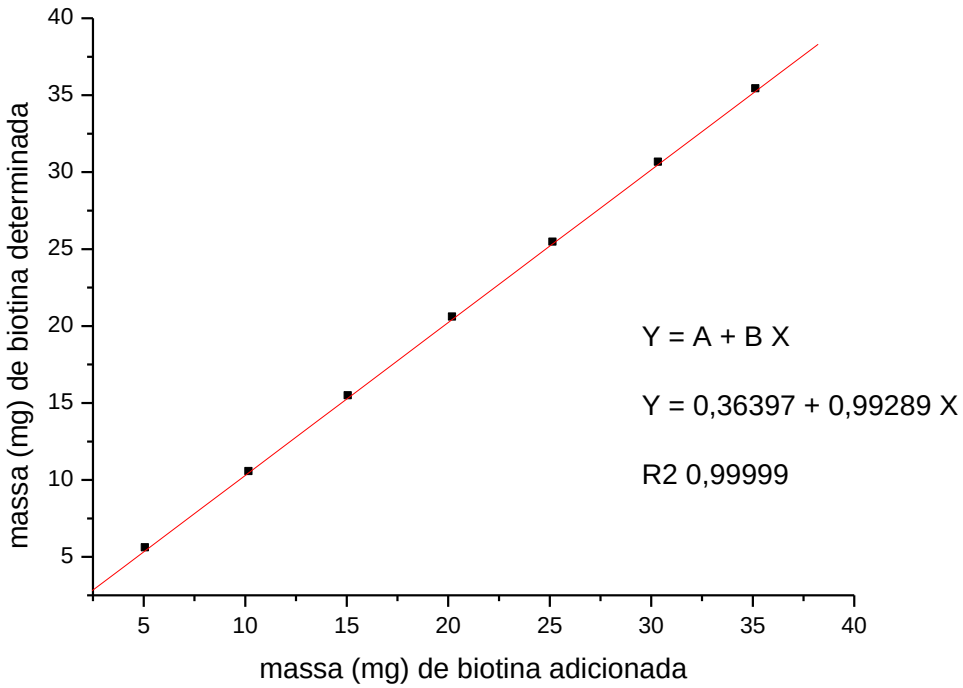


Figura 4 – Relação massa (mg) de biotina adicionada e determinada do padrão (Sigma-Aldrich).

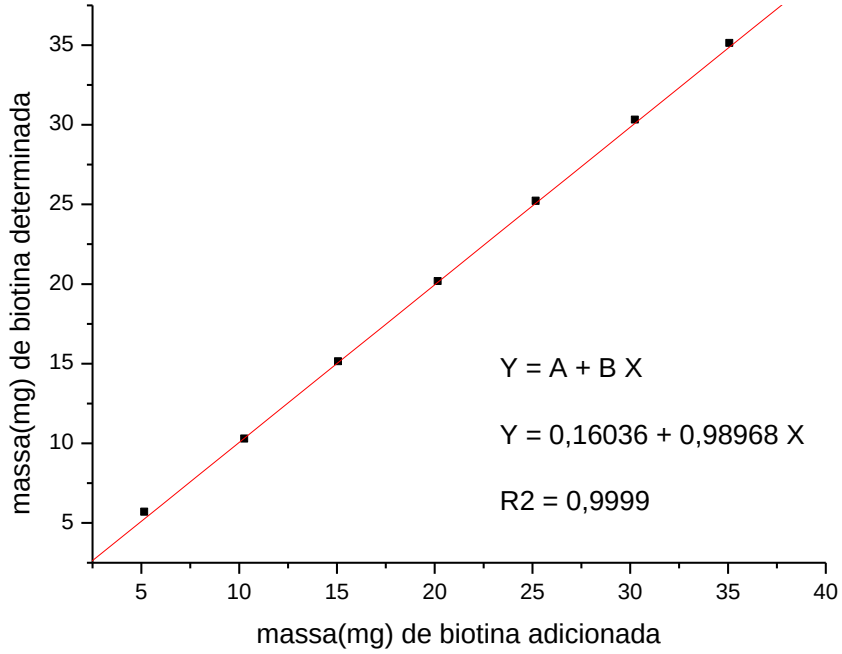


Figura 5 – Relação massa (mg) de biotina adicionada e determinada da matéria-prima.

Portanto o fator de correção a ser aplicado para determinar a concentração de biotina na matéria prima é dado pela relação entre o coeficiente angular da matéria prima/coeficiente angular do padrão, ou seja 0,98968/0,99298 = 0,996676

5.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de biotina, dentro de um intervalo especificado (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

Para tanto realizaram-se ensaios com cinco concentrações diferentes de biotina, no intervalo de 5 a 35mg da concentração a ser preconizada pelo método.

A linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A linearidade pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear(r^2) é frequentemente usado para indicar o quanto deve ser considerada adequada a reta como modelo matemático (QUINETE, 2005). Como os desvios de linearidade são difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão (INMETRO, 2003).

O gráfico analítico deve apresentar os dados estatísticos de interseção, da equação da regressão linear e o coeficiente de correlação ou de determinação. Assim, torna-se necessário o uso de número suficiente de soluções-padrão para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta. O gráfico analítico pode ser construído usando-se, no mínimo, cinco valores de concentração enquadrados no intervalo definido (AUDARN; BRESSOLLE; BROMET-PETIT, 1996; McDONALD, 1999).

Julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade (CURRIE; SVEHLA, 1994).

Embora sempre se busque obter relação linear entre a propriedade a ser medida e a concentração ou quantidade do analito pode-se também admitir a relação não-linear (por exemplo, nas

análises eletroquímicas, utilizando eletrodos de íon seletivo ou biossensores (ROCA et al, 2007).

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados numa faixa analítica especificada. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a 1 (um) e coeficiente angular diferente de 0 (zero).

Linearidade é o desempenho do equipamento de medição ao longo de toda sua faixa de uso. É a diferença da tendência numa determinada faixa do Sistema de Medição (SM). As medições são efetuadas e a tendência registrada é observada. Através de um estudo de regressão verifica-se se a tendência é função do valor de referência.

O estudo da linearidade do dispositivo de medição revela se a tendência observada nos valores medidos é ou não função da magnitude do valor medido.

No presente trabalho a linearidade foi obtida através do ensaio de 10 (dez) repetições de massas diferentes e calculou-se a sua linearidade, entre as massas adicionadas de biotina e os respectivos valores obtidos, pelo coeficiente de correlação, e o resultado é mostrado na Figura 6. Nesta figura está a equação da reta obtida e seu coeficiente de correlação, existindo um excelente valor de correlação e linearidade para o método proposto.

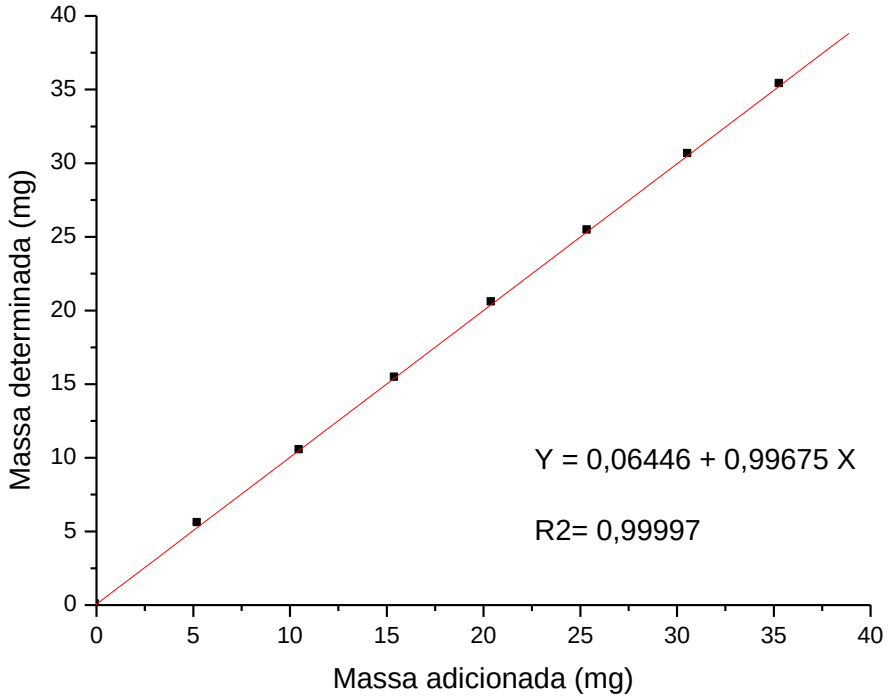
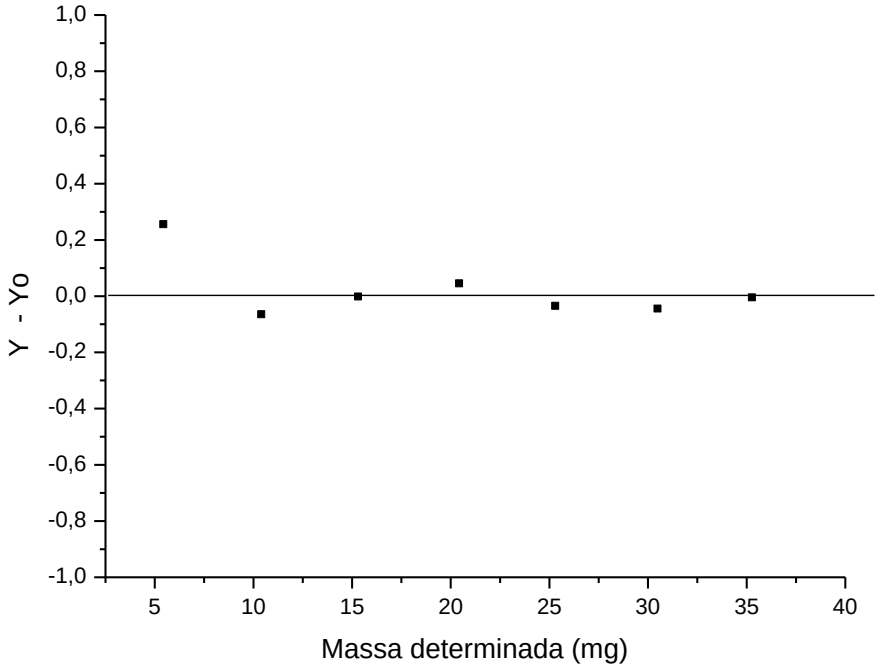


Figura 6 – Determinação da curva analítica de linearidade da biotina obtida com n= 10 por titulação potenciométrica indireta.

