

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

THIAGO ADOLFO SOBREIRA MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE α -(-)-BISABOLOL EM SOLUÇÃO
HIDROALCOÓLICA**

CRATO, CE

2015

THIAGO ADOLFO SOBREIRA MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE α -(-)-BISABOLOL EM SOLUÇÃO
HIDROALCOÓLICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santiago

CRATO, CE
2015

Miranda, Thiago Adolfo Sobreira.
M672d Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE
para quantificação de α -(-)-bisabolol em solução hidroalcoólica/
Thiago Adolfo Sobreira Miranda. – Crato-CE, 2015
129p.; il.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do
Cariri- URCA.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santiago

1. α -(-)-bisabolol; 2. Candeeiro, 3. CLAE; 4. Quantificação;
5. Validação; I. Título.

CDD:615.32

THIAGO ADOLFO SOBREIRA MIRANDA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE
PARA QUANTIFICAÇÃO DE α -(-)-BISABOLOL EM SOLUÇÃO
HIDROALCOÓLICA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de concentração: Bioprospecção molecular.

Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santiago – **Orientador**

Universidade Federal do Cariri- UFCA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa – **Avaliador Interno**

Universidade Regional do Cariri- URCA

Prof. Dr. Francisco José de Paula Filho - **Avaliador Externo**

Universidade Federal do Cariri- UFCA

Dedico a meus pais, Carlos Renato Miranda e Janette Maria Sobreira Miranda, e a minha esposa Natália de Lima Rodrigues, por tudo que me ensinaram da vida, por sempre apoiarem os meus projetos, por me reerguerem nas derrotas e por celebrarem comigo as vitórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter sido sempre meu amparo e conforto nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, Carlos Renato Miranda, por ensinar-me dentre muitas virtudes, o princípio da honestidade e por ter me tornado o homem que sou.

À minha mãe, Janette Maria Sobreira Miranda, por ter sido mãe de verdade, amiga, conselheira e sempre estar ao meu lado.

À minha esposa, Natália de Lima Rodrigues, por ser uma das pessoas que mais me motivou e incentivou para ingresso no mestrado e pela compreensão nos momentos em que precisei dedicar-me exclusivamente ao mestrado, pelas revisões ortográficas de artigos e da dissertação, bem como por todo amor e carinho dispensado durante este período.

Às minhas filhas, Nicolle Rodrigues Miranda e Marina Rodrigues Miranda por serem meu porto seguro e ponto de refúgio nos momentos de angústia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Oliveira Santiago, por ter me dado a oportunidade de retornar à vida acadêmica. Obrigado, por ter acreditado e ter me presenteado com um projeto tão valoroso para meu crescimento profissional. Sou muito grato pelos seus conselhos e por toda a orientação dispensada durante o mestrado.

Ao meu co-orientador Dr. José Galberto Martins da Costa por todo o auxílio e disponibilidade para o sucesso desse trabalho.

Aos professores, Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho e Dra. Marta Regina Kerntopf por toda ajuda direta ou indireta

na execução deste trabalho, com suas ricas colocações e orientações para melhoria da pesquisa.

Aos professores, José Galberto Martins da Costa e Marta Regina Kerntopf, por aceitarem participar da minha banca de qualificação. Sou muito grato por toda a contribuição e sugestões a serem apresentadas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular, em especial pelos conhecimentos transmitidos, e por serem o sustento do programa de pós-graduação em Bioprospecção Molecular.

Aos amigos do mestrado, pois mesmo com a minha ausência constante na instituição, sempre foram atenciosos e carinhosos.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Bios prospecção Molecular, Dr. Alysso Pontes Pinheiro e Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, às secretárias, Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, por toda disponibilidade e compromisso com o programa.

À Farmace - Indústria Químico-Farmacêutica Cearense Ltda., pois, além de me oferecer uma oportunidade de emprego, constantemente tem investido em meu crescimento profissional com cursos, viagens, congressos, entre outros. Além disso, sou muito grato por terem permitido a execução da maior parte do trabalho no laboratório de controle de qualidade da fábrica. Gostaria de agradecer, em especial, aos analistas e farmacêuticos responsáveis por este laboratório, Adriano Arantes Ribeiro e Rafael Caldas por toda ajuda na realização dos testes.

A todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para conclusão deste trabalho, como os companheiros de laboratório da Farmace, companheiros de laboratório da URCA, professores da FJN e da URCA que com seus conhecimentos abrilhantaram essa pesquisa, e em especial a Dra Adilfa Garcia que sempre me estimulou e encorajou para o interesse na área

de pesquisa e conseqüentemente a ingressão no programa do mestrado da Universidade Regional do Cariri - URCA.

“Eterno é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tamanha intensidade que se petrifica e nenhuma força o resgata...”

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

I. LISTA DE FIGURAS

II. LISTA DE FLUXOGRAMAS

III. LISTA DE TABELAS

IV. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

V. RESUMO

VI. ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Apresentação	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivo Específico	22
3 REFERENCIALTEÓRICO	24
3.1 Considerações gerais.....	24
3.1.1 α -(-)-bisabolol.....	25
3.2 Controle de qualidade de extratos vegetais.....	26
3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	26
3.3 Validação de Métodos Analíticos	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Solventes e reagentes	32
4.2 Desenvolvimento e validação do método analítico	32
4.2.1 Seleção de condições cromatográficas	32
4.2.2 Preparo de padrão	33

4.2.3 Preparo da amostra	34
4.2.4 Método de Validação	36
4.2.4.1 Especificidade	37
4.2.4.2 Linearidade	37
4.2.4.3 Sensibilidade	37
4.2.4.4 Exatidão	38
4.2.4.5 Precisão	38
4.2.4.6 Robustez	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Desenvolvimento e validação de método de análise do α -(-)-bisabolol.....	41
5.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico e Especificidade	41
5.1.2 Linearidade	46
5.1.3 Sensibilidade.....	47
5.1.4 Recuperação.....	47
5.1.5 Precisão.....	49
5.1.6 Robustez	50
5.1.7 Aplicabilidade.....	50
6 CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS	57

VII. ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do α -(-)-bisabolol.....	18
Figura 2. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 1 – Hexano + Hidroquinona.....	42
Figura 3. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 2 – Hexano + Hidroquinona.....	43
Figura 4. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 3 – Somente Hexano.....	43
Figura 5. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 4 – Somente Hexano.....	44
Figura 6. Cromatograma do ensaio de Especificidade Solução Padrão de α -(-)-bisabolol.....	44
Figura 7. Cromatograma do ensaio de Especificidade Solução Padrão de α -(-)-bisabolol.....	45
Figura 8. Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do α -(-)-bisabolol.....	47
Figura 9. Cromatograma do ensaio de quantificação do α -(-)-bisabolol no óleo essencial do candeeiro.....	52
Figura 10 Cromatograma do ensaio de quantificação do α -(-)-bisabolol no óleo essencial do candeeiro.....	53

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1- Metodologia do preparo das soluções padrões de α -(-)-bisabolol a serem utilizadas na curva de calibração do método	34
Fluxograma 2- Metodologia do preparo das soluções das amostras de α -(-)-bisabolol a serem utilizadas na exatidão e precisão do método	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das análises de adequabilidade da metodologia analítica.....	41
Tabela 2. Resultados obtidos no ensaio da linearidade para α -(-)-bisabolol e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR).....	46
Tabela 3 - Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o α -(-)-bisabolol e os valores médios de recuperação e DPR.....	48
Tabela 4 - Resultados obtidos no ensaio de precisão para α -(-)-bisabolol e os valores DPR (intra-corrída e inter-corrída).....	49
Tabela 5 - Resultados do ensaio de robustez, com variações do pH da fase móvel.....	50
Tabela 6 - Resultados do ensaio de robustez, com variações do fluxo de injeção e troca de solvente (hexano \rightarrow etanol)	50
Tabela 7 - Resultados do ensaio de quantificação do α -(-)-bisabolol no óleo essencial do candeeiro.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BISA – α -(-)-bisabolol

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG - Cromatografia Gasosa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DP - Desvio Padrão

DPR - Desvio Padrão Relativo

FR - Fator de relação

HPTLC - *High-performance thin layer chromatography*

IC - Inclinação da curva

ICH - *International Conference on Harmonisation*

LOD - *Limit of detection*

LOQ - *Limit of quantification*

n - Número de amostras

q.s.p. – Quantidade suficiente para

r - Coeficiente de correlação

RE - Resolução

URCA - Universidade Regional do Cariri

RESUMO

Plantas medicinais produzem grande variedade de substâncias químicas, de diferentes classes metabólicas e o fazem em diferentes proporções. O bisabolol é um álcool sesquiterpênico, monocíclico, insaturado e opticamente ativo podendo ser encontrado nos óleos essenciais de cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*), camomila-alemã (*Matricaria recutita*), Capitu (*Siparuna guianensis*) e candeeiro (*Vanillosmopsis arborea Baker*), espécie abundante na região da chapada do Araripe. Um método de quantificação do α -(-)-bisabolol em uma solução hidroalcoólica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido e validado. Uma solução hidroalcoólica obtida em farmácia de manipulação de α -(-)-bisabolol a 2% e o óleo essencial extraído do candeeiro foram analisados. Um padrão de α -(-)-bisabolol foi utilizado para calibração. A análise foi conduzida pela utilização de coluna cromatográfica *Thermo Scientific Hypersil C₁₈* (250 mm x 4.0 mm; tamanho da partícula, 5 μ m), como fase estacionária, e mistura de acetonitrila e solução tampão de fosfato como fase móvel, com fluxo de 1,0 mL/min e detecção no comprimento de onda de 200 nm. O método proposto foi validado, conforme resolução RE nº. 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. No método, a linearidade foi demonstrada com coeficiente de correlação (r) maior que 0.9996, e de acordo com a RE nº. 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária o critério mínimo para r aceitável deve ser igual a 0,99. Além disso, os picos cromatográficos mostraram boa resolução. Com os parâmetros da validação, incluindo precisão, especificidade, exatidão e robustez, esse método demonstrou boa repetibilidade e sensibilidade e pode ser convenientemente utilizado para quantificação de α -(-)-bisabolol em soluções hidroalcoólicas utilizando essa substância em sua formulação com utilização cosmética. Além do mais, apresenta as vantagens de fácil preparação da amostra e curto tempo de análise entre cada injeção.

Palavras-chave: α -(-)-bisabolol, candeeiro, CLAE, quantificação, validação.

ABSTRACT

Medicinal Plants produce a wide array of chemicals in the different classes and metabolic are in different proportions. The bisabolol is a sesquiterpene alcohol, monocyclic, unsaturated and optically active can be found in the essential oils of cabreuva (*Myrocarpus fastigiatus*), camomila alemã (*Matricaria recutita*), Capitu (*Siparuna guianensis*) and candeeiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker), abundant in region of Araripe. A method to quantify α - (-) - bisabolol in a water-alcohol solution by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated. A hydroalcoholic solution obtained in α manipulation Pharmaceuticals α - (-) - 2% bisabolol and essential oil extracted from the lamp were analyzed. A standard α - (-) - bisabolol was used for calibration. The analysis was conducted by using column chromatography *Thermo Scientific Hypersil C18* column (250 mm x 4.0 mm; particle size, 5 μ m) as stationary phase and a mixture of acetonitrile and phosphate buffer as the mobile phase, flow 1.0 mL / min and detection at a wavelength of 200 nm. The proposed method was validated according Resolution SR No. 899/2003 of the National Health Surveillance Agency. In the method, linearity was demonstrated with a correlation coefficient (r) greater than 0.9996 and in accordance with the RE n. 899/2003 of the National Health Surveillance Agency the minimum criteria for acceptable r should be equal to 0.99. Moreover, the chromatogram showed good resolution. With the validation criteria, including accuracy, specificity, accuracy and robustness, this method showed good repeatability and sensitivity and can be conveniently used for the quantification of α - (-) - bisabolol in ethanol-water solutions using this substance in the formulation with cosmetic use. Furthermore, it presents the advantages of easy sample preparation and analysis short time between each injection.

Keywords: α -(-)-bisabolol, candeeiro, HPLC, quantitation, validation.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação

O α -(-)-bisabolol [1-metil-4 (1,5-dimetil-1-hidroxihex-4 (5) -enil) -ciclohexeno-1] (BISA) (Fig. 1) é um álcool sesquiterpeno monocíclico insaturado obtido a partir de extratos de plantas, tais como *Chamomilla recutita*, *Achillea millefolium* L. e *Vanillosmopsis arborea* Baker, que tem sido amplamente usado em produtos cosméticos (WALECZEK et al, 2003;.. PERBELLINI et al, 2004; BHATIA et al., 2008). Vários estudos têm demonstrado atividades do α -(-)-bisabolol. Estudos mais antigos mostraram o poder antiinflamatório (JAKOVLEV et al, 1979;. GUILLOT et al, 1983;. MILLER et al., 1996), e de proteção gástrica (TORRADO et al., 1995) e mais recentemente anticancerígeno (CAVALIERI et al, 2004;.. DARRA et al, 2008) e anti mutagênico (GOMES-CARNEIRO et al., 2005).

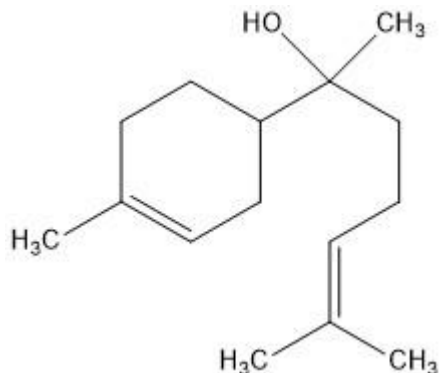


Figura 1. Estrutura química do α -(-)-bisabolol. Fonte: Autor

O BISA tem sido atribuído como um dos principais componentes de uma vasta gama de extratos de plantas com atividade antimicrobiana (HERNÁNDEZ et al, 2005;.. KAMATOU et al, 2005;.. VAGIONAS et al., 2007; FARIDI et al., 2008), apoiando o uso tradicional das plantas e o potencial dos produtos naturais como fontes de novos produtos farmacêuticos.

De acordo com o informativo técnico da *PharmaSpecial* e *Sarfam* o α -(-)-bisabolol é indicado em produtos de higiene e infantis, e também em cremes para peles delicadas, óleos bronzadores, protetores solares, loções pós-sol,

pós barba, pós depilação, pastas dentais e todo tipo de produto cosmético a ser usado em peles sensíveis e delicadas.

Vanillosmopsis arborea Baker é nativa da chapada do Araripe, no Nordeste do Brasil, no estado do Ceará. São poucos os estudos relativos ao uso tradicional desta planta. No entanto, estudos têm demonstrado que o óleo essencial da *Vanillosmopsis* apresenta ação antimicrobiana, antiinflamatória e a atividade gastroprotetora. (COLARES et.al., 2013).

O óleo do candeeiro é rico em α -(-)-bisabolol, presente em produtos dermatológicos, e além de apresentar atividades antimicrobiana, antifúngica e antiinflamatória, possui também baixa toxicidade (MATOS et al, 1998). O (-)- α -bisabolol apresenta-se como 80,43% de sua composição. O restante, propanoato de etila (5,87%), etanoato de propila (9,00%), o metil-eugenol (2,39%), óxido-bisabolol (2,31%), totalizando 100% na identificação do óleo essencial (SANTOS, 2009).

Estudos já demonstraram atividades biológicas com o óleo de *Vanillosmopsis arborea* Baker, dentre os quais pode ser destacado pesquisas realizadas pela Universidade Regional do Cariri, demonstrando efeito gastroprotetor do óleo essencial (LEITE et al., 2009); atividade antinociceptiva visceral (LEITE et al., 2011; SANTOS, 2009); atividade antioxidante para o extrato (LEITE et al., 2011); atividades antimicrobianas, antioxidante, antiinflamatória, antinociceptiva, ansiolítica, sedativa, depressora do sistema nervoso central (SANTOS et al., 2009).

Por outro lado, um dos impedimentos para aceitação de produtos vegetais é a falta de padronização de controle de qualidade (SHINDE *et al.*, 2009). Análises químicas e técnicas cromatográficas podem ser usadas para ajudar na identificação de material vegetal ou extrato. Técnicas cromatográficas, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa (CG), eletroforese capilar e métodos espectroscópicos como infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (RMN) e ultravioleta e visível (UV-Vis) podem ser usados como impressões digitais no processo de identificação e quantificação de metabólitos secundários (SHAW e BUT, 1995).

De acordo com o informativo técnico da *PharmaSpecial* e da *Sarfam* o α -(-)-bisabolol é um líquido transparente viscoso de coloração incolor/levemente

amarelado e odor característico floral, levemente adocicado. Possui índice de refração (20 °C) de 1,493 – 1,497 e rotação óptica -55 a -58°. O α -(-)-bisabolol tem densidade (20 °C) 0,925 a 0,933 e é completamente solúvel em álcool absoluto, álcool etílico, isopropílico e óleos naturais, minerais e sintéticos; insolúvel em água e glicerina, podendo ser obtida solução aquosa límpida com o auxílio de solubilizantes.

A fim de controlar a qualidade dos medicamentos à base de plantas de uma maneira mais adequada, metodologias analíticas bem fundamentadas devem ser utilizadas. Estas, quando não descritas em compêndios oficiais ou formulários nacionais, devem ser validadas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define o processo de validação como uma garantia, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Visando colaborar para o controle de produtos cosméticos que tenham como componente o α -(-)-bisabolol proveniente da extração de plantas medicinais pretende-se desenvolver uma metodologia de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O método será validado em conformidade com a regulamentação RE 899 de 2003 da ANVISA. Os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: especificidade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão e robustez (ANVISA, 2003).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Fornecer dados científicos que facilitem o controle de qualidade de produtos contendo o α -(-)-bisabolol em sua formulação, podendo servir como base para elaboração de monografia desta substância na Farmacopéia Brasileira.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método analítico, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação quantitativa de α -(-)-bisabolol; em solução hidroalcoólica.
- Aplicação do método validado para determinação do teor de α -(-)-bisabolol em solução hidroalcoólica, forma usada em cosméticos.

REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Considerações gerais

No Brasil, a Chapada do Araripe, um dos mais importantes microclimas do Ceará, destaca-se no Nordeste brasileiro por sua geomorfologia, devido a seu relevo tabuliforme e níveis altimétricos que influenciaram na manifestação de padrões vegetacionais distintos (CAVALCANTI, 1994) com sua riqueza em espécies nativas atrai uma intensa atividade antrópica que resulta em deteriorização e risco de extinção para várias formas de vida que ali habitam.

Uma das plantas que sofre mais conseqüências dessas ações é o candeeiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker), pequeno arbusto pertencente à família Asteraceae, que pode atingir até 4 metros de altura, de ramos sulcados, comum nas encostas da Chapada do Araripe no estado do Ceará, sendo que muitas populações desse vegetal já foram dizimadas (CAVALCANTI e NUNES, 2002).

Existem poucos estudos sobre o uso tradicional da planta. No entanto, estudos biológicos e farmacológicos mostraram que seu óleo essencial possui atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e de proteção gastrointestinais (COLARES et. al., 2013).

O óleo essencial da madeira desta planta é constituído por alfa bisabolol, um sesquiterpeno que está presente em teores elevados e cujo uso principal é em produtos dermatológicos, por apresentar atividades antibacteriana, antifúngica e antiinflamatória (LIMA et al., 2006) indicado para produtos de higiene e cuidado do bebê e de crianças, para cremes de peles delicadas, bronzeadores, protetores solares, loções após sol, pós-barba, pós-depilação, creme dental, enxagüatório bucal e protetores labiais (MAPRIC, 2007).

Pode-se extrair o α -(-)-bisabolol da camomila [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] que é uma espécie aromática de interesse farmacológico, alimentício e cosmético devido à presença de óleo essencial em seus capítulos florais cujos principais constituintes são, camazuleno e α -(-)-bisabolol com reconhecida atividade terapêutica. Industrialmente a camomila é usada para a

extração da essência, que tem largo emprego como aromatizante na composição de sabonetes, perfumes e loções, bem como conferir odor e sabor agradáveis a uma grande variedade de alimentos e bebidas, sendo a planta medicinal mais cultivada no mundo (LORENZI & MATOS, 2002).

Pode-se encontrar também na espécie *Achillea millefolium* L. que é outro exemplo de plantas utilizadas na medicina popular. *A. millefolium* L. também pertence à família Asteraceae e contém óleos essenciais, taninos, flavonóides e ácidos. A infusão feita a partir de suas folhas é indicado como analgésico, anti-espasmódico, digestivo, diurético, anti-séptico, adstringentes, emoliente, e agente de cura, bem como para o tratamento de hemorróidas (Silva et al., 1995).

Reis et al. (1996) citam que a manejo racional aparece como opção para obtenção de matéria prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo nas formações florestais. Muito tem sido falado a respeito dos cuidados necessários na produção de plantas medicinais, uma vez que a produção dos princípios ativos por estas plantas depende de uma série de fatores durante o crescimento vegetal, seu estabelecimento e nos procedimentos após a coleta.

O α -(-)-bisabolol possui reconhecido valor econômico, sendo um terpenóide insaturado e hidroxilado, com 1677 citações, sendo que destas, 459 correspondem a patentes de vários países do mundo. (LIMA et al., 2006)

3.1.1 α -(-)-bisabolol

De acordo com boletim técnico da *PharmaSpecial* α -(-)-bisabolol é indicado para todos os tipos de formulações cosméticas devido a sua estabilidade e compatibilidade com a pele. O seu efeito anti-irritante o torna especialmente indicado para peles sensíveis. É um líquido oleoso transparente, de cor límpida a amarelada, perfume doce, floral e amadeirado.

Boletim técnico da *Marpric* recomenda o seu uso em produtos pós-barba; formulações pós-depilatória; lenços umedecidos; desodorantes e antiperspirantes; produtos de proteção solar e pós Sol; higiene bucal (creme dental, enxaguatório); produtos para pele acnéica; produtos de cuidado do

bebê; condicionadores de cabelo; todos os tipos de produtos para pele sensível.

3.2 Controle de qualidade de extratos vegetais

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, da pluviosidade, do oferecimento de luz às plantas, das características dos solos, enfim, das características climáticas, além do seu potencial genético. Algumas substâncias químicas são características de uma determinada espécie vegetal, servindo como parâmetros para a sua caracterização e identificação (MIGLIATO *et al.*, 2007; GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Marcadores químicos podem ser utilizados para ajudar na identificação de materiais vegetais, definir especificações para matérias-primas, padronizar preparações botânicas durante todos os aspectos do processo de fabricação e obter perfis de estabilidade (LAZAROWYCH e PEKOS, 1998).

Os diferentes métodos existentes para a padronização físico-química de fitoterápicos e extratos vegetais incluem, entre outros, técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada (CCD), que permitem a quantificação de componentes de interesse diretamente ou indiretamente, após separação e extração dos compostos, seguida de determinação química ou físico-química (SONAGLIO *et al.*, 1986). No entanto, esta metodologia é considerada obsoleta, principalmente pelo advento das técnicas mais sensíveis como cromatografia líquida e gasosa acopladas a espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear, entre outras. A técnica acoplada CCD densitometria, empregando placas de alta eficiência (HPTLC), tem sido utilizada em análise de ativos de drogas vegetais e seus extrativos, tanto qualitativa quanto quantitativamente (KLEIN *et al.*, 2009).

3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A **Cromatografia Líquida de Alta Performance** ou Eficiência (CLAE), em inglês HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), que se tornou sigla oficial no meio analítico brasileiro, ou, ainda, cromatografia em fase líquida, pode ser conceituada como um método físico-químico de separação. É usada em casos em que a amostra a analisar está em solução, sendo os constituintes a serem separados chamados de solutos. A separação resulta de um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa sólida (chamada de estacionária), empacotada no interior de uma coluna, e uma fase móvel, que atravessa a fixa contida na coluna. (LEITE, 2008).

