

Validação de métodos analíticos

Requisitos regulatórios e principais exigências –
RDC 166/2017



- **Introdução**
- Parâmetros da validação
- Verificação e validação parcial



Anvisa

- RDC 166/2017 – validação de métodos analíticos

Inmetro

**DOQ-CGCRE-008 - ORIENTAÇÃO SOBRE
VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS (2011)**

Internacional

- ICH Q2 – Analytical method validation (11/2005)
- USP <1225> Validation of compendial methods

Validação

Método analítico

Procedimentos

Processos

Qualificação

Equipamentos

Fornecedores

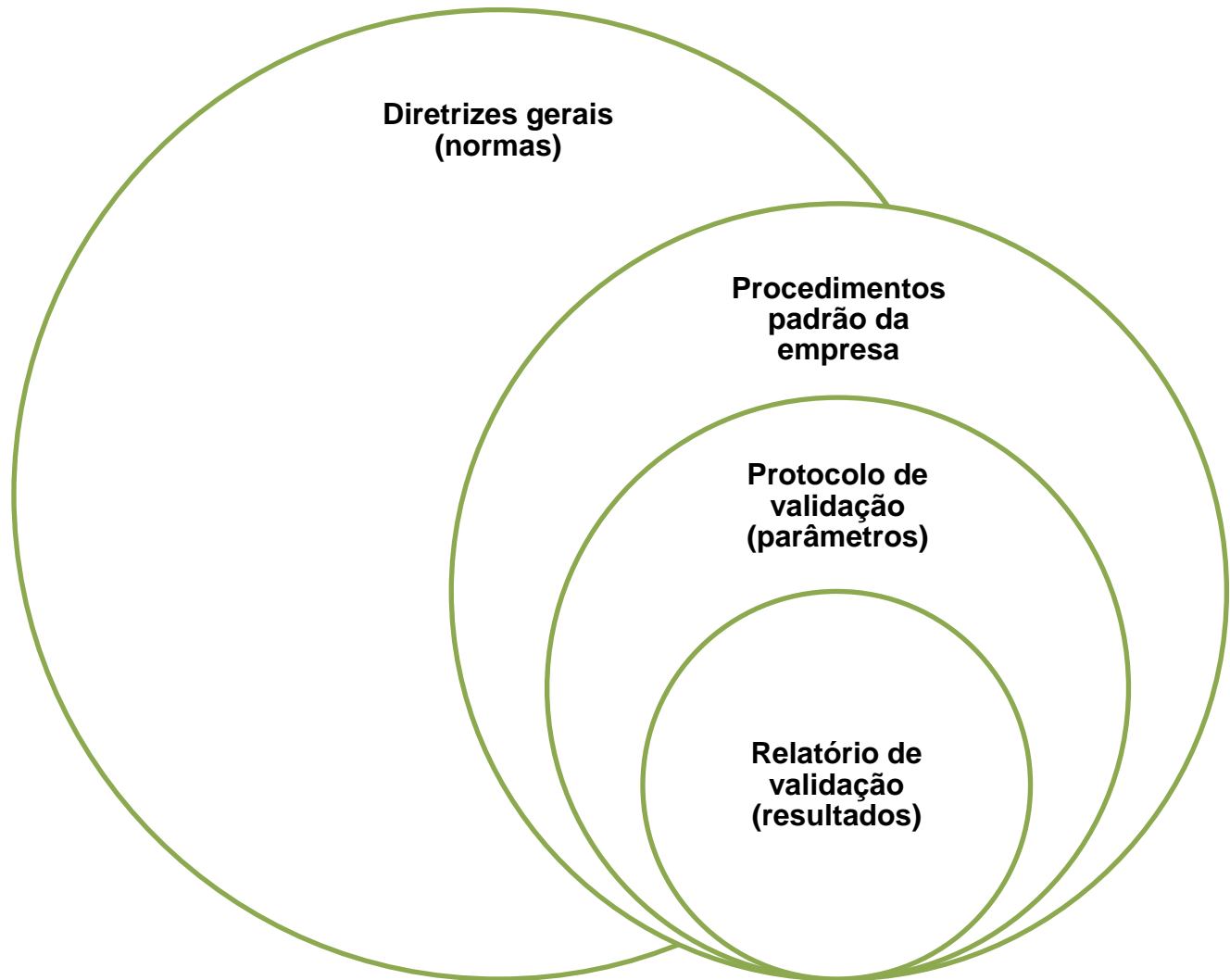
Validação de métodos analíticos

Situação ideal



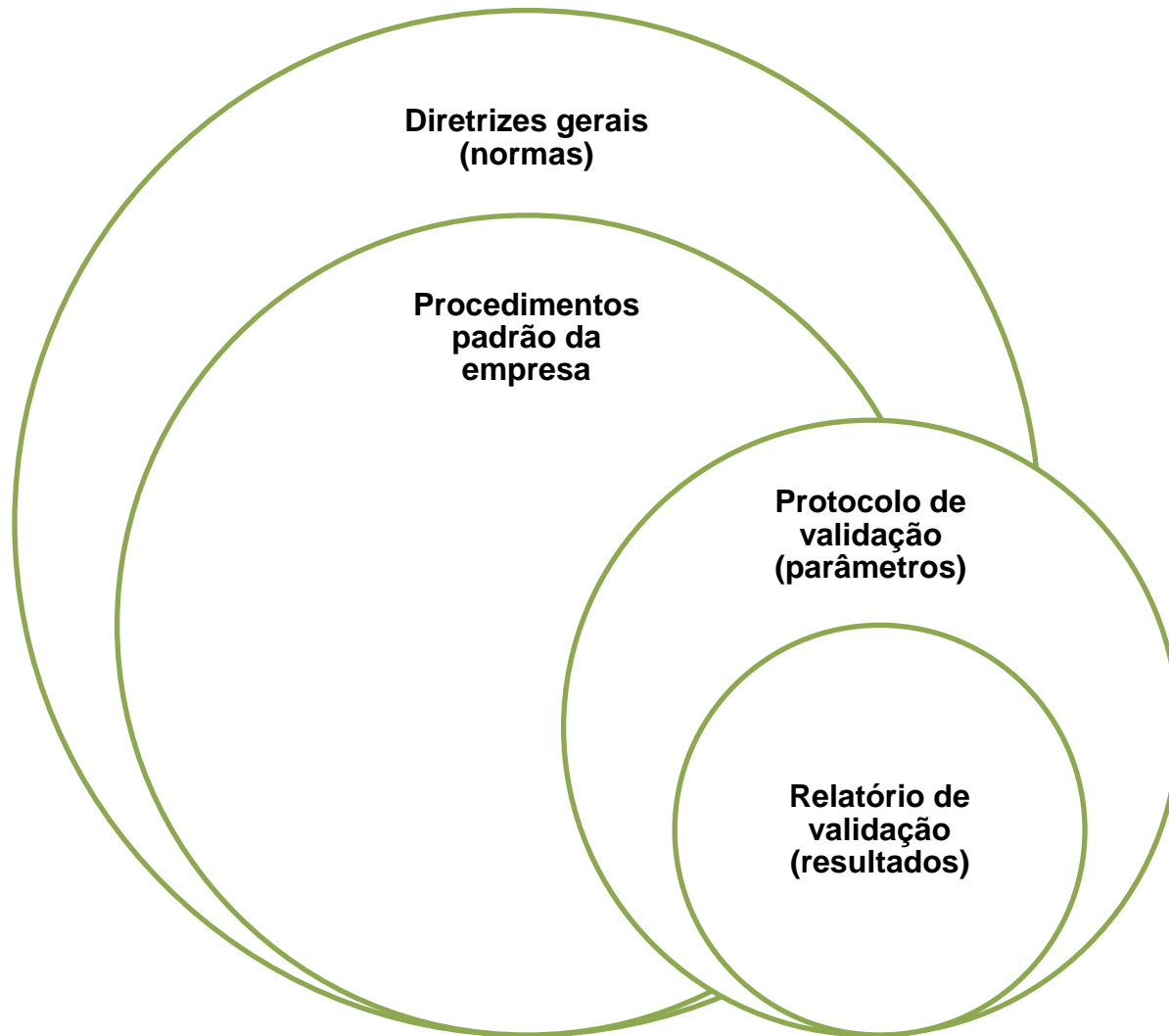
Validação de métodos analíticos

Erro sistemático



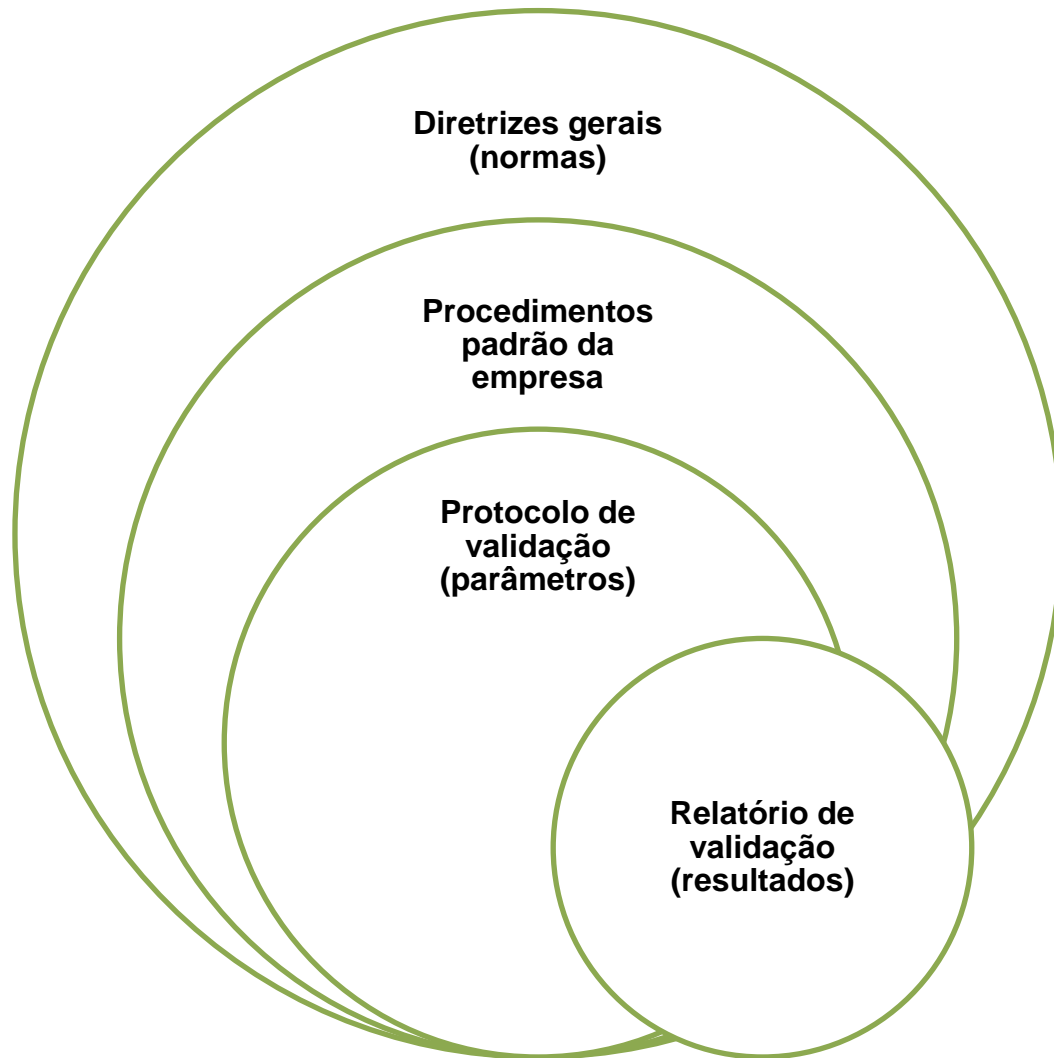
Validação de métodos analíticos

Erro de planejamento (pontual)



Validação de métodos analíticos

Desvio de protocolo ou resultado negativo (pontual)