A curva analítica de linearidade informa-nos apenas a linearidade entre os valores adicionados do analito e a respectiva massa encontrada, entretanto é necessário investigar dentro desta linearidade observada, qual é o intervalo do método em que a linearidade é obtida, considerando a incerteza da medição. Para tanto calcularam-se os valores de desvio-padrão para cada determinação de repetição, juntamente com sua média e a partir da relação entre o coeficiente do desvio e média, pela massa nominalmente adicionada, obteve-se a Figura 7 . Os resultados indicam que a menor incerteza de medição na curva analítica situa-se entre 10 e 35 mg.



Y = massa de biotina determinada

Yo= massa de biotina adicionada

Figura 7 – Avaliação da linearidade a partir dos resíduos (Y-Yo) obtidos a partir de massa de biotina determinada e dos valores de Yo, calculados.

5.3 Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito para o qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade, exigidas sob condições específicas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003).

No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (QUINETE, 2005).

Em qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. Os primeiros valores da faixa podem ser os valores dos limites de detecção e de quantificação e os últimos dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (US-FDA, 2000).

Para escolher a faixa de trabalho procede-se da seguinte maneira: quando se tem uma amostra específica, a concentração esperada deve se situar no meio da faixa de trabalho e quando a concentração do analito é desconhecida utiliza-se a faixa de trabalho estudada para amostras diversificadas (ICH, 1995).

Na Figura 8, encontramos um intervalo de trabalho, situado entre 10 e 35 mg, entretanto, se assumirmos precisão esperada melhor que 1%, a faixa linear de trabalho será de 20 a 35 mg de biotina, assumindo uma precisão melhor que 2% a faixa linear de trabalho permanece entre 10 e 35 mg de biotina.

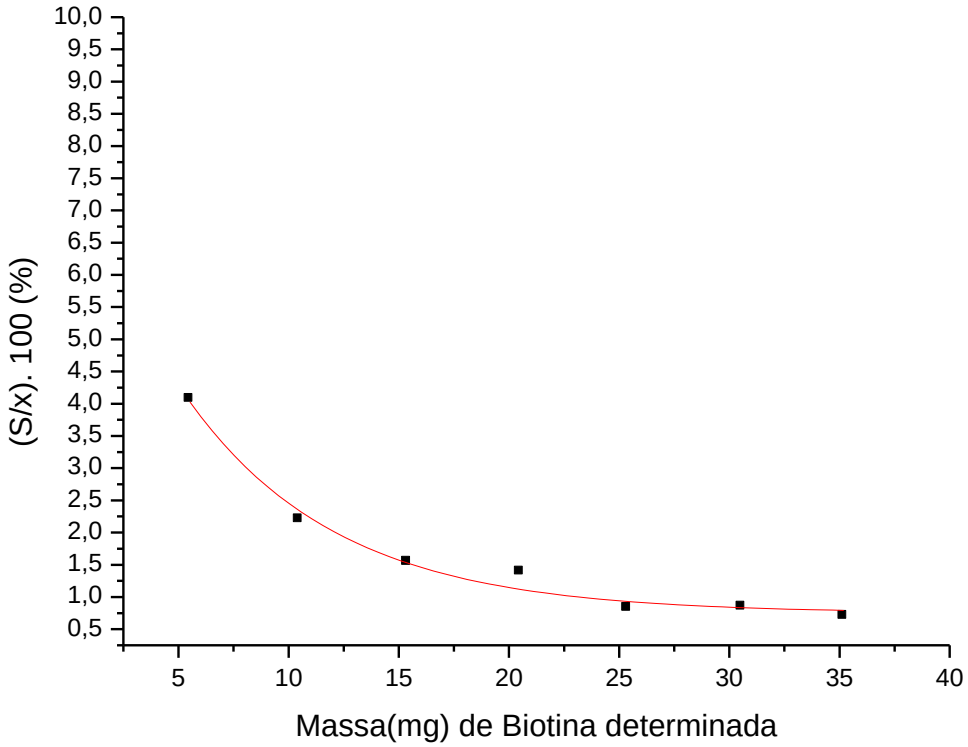


Figura 8 – Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho, através da correlação (S/x) 100 (%) x massa de biotina determinada. Assumiu-se precisão esperada para o método melhor que 1%.

5.4 Limite de Detecção e de Quantificação

O LD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, ou seja, demonstra a sensibilidade ao princípio ativo (ROCA et al, 2007).

Na verdade quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, é importante identificar o menor valor da concentração que pode ser detectado pelo método analítico.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento (INMETRO, 2003).

O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito (INMETRO, 2003).

O LDM para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. Portanto é fundamental certificar-se de que todas as etapas de processamento do método sejam incluídas na determinação deste limite de detecção (INMETRO, 2003).

O LD de um analito é muitas vezes determinado pela análise repetida de uma porção de amostras de brancos, e é a concentração de analito cuja resposta é equivalente à resposta média de brancos mais três desvios padrão. É possível que seu valor seja diferente para diferentes tipos de amostra (BRASIL, 2005)

O LD do método será determinado experimentalmente utilizando sucessivas diluições a partir da solução padrão de concentração 0,1N.

O LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. Segundo Brasil (2005), 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). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao

valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão da medição do branco (INMETRO, 2003).

A diferença entre os limites de detecção e de quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas (INMETRO, 2003).

Assim fatores consideráveis na definição dos limites de detecção são: ruído do equipamento, efeitos de matriz e interferentes e a variabilidade nos processos de extração (QUINETE, 2005).

Este método mostrou que para o equipamento utilizado o limite em que pode ser determinado o ponto de equivalência é de 5 mg, portanto, este é o limite de detecção do equipamento, para este método proposto, conforme o protocolo estabelecido para o estudo. Valores abaixo deste o aparelho não mostra sinal confiável para que se possa fazer qualquer determinação.

5.5 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação. A determinação da biotina foi realizada, variando-se a luminosidade, a temperatura, umidade, presença de substâncias oxidantes, a fim de verificar a influência destes parâmetros na determinação da biotina, pelo método proposto.

Está relacionado à capacidade de reposta de um composto específico (de interesse) que está associado a uma matriz com várias substâncias químicas detectáveis ou não. Um método que produz resposta para apenas um analito é denominado específico (INMETRO, 2003).

Assim a seletividade está voltada ao processo de detecção através da capacidade de medir com exatidão o analito de interesse, em presença de outros componentes ou interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra (QUINETE, 2005).

A concentração de biotina foi determinada com massa adicionada conhecida numa matriz que simula uma cápsula, contendo aerosil (1%), estearato de magnésio (1%), celulose microcristalina (20%), amido (40%) e lactose q.s.p. Os resultados mostraram um valor médio de biotina (massa adicionada de aproximadamente 25 mg) determinada de 99,4% com desvio-padrão de 0,0345.

5.6 Precisão

Precisão intermediária é a precisão intercorrida, ou seja, refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 (dois) dias diferentes com analistas diferentes.

Existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro de qualidade, como por exemplo, por meio de gráfico de controle de amplitude, que poderão ser aplicados para replicatas de amostra e para padrões estáveis ao longo do tempo.

Um método simplificado para estimar a precisão intermediária baseia-se na execução de:

- uma mesma amostra;
- amostras supostamente idênticas;
- padrões.

Na verdade a precisão pode ser expressa de diferentes maneiras, dependendo das condições em que for calculada (BRASIL, 2005).

Pode ser considerada em três níveis diferentes: **repetitividade,** precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo facultada a realização de dois itens (ROCA et al, 2007).

1. Repetitividade refere-se à concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista, mesma instrumentação, mesmo método, mesmo material, mesmo laboratório (BRASL, 2003), ou seja, refere-se ao grau de concordância entre os resultados das análises individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea, em condições idênticas (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

2. Precisão intermediária refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou mesmo equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

3. Reprodutibilidade está relacionada aos resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica (BRASIL, 2003). A Reprodutibilidade é um conceito de precisão relacionada a medições feitas sob condições que podem ser reproduzidas, isto é: mesmo método, operadores diferentes, equipamentos diferentes e longo período de tempo entre as medições (BRASIL, 2005).

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição ao branco de várias concentrações da faixa de trabalho.

A partir do desvio padrão dos resultados dos ensaios sob condição de repetitividade, calcula-se o limite de repetitividade "*r*" que capacita o analista a decidir se a diferença entre análises duplicatas de uma amostra é significativa para um nível de confiança de 95%.