A CLAE é considerada um método rápido e preciso, permitindo a separação e doseamento de quantidades relativamente pequenas de material (SIMÕES *et al.*, 2000).

A mais importante das vantagens da CLAE é sua versatilidade. Ela pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como para inorgânicos. As amostras podem ser líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes; os gases são as únicas amostras não determinadas pela CLAE. As amostras típicas analisadas pela CLAE são: aminoácidos, explosivos, lipídeos polares, metabólitos de animais e plantas, pigmentos de plantas, polímeros sintéticos polissacarídeos, produtos farmacêuticos, proteínas e tintas (COLLINS *et al.*, 1997).

A separação por CLAE conduz a um registro de um conjunto de sinais (picos), em que cada um corresponde a um dos constituintes a sofrer separação; tal conjunto denomina-se cromatograma. (LEITE, 2008).

Entre os suportes mais comumente usados, encontram-se substâncias inorgânicas como gel de sílica e alumina (óxido de alumínio), que são geralmente utilizadas para separar compostos lipofílicos. Materiais orgânicos como celulose, poliamida e géis de dextrano são aplicados na separação de substâncias hidrofílicas, como aminoácidos e açúcares. Outras alternativas utilizadas são os materiais modificados quimicamente, como a celulose acetilada ou gel de sílica substituído por cadeias orgânicas alifáticas de C₈ a C₁₈ (FALKENBERG *et al.*, 2000).

A CLAE pode utilizar diferentes tipos de detectores específicos. Os detectores mais frequentemente utilizados em cromatografia líquida de alta

eficiência são os espectrofotométricos (UV/Vis). Eles são utilizados para detectar compostos com grupamentos cromóforos e podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Os detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, geralmente, 254 nm. Os detectores de comprimento de onda variáveis contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio e geram radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo ainda ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Já os múltiplos medem, simultaneamente, a absorbância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados detectores de arranjo de diodos (DAD). Além desses, o cromatógrafo líquido de alta eficiência pode ser acoplado a detectores de índice de refração, fluorimétricos, eletroquímicos, de espectrometria de massa e de condutividade (BRASIL, 2010).

3.3 Validação de Métodos Analíticos

A validação é um conjunto de procedimentos que visa estabelecer que a metodologia analítica é capaz de gerar resultados confiáveis. Os procedimentos para validação estão descritos em resoluções e guias. As resoluções são documentos com poder de lei; os guias são documentos que sugerem uma linha de trabalho a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação (RIBANI *et al.*, 2004).

Conforme a resolução de nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003), o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semiquantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise (ANVISA, 2003).

A especificidade é indicada para testes de identificação do princípio ativo, excluindo-se a necessidade dos outros parâmetros. Excetuando-se o limite de detecção, os demais parâmetros devem ser avaliados para os testes de quantificação de impurezas. Para o ensaio limite de impurezas, em que não é necessária a análise quantitativa, a avaliação do limite de detecção e da especificidade é suficiente. Para os testes de determinação quantitativa, é indicado que se avaliem todos os parâmetros, exceto os limites de detecção e quantificação (ICH, 2005).

A especificidade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (CODEX, 1995; ICH, 2005, SHABIR, 2003; SWARTZ e KRULL, 1998). Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (HUBER, 1998; JENKE, 1998; VESSMAN *et al.*, 2001). Essas duas maneiras são as mais utilizadas.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 2005; USP, 2011; SWARTZ e KRULL, 1988).

A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (AUGUSTO *et al.*, 2000). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta, obtida por análise de regressão linear, chamada de curva analítica (BARROS NETO *et al.*, 2002).

Para verificar se a equação de regressão linear é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear, validade da regressão, sua eficiência e sua eficiência máxima (BARROS NETO *et al.*,

2001; CHUI *et al.*, 2001). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade. A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

De acordo com o INMETRO (2003), a robustez de um método (“robustness”) mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros, como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como o tempo de extração, agitação, etc.

As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI *et al.*, 2004).

Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de acetonitrila na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento (RIBANI *ET al.*, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solventes e reagentes

A substância α -(-)-bisabolol, Sigma-Aldrich, de alto grau de pureza foi utilizada como padrão externo nas análises por CLAE.

Todos os reagentes e solventes foram grau HPLC (Tedia, J. T. Baker), exceto o ácido fosfórico (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Água ultra-pura foi obtida através do equipamento Milli-Q Gradient® (Millipore, Advantage A10, EUA), utilizando-se uma água com condutividade menor que 0,60 $\mu\text{S}/\text{cm}$ em todas as análises.

O óleo essencial extraído do candeeiro foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais-LPPN/URCA.

4.2 Desenvolvimento e validação do método analítico

4.2.1 Seleção de condições cromatográficas

A literatura sobre análise de α -(-)-bisabolol em HPLC é muito escassa. Pouquíssimos artigos relatam sobre o assunto. O pouco que foi encontrado auxiliou selecionar o solvente do α -(-)-bisabolol e o que utilizar como fase móvel da metodologia analítica.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da Farmace Indústria Químico-Farmacêutica Cearense Ltda., utilizando um sistema de HPLC (Shimadzu, Japão) constituído por uma bomba binária (Modelo LC-10 ADvp), um detector com comprimento de onda UV/VIS variável (Modelo SPD 10 AVP), uma válvula de injeção manual (Rheodyne®, EUA) com um *loop* de 20 μL , e um desgaseificador (DGU 14A). A coleta de dados e análises foram realizadas utilizando o *software* Shimadzu CLASS-VP™. Um gradiente de eluição foi realizada numa coluna Hypersil Thermo Scientific C₁₈

(250 mm x 4,0 mm) (Thermo Scientific, EUA), com tamanho da partícula de 5µm. A fase móvel consistiu de uma solução de 200mL de acetonitrila, 10 mL de Ácido Fosfórico PA e q.s.p. 1000mL de água ultrapura. A proporção de eluição foi de 25:75 dessa solução em acetonitrila pura.

Todas as soluções foram desgaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,45µm de poro (Millipore, Bedford, EUA).

4.2.2 Preparo do padrão

A solução estoque padrão de a-(-)-bisabolol foi preparada com 200mg dessa substância para 100mL de solução usando o hexano como solvente correspondendo a concentração de 2mg/mL.

Retirando-se através de pipeta 6 mL da solução estoque, transferindo para balão volumétrico de 50 mL e completando o volume com hexano, obtém-se a solução na concentração 0,24 mg/mL, o equivalente a 120%, já que o produto utilizado na metodologia tem como valor rotulado de 0,20 mg/mL.

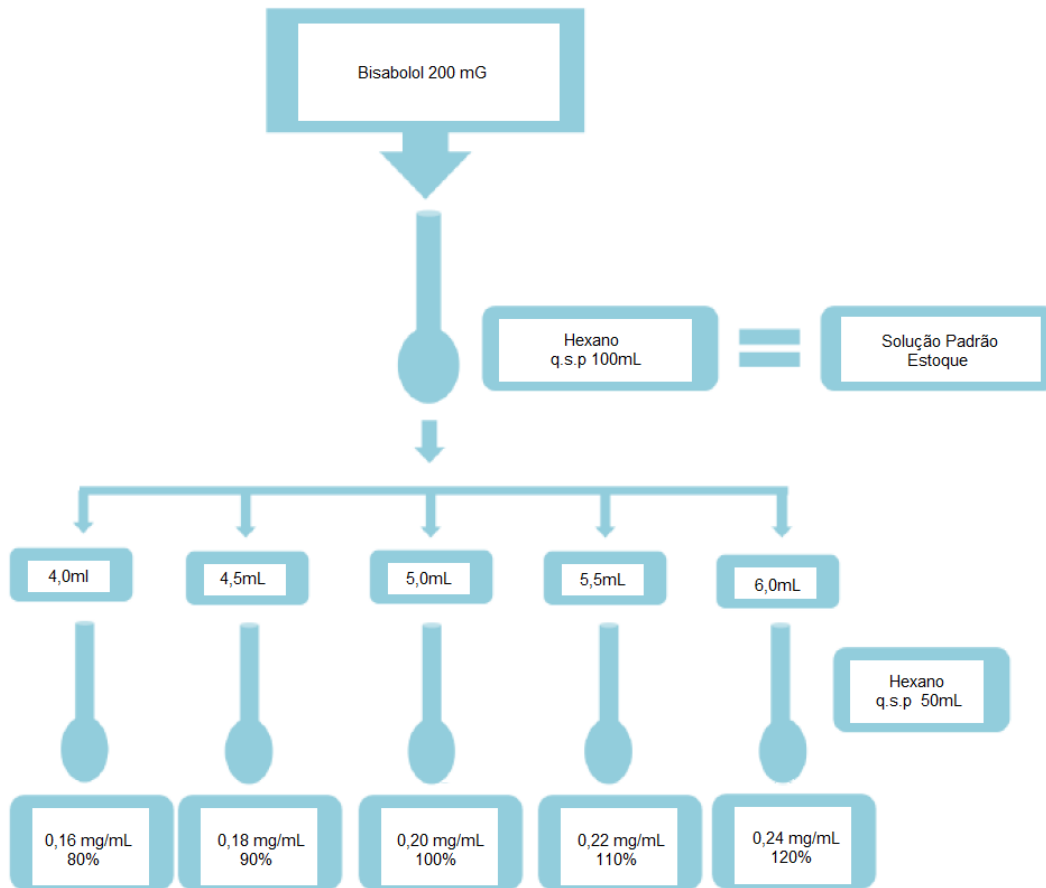
Para se chegar à concentração equivalente a 110% ou 0,22 mg/mL, pipeta-se 5,5 mL da solução estoque, transfere-se para um balão volumétrico de 50 mL completando assim o volume com hexano.

Dando sequência às diluições da curva de calibração, pipetar 5,0 mL da solução estoque, transferir para um balão de 50 mL, completar o volume com hexano, obtém-se a solução de padrão na concentração 0,20 mg/mL, a mesma concentração indicada no rótulo do produto que será utilizado na metodologia.

Para se obter a concentração de 0,18 mg/mL ou 90%, pipetar 4,5 mL da solução estoque para um balão de 50 mL e completar o volume com hexano.

E finalmente para se obter a solução em concentração de 80% ou 0,16 mg/mL, pipetar 4,0 mL da solução estoque para um balão de 50 mL e completar o volume com hexano. (Fluxograma 1).

Todas as diluições utilizadas na curva de calibração são preconizadas na RE Nº 899 da ANVISA.



Fluxograma 01 – Metodologia do preparo das soluções padrões de α -(-)-bisabolol a serem utilizadas na curva de calibração do método.

4.2.3 Preparo da amostra

Para se preparar uma solução estoque da amostra da solução hidroalcoólica de Bisabolol 20mg/mL foi retirado 1 mL da mesma e transferido para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com hexano. A partir desta diluição foi obtida uma solução estoque do cosmético contendo o BISA em hexano com concentração de 2 mg/mL. A partir desta solução estoque, foram obtidas as demais concentrações a serem utilizadas no parâmetro de exatidão do método analítico, onde a RE N° 899 da ANVISA preconiza que três concentrações devem ser escolhidas para avaliarmos esse parâmetro.

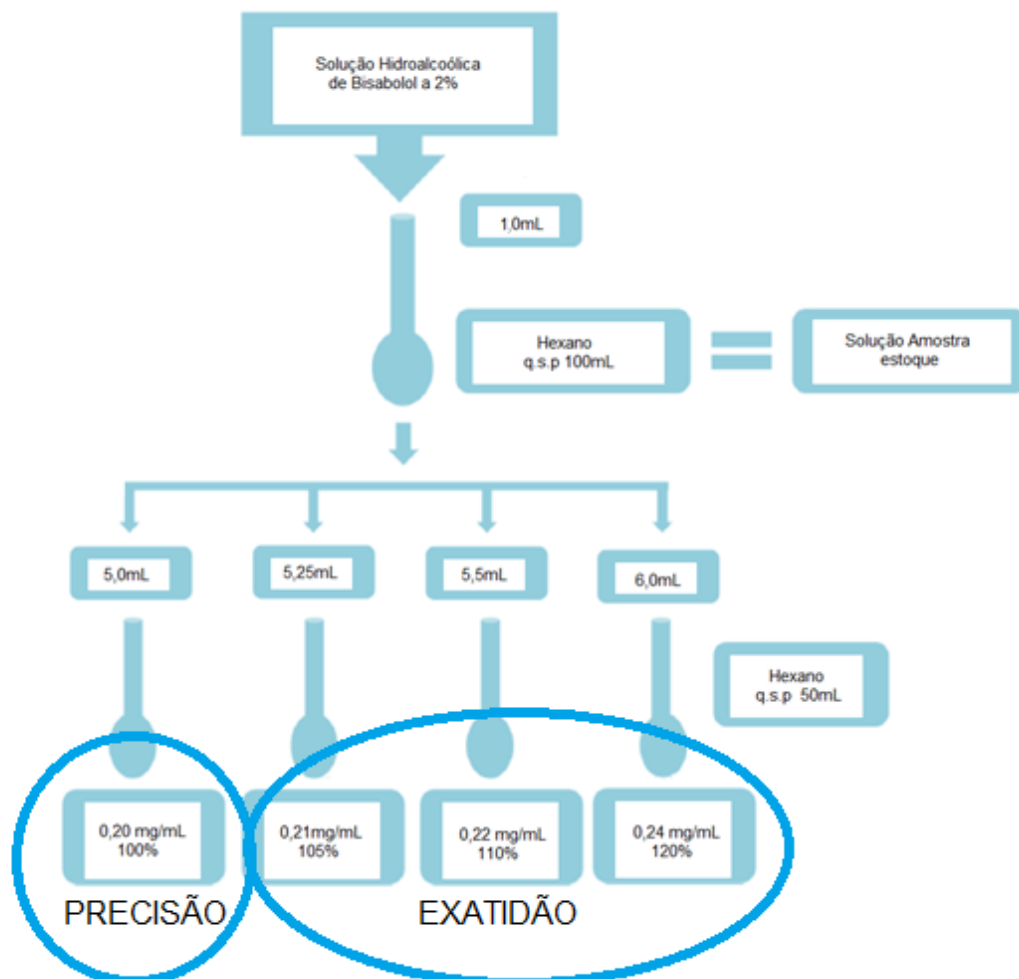
Retirando-se através de pipeta 6 mL da solução estoque, transferindo para balão volumétrico de 50 mL e completando o volume com hexano, obtivemos a solução na concentração 0,24 mg/mL equivalente a 120% do valor rotulado do produto em validação.

Para se chegar à concentração equivalente a 110% ou 0,22 mg/mL, pipetou-se 5,5 mL da solução estoque, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL completando assim o volume com hexano.

Dando sequência às diluições das amostras do cosmético foram pipetados 5,5 mL da solução estoque para balão volumétrico de 50 mL e completando o volume com hexano, foi obtido assim a concentração de 105% do valor rotulado o que equivale a 0,21 mg/mL.

Finalizando o processo de obtenção das soluções das amostras, foi pipetado agora 5,0 mL da solução estoque, transferido para um balão de 50 mL e completado o volume com hexano, foi obtido a solução de padrão na concentração 0,20 mg/mL, a mesma concentração indicada no rótulo do produto a ser utilizado na metodologia.

As diluições de 105, 110 e 120% foram utilizadas no parâmetro de exatidão e a diluição de 100% foi usada no parâmetro de precisão. (Fluxograma 2).



Fluxograma 02 – Metodologia do preparo das soluções das amostras de α -(-)-bisabolol a serem utilizadas na exatidão e precisão do método.

4.2.4 Método de Validação

Na validação do método analítico utilizado para quantificação de α -(-)-bisabolol em solução cosmética hidroalcoólica, determinou-se os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão e robustez. Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o EXCEL® *software* para obtenção dos parâmetros de desvio padrão relativo e coeficientes de correlação.

4.2.4.1 Especificidade

A especificidade é a capacidade do método distinguir o analito de outros componentes na amostra. Especificidade em um método de HPLC é demonstrado pela separação do analito de outros potenciais componentes, tais como impurezas, produtos de degradação, ou excipientes (DONG, 2006). Nessa pesquisa, será demonstrada a especificidade pela injeção de uma amostra do branco, onde 100 mL de hexano HPLC foram transferidos volumetricamente para um balão volumétrico de 100 mL. Com isso será verificado o comparativo do pico contendo o ativo de interesse no estudo e um placebo sem o α -(-)-bisabolol podendo ser verificado assim os possíveis interferentes que poderiam aparecer na leitura da amostra quando se comparada com o padrão.

Como o produto a ser analisado é uma solução hidroalcoólica de bisabolol + hidroquinona, uma solução hidroalcoólica contendo a mesma quantidade de hidroquinona será analisada, podendo ser observado assim que os demais componentes da formulação não irão interferir no sinal de quantificação da substância de interesse, o BISA.

4.2.4.2 Linearidade

A linearidade entre a área do pico e a concentração será determinada utilizando uma curva de calibração obtida com soluções padrões a cinco níveis de concentração do padrão de α -(-)-bisabolol. As concentrações do composto na solução considerada como 100% será 0,20 mg/mL. Utilizar-se-ão também as concentrações de 80%, 90%, 110% e 120% (Fluxograma 1) (Anvisa, 2003). Os dados de área do pico *versus* concentração da substância serão tratados por análise de regressão linear.

4.2.4.3 Sensibilidade

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) serão determinados da curva de calibração do padrão de BISA. Serão calculados LOD e LOQ, empregando-se as fórmulas abaixo, em que DP é o desvio padrão da resposta e IC é a inclinação da curva de calibração (ANVISA, 2003).

$\text{LOD} = \frac{\text{DP} \times 3}{\text{IC}}$	$\text{LOQ} = \frac{\text{DP} \times 10}{\text{IC}}$
---	--

4.2.4.4 Exatidão

A exatidão será avaliada pela média dos valores de recuperação encontrados, através do comparativo de concentrações conhecidas da amostra de α -(-)-bisabolol a três níveis de concentração (105%, 110% e 120%). Para avaliação da recuperação de α -(-)-bisabolol será calculado pela fórmula abaixo utilizando o que realmente foi encontrado em teor na leitura do cromatograma e a concentração teórica da amostra a ser corrida. Cada solução foi injetada em triplicata. Como as injeções serão em triplicata, a média será obtida através das mesmas.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração encontrada}}{\text{concentração original}} \times 100$$

4.2.4.5 Precisão

A precisão do método será investigada em relação a repetibilidade (intracorrída) e precisão intermediária (inter-corrída) pela determinação da solução padrão a 100%. Para executar a precisão intra-corrída do método, a amostra será injetada 6 vezes em uma sequência de corrida e a precisão inter-

corrida determinada pela injeção da amostra em diferentes dias (6 injeções por dia) e por outro analista.

4.2.4.6 Robustez

A amostra será analisada sob as condições definidas neste estudo e comparada a resposta do método diante das seguintes alterações: variação no pH da fase móvel com a utilização de ácido clorídrico para causar essa variação, diluição da amostra do produto cosmético em etanol para verificar se há variações significativas com a troca do diluente e análise do óleo essencial do candeieiro para verificar se o método tem a robustez de analisar outras substâncias que contém o α -(-)-bisabolol, como também alterações no fluxo de injeção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação de método de análise do α -(-)-bisabolol

5.1.1 Adequabilidade do sistema cromatográfico e Especificidade

O método de análise do α -(-)-bisabolol por CLAE conduzido neste estudo objetivou o desenvolvimento de um sistema cromatográfico capaz de eluir e apresentar boa resolução na identificação e quantificação do α -(-)-bisabolol em solução hidroalcoólica utilizada como cosmético, abrindo assim uma vasta possibilidade de pesquisa nessa área, já que a literatura sobre o assunto é escassa e a utilização do α -(-)-bisabolol para tal finalidade é cada vez mais crescente.

Na fase inicial, também definiu-se a concentração do α -(-)-bisabolol na solução padrão, de forma que as concentrações dos mesmos estivessem próximas a valores estimados para a amostra.

A tabela abaixo mostra os resultados nas análises de adequabilidade do sistema obtendo-se o desvio padrão menor que 5,0%. Após definição e verificação das condições cromatográficas, a metodologia foi validada.

Injeções	Áreas	
1	8702454,0	
2	8704944,0	
3	8711628,0	
4	8725239,0	
5	8729989,0	
	Critério de Aceitação	Resultado Obtido
Média das Áreas	-	8714850,8
Desvio Padrão Relativo	<5,0%	0,1400000

Tabela 1. Resultados das análises de adequabilidade da metodologia analítica

A especificidade pode ser observada no cromatograma apresentado nas Figuras 2 a 7, na qual não há pico referente à substância analisada. Dessa forma, o solvente e/ou fase móvel não apresentam interferência nos constituintes da formulação, sendo específico para determinação de α -(-)-bisabolol nas condições estudadas. Além disso, foi comprovado também que outras substâncias existentes na formulação como a hidroquinona não interfere nos resultados quando comparamos a amostra do solvente mais hidroquinona e ausência do α -(-)-bisabolol.