Condução indevida

- Inconclusivo

Condução correta,
resultados fora do
especificado

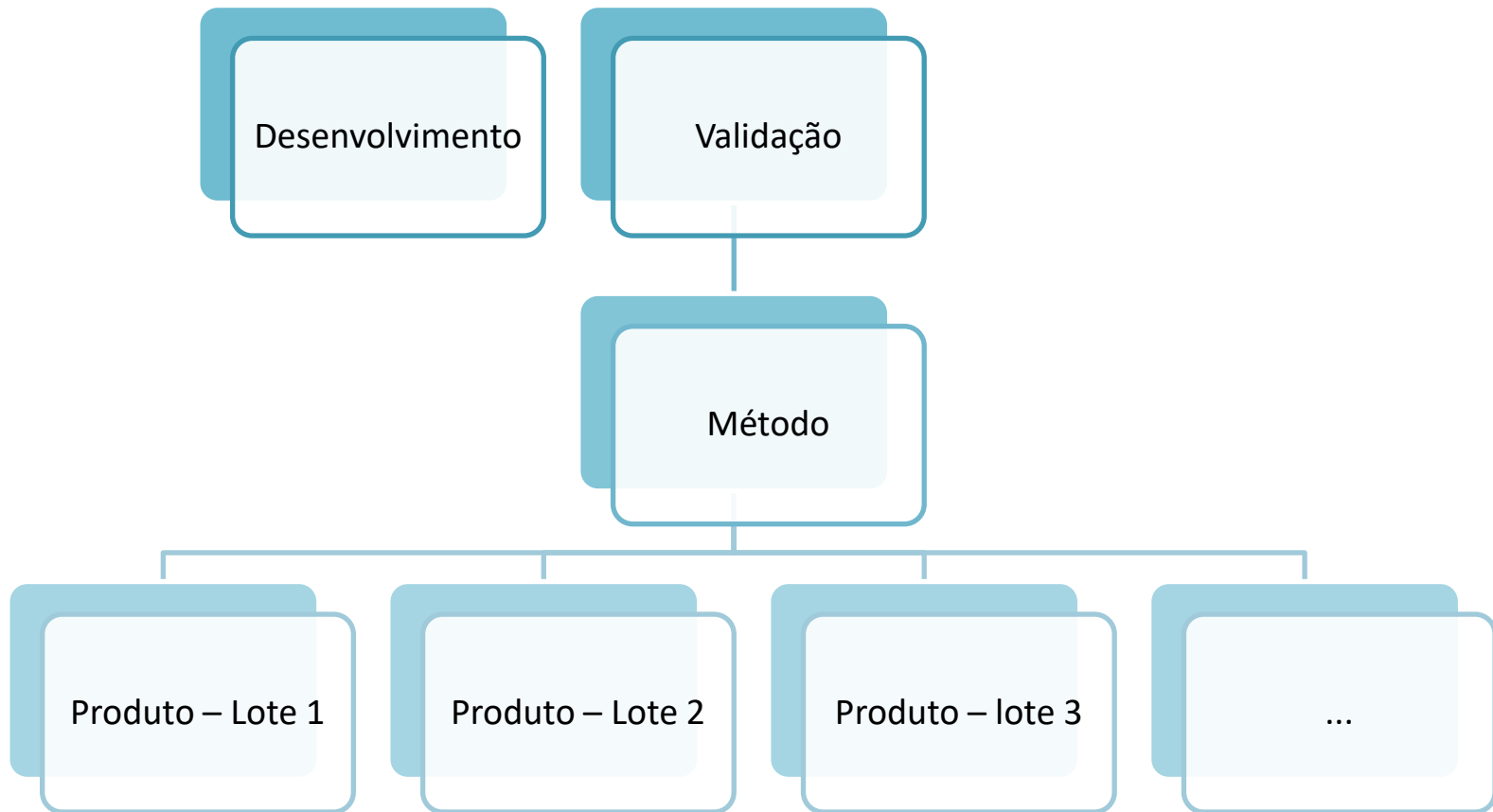
- Conclusivo, método não adequado

Condução correta,
resultados dentro
do especificado

- Conclusivo, método adequado

Validação de métodos analíticos

Importância da validação analítica

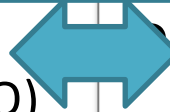


Garantia da Qualidade

Validação analítica

Produção

Controle da
Qualidade (CQ)



