

PALESTRA

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Cleide Bassani de Barros

CPTI – Tecnologia & Desenvolvimento
São Paulo – SP



RESUMO

Validação de método analítico é o processo de demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica e tem recebido considerável atenção na literatura. A determinação das características de desempenho do método é somente uma parte do processo e os critérios de aceitação são baseados no uso intencional do método. É recomendado que o planejamento e execução da validação de método siga um plano mestre de validação.

PALAVRAS-CHAVE: Validação de método, características de desempenho do método, qualidade assegurada.

ABSTRACT

ANALYTICAL METHODS VALIDATION. Analytical method validation is the process of demonstrating that analytical procedures are suitable for their intended use, it is a vital aspect of analytical quality assurance and it has received considerable attention in the literature. The evaluation of a method's performance characteristics is only part of the process. The preparation and execution of method validation should follow a validation master plan.

KEY WORDS: Method validation, method's performance characteristics, quality assurance.

Milhões de medições analíticas são efetuadas a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Uma forte infra-estrutura internacional de medições está sendo implementada e, verifica-se a necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e consistentes, para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. Para atingir este processo de reconhecimento mútuo a nível internacional, em que uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, requisitos legais, de certificação e de credenciamento devem ser observados. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação, para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.

Validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica. Os métodos de ensaios usados para avaliar a conformidade de produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade. (21 CFR 211.194(a))

A farmacopéia americana (USP 25, 2002) na Seção de Ensaios Gerais apresenta recomendações para a

validação de métodos analíticos de compêndio. Esta seção de ensaios gerais não distingue entre métodos cromatográficos e não cromatográficos. Apresenta também um sumário das características de desempenho requeridas para os vários tipos de métodos de ensaios. Existe vasta literatura, na área de medições químicas e recomendações publicadas por organizações, internacionais e nacionais (ISO/IEC 17025, 1999; ICH Q 2B, 1996; USP 25, 2002; FDA, 2000; NATA, 1998; EURACHEM, 1998; NBR ISO/IEC 17025, 2001; INMETRO DOQ-CGCRE-008, 2002). Destaca-se a apresentação bastante prática para validação de método analítico de produtos farmacêuticos (GREEN, 1996).

Validação

Validação do método analítico é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (NBR ISO/IEC 17025, 2001). A validação do método analítico permite demonstrar que o método é "adequado ao uso" pretendido.

A validação inclui a especificação dos requisitos do método; determinação das características do método; verificação de que os requisitos podem ser atendidos

com o uso do método e uma declaração sobre a validade do método (NBR ISO/IEC 17025, 2001).

Métodos normalizados, como os de compêndios, já são métodos validados e não é necessário proceder ao processo completo de validação desde que não ocorram alterações significativas dos mesmos e quando o produto em questão é o indicado na monografia (USP 25, 2002). Entretanto, a conformidade dos métodos normalizados usados deve ser verificada sob condições reais de uso. É responsabilidade do analista/laboratório verificar se as características de desempenho prescritas no método normalizado podem ser obtidas (EURACHEM, 1998).

A validação de métodos analíticos desenvolvidos no laboratório é efetuada após seleção, desenvolvimento, e otimização dos métodos (SWARTZ, 1997).

O uso de ferramentas estatísticas adequadas, testes de hipótese: t de Student e F, rejeição de dispersos: Grubbs e Cochran, análise de variância e regressão linear, entre outras, é indicado para demonstração de evidência objetiva da validade do método.

A validação do método analítico deve ser documentada. Os procedimentos devem ser claros, objetivos e completos, de acordo com a norma ISO 78/2, 1999. A documentação consiste dos documentos: Plano Mestre, Protocolo, Planilhas de dados, Relatório. O Plano Mestre de validação é o documento estratégico e contém cronograma de atividades e responsabilidades pelo desempenho das tarefas inclusive elaboração, revisão e aprovação dos documentos. O objetivo do Plano Mestre é garantir que as práticas de validação sejam efetuadas com eficiência e consistência na organização, para o atendimento dos requisitos do cliente, das normas e dos aspectos legais. O protocolo descreve como o processo de validação deve ser executado. O relatório apresenta os resultados obtidos, os critérios de aceitação, comentários e a declaração da validade, se os requisitos foram atendidos.