Cromatograma

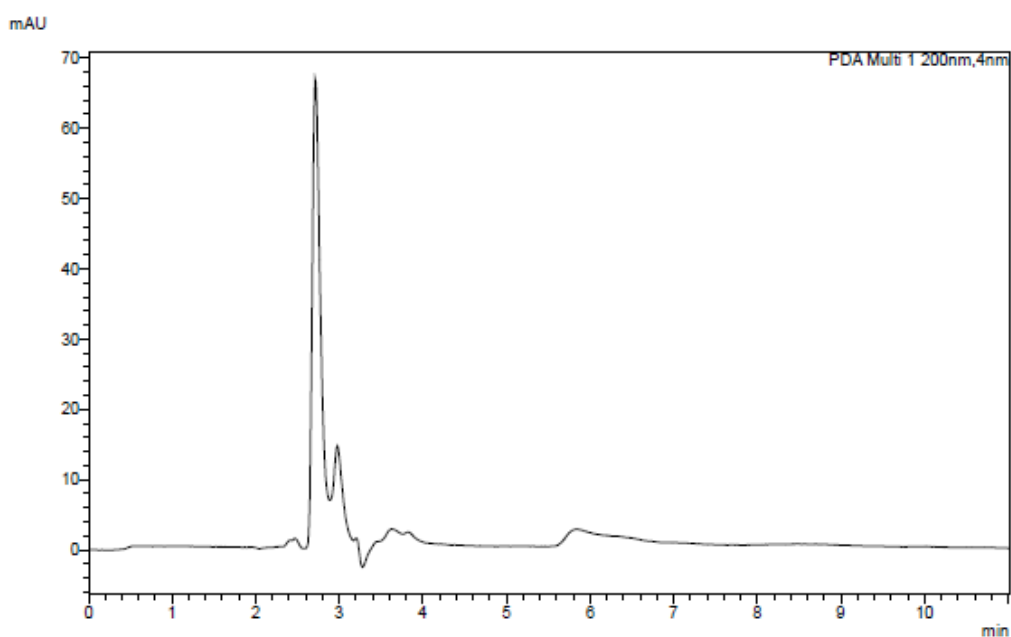


Figura 2. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 1 – Hexano + Hidroquinona

Cromatograma

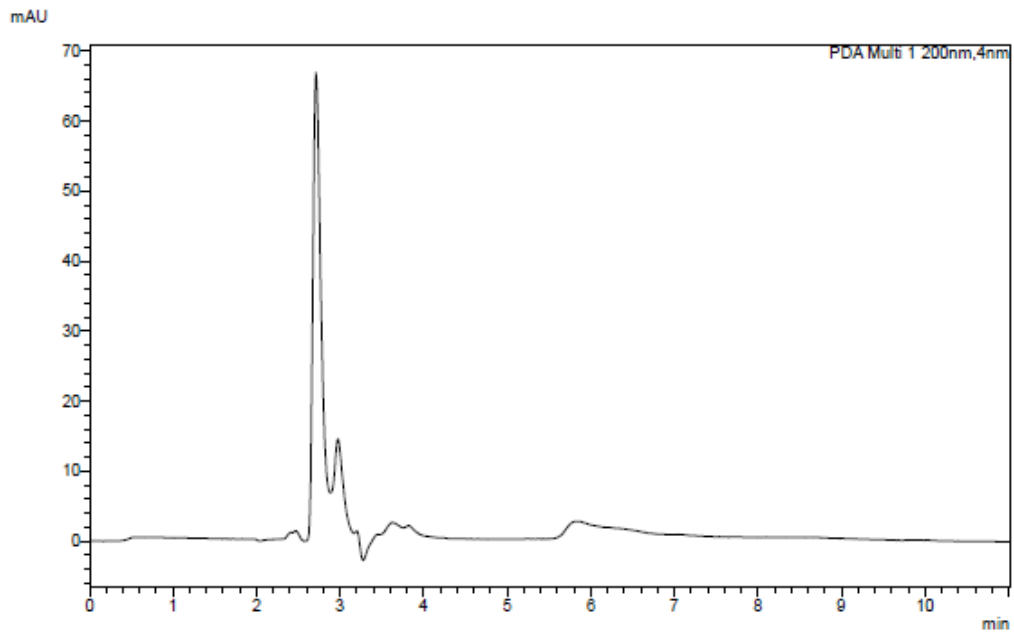


Figura 3. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 2 – Hexano + Hidroquinona

Cromatograma

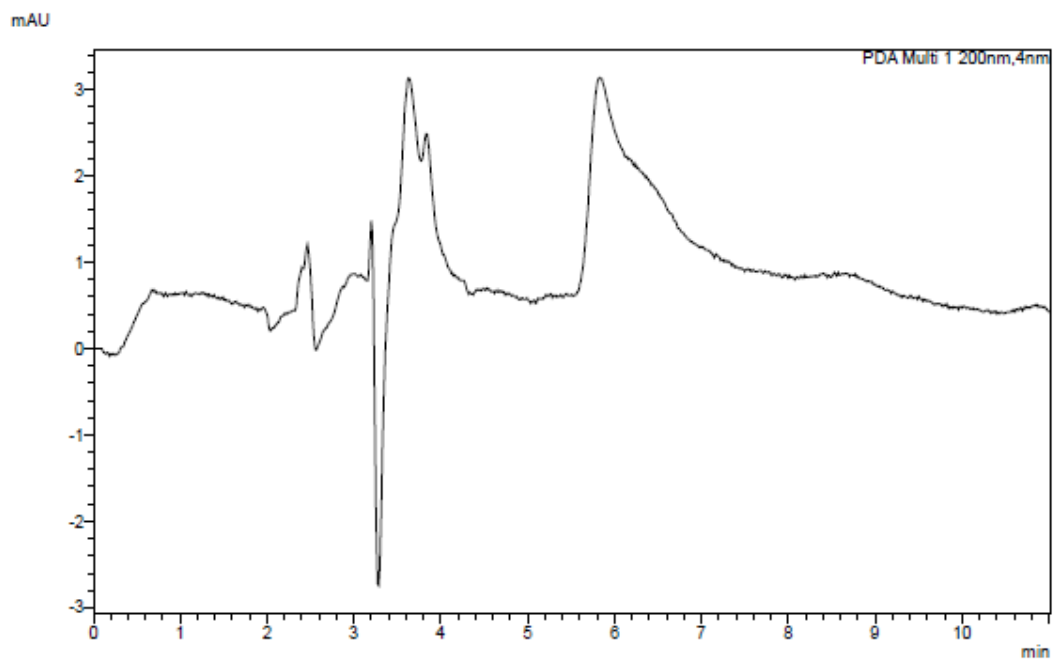


Figura 4. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 3 – Somente Hexano

Cromatograma

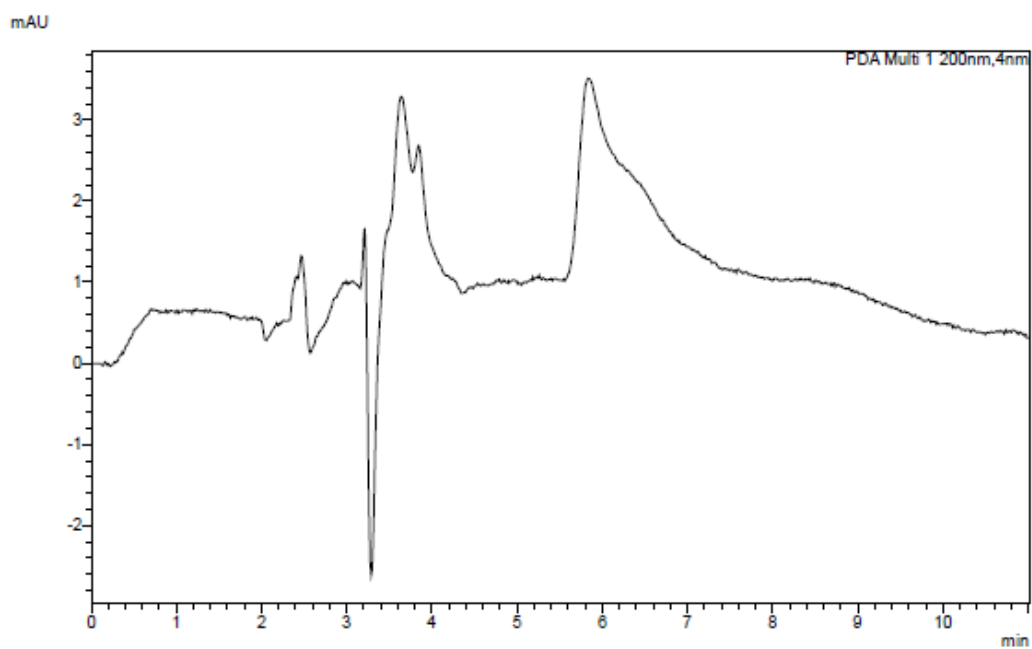
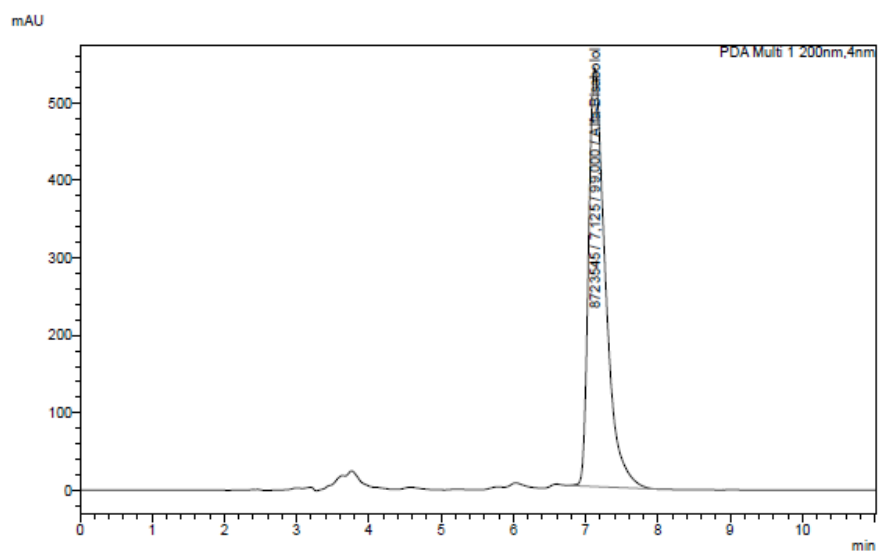


Figura 5. Cromatograma do ensaio de Especificidade Placebo 4 – Somente Hexano

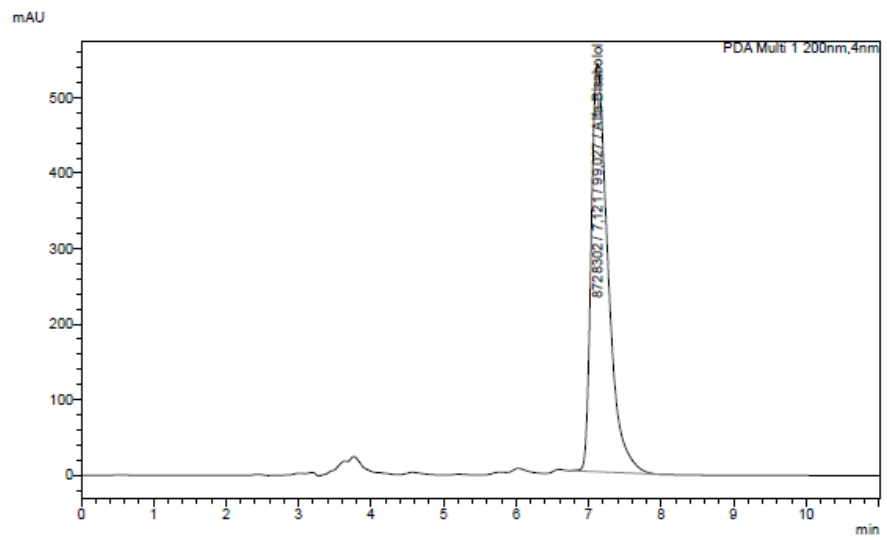
Cromatograma



PDA Ch1 200nm				
Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,125	8723545	99,000
Total			8723545	

Figura 6. Cromatograma do ensaio de Especificidade Solução Padrão de α -(-)-bisabolol

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,121	8728302	99,027
Total			8728302	

Figura 7. Cromatograma do ensaio de Especificidade Solução Padrão de α -(-)-bisabolol

5.1.2 Linearidade

A linearidade do método foi determinada pela construção de curvas de calibração dos padrões de α -(-)-bisabolol utilizando as concentrações de 0,16; 0,18; 0,20; 0,22; e 0,24 mg/mL que correspondem às faixas de 80 a 120% da concentração de trabalho.

%	Concentração (mg/mL)	Resultados Obtidos	Fator (Área/Conc)
80	0,16	7092314	4432696
90	0,18	7926174	4403430
100	0,20	8755553	4377776
110	0,22	9474160	4306436
120	0,24	10244812	4268671
	Critério de Aceitação	Resultado	
R	> 0,99	0,9996000	
	Critério de Aceitação	Resultado	
DPR	< 5,0%	1,56785509	

Tabela 2. Resultados obtidos no ensaio da linearidade para α -(-)-bisabolol e os valores de coeficiente de correlação (r) e desvio padrão relativo (DPR)

O Fator de relação (FR) expressa a relação existente entre os resultados obtidos e a concentração, pela razão entre os mesmos. Em uma curva analítica, os FR devem ser semelhantes entre si e próximos do valor da inclinação da reta. Calcularam-se os FR e o DPR entre eles. Recomenda-se que o DPR seja inferior a 5% (AEFI, 2001).

Nas Figura 8 está representada a curva analítica de BISA por CLAE e a equação da reta, calculados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

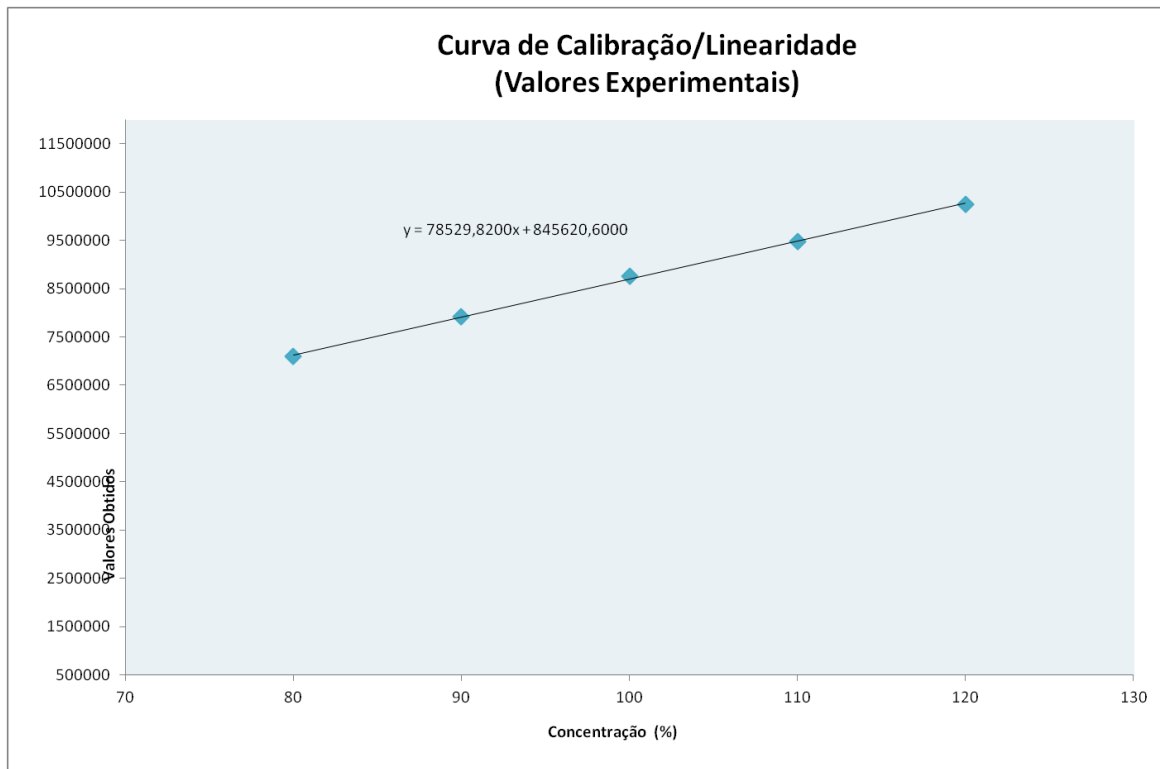


Figura 8. Curva de calibração construída a partir dos resultados do ensaio de linearidade do α -(-)-bisabolol

O coeficiente de correlação revelou ser superior a 0,99 para todos os padrões, indicando correlação linear entre suas concentrações e as áreas nas faixas 80 a 120% da concentração de trabalho.

5.1.3 Sensibilidade

O LOD, definido como a menor concentração absoluta do analito em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado sob as condições deste estudo, foi 5,16%

O LOQ, definido como a menor concentração de analito que pode ser quantificado e determinado com aceitável precisão e exatidão, resultou 17,21%.

5.1.4 Recuperação

A exatidão foi estimada pela análise da amostra de concentração conhecida, comparando o valor medido com o valor real e utilizando o método de adição de padrão.

Os resultados de exatidão evidenciaram uma concordância entre os resultados encontrados na análise da solução hidroalcoólica de BISA, comprovando que o método é exato. O percentual recuperado pode ser visualizado na Tabela 3.

O valor de porcentagem de recuperação para o α -(-)-bisabolol foi de 100,20%, para e o desvio padrão relativo foi 0,10%. Portanto, os valores médios de recuperação estão entre os 98% e 102% recomendados pela legislação brasileira vigente de validação de métodos e os valores de DPR abaixo de 2,0%.

Apesar dos resultados estarem dentro das especificações recomendadas, os valores de recuperação maiores que 100 % poderiam estar relacionados a erros analíticos ou a efeitos da matriz, valendo ressaltar que foi utilizada a mesma coluna cromatográfica para execução de todos os ensaios.

Conc. % α -(-)-bisabolol	Resultado	Recuperação	Média	DPR
	Encontrado	%	Recuperação	
	α -(-)-bisabolol	α -(-)-bisabolol	%	
105%	105,780%	100,74	100,87	0,12
105%	105,914%	100,87		
105%	106,042%	100,99		
110%	109,994%	99,99	100,08	0,09
110%	110,077%	100,07		
110%	110,182%	100,17		
120%	119,469%	99,56	99,64	0,08
120%	119,577%	99,65		
120%	119,663%	99,72		
Médias			100,20	0,10

Tabela 3 - Resultados obtidos no ensaio de exatidão para o α -(-)-bisabolol e os valores médios de recuperação e DPR

5.1.5 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois dias consecutivos de análise por analistas diferentes, porém com o mesmo equipamento, obtendo-se os valores de repetibilidade (intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrídas). Os valores dos teores de α -(-)-bisabolol e os valores de DPR para avaliar as precisões estão representados na Tabela 4.

1ª corrida - Analista A - Data: 08/01/13			
Amostra	Concentração (mg/mL)	Área	Fator de Correlação
1	0,2	8784167	43920835
2	0,2	8795448	43977240
3	0,2	8803102	44015510
4	0,2	8804341	44021705
5	0,2	8810936	44054680
6	0,2	8816651	44083255
	Critério de Aceitação	Resultado Obtido	
DPR 1	< 5,0%	0,131000	
2ª corrida - Analista B - Data: 10/01/13			
Amostra	Concentração (g/L)	Área	Fator de Correlação
1	0,2	9036692	45183460
2	0,2	9043820	45219100
3	0,2	8980614	44903070
4	0,2	8964566	44822830
5	0,2	8996569	44982845
6	0,2	9014780	45073900
	Critério de Aceitação	Resultado Obtido	
DPR 2	< 5,0%	0,348000	
Precisão Intercorrída			
	Critério de Aceitação	Resultado Obtido	
DPR	< 5,0%	1,221000	

Tabela 4 - Resultados obtidos no ensaio de precisão para α -(-)-bisabolol e os valores DPR (intra-corrída e inter-corrída)

O ensaio de precisão intra-corrída de seis réplicas autênticas na concentração 100% de BISA, apresentou como resultado na 1ª corrida os desvios padrão relativos de 0,131 e DPR de 0,348 para 2ª corrida, atendendo às exigências normativas (ANVISA, 2003). O aumento do DPR entre a 1ª corrida e 2ª corrida pode ser explicada pelo efeito do analista, ou seja, a forma como a amostra foi injetada, uma vez que eles utilizaram a mesma amostra.

Os valores de desvio padrão relativo para a precisão inter-corrída (n=12) foi de 1,221, valores inferiores ao limite estabelecido pela legislação brasileira

vigente de validação de método, cujo DPR deve ser menor que 5,0% (ANVISA, 2003).

5.1.6 Robustez

A variação dos parâmetros de pH da fase móvel não alterou, de forma significativa, as concentrações encontradas na amostra da solução hidroalcoólica de BISA. Outro parâmetro a ser alterado foi a injeção do fluxo e do solvente para verificarmos se essa alteração influenciaria os resultados de quantificação. Os resultados do teor de α -(-)-bisabolol demonstram a robustez do método encontrados em cada condição testada estão representados nas Tabela 5 e 6.

Condições Avaliadas	Descrição	Tempo de Retenção (min)	Teor (%)	Média Teor (%)	DPR
Adição de HCl 0,0008M	Padrão	7,125	101,437	101,500	0,09
	Amostra	7,125	101,564		
Adição de HCl 0,0012M	Padrão	7,123	101,696	101,758	0,09
	Amostra	7,124	101,821		

Tabela 5 - Resultados do ensaio de robustez, com variações do pH da fase móvel.

Condições Avaliadas	Descrição	Tempo de Retenção (min)	Teor (%)	Média Teor (%)	DPR
Fluxo 0,9 mL/min	Padrão	7,993	101,494	101,545	0,07
	Amostra	7,991	101,596		
Fluxo 1,1 mL/min	Padrão	6,565	101,494	101,489	0,01
	Amostra	6,564	101,484		

Tabela 6 - Resultados do ensaio de robustez, com variações do fluxo de injeção e troca de solvente (hexano → etanol).

5.1.7 Aplicabilidade

Além da utilização da metodologia validada no controle de qualidade de medicamentos e cosméticos que possuam a substância em questão, o BISA, em sua formulação, podemos estender a importância do estudo abordado na aplicação em óleos essenciais como o do candeeiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker).

Com a aplicabilidade desse estudo em óleos contendo o α -(-)-bisabolol em sua composição, favorecerá a extração e comercialização dessa substância na região da Chapada do Araripe, aumentando assim possibilidades de renda para os agricultores da região.

Análises do óleo essencial do candeeiro em etanol foram realizadas com sucesso, e essa metodologia pode ser estendida para tal finalidade, identificar e quantificar o α -(-)-bisabolol em óleos essenciais, dentre eles o do candeeiro.

Como a concentração do produto cosmético em análise no estudo possui como valor rotulado e 0,20 mg/mL de BISA, para prepararmos o padrão na mesma concentração pegou-se 20 mg de diluiu-se em q.s.p 100 mL de etanol.

O óleo foi pesado na mesma quantidade, ou seja, 20 mg e diluído em q.s.p. 100 mL de etanol.

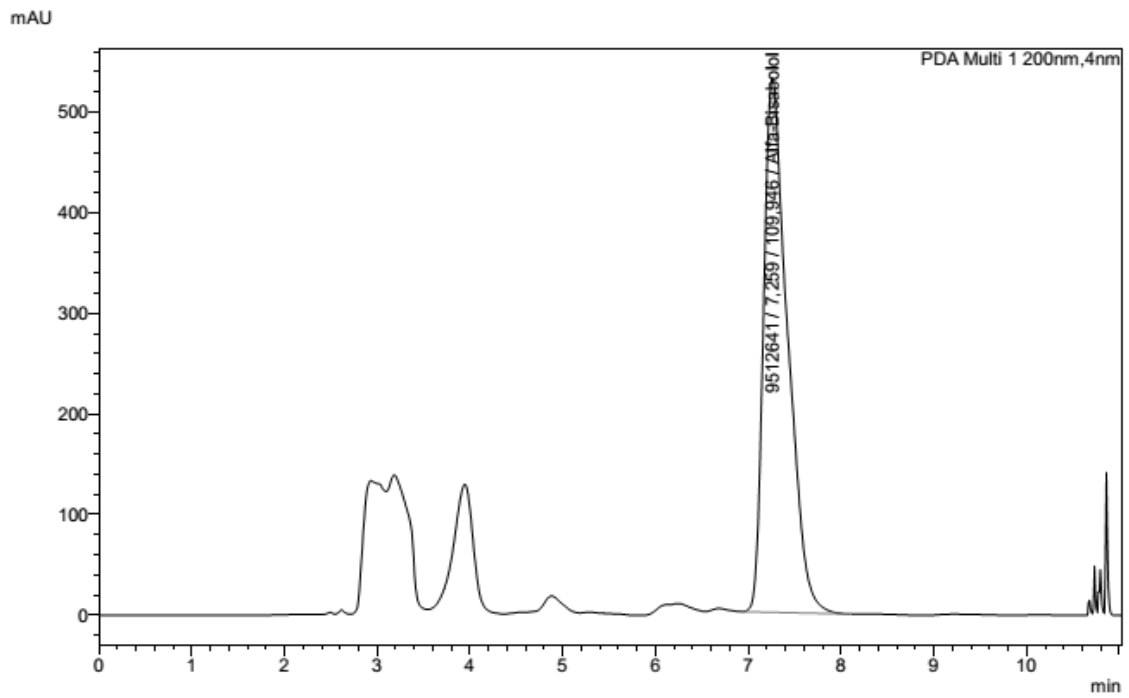
Com o comparativo dos resultados, obtêm-se a tabela abaixo:

Condições Avaliadas	Descrição	Tempo de Retenção (min)	Teor (%)	Concentração mg/mL
Óleo Essencial do Candeeiro	Padrão	7,291	101,494	0,202988
	Óleo	7,259	109,946	0,219892
	Padrão	7,273	101,601	0,203202
	Óleo	7,242	109,876	0,219752

Tabela 7 - Resultados do ensaio de quantificação do α -(-)-bisabolol no óleo essencial do candeeiro.