Para tanto, o protocolo projetado para este parâmetro foi realizado envolvendo a repetitividade do método por 10 (dez) determinações, contemplando o intervalo linear do método.

As Figuras 9 e 10, foram obtidas determinando a concentração de biotina em massa adicionada de aproximadamente 10 e 30 mg.

Figura 9 – Determinação da precisão por repetitividade, n= 10 para massa adicionada de 10 mg.

Figura 10 – Determinação da precisão por repetitividade, n= 10 para massa adicionada de 30 mg.

5.7 Exatidão

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de 10 (dez) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento.

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

$$E = \frac{CMe}{Ct} \times 100$$

Onde: CMe é a concentração média experimental
Ct é a concentração teórica

Tabela 3 – Ensaio de recuperação por fortificação para avaliação da exatidão do método.

5 mg*	10 mg**	R %	20 mg**	R%	30 mg**	R%
5,2	10,3	99,7	20,2	99,1	30,5	99,6
5,5	10,2	99,6	20,4	98,4	30,6	99,3
5,2	10,7	100,4	20,3	98,9	30,8	99,2
5,3	10,5	99,1	20,3	98,1	30,4	99,3
5,7	10,5	99,2	20,4	100,3	30,8	99,1
5,2	10,6	98,4	20,2	100,2	30,7	99,5
5,4	14,96	98,3	20,5	99,5	30,8	100,4
5,2	10,4	98,2	20,6	99,6	30,9	99,5
5,4	10,5	99,4	20,7	99,6	30,5	99,9
5,5	10,4	100,3	20,6	98,5	30,3	98,9
5,7	10,6	99,5	20,4	98,3	30,8	99,6
5,3	10,4	100,2	20,3	100,5	30,4	98,9
5,3	10,2	99,5	20,4	100,3	30,5	98,9
Média		**99,36**		**99,33**		**99,39**
Desvio padrão		**0,7284**		**0,8439**		**0,4329**
CV%		**0,7330**		**0,8495**		**0,4355**

*massa de biotina determinada previamente

** massa de biotina adicionada

5.7.1 Recuperação

O ensaio de recuperação consiste no método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analíto, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008).

O ensaio de recuperação visa garantir que o analito seja analisado na totalidade de sua massa presente na amostra, determinando a eficácia do método, uma vez que, ao receber qualquer

tipo de tratamento durante a análise, como a diluição, por exemplo, a perda do analito durante o ensaio deve ser calculada experimentalmente. Com o fator de recuperação, o resultado fica mais próximo da realidade analítica.

O fator de recuperação é obtido pela diferença entre o produto com analito e o produto sem o analito adicionado como mostra as Tabelas 3 e 4 (FARINELLI, 2008).

Neste sentido a taxa de recuperação refere-se à relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra, fortificada com uma quantidade conhecida do analito, e o valor teórico desta quantidade fortificada.

Segundo o INMETRO (2003), a recuperação é calculada da seguinte forma:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = concentração adicionada.

Tabela 4 – Ensaio de recuperação aplicado em massa adicionada de biotina à uma mistura de excipientes.

15 mg*	**15 mg****	**R %**	**25 mg***	**25 mg****	**R%**	**35 mg***	**35 mg****	**R%**
15,3	15,22	99,5	25,4	25,29	99,6	35,5	35,23	99,5
15,4	15,27	99,2	25,3	25,14	99,4	35,4	35,11	99,2
15,6	15,61	100,1	25,5	25,21	98,9	35,3	34,91	98,9
15,1	15,06	99,8	25,7	25,46	99,1	35,2	34,98	99,4
15,7	15,73	100,2	25,8	25,61	99,3	35,5	35,21	99,2
15,0	14,95	99,7	25,6	25,39	99,2	35,7	35,37	99,1
15,3	14,96	97,8	25,7	25,46	99,1	35,6	35,70	100,3
15,6	15,31	98,2	25,8	25,59	99,2	35,7	35,52	99,5
15,7	15,62	99,5	25,8	25,85	100,2	35,6	35,49	99,7
15,3	15,33	100,2	25,6	25,62	100,1	35,9	35,50	98,9
15,7	15,65	99,7	25,4	25,47	100,3	35,6	35,42	99,5
15,4	15,44	100,3	25,3	25,17	99,5	35,6	35,70	100,3
15,3	15,26	99,8	25,6	25,42	99,3	35,7	35,73	100,1
Média		**99,53**			**99,47**			**99,50**
Desvio padrão		**0,757**			**0,451**			**0,478**
CV%		**0,7605**			**0,4534**			**0,4804**

*Massa de biotina determinada previamente

** Massa de biotina adicionada

5.8 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este representa em face de pequenas e deliberadas variações. Diz-se que um método é robusto se se revelar praticamente insensível a

mínimas alterações que possam ocorrer quando este está sendo executado (INMETRO, 2003).

Neste trabalho, a massa de biotina de aproximadamente 25 mg foi ensaiada considerando as variações do protocolo fatorial proposto por Yuden-Steiner (US-FDA, 1994). O Tratamento estatístico aplicado para verificar se havia diferenças significativas entre os resultados obtidos, comprovou que o método é robusto.

Ainda de acordo com Quinete (2005), com os dados obtidos dos efeitos destes parâmetros, pode-se delimitar a faixa aceitável de valores a ser incluída no método final como podemos visualizar na Tabela 5.

Tabela 5 - Modelo e resultados experimentais para avaliação da robustez pelo método de Yunden-Steiner (US-FDA, 1994).

	Experimentos								**Variação dos fatores**	
	1	2	3	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**Nomi Nal**	**Varia ções**
Temperatura	31	31	31	**31**	**27**	**27**	**27**	**27**	**31**	27
Conc. NaOH	0,1	0,12	0,1	**0,12**	**0,1**	**0,12**	**0,1**	**0,12**	**0,1**	0,12
Conc. HCl	0,1	0,1	0,12	**0,1**	**0,12**	**0,1**	**0,12**	**0,1**	**0,1**	0,12
Agitação	N	L	N	**L**	**L**	**N**	**L**	**N**	**N**	L
Vol. Adição do HCl	10 µL	20 µL	10 µL	**20 µL**	**10 µL**	**20 µL**	**10 µL**	**20 µL**	**10**	20
Vol NaOH	15	15	12	**12**	**15**	**15**	**12**	**12**	**15**	12
% Recupera Cão	99,7	99,5	99,8	**99,5**	**99,6**	**99,7**	**99,6**	**99,7**		
Média	25,4	25,3	25,2	25,3	25,2	25,3	25,2	25,3		
Desvio-padrão	0,45	0,51	0,34	**0,43**	**0,47**	**0,46**	**0,38**	**0,35**		

Onde: N = Normal
L = Lenta

6 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, através dos experimentos executados, podemos afirmar que:

1 – O método de doseamento da biotina, através da titulação indireta utilizando pontenciômetro automático demonstrou linearidade no intervalo de 5 a 35 mg, com adição inicial de 15 mL de NaOH 0,1N, e o excesso de álcali determinado por titulação com HCl 0,1N, todos devidamente corrigidos a sua molaridade com padrões primários.

2 – O intervalo linear observado no protocolo experimental de validação é de 10 a 35 mg, desde que seja utilizado volume de 15 mL de solução de NaOH 0,1N inicial.

3 – A faixa linear de trabalho compreende o intervalo de 20 a 35 mg de biotina, quando queremos assumir uma precisão melhor que 1%; para uma precisão melhor que 2% o intervalo é de 10 a 35 mg.

4 - O limite detectado observado para as condições do equipamento é de 5 mg. O limite de quantificação pode ser assumido como 20 mg, para precisão de 1%.

5 – O ensaio conduzido para avaliar a robustez do método permite assinalar que o método é robusto.

6 – A recuperação do analito é excelente, bem como a sua seletividade.

7 - O método proposto tem demonstrado ser superior aos métodos relatados na literatura, com respectiva velocidade, simplicidade, sensibilidade, baixo custo e baixa geração de resíduos.

8 - Estas vantagens associadas à alta exatidão e precisão, tornam o método adequado para o uso rotineiro.

7 REFERÊNCIAS

ABREU, A. B. G.; MATTA, M. H. R.; MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.1, p.35-36, 2008.

ANICETO, C.; CANAES, L. S.; CAVALHEIRO, C. C. S.; FILHO, O. F. Determinação espectofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. **Química Nova,** São Paulo, v.23, n.5, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR/IEC 17024:** requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**,** Rio de Janeiro, 2001.

AUDRAN, M.; BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, London, v.686, p.3-10, 1996.

BALIZA, P. X. **Estudo potenciométrico de reações oscilantes para determinação de ácido ascórbico, por perturbações do padrão de oscilação**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Visçosa, Visçosa, 2006.

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

BASQUES, J. C. Validação de métodos quantitativos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANALISES CLÍNICAS. 34., 2007, Belo Horizonte. **Anais…**Belo Horizonte, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Resolução - RE nº 899*,* de 29 de maio de 2003, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para qualidade em química analítica:** uma assistência à habilitação. Brasília, DF, p.41-42, 2005.

BRITO, N. M.; AMARANTE Jr., O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas,** v.13, p.129-46, 2003.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, v.689, p.175-180, 1997.

CHASIN, A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **R. Farm. Bioquim.**, v.30, n.2, p.49-53, 1994.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING. **Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for codex purposes**, CX/MAS 95/3, 1995.

CURRIE, L. A.; SVEHLA, G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. **Pure & Appl. Chem**., Research Triangle Park, v.66, n.3, p.595-908, 1994.