Desenvolvimento
analítico

Desenvolvimento
do produto
(Farmacotécnico)

Reprodutibilidade

Qualidade



BPF



Registro

- Introdução
- **Parâmetros da validação**
- Verificação e validação parcial

- Seletividade
- Linearidade
- Intervalo
- Precisão
- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Exatidão
- Robustez

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

Impurezas

Impurezas
Inorgânicas

Impurezas Orgânicas

Impurezas
de Síntese

Produtos de degradação

Produtos de
degradação
detectados

Produtos de
degradação
relevantes

Para testes de identificação, o resultado deve ser **positivo** para o material de referência e para amostras contendo o analito, e **negativo** para amostras que não contem o analito, mesmo que contenham compostos estruturalmente semelhantes **(adulteração / erro de entrega)**.

- Testes de coloração
(dipirona, captopril)
- Ensaaios espectroscópicos
(ibuprofeno, paracetamol, captopril)
- Ensaaios cromatográficos - pelo tempo de retenção
(digoxina, captopril)

Para ensaios quantitativos, comparar resultado com:

- Placebo
- Mistura de impurezas / produtos de degradação
- **Quando não houver padrões de produtos de degradação**, amostras armazenadas sob condição de estresse

Necessidade de sempre avaliar impurezas / produtos de degradação?

Finalidade do método:

- Quantitativo
- Desempenho

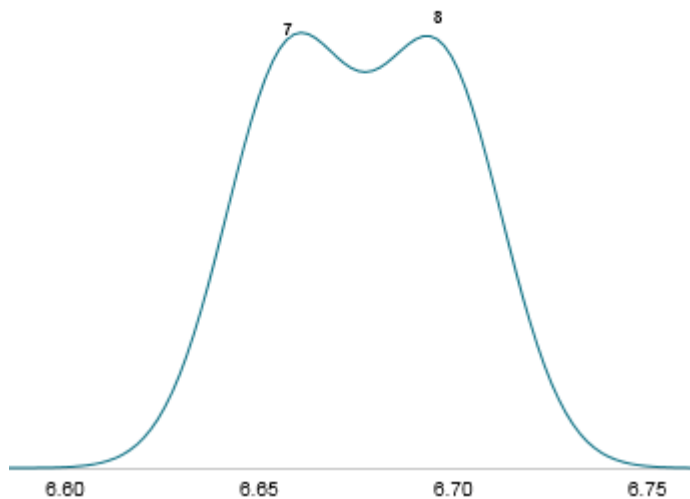
A falta de seletividade de um método pode ser compensada por outro.

Para ensaios cromatográficos → pureza cromatográfica (pureza de pico)

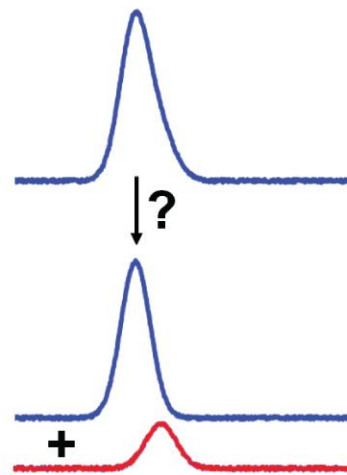
- Não é possível em todos os detectores
- Principal uso: DAD.
- Calculada pelo Software, com base no ruído e no espectro dos picos.