As figuras a seguir demonstram como a metodologia pode ser aplicada para estudos em óleos essenciais contendo o BISA:

Cromatograma

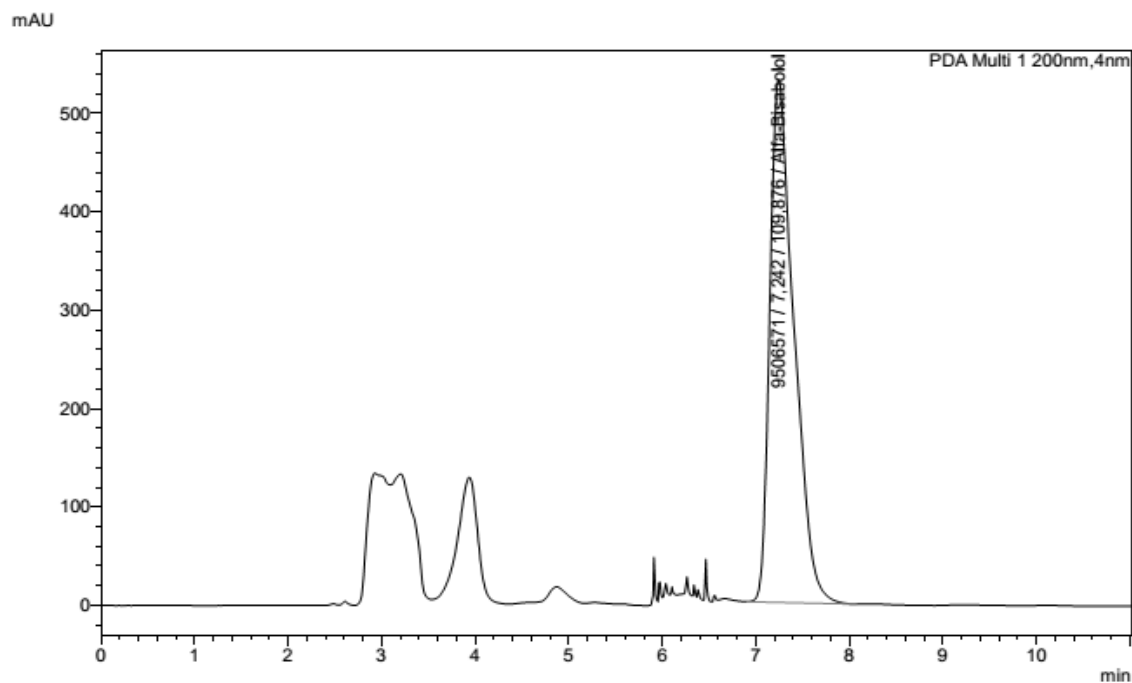


PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,259	9512641	109,946
Total			9512641	

Figura 9 - Cromatograma do ensaio de quantificação do α -(-)-bisabolol no óleo essencial do candeiro.

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,242	9506571	109,876
Total			9506571	

Figura 10 - Cromatograma do ensaio de quantificação do α -(-)-bisabolol no óleo essencial do candeiro.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1- O método analítico por CLAE para quantificação de α -(-)-bisabolol em solução hidroalcoólica foi validado demonstrando especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.
- 2- Todos os resultados obtidos nesta validação estão dentro das especificações preconizadas pelo guia nacional de validação de método analítico (ANVISA, 2003).
- 3- A metodologia de quantificação do α -(-)-bisabolol pode ser aplicada em soluções hidroalcoólicas cosméticas disponíveis no mercado que contém essa substância.
- 4- Este trabalho ressalta a importância do desenvolvimento e validação de métodos de quantificação e de controle de qualidade de soluções cosméticas. Além disso, pretende incentivar a realização de mais estudos nessa mesma linha de pesquisa, uma vez que o assunto estudado é pobre em literatura e a substância já é bastante utilizada na produção de cosméticos.
- 5- Favorecer a utilização do candeeiro de forma a atender um processo de renda para agricultores, já que esta metodologia pode ser estendida para o controle de qualidade de óleos essenciais que possuam o α -(-)-bisabolol em sua composição.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

AEFI (ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA). **Validación de métodos analíticos**. Barcelona, 2001.

ALBUQUERQUE, ELAINE CABRAL; DETONI, CÁSSIA; FERREIRA DOMINGOS; SÃO PEDRO, ANDRÉ ; SARMENTO, BRUNO. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of (-)- α -bisabolol from particulate systems. **Biomedical Chromatography**, 2009. **23**: 966-972

ANVISA 2003. **Resolução-RE no 899: Guia para validação de métodos analíticos bioanalíticos**. Diário Oficial da União. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=56&data=02/06/2003>> Acesso em: 05 Julho 2014.

Aracélio Viana Colares, Fernando Almeida-Souza, Noemi Nosomi Taniwaki, et al., "In Vitro Antileishmanial Activity of Essential Oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker," Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2013, Article ID 727042, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/727042

AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. **Chemkeys**, 2000.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova** 25, 856, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Editora da Unicamp: Campinas, 2001.

Bhatia SP, Mcginty D, Letizia CS and Api AM. Frangrance material review on α - α -(-)-bisabolol. *Food and Chemical Toxicology* 2008; *in press*.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. vol. 1, 2010.

CAVALCANTI, F. S. **Estudo agrônômico exploratório do candeeiro (*Vanillosmopsis arborea* Baker)**. 1994. 101f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

CAVALCANTI, F. S.; NUNES, E. P. Reflorestamento de clareiras na floresta nacional do Araripe com *Vanillosmopsis arborea* Baker. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 12, p. 94-96, 2002.

Cavalieri E, Mariotto S, Fabrizi C, de Prati AC, Gottardo R, Leone S, Berra LV, Lauro GM, Ciampa AR and Suzuki H. α -A-(-)-bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; **315**: 589–594.

CODEX Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. **Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes**. CX/MAS 95/3, 1995.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (coordenadores). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7a ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

Darra E, Abdel-Azeim S, Manara A, Shoji K, Maréchal J-D, Mariotto S, Cavalieri E, Perbellini L, Pizza C, Perahia D, Crimi M and Suzuki H. Insight into the apoptosis-inducing action of α - α -(-)-bisabolol towards malignant tumor cells: Involvement of lipid rafts and Bid. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; **476**: 113–123.

FALKENBERG, M. de B.; SANTOS, R.I. dos; SIMÕES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.;PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta**

ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, p. 163-179, 2000.

Faridi P, Ghasemi Y, Gholami A, Mehregan I and Mohagheghzadeh A. Antimicrobial essential oil from *Smyrniopsis aucheri*. *Chemistry of Natural Compounds* 2008; **44**: 116–118.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-381, 2007.

Gomes-Carneiro MR, Dias DM, De-Oliveira AC and Paumgarten FJ. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α α (-)-bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research* 2005; **585**: 105–112.

Guillot JP, Martini MC, Giauffret JY, Gonnet JF and Guyot JY. Anti-irritant potential of cosmetic raw materials and formulations. *International Journal of Cosmetic Science* 1983; **5**: 255–265.

Hernández T, Canales M, Avila JG, García AM, Martínez A, Caballero J, Roma de Vivar A and Lira R. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 2005; **96**: 551–554.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. *LC-GC International*, 11: 96-105, 1998.

ICH - International Conference on Harmonization; **Q2R1- Validation of Analytical procedure: Text and Methodology**, Food and Drug Administration, USA, 2005.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE- 008, 2003

Jakovlev V, Isaac O, Thiemer K and Kunde R. Pharmacological investigations with compounds of chamomille. II. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)- α - α -(-)-bisabolol and α -(-)-bisabolol oxides. *Planta Medica* 1979; **35**: 125–140.

JENKE, D.R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. *Instrumentation Science & Technology* 26:1-35, 1998.

JOLY, A. B. Botânica. 7. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1985.

Kamatou GPP, Viljoen AM, Gono-Bwalya AB, van Zyl RL, van Vuuren SF, Lourens ACU, Baser KHC, Demirci B and Lindsey KL. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; **102**: 382– 390.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 30(3): 241-248, 2009.

LAZAROWYCH, N.J.; PEKOS, P. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: Strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products. *Drug Information Journal* 32: 497-512, 1998.

LEITE, Flávio. **Validação em Análise Química**. 5ª ed. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LEITE, G.O.L.; PENHA, A.R.; FERNANDES, C.N.; CAMPOS, A.R, et al. Mecanismo gastroprotetor do óleo essencial da casca de *Vanillosmopsis arborea*. *Fitoterapia*, vol.80 (1), p.77-80, 2009.

LEITE, G. O.; SAMPAIO, R. S.; LEITE, L. H. I.; ARAR UNA, M. K. A.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. **α -bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice.** Fitoterapia, vol.82, p.208-211, 2011.

LEITE, G. O.; SAMPAIO, R. S.; LEITE, L. H. I.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R. Attenuation of visceral pain in mice by the essential oil from *Vanillosmopsis arborea* Bark. Rev Dor, São Paulo, vol.12(1), p.46-9, 2011.

LIMA, I. V.; SILVA, M. G. V.; CAVALCANTI, F. **Estudo químico de *vanillosmopsis arborea* Baker – fonte cearense de α -bisabolol.** Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2006/trabalhos2006/1/192-333-1-T2.htm>>. Acesso em: 12 Janeiro. 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A.; **Plantas medicinais do Brasil nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MAPRIC. **Produtos Farmacêuticos e Cosméticos.** Disponível em: <<http://www.google.com.br/Antiinflamatório/Cicatrizante.>>. Acesso em: 05 Julho 2014.

MATOS, M.E.O.; SOUSA, M.P.; MATOS, F.J.A. et al. Sesquiterpenos de *Vanillosmopsis arborea* .J Nat. Prod, vol.51, p.780, 1998.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORREA, M.A; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17(1):94-101, 2007.

Miller T, Wittstock U, Lindequist U and Teuscher E. Effects of some components of the essential oil of chamomile, *Chamomilla recutita*, on histamine release from rat mast cells. *Planta Medica* 1996; **62**: 60–61.

PADETEC. Parque de desenvolvimento tecnológico. **Óleos essenciais.** Disponível em: <http://www.padetec.ufc.br/novapagina/pesquisas/oleos.php> Acesso em: 12 Janeiro. 2015.

Perbellini L, Gottardo R, Caprini A, Bortolotti F, Mariotto S and Tagliaro F. Determination of alpha- α -(-)-bisabolol in human blood by micro-HPLC-ion trap MS and head space-GC-MS methods. *Journal of Chromatography B* 2004; **812**: 373–377.

REIS, M.S. dos. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: DI STASI, C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. S.P.: Ed. da Univ. Est. Paulista, p. 198-214, 1996.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.F.S.; MELO, L.F.C. **Química Nova**, 27, 771, 2004.

SANTOS, N.K.A.; Verificação das propriedades antibacteriana e farmacológica do Óleo essencial de *Vanillosmopsis arbórea* (Asteraceae) Baker. Dissertação de Mestrado. Programa de pós-graduação em Bioprospecção molecular da Universidade Regional do Cariri, Brasil – 2009.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, 987: 57-66, 2003.

SHAW, P.C.; BUT, P.P. Authentication of Panax species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction. **Planta Medica** 61: 466-469, 1995.

SHINDE, V.M.; DHALWAL, K.; POTDAR, M.; MAHADIK, K.R. Application of quality control principles to herbal drugs. **International Journal of Phytomedicine** 1: 4-8, 2009.

Silva I, Franco SL, Molinari SL, Conegero CI, Miranda Neto MH, Cardoso MLC, Sant'ana DMG and Iwanko, NS (1995) Noções Sobre o Organismo Humano e Utilização de Plantas Medicinais. Assoeste - Editora Educativa, Cascavel, PR, Brasil, pp 203.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000.

SONAGLIO, D.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureoides* (LAM.) DC., compositae (Marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. **Caderno de Farmácia** 2(1):55-74, 1986.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology** 2(3): 12-20, 1998.

Torrado S, Torrado S, Agis A, Jimenez ME and Cadórniga R. Effect of dissolution profile and (-)-alpha-alpha(-)-bisabolol on the gastrotoxicity acetylsalicylic acid. *Pharmazie* 1995; **50**: 141–143.

USP (United States Pharmacopeia Convention); 34 ed., **Validation of Compendial Methods** <1225>, Rockville, 2011.

Vagionas K, Graikou K, Ngassapa O, Runyoro D and Chinou I. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja* species growing in Tanzania. *Food Chemistry* 2007; **103**: 319–324.

VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; STADEN, J.F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, T.; FAJGELJ, A.; MULLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry** 73: 1381-1386, 2001.

Waleczek KJ, Marques HM, Hempel B and Schmidt PC. Phase solubility studies of pure (-)-alpha-alpha(-)-bisabolol and camomile essential oil with beta-cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2003; **55**: 247–251.

ANEXOS

Anexo I: Teste de Adequação 1-5

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

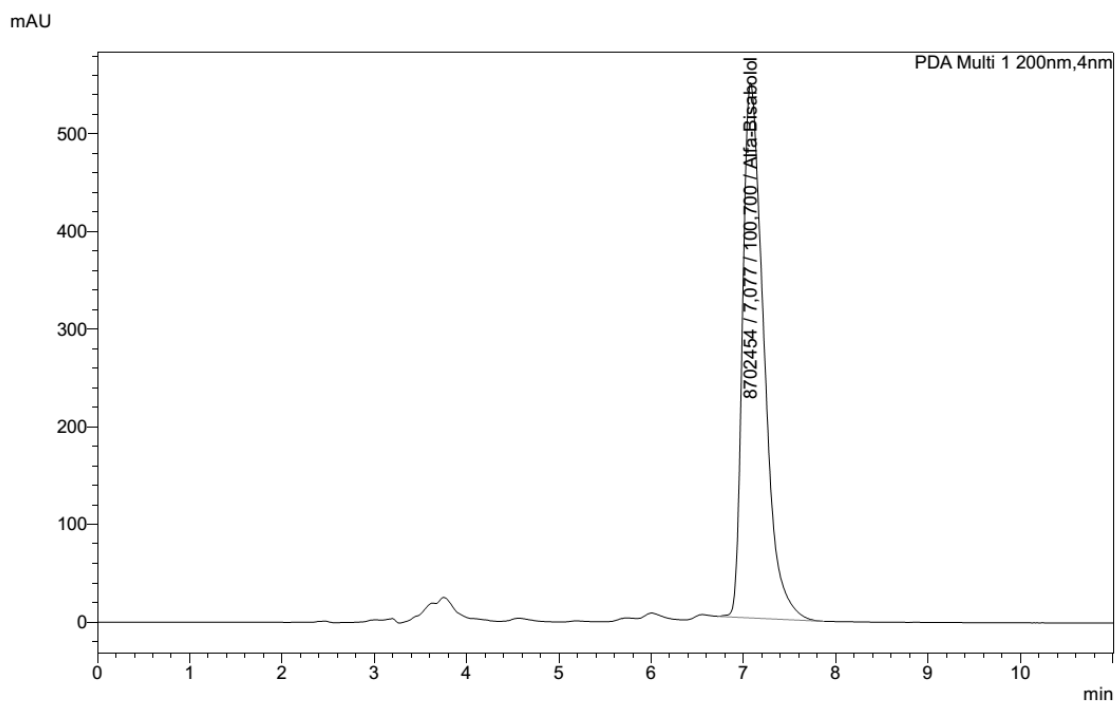
Arquivo: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Suitability 1.lcd

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Suitability 1

Data de Aquisição: 13/11/2014 20:33:28

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,077	8702454	100,700
Total			8702454	

Anexo II: Teste de Adequação 2-5

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

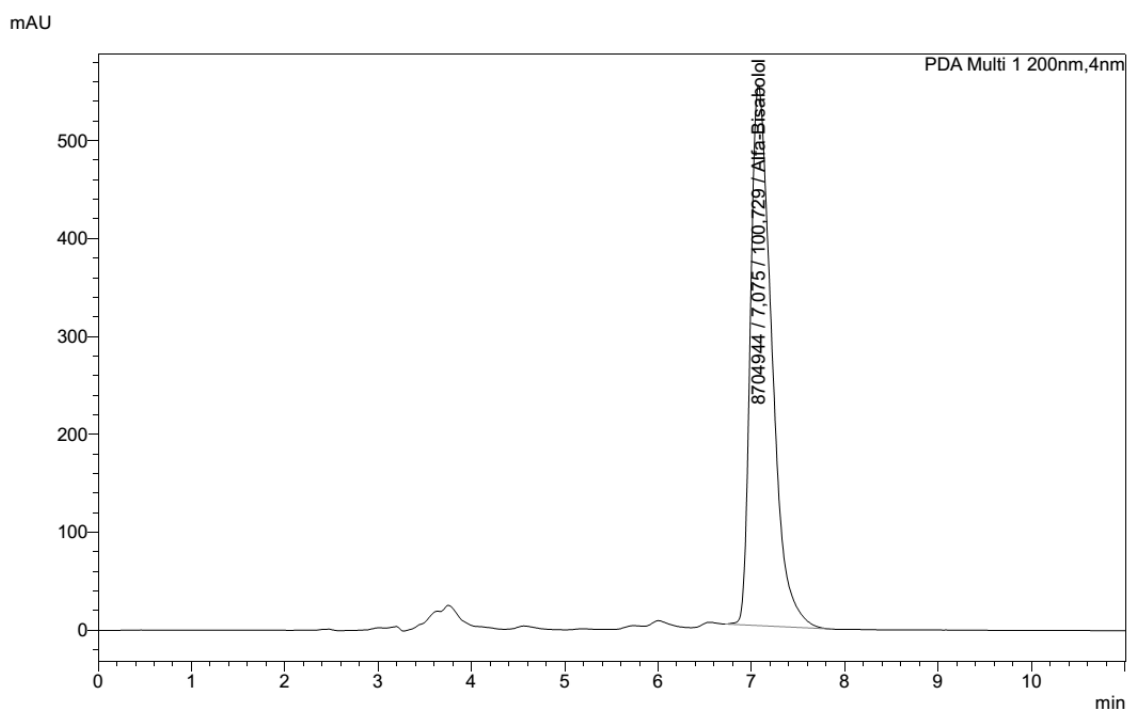
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Suitability 2.lcd

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Suitability 2

Data de Aquisição: 13/11/2014 20:44:57

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



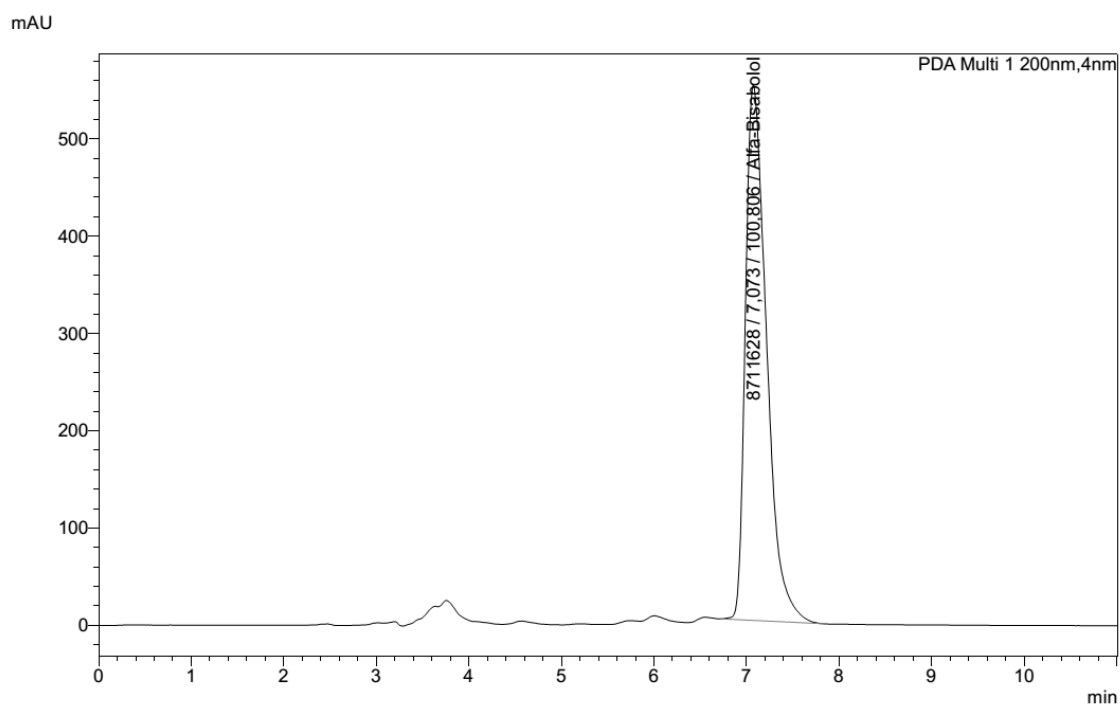
PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,075	8704944	100,729
Total			8704944	

Anexo III: Teste de Adequação 3-5

Método: Bisabolol.lcm
Sequencia: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb
Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol
Arquivo: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Suitability 3.lcd
Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Suitability 3
Data de Aquisição: 13/11/2014 20:56:27
Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,073	8711628	100,806
Total			8711628	

Anexo IV: Teste de Adequação 4-5

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

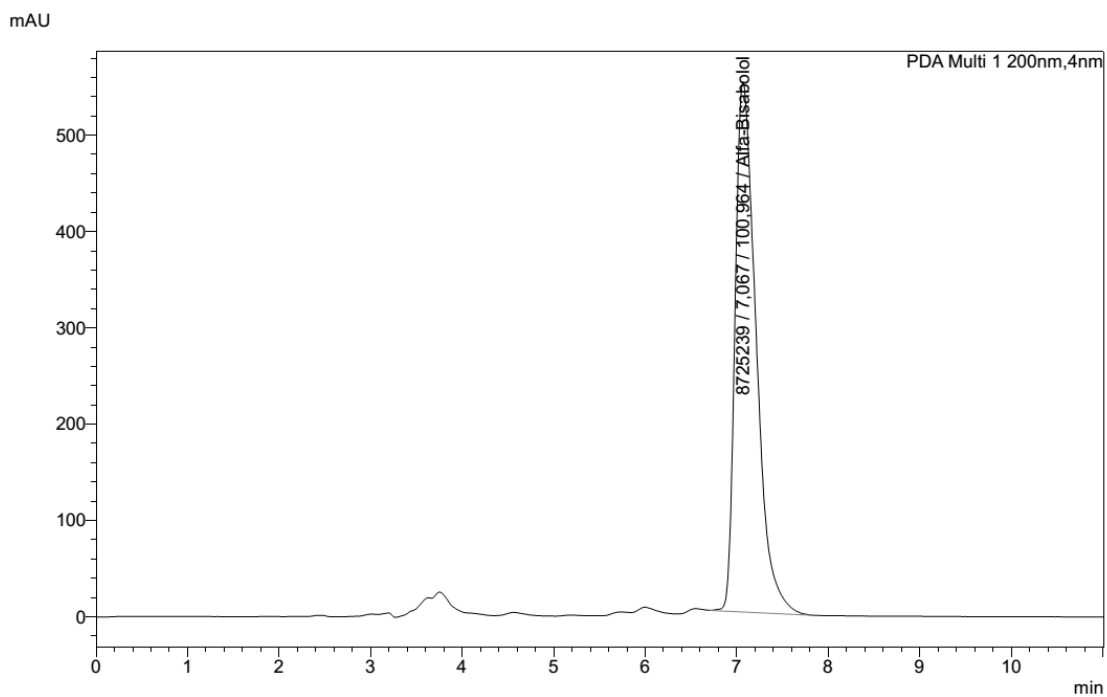
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Suitability 4.lcd