ELLISON, S. L. R.; THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.,** London, v.74, n.5, p.835-855, 2002.

EURACHEM WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods,** A laboratory guide to method validation and related topics, 1998.

EUROPEAN COMMISSION. **Guidance document on residue analytical methods,** SANCO/825/00, 2000.

FARINELLI, J. **Avaliação, modificação e validação de metodologia para estudo de estabilidade de hidroquinona em creme.** 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Anal. Chim. Acta**, London, v.391, p.239-252, 1999.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2004, p.50-52.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **J. Chromatogr. B**, London, v.686, p.77-80, 1996.

FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A.; MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.11, n.4, 2006.

GIBNEY, M. J.; VORSTER, H. H.; KOK, F. J. **Introdução à nutrição humana**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.253-253.

GRAVEL, R. A; NARANG, M. A. Molecular genetics of biotin metabolism: old vitamin, new science. **Journal of Nutritional Biochemistry**, London, v.16, p.428-431, 2005.

HEALY, S.; CADAHIA, B. P.; JIA, D.; McDONALD, M. K.; DAVIE, J. R.; GRAVEL, R. A. Biotin is not a natural histone modification**. Biochimica et Biophysica Acta**, London, p.719-733, 2009.

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

HORWITZ, W. International union of pure and applied chemistry. **Pure & Appl. Chem.,** Washington, v.67, n.2, p.331-343, 1995..

HUBERT, P.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; MARTIN, S. B.; CAVALEIRO, P.; GRANDJEAN, D.; LAGORCE, P.; LALLIER, M.; LAPARRA, M. C.; NIVET, M. L. J. C. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta**, London, v. 391, p.135-139, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003, 36p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of analytical procedures:** definitions and terminology; Availability, US Department of Health and Human Services (HHS); Federal Register, v.60, n.40, p.11260-11265, 1995.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **General requeriments for the competence of testing and calibration laboratories**, ISO/IEC 17025, 1999.

KRULL, I.; SWARTZ, M. Quantitation in method validation. **LC-GC**, v.16, n.12, p.1084-1090, 1998

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

MASSART, D. L.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.; **Analusis.,** 1994, *22*, M14.in Aragão, N.M., Veloso, M.C.C., Andrade, J.B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (clae) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas**. Quimica Nova***,* v.32, n.9, p.2476-2481, 2009.

McDONALD, R. D. The role of laboratory information management

systems (LIMS) in analytical method validation. **Anal. Chim. Acta**, London, v. 391, p.149-158, 1999.

MORENO, A. H. **Desenvolvimento de técnicas analíticas instrumentais de baixo custo para análise de medicamentos**. 2003. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2003.

PEREIRA, D. M. C.; ARCOS, M. A. S. V.; AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A. Comparação de métodos dicromatométricos para determinação de ferro total em minérios de ferro. **Assoc. Bras. Quím**, v.49, n.4, p.198-203, 2000.

QUINETE, N. S. **Extração de poluentes organoclorados persistentes em fragmentos remanescentes da mata atlântica, RJ:** comparação de métodos. 2005. 155 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Fluminense de Niterói, Rio de Janeiro, 2005.

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

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.1, 2008.

ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

RODOVALHO, W. **Estudos metodológicos visando a síntese da biotina a partir da hidantoína.** 2008. 58 f. Tese (Doutorado em

Química) – Universidade de Brasília; Instituto de Química, Brasília, DF, 2008.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference on harmonization. **J. Chromatogr. A,** United Kingdom, v.987, p.57-66, 2003.

SLATER, B.; PHILIPPI, S. T.; MARCHIONI, D. M. L.; FISBERG, R. M**.** Validação de questionário de freqüência alimentar - QFA: considerações metodológicas. **Revista Brasileira de Epidemiologia,** São Paulo, v.6, n.3, 2003.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.**, São Paulo, v.2, n.3, p.12-20, 1998.

TAVARES, P. **Métodos instrumentais de análise I**. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2002.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Reviewer guidance***,* validation of chromatographic methods, 1994.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (US-FDA). **Guidance for industry***,* analytical procedures and methods validation, 2000.

VALENTINI, S. R . **Atributos da validação da metodologia analitica do captopril num programa de garantia da qualidade.** 2002. 122 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

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

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.18, p.616-623, 1999.

WIELING, J.; HENDRIKS, G.; TAMMINGA, W. J.; HEMPENIUS, J.; MENSINK, C. K..; OOSTERHUIS, B.; JONKMAN, J. H. G. Rational experimental desing for bioanalytical methods validation: illustration using an assay method for total captropil in plasma. **J. Chromatogr. A**, London, v.730, p.381-394, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS. Thirty-second report, **WHO Technical Report Series**, Geneva, n.823, 1992.

ZERZANOVA, A.; ZIZKOVSKY, V.; KUCERA, R.; KLIMES, J.; JESENSKY, I.; DOHNAL, J.; BARRON, D. Using of HPLC coupled with coulometric detector for the determination of biotin in pharmaceuticals**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** London, v.45, p.730–735, 2007.

CAPÍTULO II:

ATRIBUTOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA BIOTINA EMPREGANDO A TÉCNICA POTENCIOMETRICA

Artigo enviado para publicação na Revista Alimentos e Nutrição (ISSN **0103-4235)**

ATRIBUTOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DA BIOTINA EMPREGANDO A TÉCNICA POTENCIOMETRICA

Gabriela Soldi Gonçalves[1], José Paschoal Batistuti[1]*

Resumo

GONÇALVES, Gabriela Soldi, M.Sc., Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Dezembro de 2010. **Atributos da validação do método analítico para quantificação da biotina empregando a técnica potenciometrica**. Orientador: José Paschoal Batistuti.

O presente trabalho consiste no desenvolvimento de um método analítico, para determinação de biotina, utilizando-se a potenciometria indireta. O objetivo é apresentar a validação de métodos analíticos como um processo que estime eficiência da metodologia proposta na rotina do laboratório para garantia da qualidade total. É um método que envolve equipamento simples e pouco dispendioso como o potenciômetro, que possibilita medir com precisão o valor da concentração de biotina. O doseamento quantitativo de biotina baseia-se no estudo das reações oscilantes do analito perante as análises da titulação indireta utilizando potenciômetro automático. A concentração de biotina foi determinada com massa adicionada conhecida numa matriz que simula uma cápsula, contendo aerosil (1%), estearato de magnésio (1%), celulose microcristalina (20%), amido (40%) e lactose q.s.p. Os resultados mostraram um valor médio de biotina (massa adicionada de aproximadamente 25 mg) determinada de 99,4% com desvio-padrão de 0,0345. As condições experimentais como temperatura, vidraria e concentração dos reagentes, foram otimizadas. Os parâmetros investigados no processo de validação para demonstrar o desempenho do método foram: especificidade, linearidade, intervalo, precisão tanto repetitividade, quanto intermediária, exatidão e robustez. O tratamento estatístico dos dados da validação do método analítico envolveu a determinação da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação. Para obtenção da curva de calibração se fez necessária a determinação da equação da reta, regressão linear e coeficiente de correlação linear. Este método apresenta grande aplicabilidade a soluções turvas, fluorescente, opacas ou coradas, ou quando não existem, ou não podem aplicar-se indicadores visuais apropriados. Possibilidade de determinação de uma sucessão de pontos de equivalência na titulação de diversos componentes em uma mistura. A metodologia para determinação de biotina mostrou-se um procedimento eficiente, na qual a montagem do sistema pode ser reutilizada em outros estudos de validação de métodos analíticos apresentando baixo custo e pouca utilização de reagentes.

Palavra-chave: biotina, validação e titulação potenciométrica.

Abstract

GONÇALVES, Gabriela Soldi, M.Sc., Universidade Estadual Paulista, Araraquara, December 2010**. Validation attributes of the analytic methodology of the quantity biotin through potentiometry.** Adviser: José Paschoal Batistuti.

The present work shows the development of an analytical methodology for the determination of biotin by using indirect potentiometry. The main goal is to present the validation of analytical methods as a process to estimate the efficiency of the proposed methodology in the laboratory routine for the guaranty of total quality. This method involves simple and low cost devices as the potentiometer, which allows the precise measurement of biotin concentration. The quantitative dosing of biotin is based on the study of the oscillating chemical reactions with the analyte by performing the analysis of the indirect titration with an automatic potentiometer. Biotin concentration was determined by adding a known mass to a matrix that simulates a capsule containing aerosol (1%), estearato de magnésio (1%), celulose microcristalina (20%), amido (40%) e lactose q.s.p. The results showed an average value for the determination of biotin (added mass was ca. 25 mg) of 99.4% with a standard deviation of 0.0345. The experimental conditions as temperature, glassware, and concentration of the chemicals were optimized. The investigated parameters of the validation procedure to demonstrate the performance of the method were: specificity, linearity, interval, precision (repeatability and intermediate), exactness and robustness. The statistical treatment of the data for the validation of the analytical method involved the determination of the average value, standard deviation, and the variation coefficient. In order to obtain the calibration curve, the line´s equation, the linear regression and the coefficient of linear correlation were determined. This method shows great applicability for turbid, fluorescent, opaque or color solutions, or if an appropriate visual indicator is not available or cannot be applied. The method also shows the possibility for the determination of a sequence of equivalence points on the titration of several components in a mixture. The methodology for the biotin determination showed to be an efficient procedure, and the system assembly can be reused in other validation studies of analytical methods with low costs and low consumption of chemicals.

Keywords: biotin, validation and potentiometric titration.

[1] Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Julio de Mesquita Filho (UNESP).