Validação de métodos analíticos

Seletividade – ensaios cromatográficos

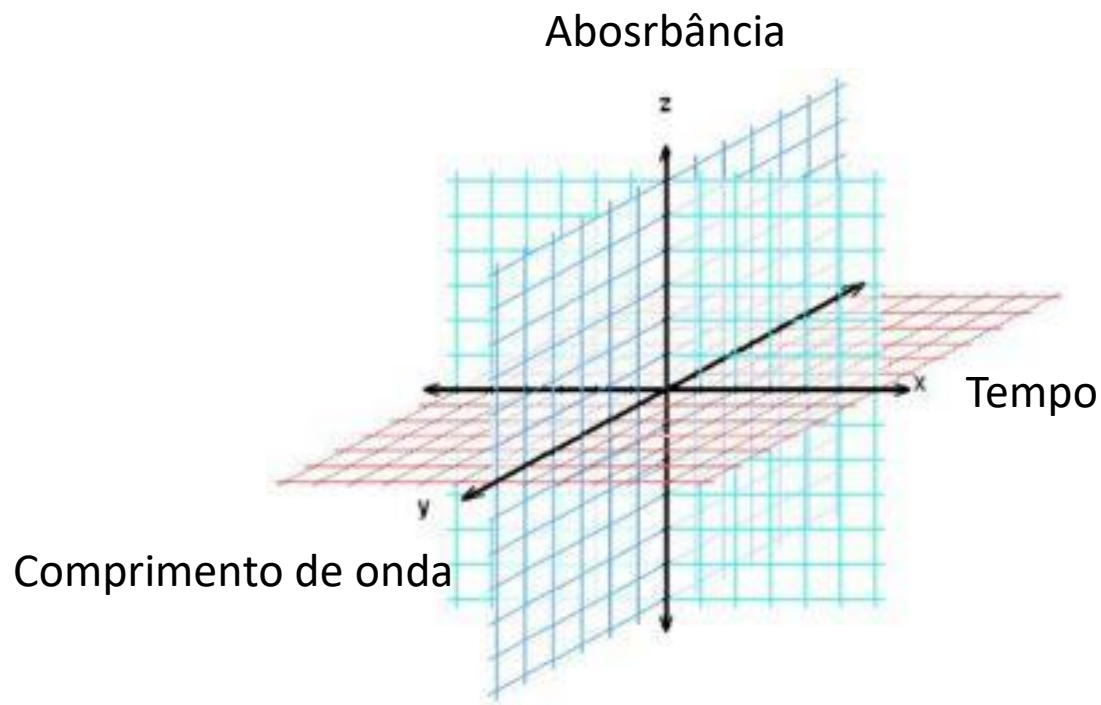


Evidente



**Muito menos
evidente**

HPLC com detector DAD



Para que método seja considerado 100% seletivo:

- Injeção de placebo;
- Injeção de principais impurezas / produtos de degradação

E

- Estudo de degradação forçada

- Métodos não cromatográficos quase nunca serão 100% seletivos (separação de impurezas e produtos de degradação);
- Métodos cromatográficos podem ser 100% seletivos (**comprovação necessária**);

Exceções:

- Moléculas não passíveis de cromatografia
- Ensaio biológicos
- Íons inorgânicos

Estudo de estresse ou de degradação forçada:

- Objetivo: deliberadamente formar produtos de degradação (desafio ao método);
- Necessário para comprovar seletividade e potencial indicativo de estabilidade
- Não usar condições muito brandas nem muito forçadas.

Condições de estresse geralmente usadas:

- Ácida (HCl 0,1-1M, em solução)
- Alcalina (NaOH 0,1-1M, em solução)
- Oxidante (H_2O_2 0,3-3%, em solução)
- Calor seco (60-80°C, estado sólido)
- Calor úmido (50-80°C/75% UR sólido - solução)
- Luz (visível, UV, estado sólido)
- Íons metálicos (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , solução)*

Seletividade: separar ativo das impurezas

Indicativo de estabilidade: detectar todos os produtos de degradação relevantes.

Capacidade de demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração de analito.

- Correlação concentração vs. Resposta analítica –
 $r \geq 0,99$
- Análise estatística
- Tratamento matemático se necessário

O que é resposta analítica?

- Espectrofotometria: absorvância
- HPLC, CG: área ou altura do pico
- TLC: tamanho da mancha
- Titulação: quantidade de agente titulante

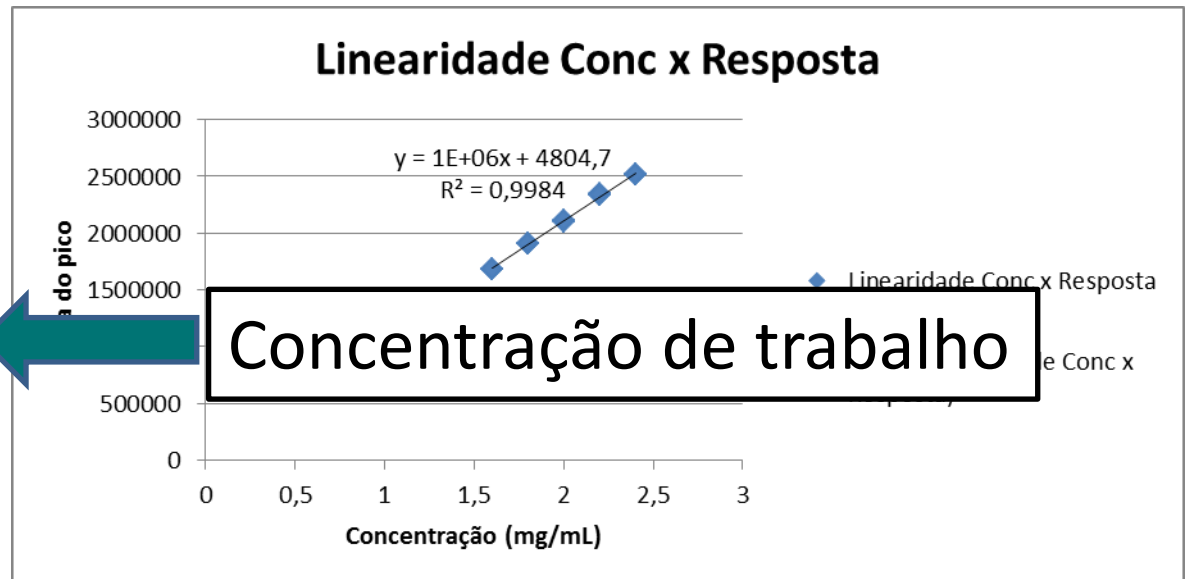
Comprovação da relação linear:

- Pelo menos 5 níveis de concentração
- Pelo menos 3 réplicas por nível
- Cálculos estatísticos.