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Suitability 4

Data de Aquisição: 13/11/2014 21:07:56

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,067	8725239	100,964
Total			8725239	

Anexo V: Teste de Adequação 5-5

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

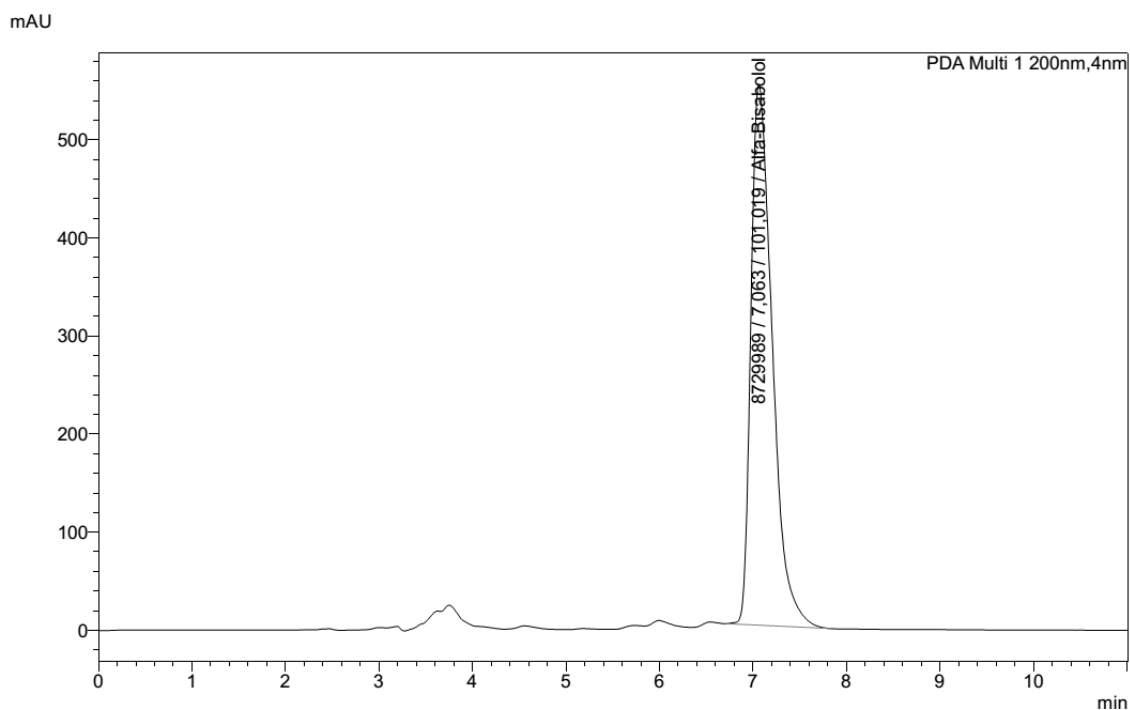
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Suitability 5.lcd

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Suitability 5

Data de Aquisição: 13/11/2014 21:19:26

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,063	8729989	101,019
Total			8729989	

Anexo VI: Cromatograma da Solução do Padrão de Bisabolol 1-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

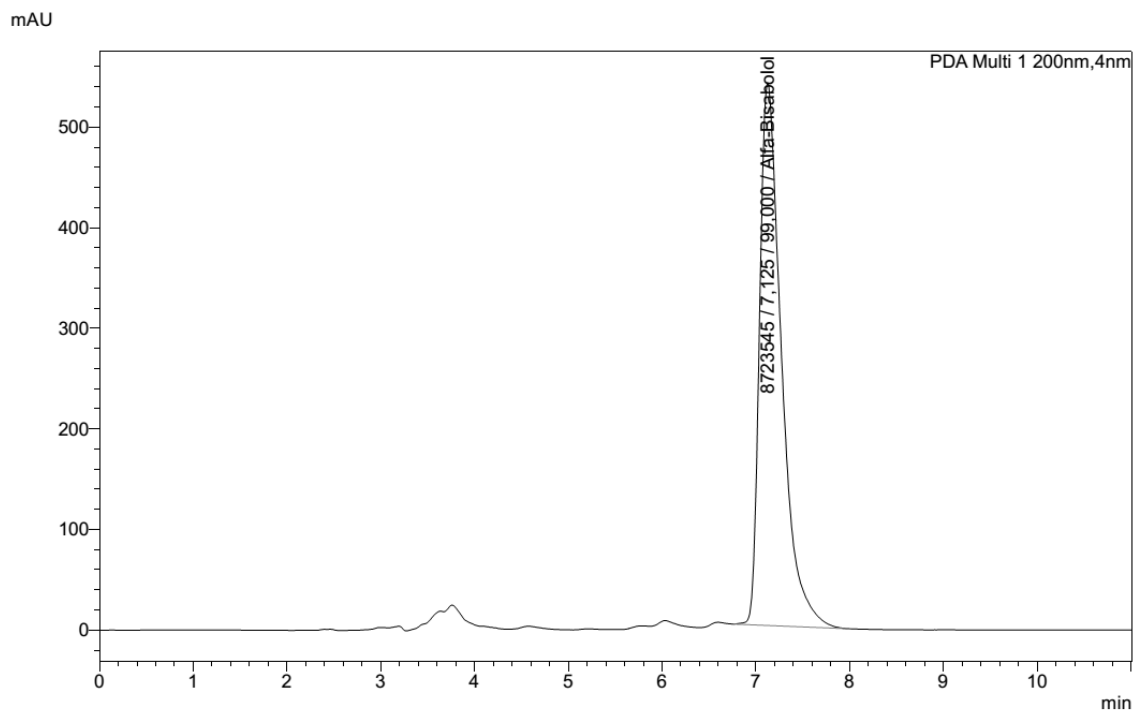
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Padrão 1-2.lcd

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Padrão 1-2

Data de Aquisição: 13/11/2014 21:17:09

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,125	8723545	99,000
Total			8723545	

Anexo VII: Cromatograma da Solução do Padrão de Bisabolol 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

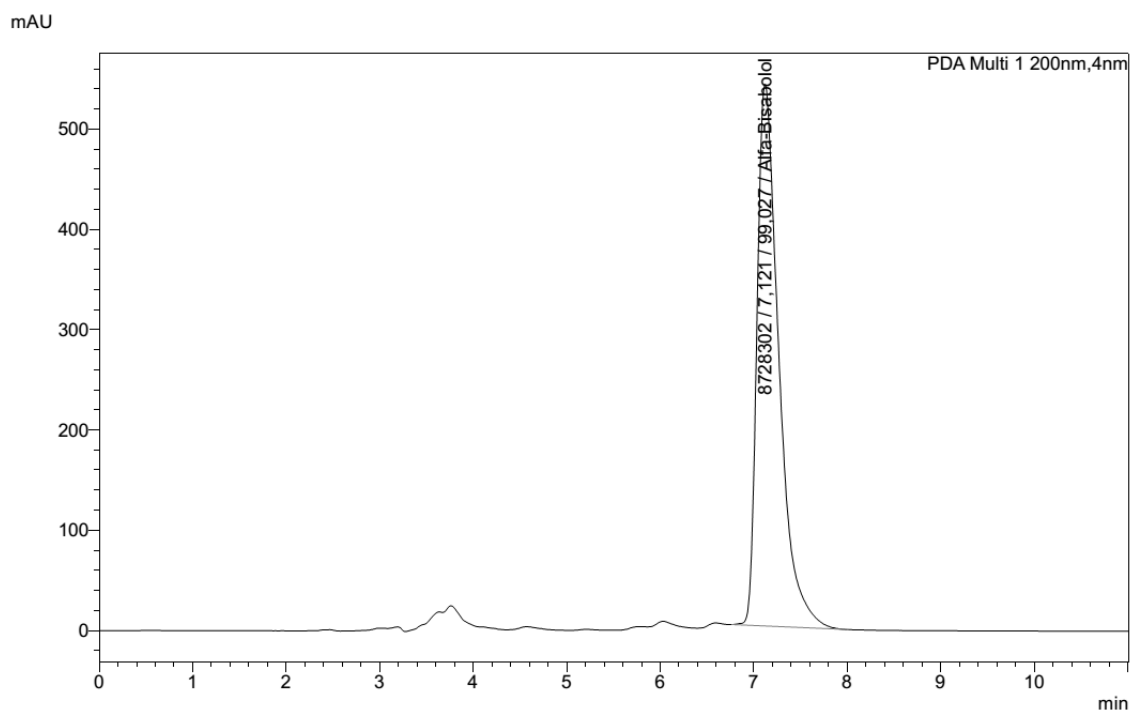
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Padrão 2-2.lcd

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Padrão 2-2

Data de Aquisição: 13/11/2014 21:28:41

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,121	8728302	99,027
Total			8728302	

Anexo VIII: Teste de seletividade, Placebo 1 (Solvente + Hidroquinona) 1-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSolutions\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

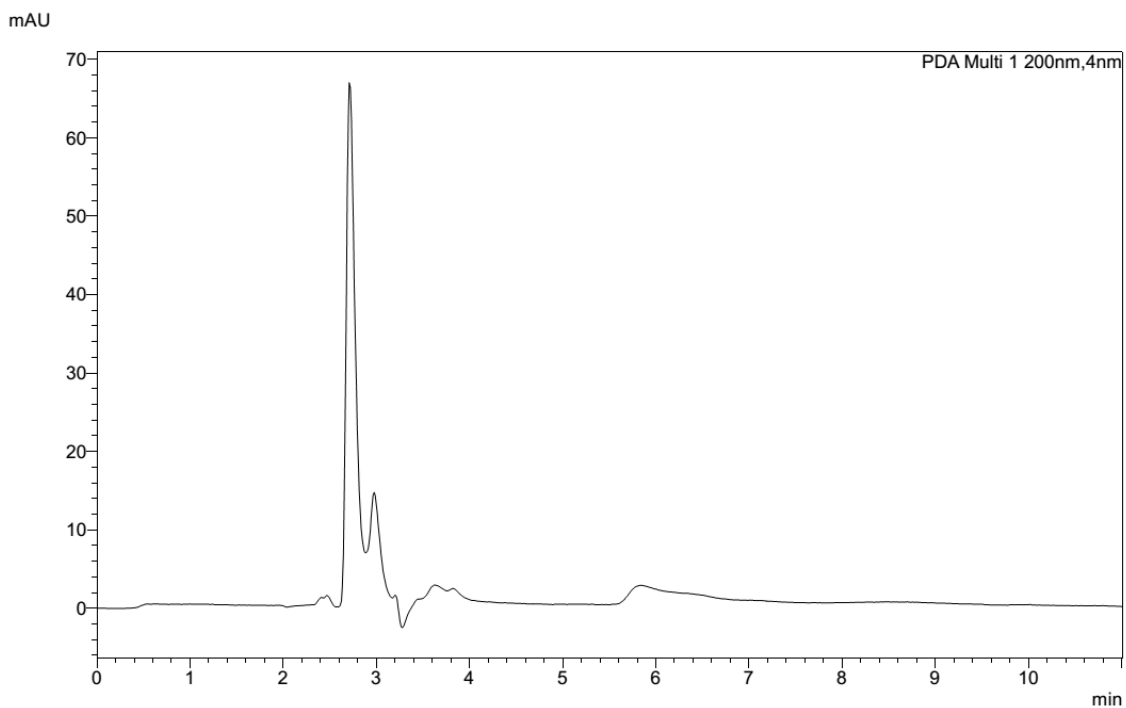
Arquivo: C:\LabSolutions\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol seletividade Placebo A 1-2.

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol seletividade Placebo A 1-2

Data de Aquisição: 14/11/2014 02:15:42

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
Total				

Anexo IX: Teste de seletividade, Placebo 1 (Solvente + Hidroquinona) 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSolutions\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

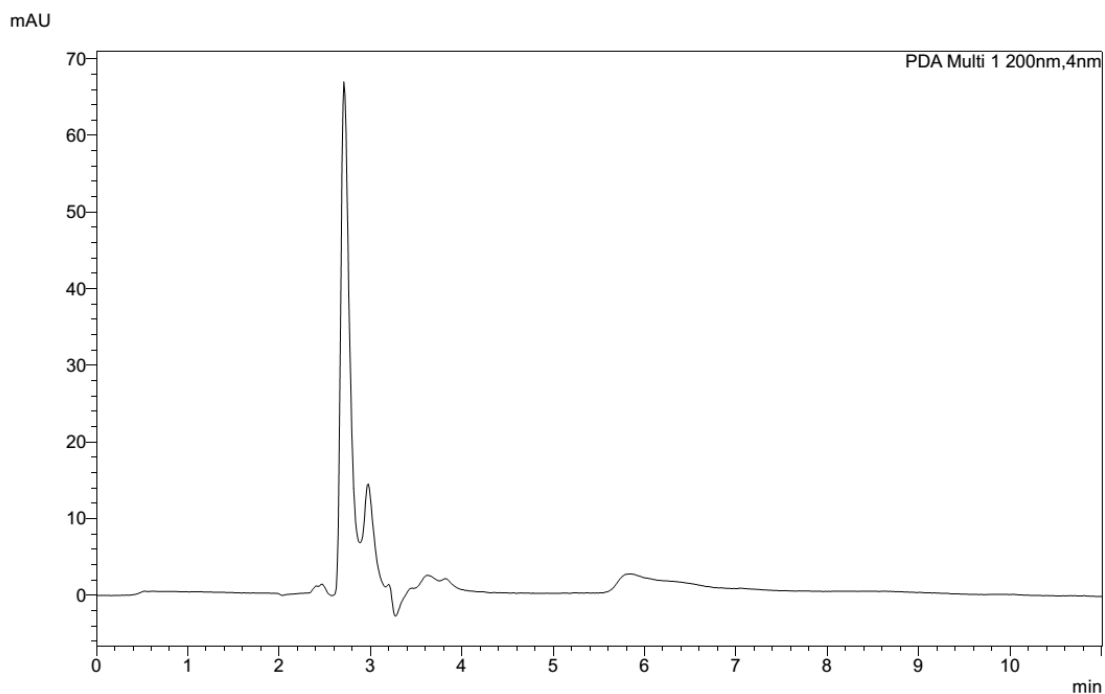
Arquivo: C:\LabSolutions\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol seletividade Placebo A 2-2.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol seletividade Placebo A 2-2

Data de Aquisição: 14/11/2014 02:27:10

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
Total				

Anexo X: Teste de seletividade, Placebo 2 (Solvente) 1-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

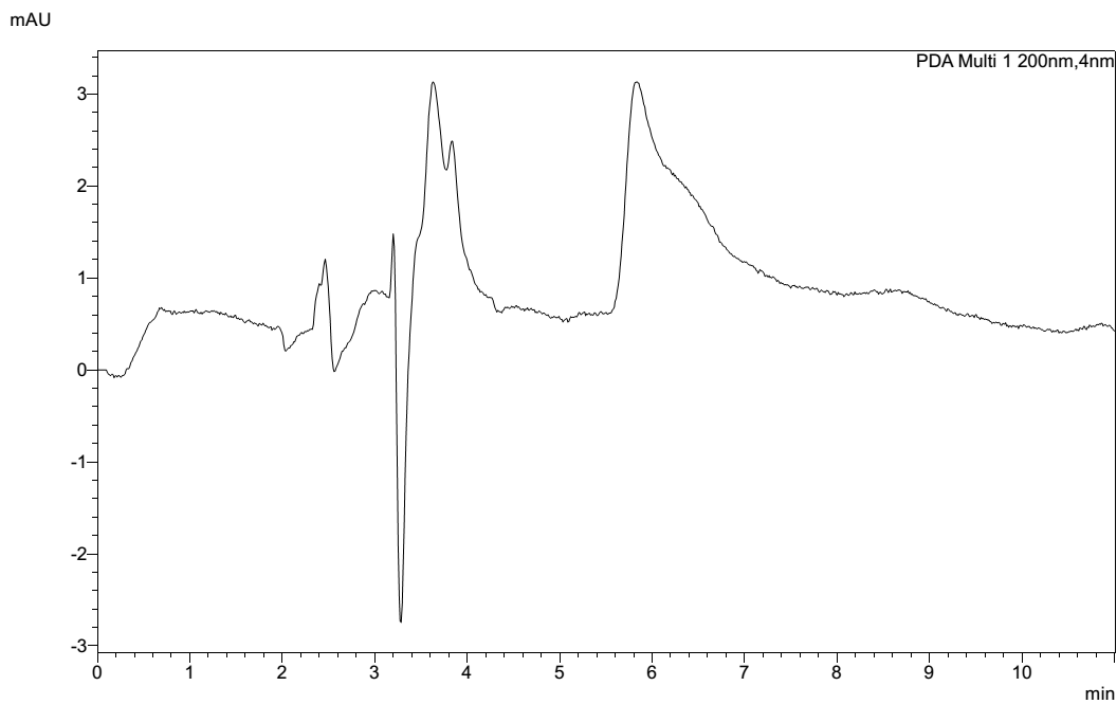
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol seletividade Plac

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol seletividade Placebo B 1-2

Data de Aquisição: 14/11/2014 02:10:39

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
Total				

Anexo XI: Teste de seletividade, Placebo 2 (Solvente) 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

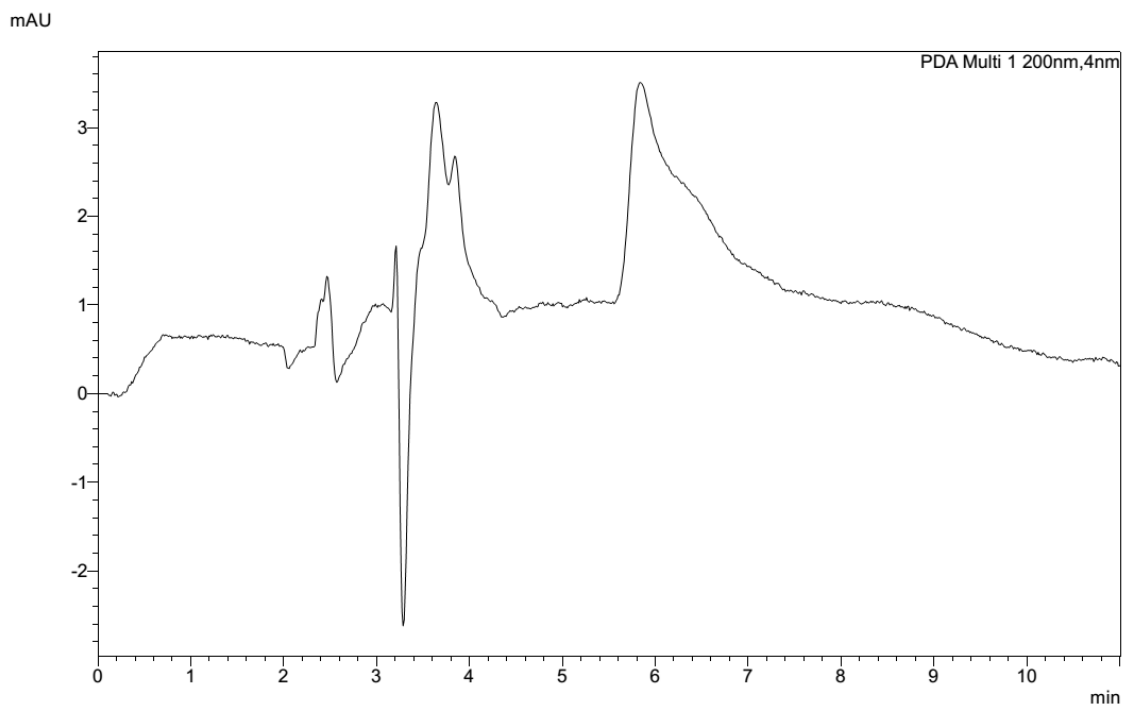
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol seletividade Plac

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol seletividade Placebo B 2-2

Data de Aquisição: 14/11/2014 02:22:08

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
Total				

Anexo XII: Teste de Linearidade, Concentração 80%

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

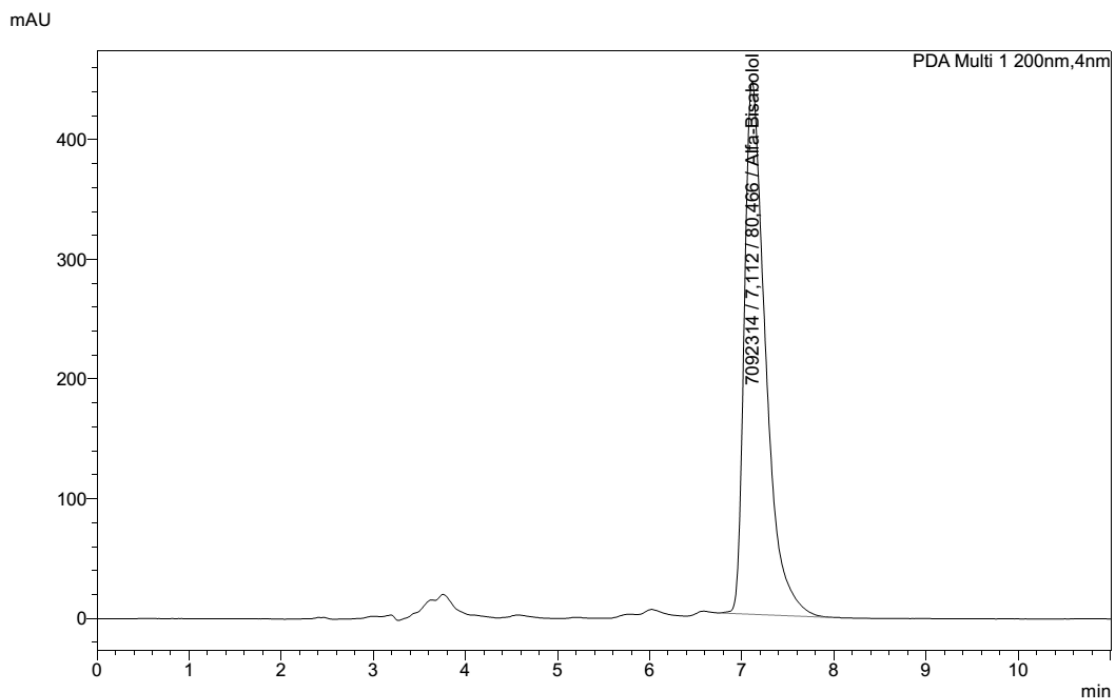
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Linearidade 80.l

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Linearidade 80

Data de Aquisição: 13/11/2014 21:40:10

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,112	7092314	80,466
Total			7092314	