*Autor para correspondência. Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Julio de Mesquita Filho (UNESP), Tel (16) 3301-6933, batistut@fcfar.unesp.br.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido, envolve processo de avaliação que estime sua eficiência, ou "performance" na rotina do laboratório, com evidências objetivas (BRITO et al, 2003). Várias definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se, portanto, de termo não-específico.

Determinado método é considerado validado se suas características estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos. Portanto, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Esta deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (WALSH, 1999). A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos.

A literatura dispõe de vários trabalhos que relatam a validação de métodos analíticos (AUDARN; BRESSOLLE; BROMET-PETIT, 1996; CAUSON, 1997; CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994; CURRIE; SVEHLA, 1994; FEINBERG; RAGUÈNÈS, 1999; FRANCOTTE; DAVATZ; RICHERT, 1996; HUBERT et al, 1999; McDONALD, 1999; PEREIRA et al, 2000; WIELING et al, 1996) e definem os critérios que devem ser seguidos durante seu desenvolvimento. Dentre estes, muitos são das áreas biológica (AUDRAN; BRESSOLLE; BROMET-PETIT, 1996; CAUSON, 1997; HUBERT et al, 1999; WIELING et al, 1996), farmacêutica (AUDARN; BRESSOLLE; BROMET-PETIT, 1996; CHASIN; CHASIN; SALVADORI, 1994; FRANCOTTE; DAVATZ; RICHERT, 1996) e química (CURRIE; SVEHLA, 1994; FEINBERG; RAGUÈNÈS, 1999; McDONALD, 1999; PEREIRA et al, 2000). Tais artigos abordam os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e de quantificação.

As aplicações da metrologia na área de química analítica ou controle de qualidade de alimentos são enormes. Veja o exemplo das necessidades humanas de ingerir alimentos que devem ter suas características nutricionais em conformidade às especificações regulamentadas e livres de componentes indesejáveis. Assim os exames laboratoriais devem ser conduzidos por métodos que permitam obter resultados confiáveis (THOMPSON, 2002).

A **biotina**, também conhecida como **vitamina H**, **vitamina B_7** ou **vitamina B_8**, é uma molécula da classe das vitaminas que funciona como cofator enzimático. Necessária no

metabolismo das proteínas e dos carboidratos, ela age diretamente na formação da pele e indiretamente na utilização dos hidratos de carbono (açúcares e amido) e das proteínas. Tem como principal função neutralizar o colesterol (diretamente ligado à obesidade). É uma vitamina hidrossolúvel. A biotina tem a fórmula química $C_{10}H_{16}O_3N_2S$. As principais fontes alimentares de biotina são frutas, nozes, ovos, carnes, leite e levedura. Também é produzida por bactérias intestinais. A carência de biotina no homem apesar de rara pode causar dermatite esfoliativa, conjuntivite, descoloração da pele e mucosas, furunculose, seborréia do couro cabeludo e dores musculares (FRANCO, 2004).

A potenciometria é, atualmente, um método alternativo que permite o uso da titulação para determinar as propriedades químicas dos alimentos. Este é um método primário, de custo reduzido e sem geração de resíduos que podem agredir o meio ambiente, cujos equipamentos não necessitam de vultuosos investimentos para o controle de qualidade de matérias-primas ou produtos alimentares acabados.

Tendo em vista que a biotina é um ácido fraco, e pelas propriedades químicas é possível determinar a sua concentração, através da titulação de neutralização. Para tanto foi proposto um método de titulação indireta, com auxílio de um potenciômetro automático, para efetuar a validação. O objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um método quantitativo para doseamento da biotina utilizando a titulação potenciométrica automática.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

As determinações foram realizadas com auxílio de vidraria calibrada e titulador potenciométrico automático (Metrohm 848 Titrino).

Biotina, padrão primário, obtido junto à empresa Sigma Aldrich.

A matéria-prima utilizada foi biotina manipulada obtida junto a uma drogaria na cidade de Araraquara/SP.

Os reagentes utilizados foram Ácido clorídrico (HCl) 0,1N e Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N ambos de grau P.A.

2.2 Métodos

A determinação da concentração da biotina em solução foi realizada com auxílio da potenciometria, com eletrodo de vidro para titulação ácido-base.

Este tipo de titulação potenciométrica requer o controle constante das diversas etapas, anotando o volume de reagente dosado e o respectivo potencial. Os dados obtidos foram utilizados para construção da curva de titulação, na qual é calculado o volume de reagente gasto até o ponto de equivalência e a concentração da espécie analisada**.** Alíquotas de biotina foram diluídas em meio alcalino com 15mL de NaOH **0,1 N**, sob constante agitação por trinta segundos onde posteriormente a solução foi titulada com ácido clorídrico **0,1 N** – devidamente fatorado – e o ponto de equivalência da reação determinado pela máxima variação da diferença de potencial apresentada, através do monitoramento com potenciômetro.

2.2.1 Padronização do HCl

Para padronizar o ácido clorídrico (HCl) utilizou-se um padrão primário, carbonato de sódio (Na_2CO_3), de valor conhecido, considerando sua massa molecular 105,99 g/mol e valência 2.

2.2.2 Padronização do NaOH

Para padronizar o hidróxido de sódio (NaOH) utilizou-se um padrão primário, biftalato de potássio ($KC_8H_5O_4$), de valor conhecido, considerando sua massa molecular de 204,22 g/mol.

2.3 Curva Analítica de Linearidade

A curva analítica de linearidade foi ensaiada com 10 repetições para cada concentração de biotina no intervalo entre 5 a 35 mg.

2.4 Faixa Linear de Trabalho.

O intervalo linear de trabalho da curva de calibração deriva do estudo de linearidade do método o qual foi calculado relacionando a diferença entre a massa determinada e adicionada de biotina (Y-Yo).

2.5 Precisão

A precisão foi determinada através da repetitividade de três massas diferentes, sendo cada uma delas submetida a 10 repetições, no mesmo dia, com mesmo operador.

2.6 Exatidão.

De acordo com Barros (2002), a exatidão de um método analítico é verificada quando são obtidos resultados muito próximos em relação ao valor verdadeiro, a exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança. A partir de 10 repetições de massas de biotina, adicionada à matriz (Aerosil 1%, estearato de magnésio 1%, celulose microcristalina 20%, amido 40% e lactose q.s.p.), em três diferentes concentrações, e após obtenção dos resultados calculou-se a sua exatidão.

2.7 Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, na determinação da concentração da biotina, em diferentes massas adicionadas.

2.8 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto específico independente da matriz da amostra e de suas impurezas. Para tanto, efetuou-se 10 repetições de uma determinada concentração de biotina, adicionada a matriz descrita no item 4.6 e 5.5, calculando a massa determinada na presença desta matriz.

2.9 Limite de Quantificação (LQ)

O Limite de Quantificação corresponde a massa determinada com uma incerteza conhecida. No presente trabalho calculou-se a massa com incerteza determinada, em 10 repetições.

2.10 Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. No trabalho determinou-se o limite de detecção do equipamento pela razão ruído/sinal apresentado pelo equipamento de acordo com a concentração de analito presente na amostra.

2.11 Robustez

A robustez refere-se à sensibilidade do método apresentada nas mínimas variações que possam ocorrer quando este está sendo executado.

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Experimentalmente, um protocolo fatorial proposto por Yuden-Steiner, foi utilizado

para avaliar a robustez, cujas variáveis foram; concentração de NaOH, velocidade de agitação, velocidade de adição do titulante e temperatura.

2.12 Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis. Este parâmetro deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta). Para tanto, também realizou 10 repetições para os ensaios experimentais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo proposto e realizado através da parte experimental, possibilitou atingir o objetivo específico do trabalho, definido como determinação da biotina por potenciometria de neutralização aplicando os parâmetros da validação de métodos analíticos. Com estas características alcançadas, pode-se assegurar o cumprimento das normas regulatórias.

3.1 Determinação da concentração da biotina na matéria-prima e no padrão primário.

As Figuras 1 e 2, mostram os resultados obtidos para a determinação da concentração de biotina contida na matéria-prima, que foi utilizada para validar os parâmetros do método, comparando com a concentração obtida da biotina com o padrão primário. Para determinar a sua concentração de biotina na matéria prima, calculou-se a relação entre os coeficientes angulares de equações da reta obtida na titulação potenciométrica.

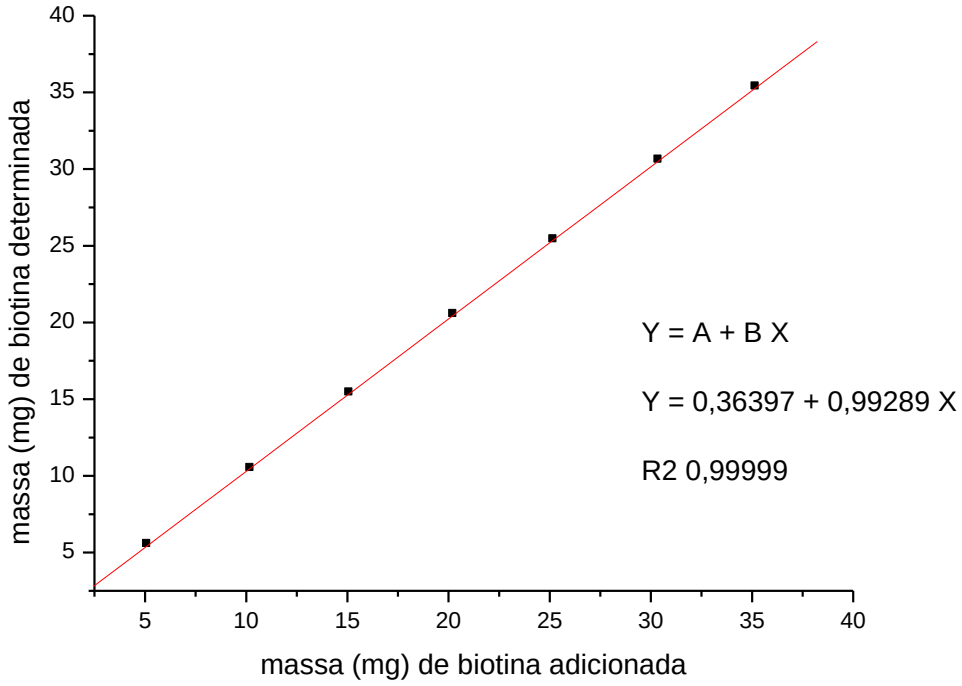


Figura 1 – Relação massa (mg) de biotina adicionada e determinada do padrão (Sigma-Aldrich).