Validação de métodos analíticos

Linearidade - Demonstração

Nível (%)	Concentração	Área
80	1,6	1684430
80	1,6	1682601
80	1,6	1682633
90	1,8	1902947
90	1,8	1904307
90	1,8	1905599
100	2	2104455
100	2	2108661
100	2	2111487
110	2,2	2342465
110	2,2	2341857
110	2,2	2341258
120	2,4	2516210
120	2,4	2517854
120	2,4	2518562

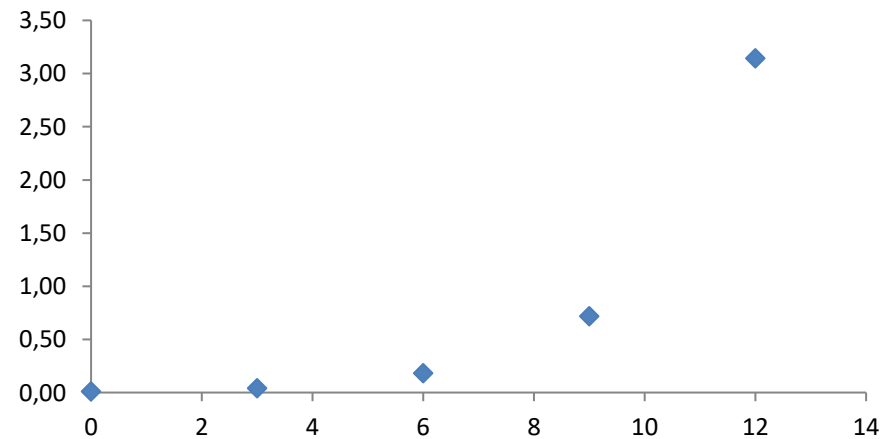
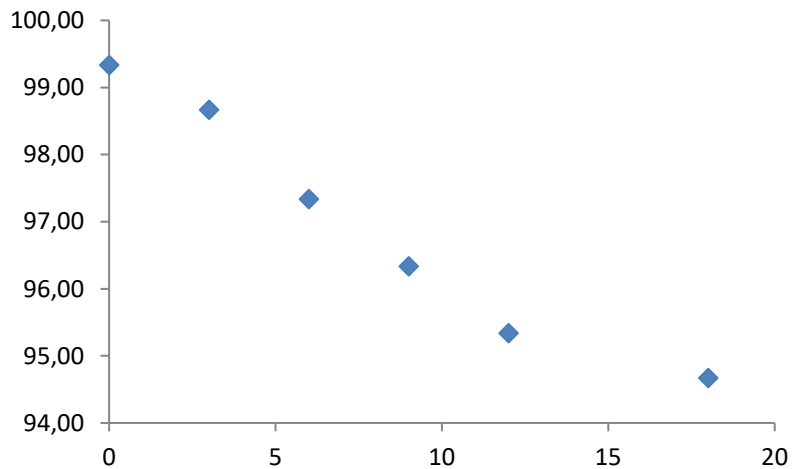


Parâmetros de análise:

- Visual (aparência linear, necessidade de transformação matemática);
- R (correlação)
- Teste de Grubbs (outliers)
- Teste de Cochran (homocedasticidade)

Análise visual:

- Conc. Vs. Resposta – linha reta?



R:

- $0 < R < 1$
- Resultado da análise erro vs. modelo
- Representa o quanto o modelo proposto (equação) prevê dos dados experimentais

Teste de Grubbs:

- Gráfico de valor real – valor previsto pelo modelo (resíduos)
- Se um resíduo $>$ média + 2 dp dos resíduos, trata-se de um *outlier* estatístico
- *Outliers* estatísticos podem requerer investigação – erro analítico? Interferência no resultado?

Teste de Cochran:

- Pressuposto do cálculo de R: todos os pontos tem a mesma variância (mesma incerteza) – homocedasticidade
- O teste de Cochran verifica este pressuposto:

$$C = \frac{\sigma^2_{max}}{\epsilon \sigma^2}$$

Teste de Cochran:

- Reprovação no teste de Cochran (heterocedasticidade), R precisa ser calculado de forma diferente – R ponderado pela variância
- Particularmente importante no caso de intervalos lineares muito grandes (ex. um só método para teor e impurezas)

- Determinado a partir da linearidade, da precisão e da exatidão

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e +20% sobre o maior valor.

- Intervalo precisa englobar todas as concentrações possíveis (com margem de segurança)
- Teor: concentrações possíveis 90-110% (geralmente) + 10% de margem de segurança – 80-120%
- Impurezas: concentração 0% a 100% da especificação – LQ-120%