Anexo XIII: Teste de Linearidade, Concentração 90%

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

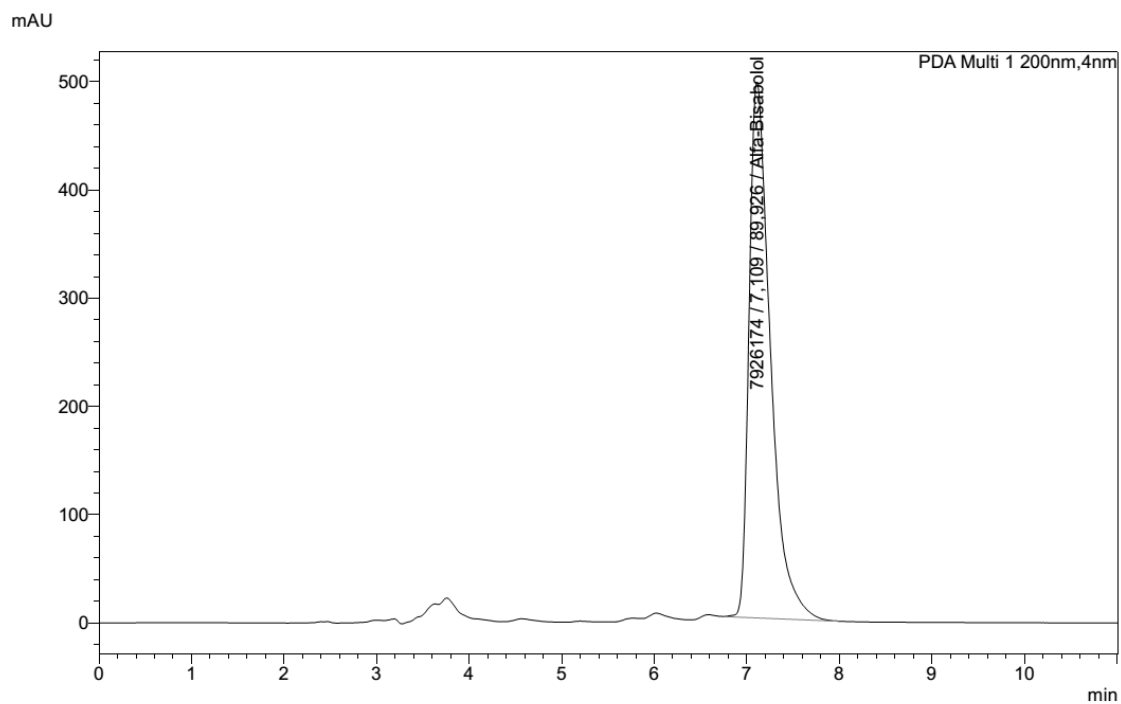
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Linearidade 90.l

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Linearidade 90

Data de Aquisição: 13/11/2014 21:51:40

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,109	7926174	89,926
Total			7926174	

Anexo XIV: Teste de Linearidade, Concentração 100%

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

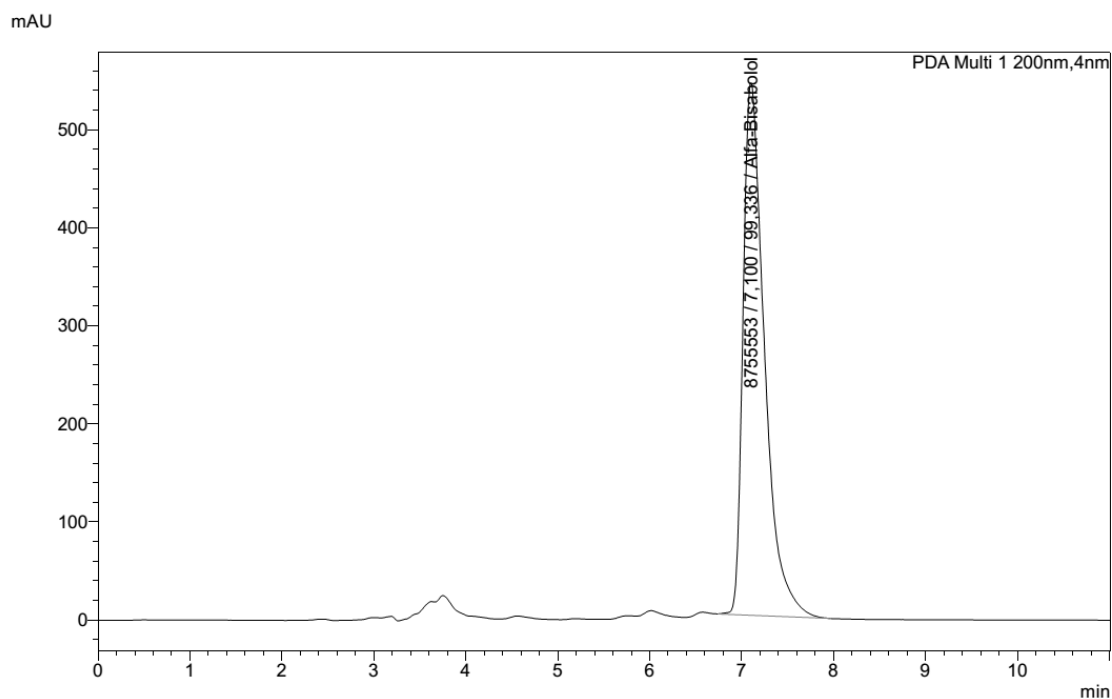
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Linearidade 100.

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Linearidade 100

Data de Aquisição: 13/11/2014 22:03:09

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,100	8755553	99,336
Total			8755553	

Anexo XV: Teste de Linearidade, Concentração 110%

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

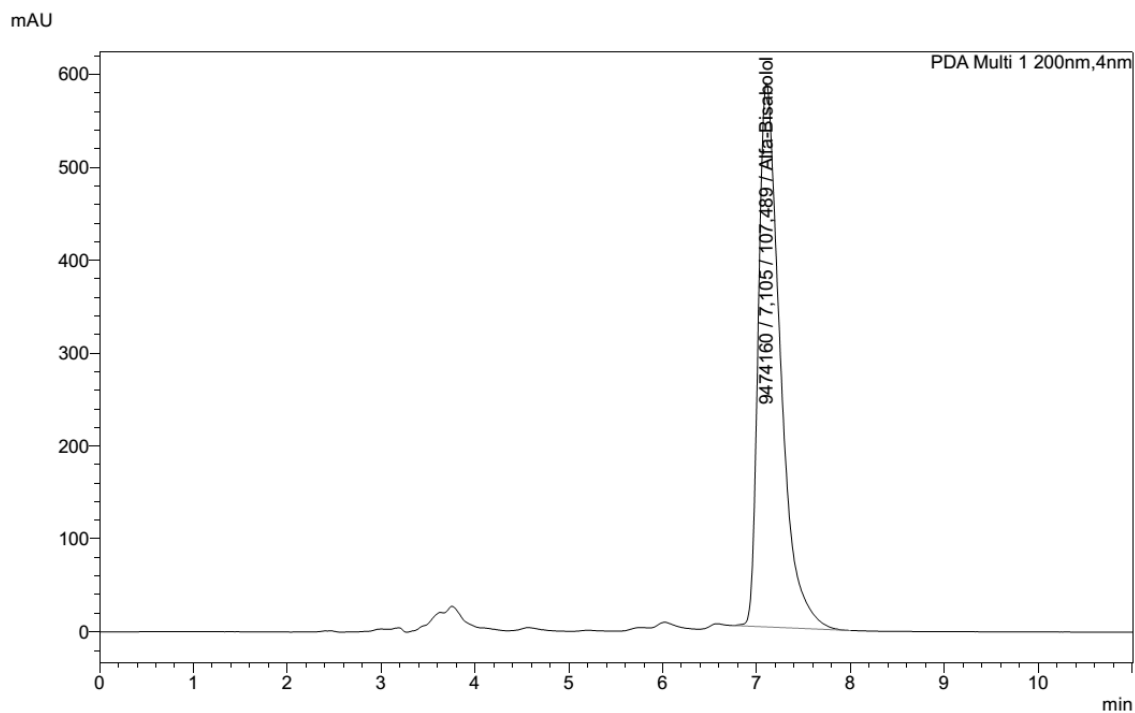
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Linearidade 110.

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Linearidade 110

Data de Aquisição: 13/11/2014 22:14:37

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,105	9474160	107,489
Total			9474160	

Anexo XVI: Teste de Linearidade, Concentração 120%

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

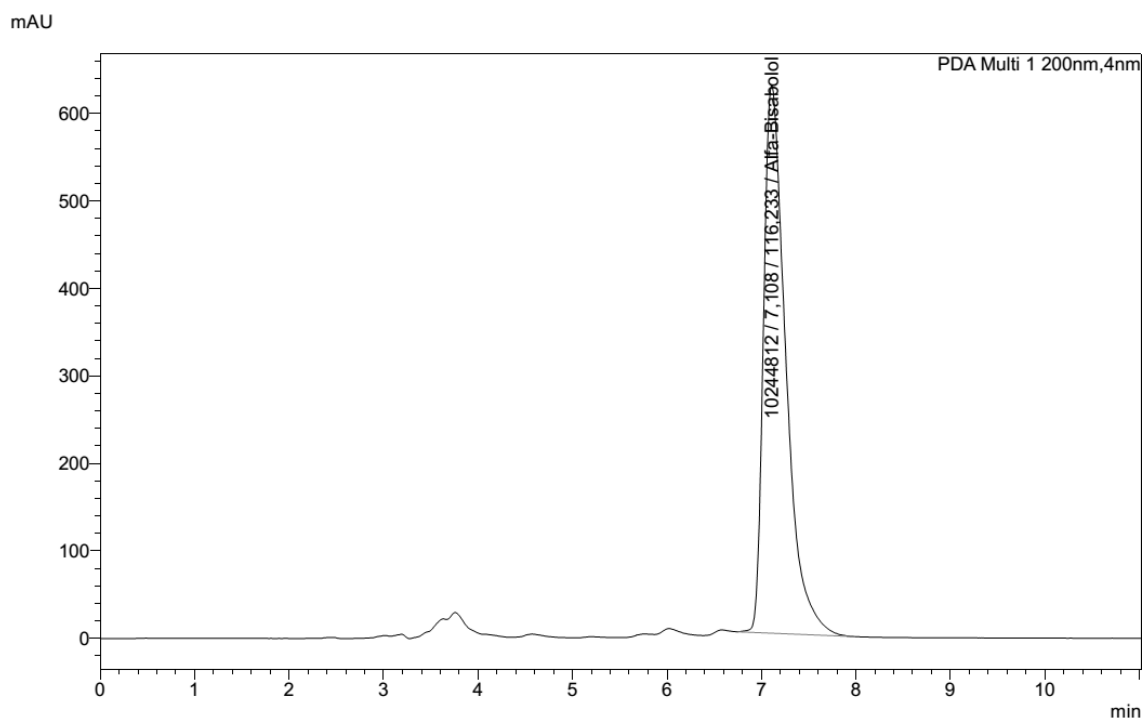
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Linearidade 120.

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Linearidade 120

Data de Aquisição: 13/11/2014 22:26:06

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,108	10244812	116,233
Total			10244812	

Anexo XVII: Teste de Exatidão, Solução do Padrão de Bisabolol 1-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

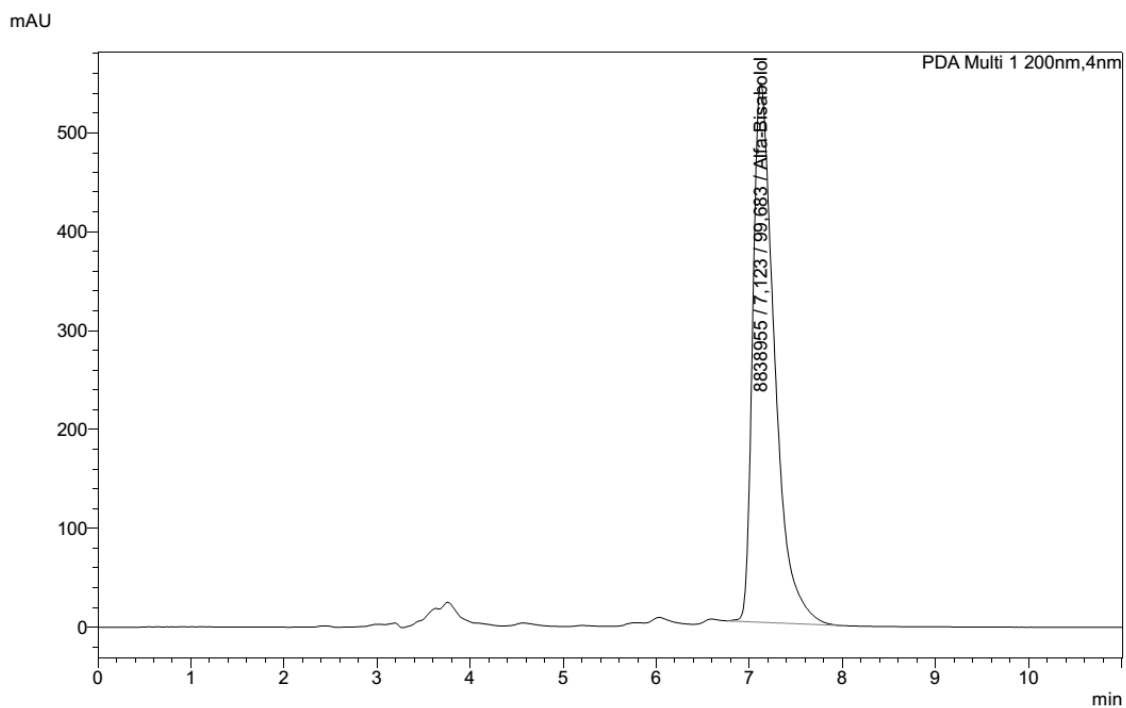
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão Padrão

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão Padrão 1-2

Data de Aquisição: 14/11/2014 00:09:28

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,123	8838955	99,683
Total			8838955	

Anexo XVIII: Teste de Exatidão, Solução do Padrão de Bisabolol 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

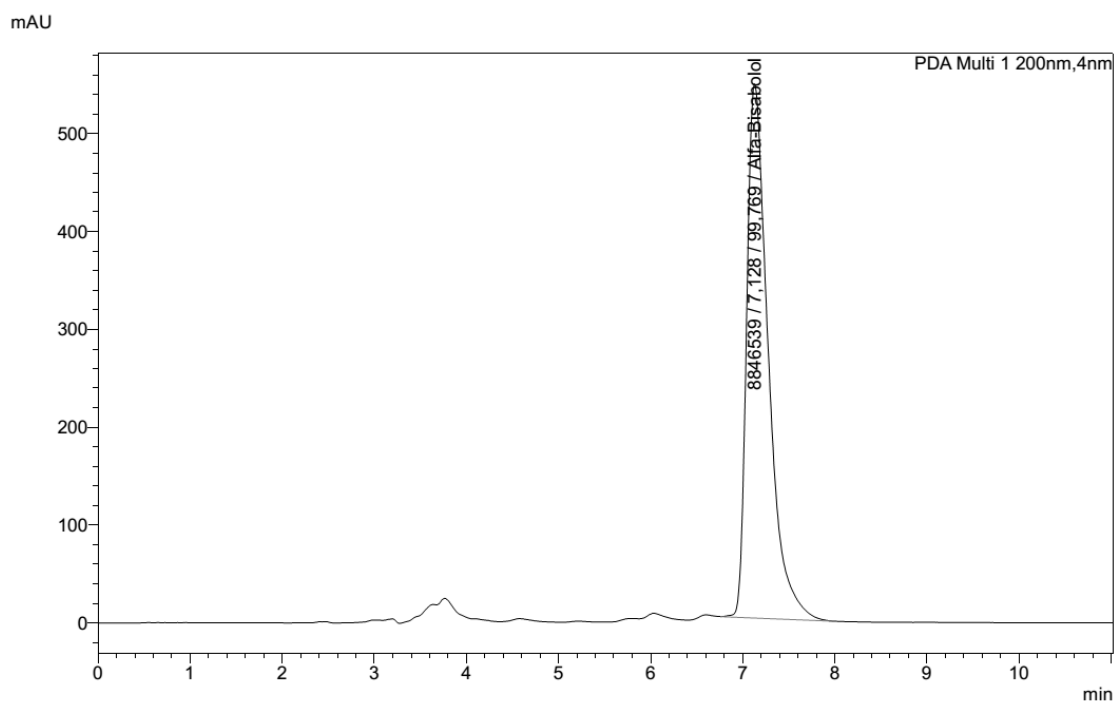
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão Padrão :

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão Padrão 2-2

Data de Aquisição: 14/11/2014 00:20:57

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,128	8846539	99,769
Total			8846539	

Anexo XIX: Teste de Exatidão, Concentração 105% 1-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.Icb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

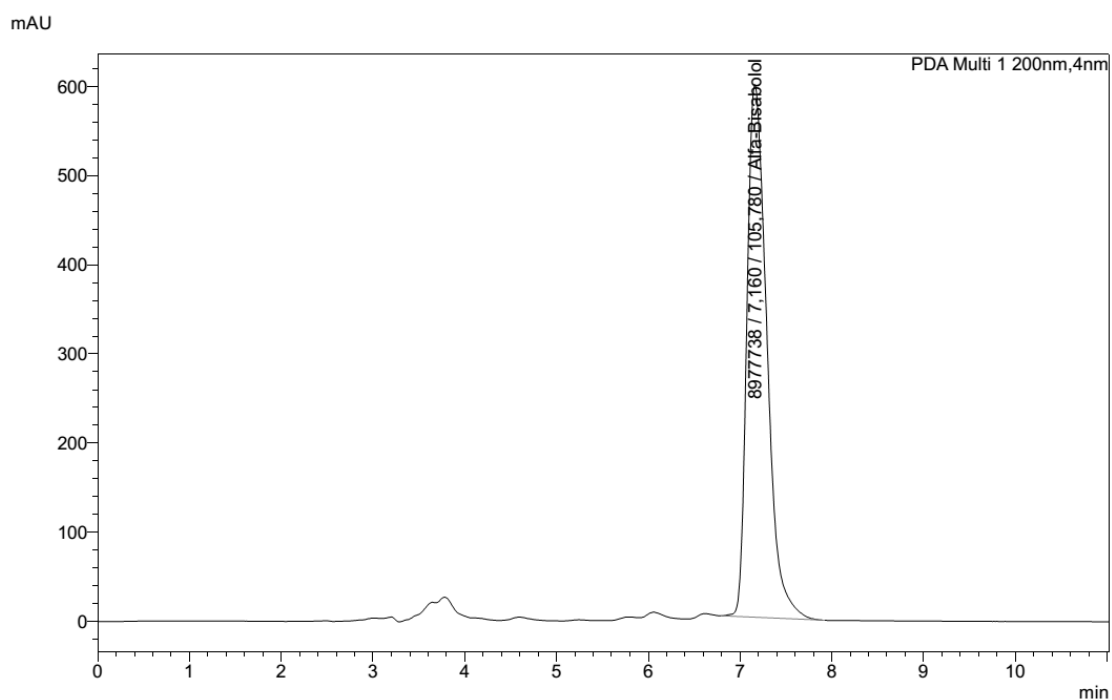
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 105 1-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 105 1-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 00:27:19

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,160	8977738	105,780
Total			8977738	

Anexo XX: Teste de Exatidão, Concentração 105% 2-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

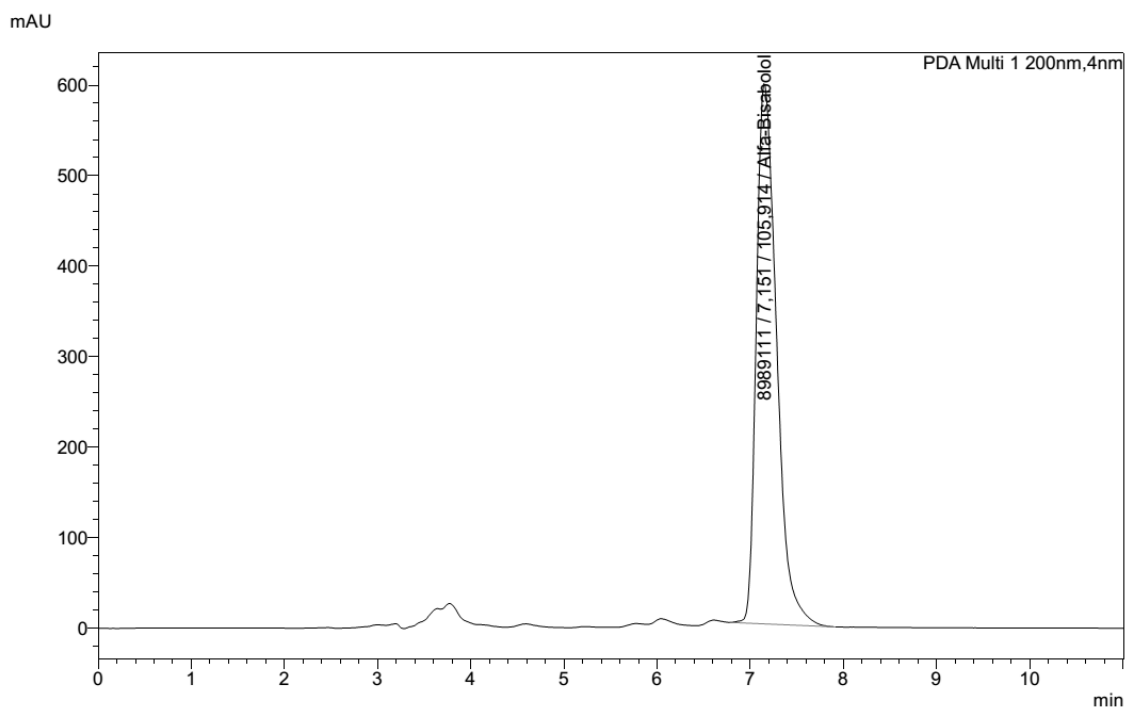
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 105 2-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 105 2-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 00:38:48

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,151	8989111	105,914
Total			8989111	

Anexo XXI: Teste de Exatidão, Concentração 105% 3-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

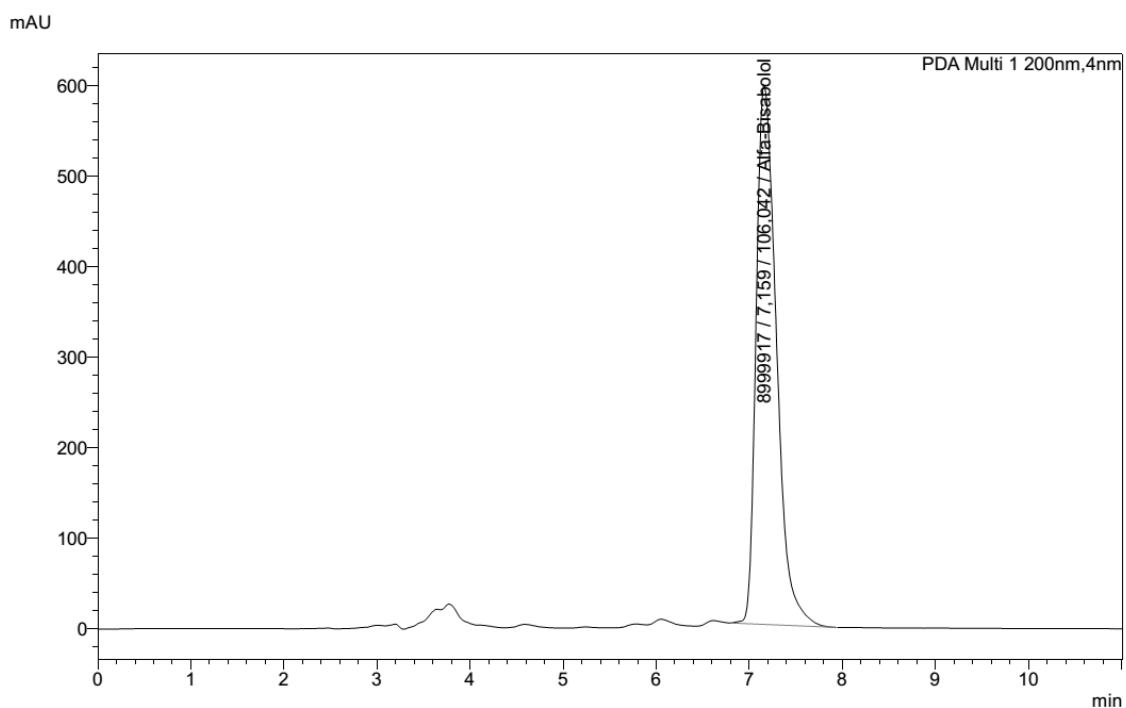
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 105 3-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 105 3-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 00:50:18