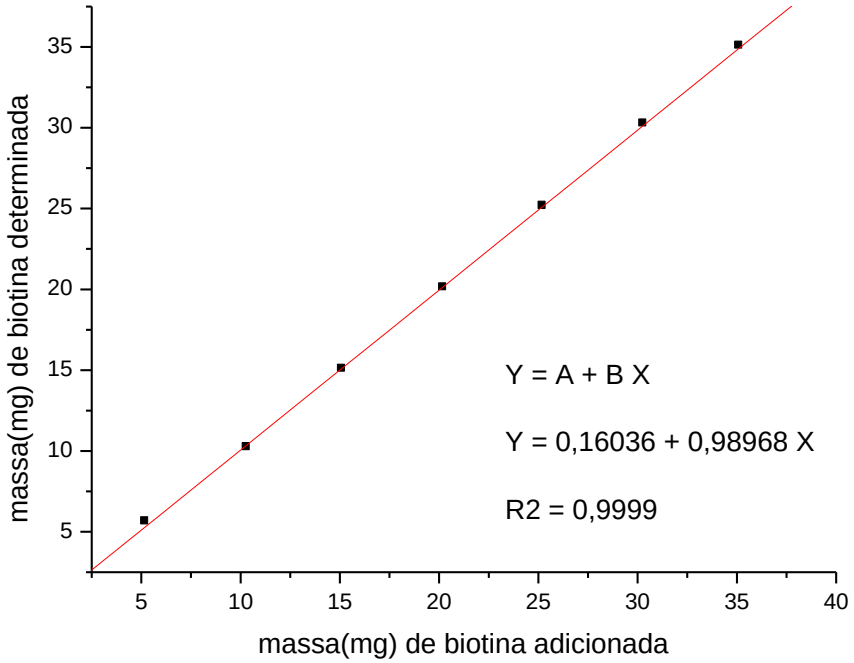


Figura 2 – Relação massa (mg) de biotina adicionada e determinada da matéria-prima.

Portanto a fator de correção a ser aplicado para determinar a concentração de biotina na matéria prima é dado pela relação entre o coeficiente angular da matéria prima/coeficiente angular do padrão, ou seja 0,98968/0,99298 = 0,996676

3.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de biotina, dentro de um intervalo especificado. Para tanto realizaram-se ensaios com cinco concentrações diferentes de biotina, no intervalo de 5 a 35 mg da concentração a ser preconizada pelo método.

A linearidade em um procedimento analítico representa a capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A linearidade pode ser calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r^2) é frequentemente usado para indicar o quanto deve ser considerada adequada a reta como modelo matemático (QUINETE, 2005). Como os desvios de linearidade são difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão (INMETRO, 2003).

Julga-se satisfatória a linearidade do gráfico quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade (CURRIE; SVEHLA, 1994).

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada. Assim, é necessário obter coeficiente de correlação estatisticamente igual a 1 (um) e coeficiente angular diferente de 0 (zero).

Linearidade é o desempenho do equipamento de medição ao longo de toda sua faixa de uso. É a diferença da tendência numa determinada faixa do Sistema de Medição (SM). Para o estudo de linearidade utilizar várias peças cujos valores de referência contemplem a faixa de uso do equipamento. As medições são efetuadas e a tendência registrada é observada. Através de um estudo de regressão verifica-se se a tendência é função do valor de referência.

O estudo da linearidade do dispositivo de medição revela se a tendência observada nos valores medidos é ou não função da magnitude do valor medido.

No presente trabalho a linearidade foi obtida através do ensaio de 10 (dez) repetições de massas diferentes, e calculou-se a sua linearidade, entre as massas adicionadas de biotina e os respectivos valores obtidos, pelo coeficiente de correlação, e o resultado é mostrado na Figura 3. Nesta figura está a equação da reta obtida e seu coeficiente de correlação, existindo um excelente valor de correlação e linearidade para o método proposto.

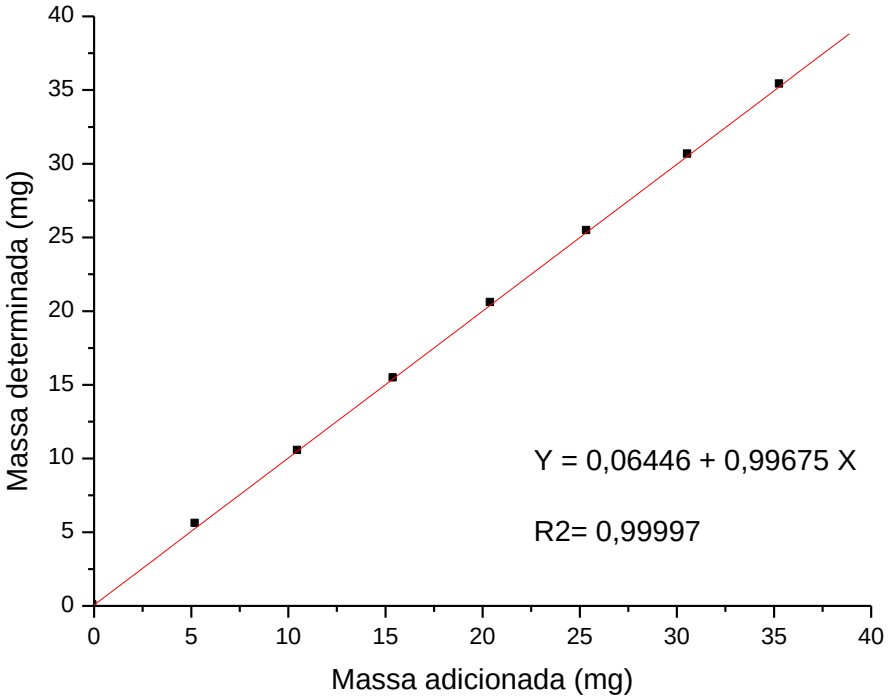
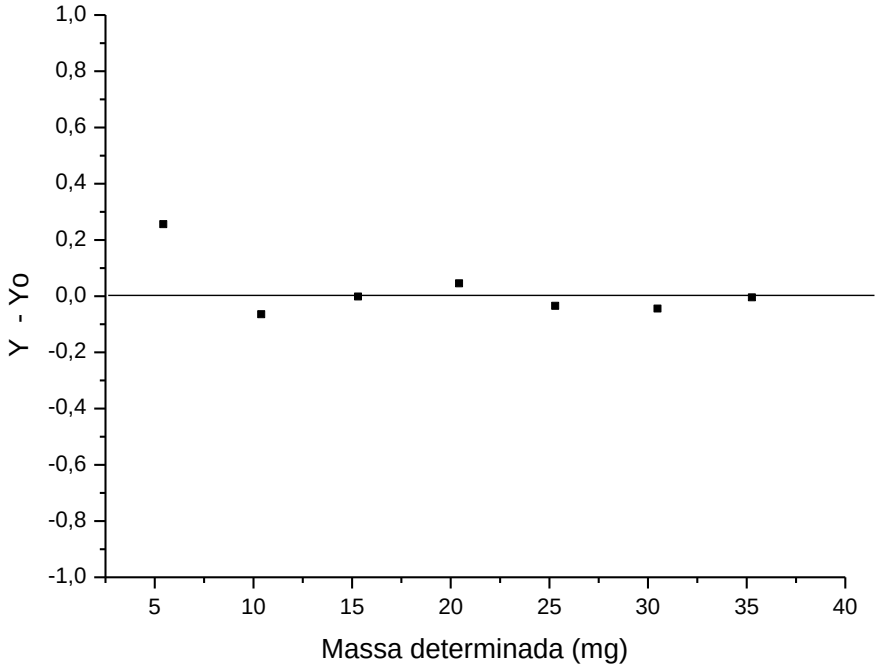


Figura 3 – Determinação da curva analítica de linearidade da biotina, obtida com n= 10 obtida pela titulação potenciométrica indireta.

A curva analítica de linearidade informa-nos apenas a linearidade entre os valores adicionados do analito e a respectiva massa encontrada, entretanto, é necessário investigar dentro desta linearidade observada, qual seria o intervalo do método em que a incerteza da medição é a menor, e se mantém linearidade. Para tanto calcularam-se os valores de desvio-padrão para cada determinação de repetição, juntamente com sua média, e a partir da relação entre o coeficiente do desvio e média, pela massa nominalmente adicionada, obteve-se a Figura 4. Os resultados indicam que a menor incerteza de medição na curva analítica situa-se entre 10 e 35 mg.