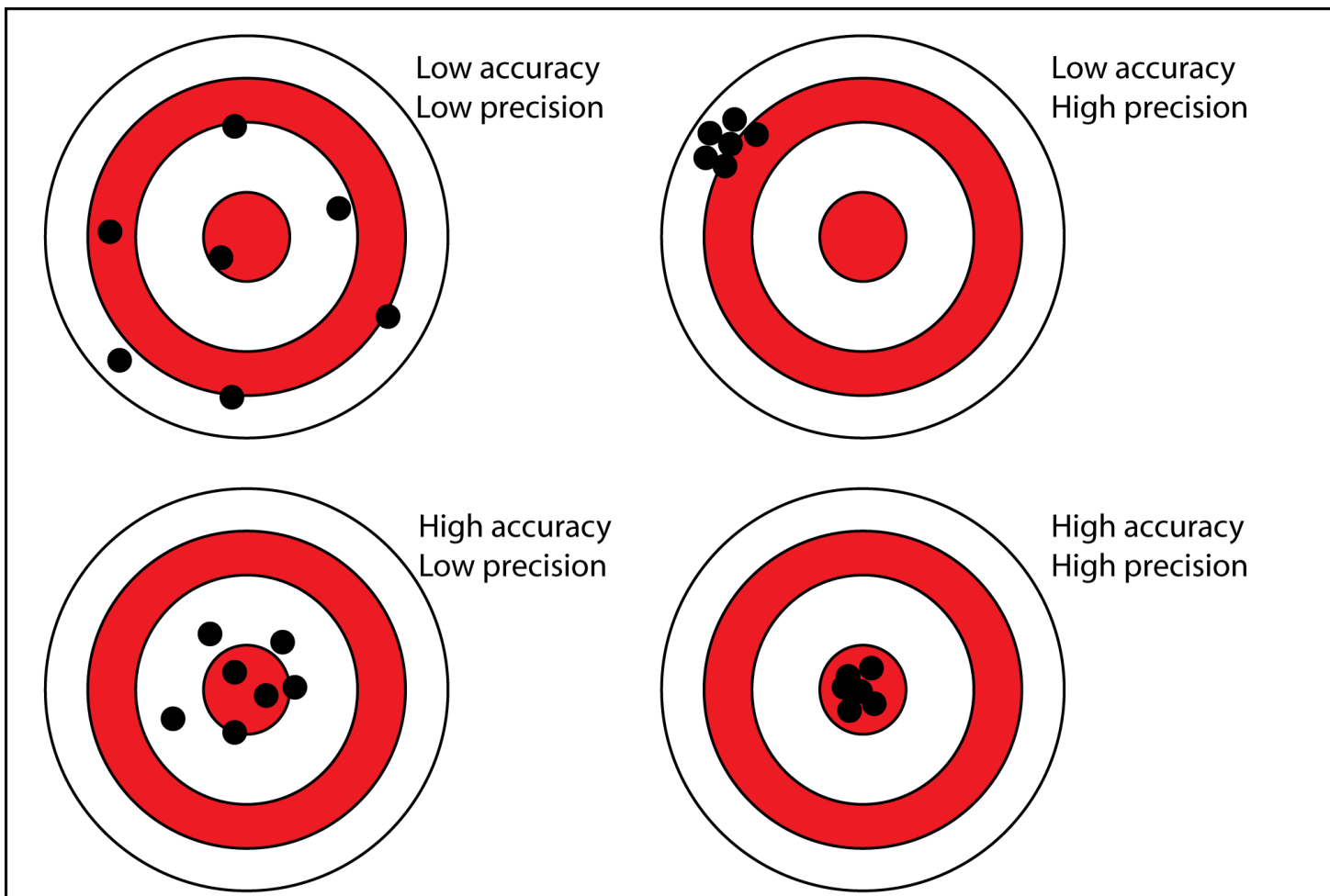
- Quando se usa mesmo método para teor e impurezas:
LQ-120% do teor (uma só linearidade)

Faixas em desacordo com a RDC 166/2017:

- Mais amplas: pode prejudicar o cálculo na faixa de interesse ou não
- Mais restritas: geralmente não é aceito.

Validação de métodos analíticos

Precisão e exatidão



- Exatidão: proximidade dos resultados obtidos ao valor real
- Precisão: proximidade dos resultados obtidos entre si
 - Repetibilidade (precisão intra-corrída): mesma corrida analítica;
 - Precisão intermediária (inter-corrídas): corridas analíticas diferentes

- Exatidão: proximidade dos resultados obtidos ao valor real
- Precisão: proximidade dos resultados obtidos entre si
 - Reprodutibilidade (inter-laboratorial): laboratórios diferentes

Exatidão:

- Sempre 3 réplicas em 3 níveis de concentração (baixa, média, alta) – **amostras artificiais (placebo contaminado, padrão);**

Precisão – duas opções:

- 6 réplicas na concentração alvo, ou
- 3 réplicas em 3 níveis de concentração (baixa, média, alta);

Diferentes equipamentos, dias, analistas

Precisão intra
(3x3 ou 6)



Precisão inter
(3x3 ou 6)

Exatidão:

- Recuperação (%): $\text{Conc. Obtida vs. Conc. Esperada}$

Precisão:

- CV ou DPR (%) – intra e inter
- Ensaio estatísticos: teste f e teste t

Critério de aceitação:

- Variável
- Depende da concentração, da variabilidade esperada do método e da margem de segurança.
- RE 899/2003 diz não mais que 5%

Critério de aceitação:

- Impurezas
 - Valor usual 0,2% - DPR de 5% significa 0,01% (muito pouco)
 - Concentração da impureza geralmente na ordem de ppm – variação de 5% é menor que a esperada

Critério de aceitação:

- Teor
 - Valor alvo 100%, 5% significa variação de 95 a 105 – muito permissivo
 - Concentração geralmente na ordem de mg/mL – variação esperada pode ser 2% ou menor

Critério de aceitação:

- Métodos complexos:
 - Em alguns casos 5% de variação é impraticável (variação intrínseca)
 - Muitos métodos de CG, ensaios microbiológicos...