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,159	8999917	106,042
Total			8999917	

Anexo XXII: Teste de Exatidão, Concentração 110% 1-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti\os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

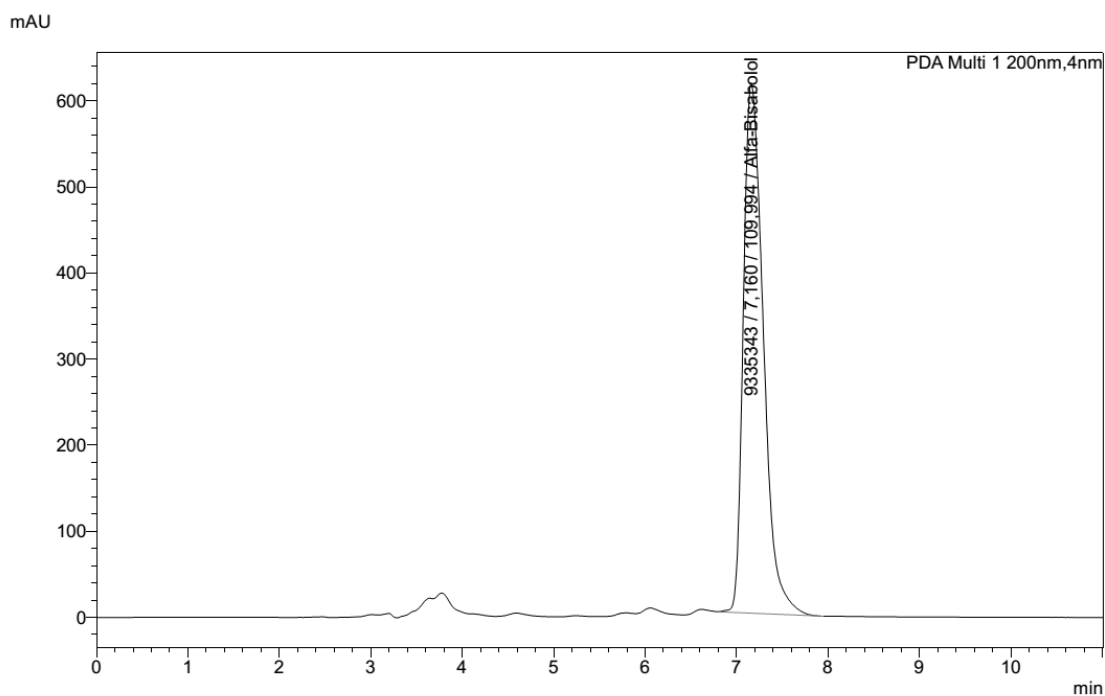
Arquivo: C:\LabSoluti\os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 110 1-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 110 1-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 01:01:46

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,160	9335343	109,994
Total			9335343	

Anexo XXIII: Teste de Exatidão, Concentração 110% 2-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

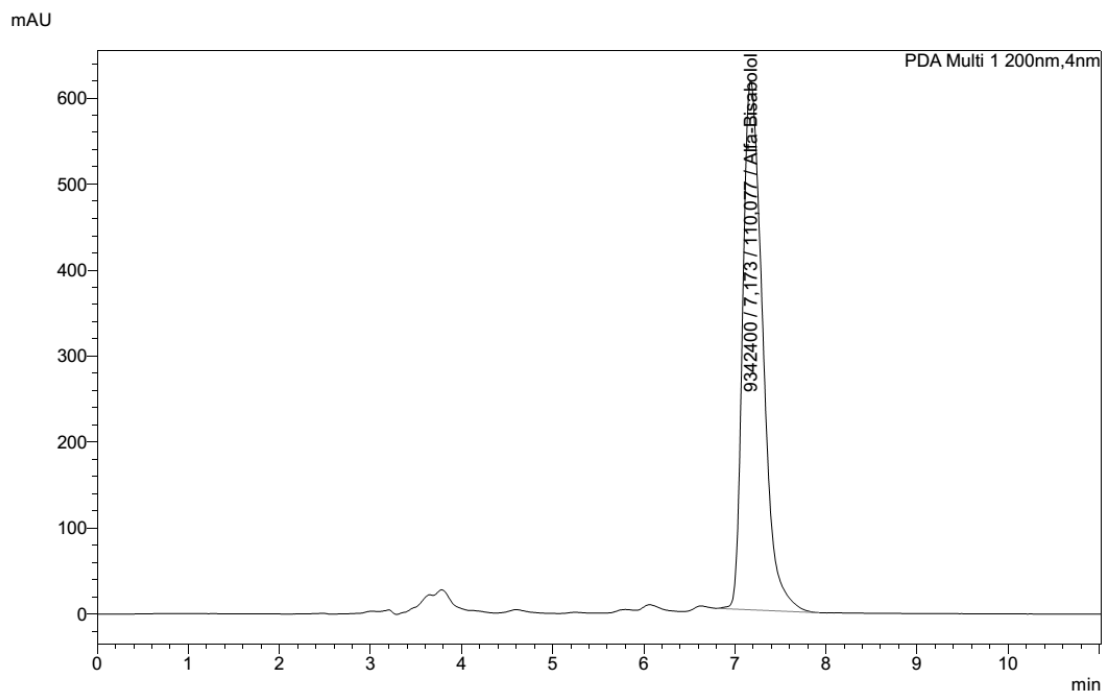
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 110 2-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 110 2-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 01:13:15

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,173	9342400	110,077
Total			9342400	

Anexo XXIV: Teste de Exatidão, Concentração 110% 3-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

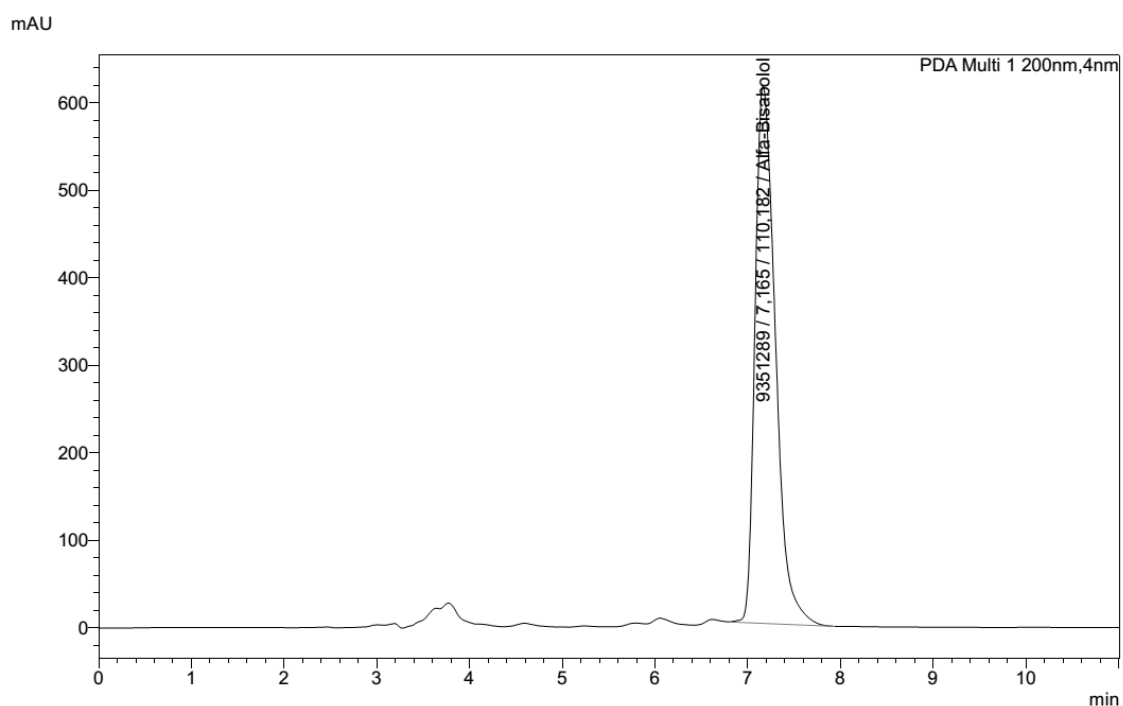
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 110 3-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 110 3-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 01:24:45

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,165	9351289	110,182
Total			9351289	

Anexo XXV: Teste de Exatidão, Concentração 120% 1-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

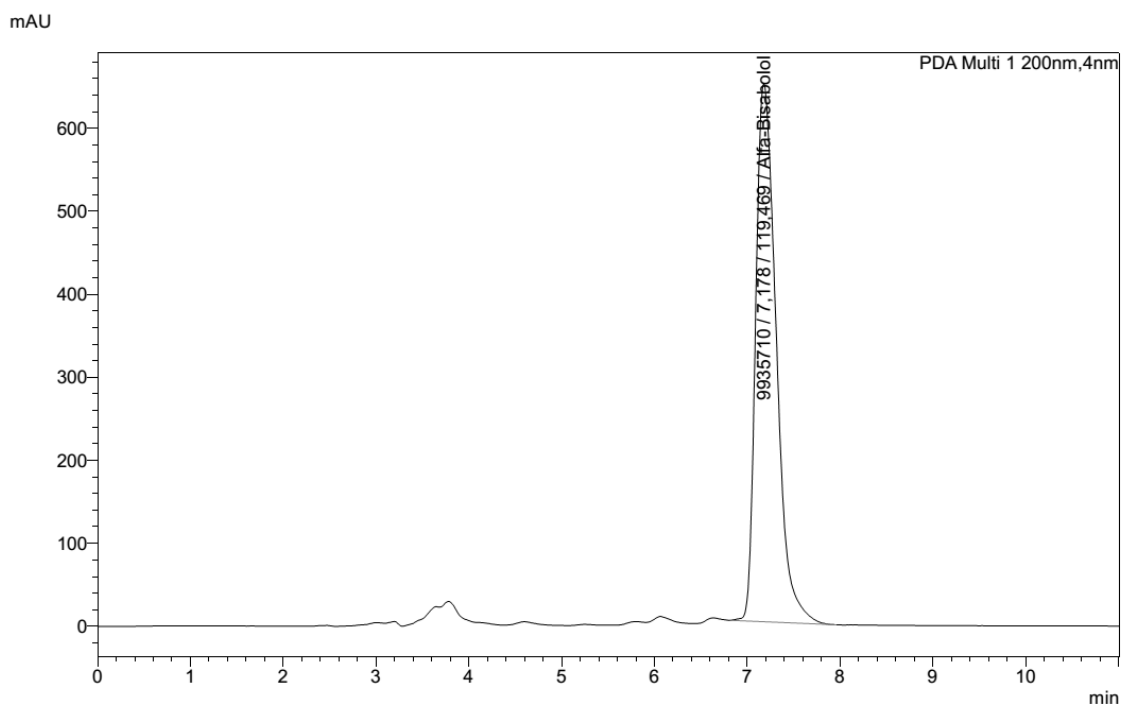
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 120 1-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 120 1-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 01:36:13

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,178	9935710	119,469
Total			9935710	

Anexo XXVI: Teste de Exatidão, Concentração 120% 2-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

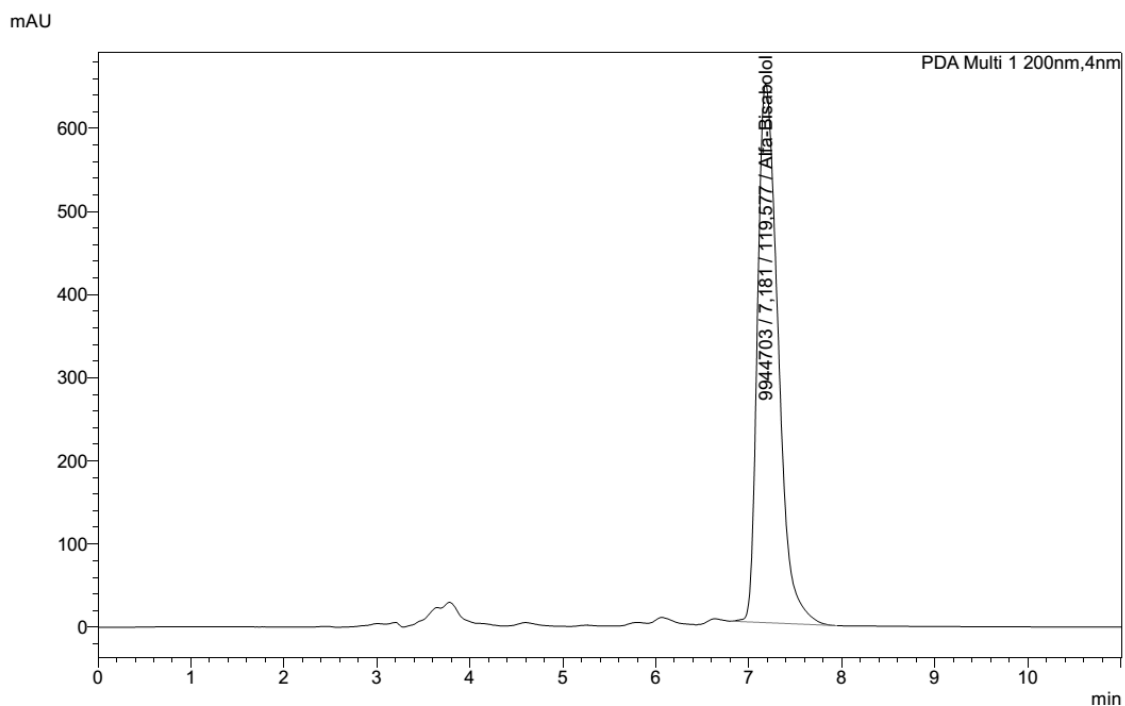
Arquivo: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 120 2-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 120 2-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 01:47:42

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,181	9944703	119,577
Total			9944703	

Anexo XXVII: Teste de Exatidão, Concentração 120% 3-3

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

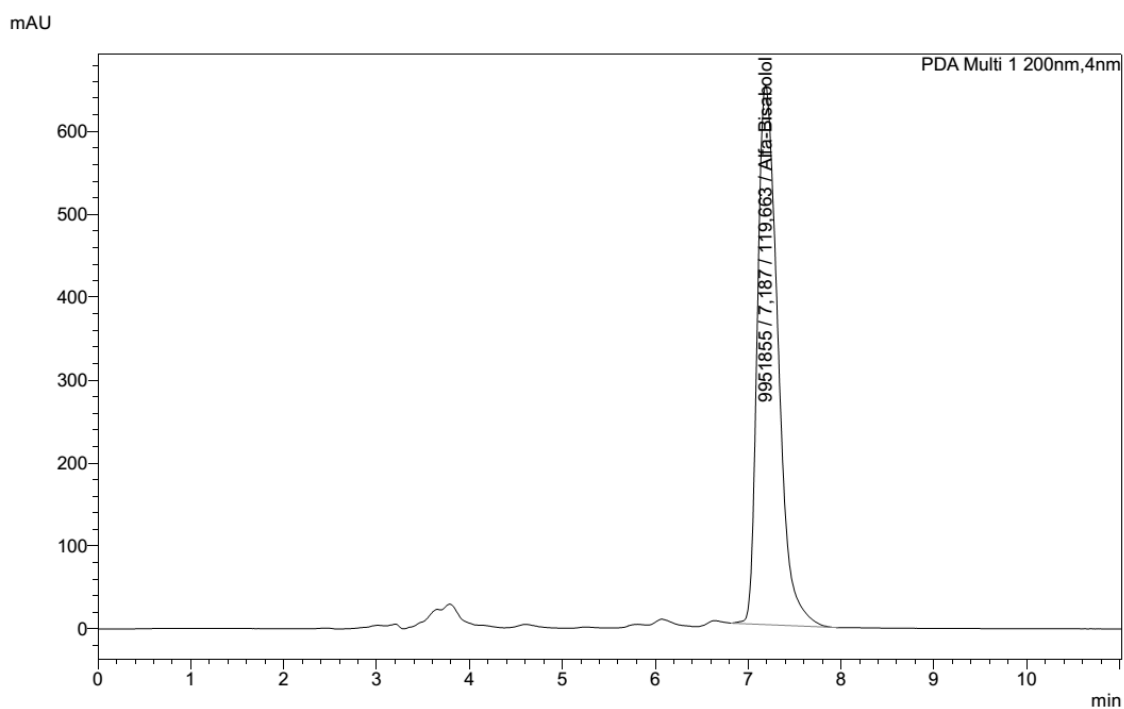
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Exatidão 120 3-3

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Exatidão 120 3-3

Data de Aquisição: 14/11/2014 01:59:10

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,187	9951855	119,663
Total			9951855	

Anexo XXVIII: Teste de Precisão, Analista 1, Amostra 1-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

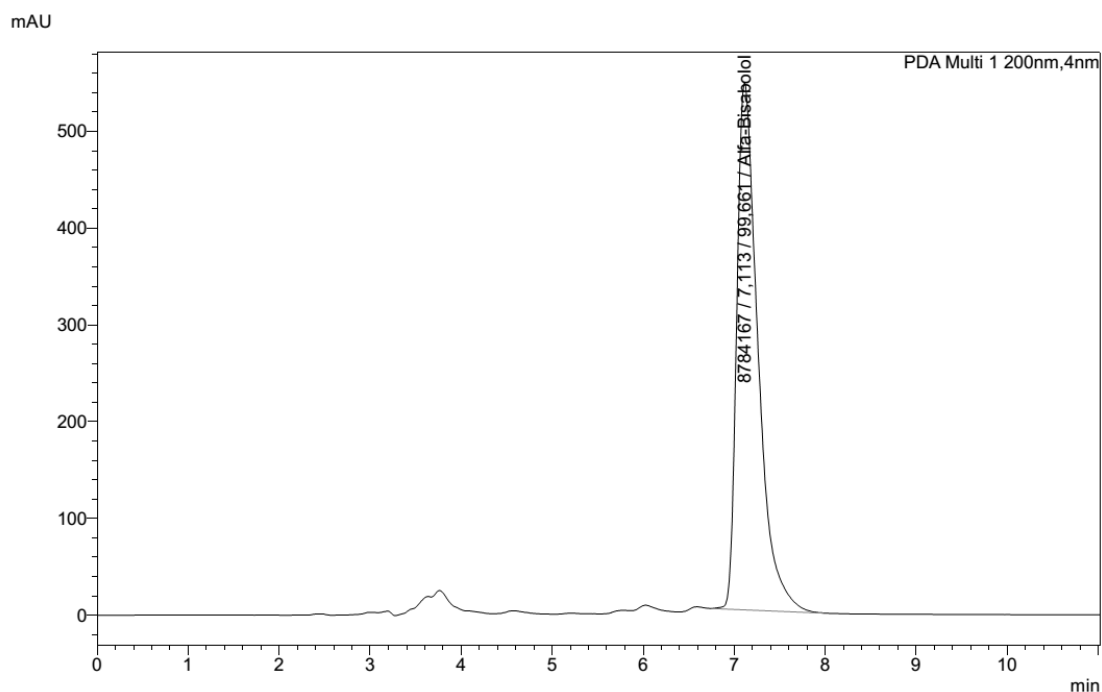
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 1 Amostra 1

Data de Aquisição: 13/11/2014 22:37:35

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



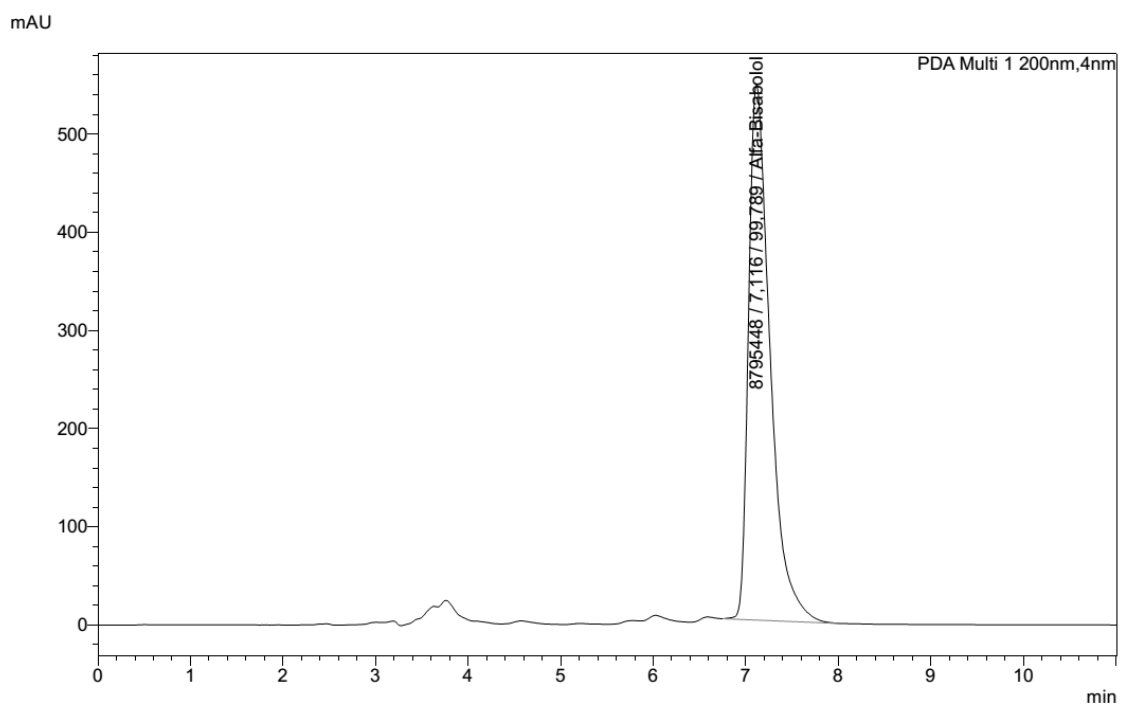
PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,113	8784167	99,661
Total			8784167	

Anexo XXIX: Teste de Precisão, Analista 1, Amostra 2-6

Método: Bisabolol.lcm
Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb
Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist
Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 1 Amostra 2
Data de Aquisição: 13/11/2014 22:49:03
Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,116	8795448	99,789
Total			8795448	

Anexo XXX: Teste de Precisão, Analista 1, Amostra 3-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