Características de desempenho

As características de desempenho investigadas no processo de validação, a fim de demonstrar o desempenho do método são: Especificidade; Exatidão; Precisão; Limite de detecção; Limite de quantificação; Linearidade; Faixa de aplicação; Robustez.

Especificidade do método analítico refere-se à capacidade de medir com exatidão o analito de interesse em presença de outros componentes ou interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra. Especificidade do método é demonstrada como o desvio dos resultados obtidos pela análise do analito de interesse em amostras fortalecidas com todos os interferentes e os resultados obtidos com amostras não fortalecidas, contendo somente o analito. Quando não se conhecem os interferentes, a especificidade do método pode ser investigada

pela comparação dos resultados com outros métodos/ técnicas independentes.

Exatidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito. Exatidão pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado ou com outro método validado cujo erro sistemático é sabidamente não significativo. Outra forma de investigação é comparar a média dos resultados obtidos com a média obtida do programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz limpa da amostra ou ainda na matriz da amostra.

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

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob determinadas condições experimentais. Existem muitos critérios para definição do limite de detecção. Para métodos analíticos instrumentais, o critério adotado é a relação sinal/ ruído de 3:1.

Limite de quantificação (LQ) do método analítico é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão, aceitáveis, sob determinadas condições experimentais. É calculado como a concentração do analito para o qual a relação sinal/ ruído é de 10:1.

É indicado, ainda, uma outra opção baseada em cálculo dos limites de detecção e de quantificação, pelo uso do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva de calibração (b) construída em níveis próximos dos limites. As equações são: $LD = 3,3 s/b$ e $LQ = 10 s/b$. O desvio padrão da resposta pode ser baseado no desvio padrão do branco, no desvio padrão residual da linha de regressão ou no desvio padrão da intersecção da reta no eixo y. (ICH Q 2B, 1996)

Linearidade é a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa. Faixa de aplicação do método analítico é validada verificando se o método fornece precisão, exatidão e linearidade aceitáveis quando aplicado a amostras contendo analito nos extremos da faixa e dentro da mesma.

A robustez deve ser investigada na etapa de desenvolvimento do método e normalmente é feita avaliando os parâmetros do método, simultaneamente, aplicando

técnica estatística de planejamento de experimento. Com os dados obtidos dos efeitos destes parâmetros nos resultados, pode-se delimitar a faixa aceitável de valores a ser incluída no método final. Indica confiabilidade do método durante uso normal.

Conclusão

Validação é um processo dinâmico e constante que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal e continua da fase de experimentos e transferência do método. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidência objetiva de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CFR Code of Federal Regulations, Title 21, part 211.194(a). (U.S. Government Printing Office, Washington, DC).
- EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 1.ed. 1998
- FDA's Draft Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation. 2000. (Center for Drug Evaluation and Research. CDER).
- GREEN, M.J. A practical guide to analytical method validation. *Anal. Chem. News and Features*, p.305A-309A, 1996.
- HORWITZ, W. Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v.63, n.6, p.1344-1354, 1980.
- ICH – Q 2B. *Validation of analytical procedures: methodology*. (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Nov, 1996. Geneva, Switzerland)
- INMETRO DOQ-CGCRE-008 Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. 2002. RJ. Brasil.
- ISO 78/2. Chemistry Layout for Standards. Part 2: Methods of Chemical Analysis. 1999. International Organization for Standardization. ISO, Geneva. Switzerland.
- ISO/IEC 17025. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. 1999. International Organization for Standardization. ISO, Geneva. Switzerland.
- NATA Technical Note 17. Format and Content of Test Methods and Procedures for Validation and Verification of Chemical Test Methods. National Association of Testing Authorities. Australia. 1998
- NBR ISO/IEC 17025. Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração e de Ensaio. 2001 ABNT. RJ. Brasil
- SWARTZ, M. & KRULL, I. (Ed.) *Analytical Method Development*. Marcel Dekker, NY. 1997.
- USP *U.S. Pharmacopeia 25/National Formulary 20*. (U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, Maryland, 2002)