Observações importantes

- RDC 166/2017 – número de amostras variável
- Importante que as réplicas sejam **verdadeiras**
(desde o início do preparo da amostra)

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ):

- LD: menor concentração detectável
 - Determinação visual (menor concentração que produz efeito)
 - Métodos instrumentais: cálculo
- LQ: menor concentração quantificável
 - Determinado com base na relação sinal/ruído ou em cálculo

Cálculos LD e LQ – com base em curva linear:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC}$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC}$$

Sinal/ruído (SNR):

LD=3, LQ=10

LD e LQ:

- Importantes medidas de sensibilidade do método
- Se $LQ < \text{limite de especificação}$, método não tem sensibilidade suficiente

Robustez: capacidade de resistir a pequenas e deliberadas variações (dia-a-dia):

- Tempo de preparo da amostra
- Estabilidade das soluções analíticas
- pH da solução
- Composição/pH da fase móvel
- Temperatura
- Etc.

Robustez: monitorar resultado e características importantes para o método

	k'		R		TR		N		A		Resultado	
	Medido	Variação (%)	Medido	Variação (%)	Medido	Variação (%)	Medido	Variação (%)	Medido	Variação (%)	Medido	Variação (%)
Inicial		0		0		0		0		0		0
Estabilidade das Soluções												
Tempo de extração (+)												
Tempo de extração (-)												
pH da fase (+)												
pH da fase (-)												
Temperatura (+)												
Temperatura (-)												
Composição da fase (+)												
Composição da fase (-)												
Fluxo (+)												
Fluxo (-)												
Coluna												

Método pode não ser robusto e ainda ser usado, desde que haja alertas no procedimento.

Parâmetros relacionados a adequabilidade do método:

- Efeito da matriz (métodos bioanalíticos)
- Adequação do sistema.

Efeito da matriz:

- Mais comum em métodos biológicos e fitoterápicos;
- Matriz complexa – não há interferência de sinal, mas de interação
- Pode acontecer principalmente em métodos por LC-MS ou ensaios complexos como ELISA

Adequação do sistema (System Suitability):

- Verificação necessária em cada corrida analítica (mesmo depois da validação, em análises de rotina);
- Estabelece-se verificação de adequação do sistema quando há preocupação com algum ponto do método.

Adequação do sistema (System Suitability):

- Embora o método tenha sido validado, existem algumas características que podem ameaçar sua adequabilidade no dia-a-dia

Ameaças à validade do método e verificações:

Motivo	Parâmetro ameaçado	O que verificar
Variações na preparação da fase móvel	Seletividade	Resolução, pureza de pico
Variações no sistema de injeção ou leitura	Precisão / exatidão	DPR de injeções repetidas de padrão
Idade do detector	Sensibilidade (LQ, linearidade)	Relação sinal/ruído de amostra diluída
Caminho óptico do equipamento	Linearidade, exatidão	Linearidade (R^2)
Envelhecimento da coluna cromatográfica	Precisão, exatidão, linearidade	Assimetria, Número de pratos teóricos

Introduzir Adequação do Sistema no método quando:

- Durante o desenvolvimento, for detectado parâmetro crítico
- Validação do método obtiver resultado limítrofe
- **Necessário verificar adequação do sistema antes de cada corrida analítica!**

- Introdução
- Parâmetros da validação
- **Verificação e validação parcial**



Art. 7º Os métodos analíticos compendiais devem ter sua adequabilidade demonstrada ao uso pretendido, nas condições operacionais do laboratório, por meio da apresentação de um estudo de validação parcial.

- Precisão
- Exatidão
- Seletividade

Por quê?

- Métodos compendiais – desenvolvidos e validados para 1 produto, em 1 laboratório com determinadas condições
- Necessário verificar aplicação no SEU produto, no SEU laboratório, com as SUAS condições analíticas.

Possíveis problemas com métodos compendiais:

- Método não adequado para formulação específica (extração inadequada, interferência do placebo);
- Método não adequado para produto (perfil de impurezas / degradação)
- Método não aplicável para condições laboratoriais (sensibilidade do equipamento, treinamento dos analistas);

Possíveis problemas com métodos compendiais:

- Extração
 - Solvente inadequado
 - Tempo de extração insuficiente
 - Impacto – precisão, exatidão
- Interferência do placebo
 - Composição diferente do farmacopeico
 - Impacto: seletividade

Possíveis problemas com métodos compendiais:

- Diferenças perfis de impurezas
 - Rota de síntese do IFA
 - Impacto: seletividade
- Diferença perfil de degradação:
 - Perfil de impurezas, fórmula
 - Impacto: seletividade

Possíveis problemas com métodos compendiais:

- Sensibilidade do equipamento:
 - Diferentes caminhos ópticos, fabricantes de equipamentos
 - Impacto: linearidade, sensibilidade
- Treinamento dos analistas:
 - Práticas gerais de laboratório, costumes
 - Impacto: desconhecido.

Portanto:

- Necessário verificar métodos analíticos compendiais na prática do laboratório
- O mesmo vale para métodos validados e transferidos (ressalva – pode ser o mesmo produto)

Muito obrigado!

Raphael Sanches Pereira

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

SIA Trecho 5 - Área especial 57 - Lote 200

CEP: 71205-050

Brasília - DF

Telefone: 61 3462 6000

www.anvisa.gov.br

www.twitter.com/anvisa_oficial

Anvisa Atende: 0800-642-9782

ouvidoria@anvisa.gov.br



ANVISA
Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ministério da
Saúde