Y = massa de biotina determinada

Yo= massa de biotina adicionada

Figura 4 – Avaliação da linearidade a partir dos resíduos (Y-Yo) obtidos a partir de massa de biotina determinada e dos valores de Yo, calculados.

3.3 Faixa linear de trabalho

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade, exigidas sob condições específicas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003).

No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (QUINETE, 2005).

Em qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito no qual o método pode ser aplicado. Os primeiros valores da faixa podem ser os valores dos

limites de detecção e de quantificação e os últimos dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

Para escolher a faixa de trabalho procede-se da seguinte maneira: quando se tem uma amostra específica, a concentração esperada deve se situar no meio da faixa de trabalho e quando a concentração do analito é desconhecida utiliza-se a faixa de trabalho estudada para amostras diversificadas. Os valores medidos têm que estar dentro da faixa de trabalho, e os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de trabalho têm que ser diferente dos brancos dos métodos (ICH, 1995).

Na Figura 5, encontramos um intervalo de trabalho, situado entre 10 e 35 mg, entretanto, se assumirmos precisão esperada melhor que 1%, a faixa linear de trabalho será de 20 a 35 mg de biotina, assumindo uma precisão melhor que 2% a faixa linear de trabalho permanece entre 10 e 35 mg de biotina.

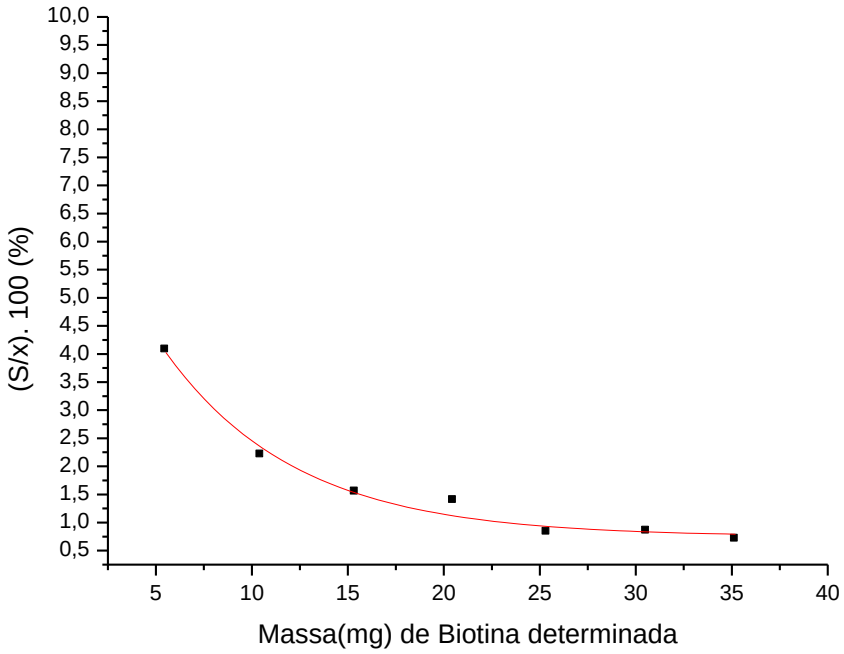


Figura 5 – Determinação do limite inferior da faixa linear de trabalho, através da correlação (S/x) 100 (%) x massa de biotina determinada. Assumiu-se precisão esperada para o método melhor que 1%.

3.4 Limite de Detecção e de Quantificação

O LD representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, ou seja, demonstra a sensibilidade ao princípio ativo (ROCA et al, 2007).

Na verdade quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito ou de uma propriedade, é importante identificar o menor valor da concentração que pode ser detectado pelo método analítico.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento (INMETRO, 2003).

O limite de detecção do método (LDM) para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. Portanto é fundamental certificar-se de que todas as etapas de processamento do método sejam incluídas na determinação deste limite de detecção (INMETRO, 2003).

O LD de um analito é muitas vezes determinado pela análise repetida de uma porção de amostras de brancos, e é a concentração de analito cuja resposta é equivalente à resposta média de brancos mais três desvios padrão. É possível que seu valor seja diferente para diferentes tipos de amostra (BRASIL, 2005)

O LD do método será determinado experimentalmente utilizando sucessivas diluições a partir da solução padrão de concentração 0,1N.

O LQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. Segundo Brasil (2005), 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). Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão da medição do branco (INMETRO, 2003).

A diferença entre os limites de detecção e de quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas (INMETRO, 2003).

Assim fatores consideráveis na definição dos limites de detecção são: ruído do equipamento, efeitos de matriz e interferentes e a variabilidade nos processos de extração (QUINETE, 2005).

Este método mostrou que para o equipamento utilizado o limite em que pode ser determinado o ponto de equivalência é de 5 mg, portanto, este é o limite de detecção do equipamento, para este método proposto, conforme o protocolo estabelecido para o estudo. Valores abaixo deste o aparelho não mostra sinal confiável para que se possa fazer qualquer determinação.

3.5 Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação. A determinação da biotina foi realizada, variando-se a luminosidade, a temperatura, umidade, presença de substâncias oxidantes, a fim de verificar a influência destes parâmetros na determinação da biotina, pelo método proposto.

Está relacionado à capacidade de reposta de um composto específico (de interesse) que está associado a uma matriz com várias substâncias químicas detectáveis ou não. Um método que produz resposta para apenas um analito é denominado específico (INMETRO, 2003).

Assim a seletividade está voltada ao processo de detecção através da capacidade de medir com exatidão o analito de interesse, em presença de outros componentes ou interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra (QUINETE, 2005).

A concentração de biotina foi determinada com massa adicionada conhecida numa matriz que simula uma cápsula, contendo aerosil (1%), estearato de magnésio (1%), celulose microcristalina (20%), amido (40%) e lactose q.s.p. Os resultados mostraram um valor médio de biotina (massa adicionada de aproximadamente 25 mg) determinada de 99,4% com desvio-padrão de 0,0345.A seletividade é dada pelo coeficiente angular da reta, cujo valor encontrado é 0,99289.

3.6 Precisão.

Precisão intermediária é a precisão intercorrida, ou seja, refere-se à concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 (dois) dias diferentes com analistas diferentes.

Existem vários métodos para determinação e controle desse parâmetro de qualidade, como por exemplo, por meio de gráfico de controle de amplitude, que poderão ser aplicados para replicatas de amostra e para padrões estáveis ao longo do tempo.

Na verdade a precisão pode ser expressa de diferentes maneiras, dependendo das condições em que for calculada (BRASIL, 2005).

Pode ser considerada em três níveis diferentes: **repetitividade,** precisão intermediária e reprodutibilidade, sendo facultada a realização de dois itens (ROCA et al, 2007).

1. Repetitividade refere-se à concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista, mesma instrumentação, mesmo método, mesmo material, mesmo laboratório (BRASL, 2003), ou seja, refere-se ao grau de concordância entre os resultados das análises individuais, quando o procedimento é aplicado repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea, em condições idênticas (FREITAS; LEMOS; MARIN, 2006).

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição ao branco de várias concentrações da faixa de trabalho.

Para tanto, o protocolo projetado para este parâmetro, foi realizado envolvendo a repetitividade do método por 10 (dez) determinações, contemplando o intervalo linear do método.

As figuras 6 e 7, foram obtidas determinando a concentração de biotina em massa adicionada de aproximadamente 10 e 30 mg.

Figura 6 – Determinação da precisão por repetitividade, n=10 para massa adicionada de 10 mg.

Figura 7 – Determinação da precisão por repetitividade, n=10 para massa adicionada de 30 mg.

3.7 Exatidão

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de 10 (dez) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento.

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

$$E = \frac{CMe}{Ct} \times 100$$

Onde: CMe é a concentração média experimental

Ct é a concentração teórica

Tabela 1 – Ensaio de recuperação por fortificação para avaliação da exatidão do método.

5 mg*	10 mg**	R %	20 mg**	R%	30 mg**	R%
5,2	10,3	99,7	20,2	99,1	30,5	99,6
5,5	10,2	99,6	20,4	98,4	30,6	99,3
5,2	10,7	100,4	20,3	98,9	30,8	99,2
5,3	10,5	99,1	20,3	98,1	30,4	99,3
5,7	10,5	99,2	20,4	100,3	30,8	99,1
5,2	10,6	98,4	20,2	100,2	30,7	99,5
5,4	14,96	98,3	20,5	99,5	30,8	100,4
5,2	10,4	98,2	20,6	99,6	30,9	99,5
5,4	10,5	99,4	20,7	99,6	30,5	99,9
5,5	10,4	100,3	20,6	98,5	30,3	98,9
5,7	10,6	99,5	20,4	98,3	30,8	99,6
5,3	10,4	100,2	20,3	100,5	30,4	98,9
5,3	10,2	99,5	20,4	100,3	30,5	98,9
Média		**99,36**		**99,33**		**99,39**
Desvio-padrão		**0,7284**		**0,8439**		**0,4329**
CV %		**0,7330**		**0,8495**		**0,4355**

*massa determinada previamente

** massa adicionada

3.7.1 Recuperação

O ensaio de recuperação consiste no método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analíto, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008).

O ensaio de recuperação visa garantir que o analito seja analisado na totalidade de sua massa presente na amostra, determinando a eficácia do método, uma vez que, ao receber qualquer tipo de tratamento de análise, como a diluição, por exemplo, a perda do analito durante o ensaio deve ser calculada experimentalmente. Com o fator de recuperação, o resultado fica mais próximo da realidade analítica.

O fator de recuperação é obtido pela diferença entre o produto com analito e o produto sem o analito adicionado (FARINELLI, 2008).

Neste sentido a taxa de recuperação refere-se à relação entre o resultado experimental obtido depois da análise de uma amostra fortificada com uma quantidade conhecida do analito, e o valor teórico desta quantidade fortificada.

Segundo o INMETRO (2003), a recuperação é calculada da seguinte forma:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

onde: C_1 = concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = concentração adicionada.

O ensaio de recuperação foi realizado por fortificação para avaliação da exatidão do método. Para tanto, massas de biotina foram determinadas previamente nas concentrações de 5mg, 15mg, 25mg e 35mg. Para massa de biotina na concentração de 5mg adicionou-se concentrações de 10mg, 20mg e 30mg de biotina respectivamente como mostra as Tabelas 1 e 2.

Para massa de 15mg de biotina foi adicionada 15mg de biotina para o ensaio de recuperação do método. Em 25mg de biotina determinada previamente foi adicionada 25mg de biotina para verificar a porcentagem de recuperação. Para 30mg de biotina determinada previamente foi adicionada 30mg de biotina.

Para calcular a porcentagem de Recuperação considerou-se a concentração de biotina determinada na amostra fortificada menos a concentração de biotina determinada na amostra não fortificada dividido pela concentração de biotina adicionada e multiplicada por 100. Posteriormente calculou-se a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação, obtendo-se ótima porcentagem de recuperação de biotina próxima a 100%.

Tabela 2 – Ensaio de recuperação aplicado em massa adicionada de biotina à uma mistura de excipientes.

15 mg*	15 mg**	R %	25 mg*	25 mg**	R%	35 mg*	35 mg**	R%
15,3	15,22	99,5	25,4	25,29	99,6	35,5	35,23	99,5
15,4	15,27	99,2	25,3	25,14	99,4	35,4	35,11	99,2
15,6	15,61	100,1	25,5	25,21	98,9	35,3	34,91	98,9
15,1	15,06	99,8	25,7	25,46	99,1	35,2	34,98	99,4
15,7	15,73	100,2	25,8	25,61	99,3	35,5	35,21	99,2
15,0	14,95	99,7	25,6	25,39	99,2	35,7	35,37	99,1
15,3	14,96	97,8	25,7	25,46	99,1	35,6	35,70	100,3
15,6	15,31	98,2	25,8	25,59	99,2	35,7	35,52	99,5
15,7	15,62	99,5	25,8	25,85	100,2	35,6	35,49	99,7
15,3	15,33	100,2	25,6	25,62	100,1	35,9	35,50	98,9
15,7	15,65	99,7	25,4	25,47	100,3	35,6	35,42	99,5
15,4	15,44	100,3	25,3	25,17	99,5	35,6	35,70	100,3
15,3	15,26	99,8	25,6	25,42	99,3	35,7	35,73	100,1
Média		**99,53**			**99,47**			**99,50**
Desvio padrão		**0,757**			**0,451**			**0,478**
CV%		**0,7605**			**0,4534**			**0,4804**

*Massa de biotina adicionada

** Massa de biotina adicionada

3.8 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este representa em face de pequenas e deliberadas variações. Diz-se que um método é robusto se se revelar praticamente insensível a mínimas alterações que possam ocorrer quando este está sendo executado (INMETRO, 2003).

Pode ser avaliado pela variação de parâmetros como marca, concentração de solvente e tipo de agitação (ROCA et al, 2007).

Ainda de acordo com Quinete (2005), com os dados obtidos dos efeitos destes parâmetros, pode-se delimitar a faixa aceitável de valores a ser incluída no método final como podemos visualizar na Tabela 3.

Tabela 3 - Modelo e resultados experimentais para avaliação da robustez pelo método de Yunden-Steiner (US-FDA, 1994).

	Experimentos								**Variação dos fatores**	
	1	2	3	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**Nomi Nal**	**Varia ções**
Temperatura	31	31	31	**31**	**27**	**27**	**27**	**27**	**31**	27
Conc. NaOH	0,1	0,12	0,1	**0,12**	**0,1**	**0,12**	**0,1**	**0,12**	**0,1**	0,12
Conc. HCl	0,1	0,1	0,12	**0,1**	**0,12**	**0,1**	**0,12**	**0,1**	**0,1**	0,12
Agitação	N	L	N	**L**	**L**	**N**	**L**	**N**	**N**	L
Vol. Adição do HCl	10 µL	20 µL	10 µL	**20 µL**	**10 µL**	**20 µL**	**10 µL**	**20 µL**	**10**	20
Vol NaOH	15	15	12	**12**	**15**	**15**	**12**	**12**	**15**	12
% Recupera Cão	99,7	99,5	99,8	**99,5**	**99,6**	**99,7**	**99,6**	**99,7**		
Média	25,4	25,3	25,2	25,3	25,2	25,3	25,2	25,3		
Desvio-padrão	0,45	0,51	0,34	**0,43**	**0,47**	**0,46**	**0,38**	**0,35**		

Onde: N = Normal
L = Lenta

4 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, através dos experimentos executados, podemos afirmar que;

1 – O método de doseamento da biotina, através da titulação indireta utilizando pontenciometro automático demonstrou linearidade no intervalo de 5 a 35 mg, com adição inicial de 15 mL de NaOH 0,1N, e o excesso de álcali determinado por titulação com HCl 0,1N, todos devidamente corrigidos a sua molaridade com padrões primários.

2 – O intervalo linear observado no protocolo experimental de validação é de 10 a 35 mg, desde que seja utilizado volume de 15 mL de solução de NaOH 0,1N inicial.

3 – A faixa linear de trabalho compreende o intervalo de 20 a 35 mg de biotina, quando queremos assumir uma precisão melhor que 1%; para uma precisão melhor que 2% o intervalo é de 10 a 35 mg.

4 - O limite detectado observado, para as condições do equipamento é de 5 mg.O limite de quantificação pode ser assumido como 20 mg, para precisão de 1%.

5 – O ensaio conduzido para avaliar a robustez do método permite assinalar que o método é robusto.

6 – A recuperação do analito é excelente, bem como a sua seletividade.

7 - O método proposto tem demonstrado ser superior aos métodos relatados na literatura, com respectiva velocidade, simplicidade, sensibilidade, baixo custo e baixa geração de resíduos.

8 - Estas vantagens associadas à alta exatidão e precisão, tornam o método adequado para o uso rotineiro.

5 REFERÊNCIAS

ABREU, A. B. G.; MATTA, M. H. R.; MONTAGNER, E. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.1, p.35-36, 2008.

AUDRAN, M.; BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **J. Chromatogr. B**, London, v.686, p.3-10, 1996.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para qualidade em química analítica:** uma assistência à habilitação. Brasília, DF, p.41-42, 2005.

BRITO, N. M.; AMARANTE Jr., O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas,** v.13, p.129-46, 2003.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B**, v.689, p.175-180, 1997.

CHASIN, A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **R. Farm. Bioquim.**, v.30, n.2, p.49-53, 1994.

CURRIE, L. A.; SVEHLA, G. Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. **Pure & Appl. Chem**., Research Triangle Park, v.66, n.3, p.595-908, 1994.

ELLISON, S. L. R.; THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. **Pure Appl. Chem.,** London, v.74, n.5, p.835-855, 2002.

FARINELLI, J. **Avaliação, modificação e validação de metodologia para estudo de estabilidade de hidroquinona em creme.** 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

FEINBERG, M.; RAGUÈNÈS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Anal. Chim. Acta**, London, v.391, p.239-252, 1999.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 2004, p.50-52.

FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **J. Chromatogr. B**, London, v.686, p.77-80, 1996.

FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A.; MARIN, V.A. Validação de métodos alternativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.11, n.4, 2006.

HUBERT, P.; CHIAP, P.; CROMMEN, J.; BOULANGER, B.; CHAPUZET, E.; MERCIER, N.; MARTIN, S. B.; CAVALEIRO, P.; GRANDJEAN, D.; LAGORCE, P.; LALLIER, M.; LAPARRA, M. C.; NIVET, M. L. J. C. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta**, London, v. 391, p.135-139, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003, 36p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of analytical procedures:** definitions and terminology; Availability, US Department of Health and Human Services (HHS); Federal Register, v.60, n.40, p.11260-11265, 1995.

McDONALD, R. D. The role of laboratory information management systems (LIMS) in analytical method validation. **Anal. Chim. Acta**, London, v. 391, p.149-158, 1999.

PEREIRA, D. M. C.; ARCOS, M. A. S. V.; AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A. Comparação de métodos dicromatométricos para determinação de ferro total em minérios de ferro. **Assoc. Bras. Quím**, v.49, n.4, p.198-203, 2000.

QUINETE, N. S. **Extração de poluentes organoclorados persistentes em fragmentos remanescentes da mata atlântica, RJ:** comparação de métodos. 2005. 155 f. Dissertação

(Mestrado em Química) – Universidade Federal Fluminense de Niterói, Rio de Janeiro, 2005.

ROCA, M. F.; SOBRINHO, J. L. S.; NUNES, L. C. C.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**, London, v.18, p.616-623, 1999.

WIELING, J.; HENDRIKS, G.; TAMMINGA, W. J.; HEMPENIUS, J.; MENSINK, C. K..; OOSTERHUIS, B.; JONKMAN, J. H. G. Rational experimental desing for bioanalytical methods validation: illustration using an assay method for total captropil in plasma. **J. Chromatogr. A**, London, v.730, p.381-394, 1996.