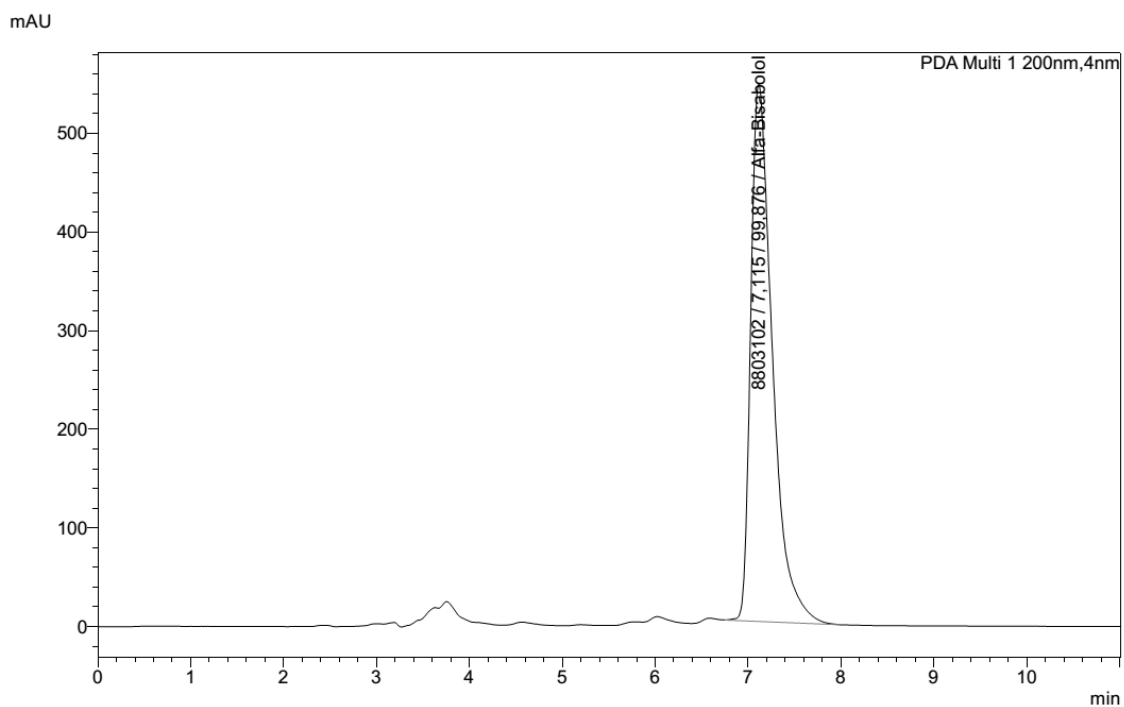
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 1 Amostra 3

Data de Aquisição: 13/11/2014 23:00:33

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,115	8803102	99,876
Total			8803102	

Anexo XXXI: Teste de Precisão, Analista 1, Amostra 4-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

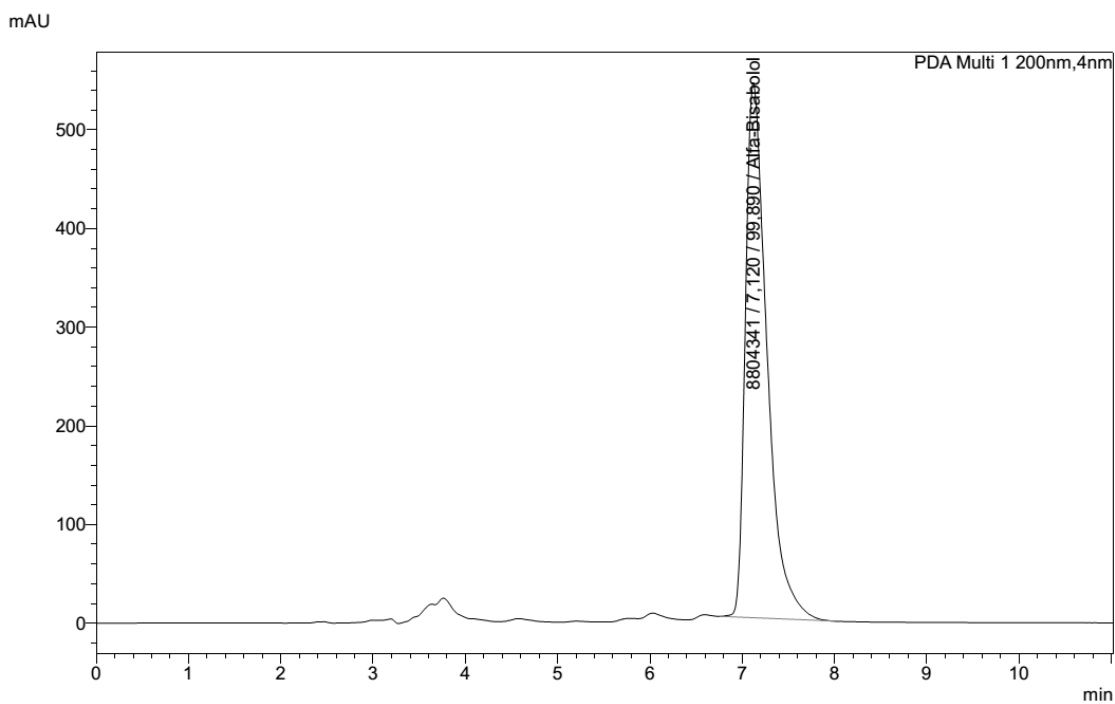
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 1 Amostra 4

Data de Aquisição: 13/11/2014 23:12:03

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,120	8804341	99,890
Total			8804341	

Anexo XXXII: Teste de Precisão, Analista 1, Amostra 5-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

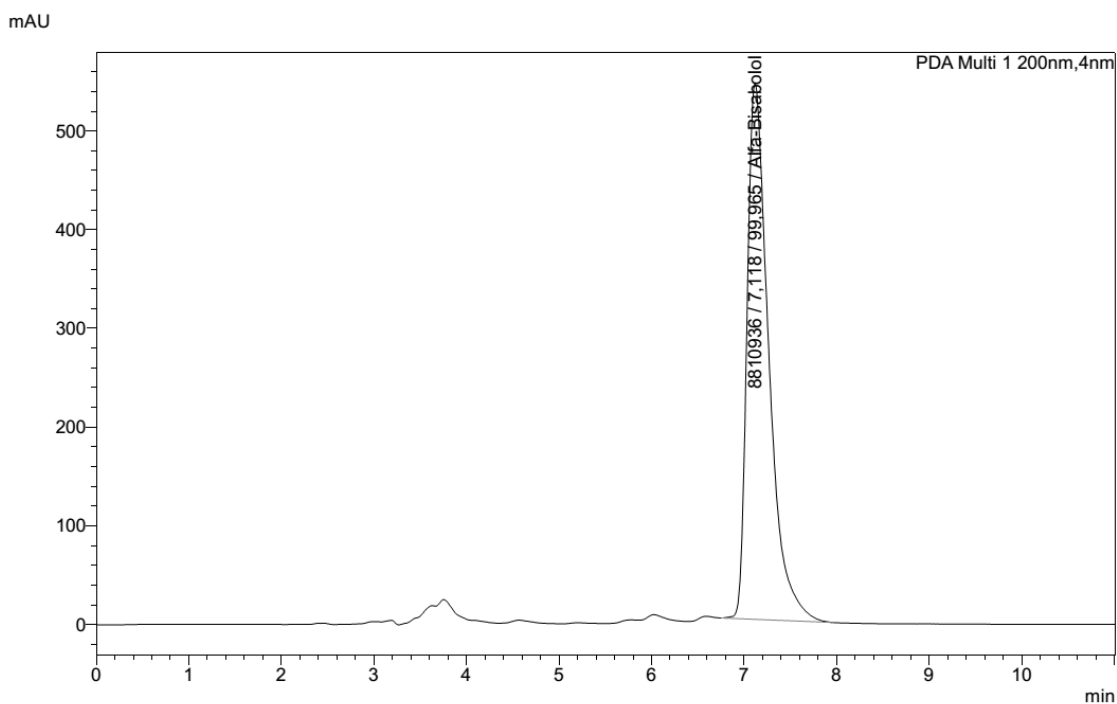
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 1 Amostra 5

Data de Aquisição: 13/11/2014 23:23:32

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,118	8810936	99,965
Total			8810936	

Anexo XXXIII: Teste de Precisão, Analista 1, Amostra 6-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

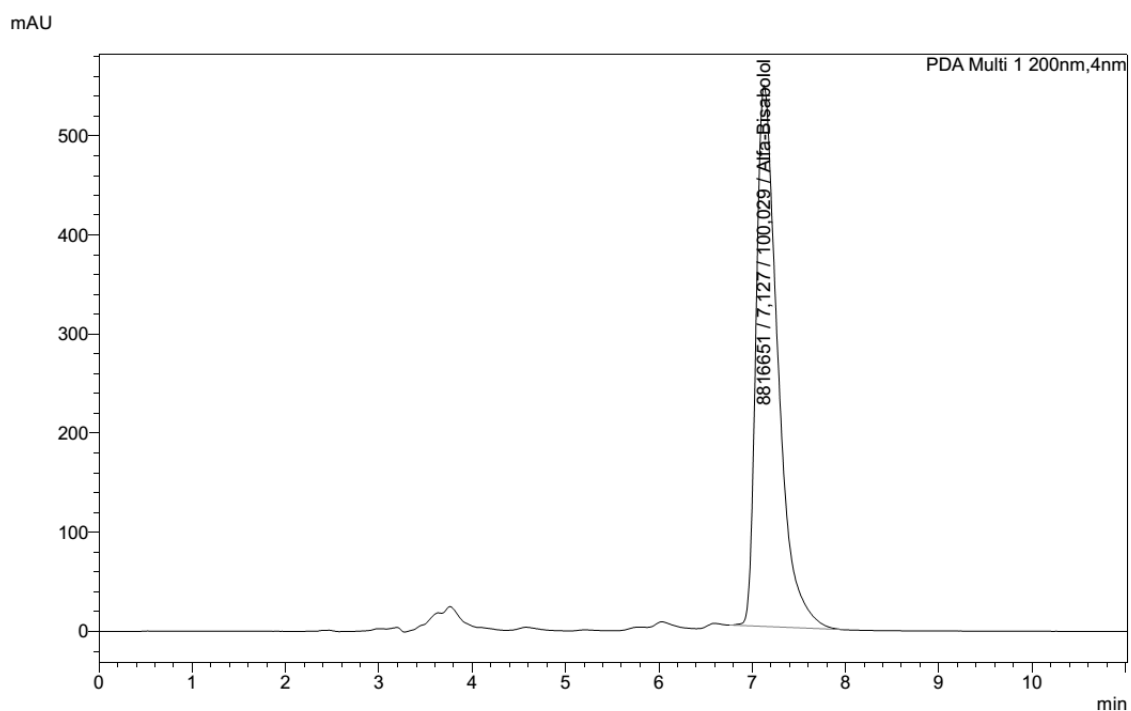
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 1 Amostra 6

Data de Aquisição: 13/11/2014 23:35:02

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,127	8816651	100,029
Total			8816651	

Anexo XXXIV: Teste de Precisão, Analista 2, Amostra 1-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

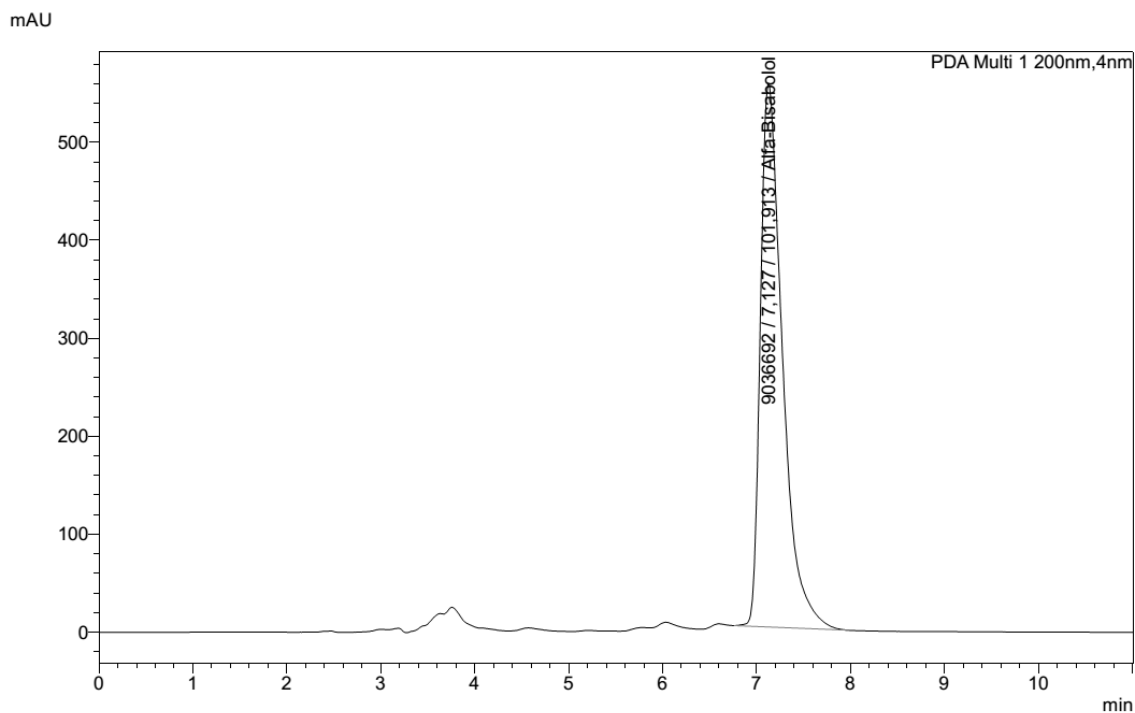
Arquivo: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 2 Amostra 1

Data de Aquisição: 14/11/2014 04:11:53

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,127	9036692	101,913
Total			9036692	

Anexo XXXV: Teste de Precisão, Analista 2, Amostra 2-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

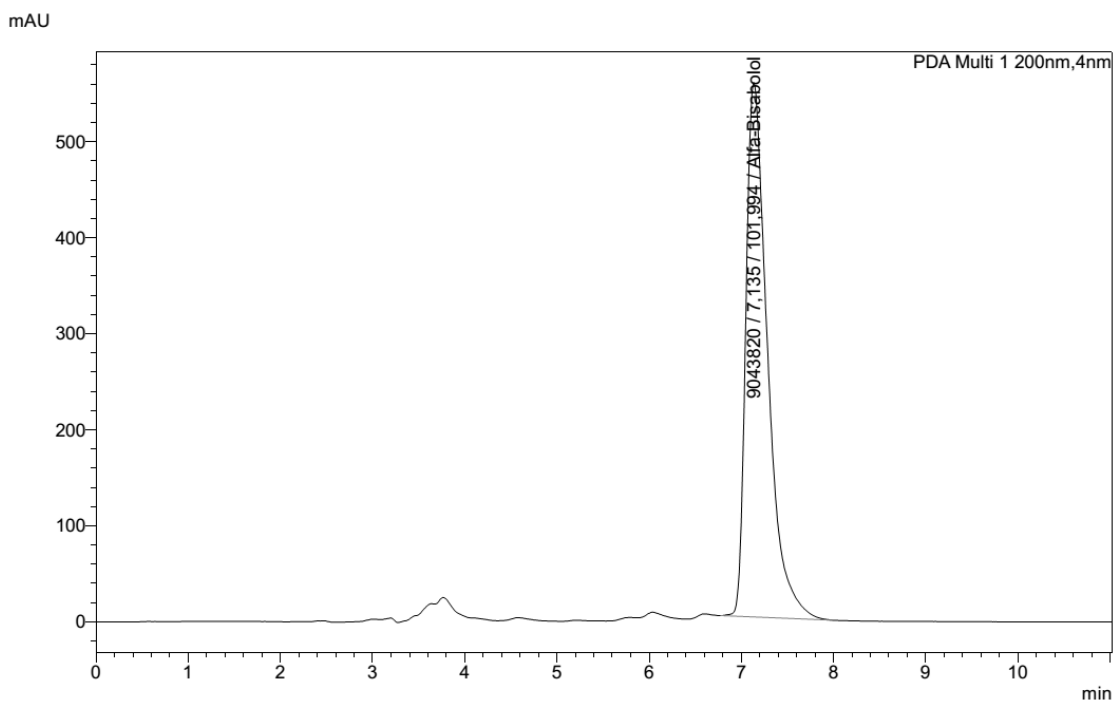
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Prescisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Prescisão Analista 2 Amostra 2

Data de Aquisição: 14/11/2014 04:23:23

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,135	9043820	101,994
Total			9043820	

Anexo XXXVI: Teste de Precisão, Analista 2, Amostra 3-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

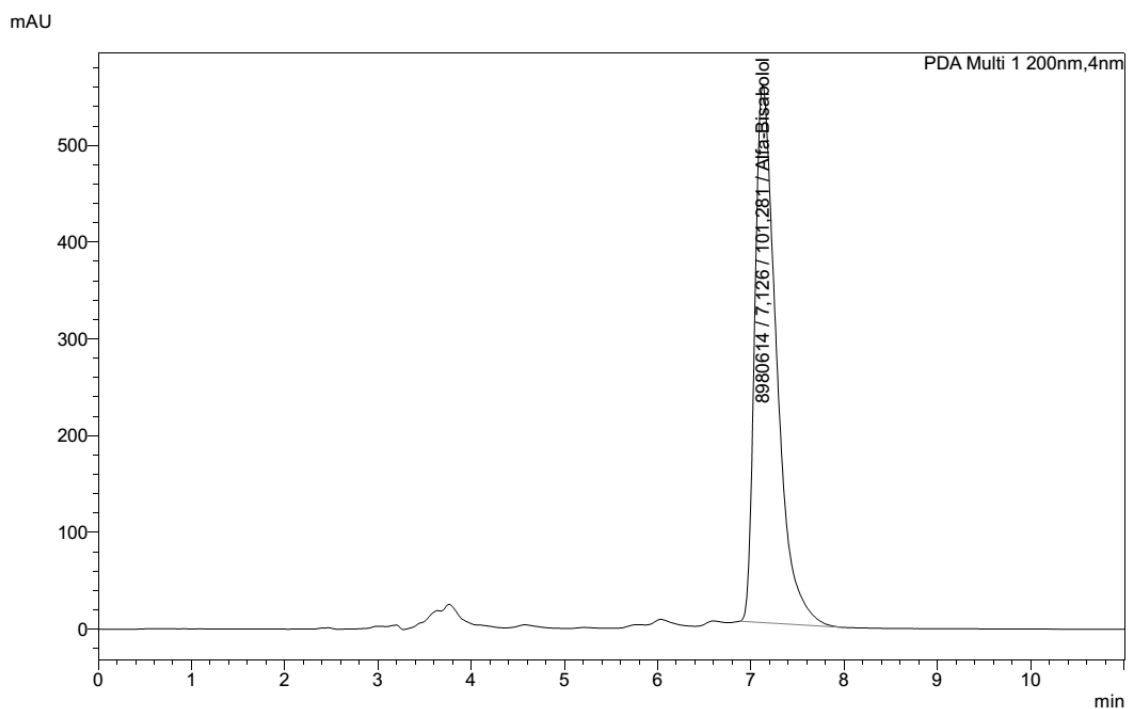
Arquivo: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 2 Amostra 3

Data de Aquisição: 14/11/2014 04:34:53

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,126	8980614	101,281
Total			8980614	

Anexo XXXVII: Teste de Precisão, Analista 2, Amostra 4-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

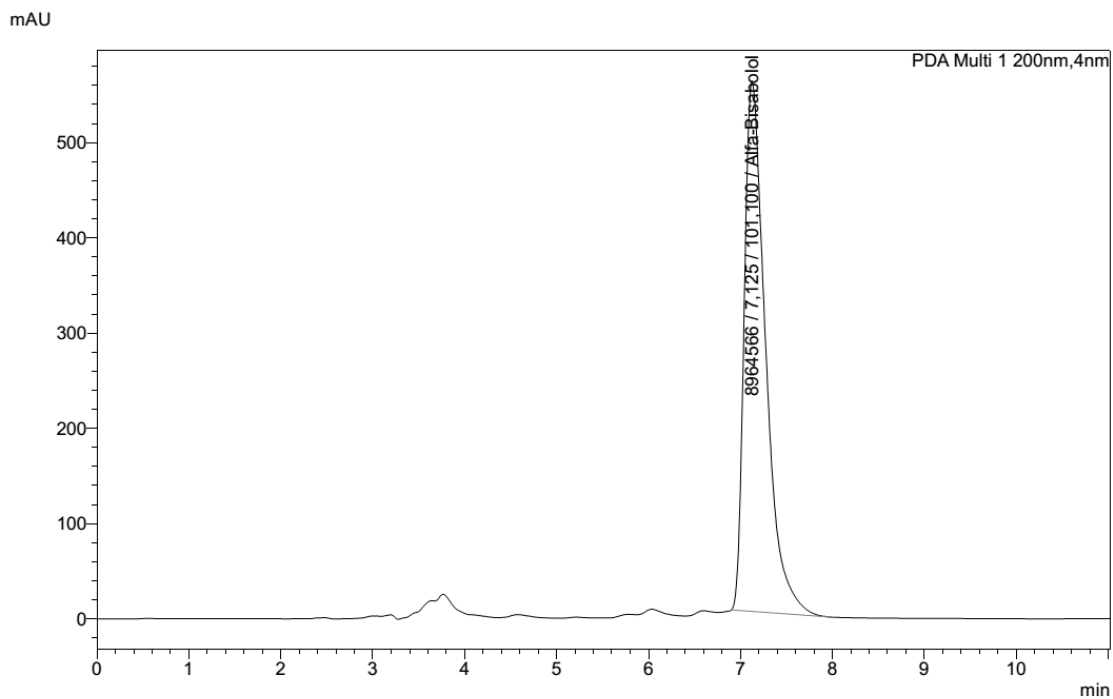
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Prescisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Prescisão Analista 2 Amostra 4

Data de Aquisição: 14/11/2014 04:46:22

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,125	8964566	101,100
Total			8964566	

Anexo XXXVIII: Teste de Precisão, Analista 2, Amostra 5-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

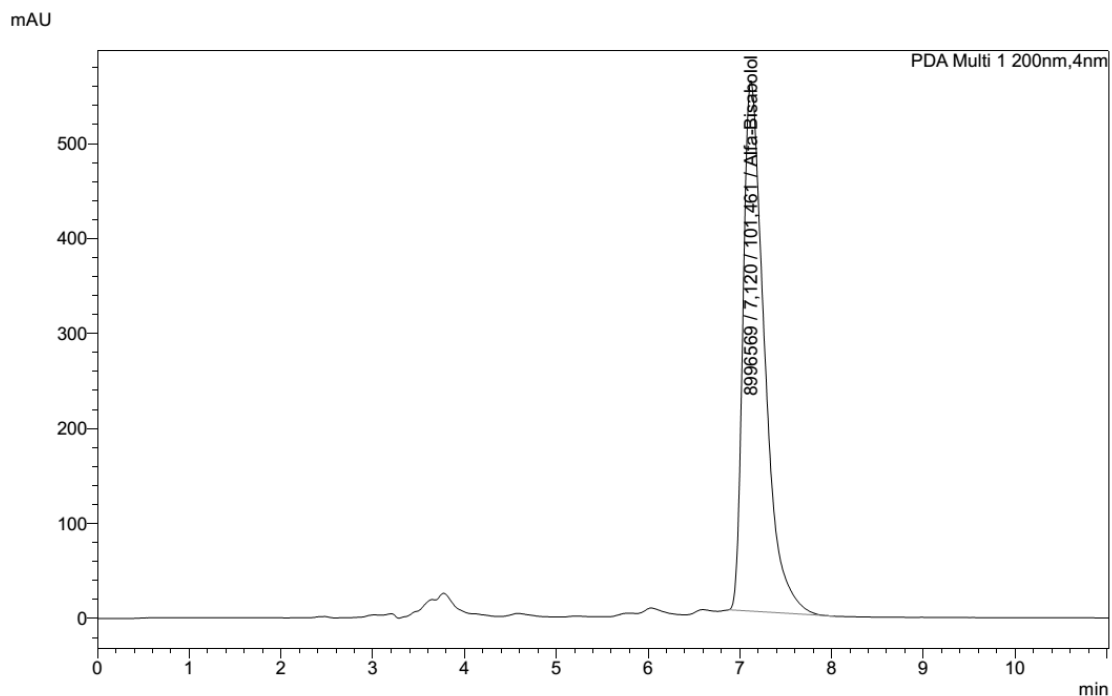
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 2 Amostra 5

Data de Aquisição: 14/11/2014 04:57:51

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,120	8996569	101,461
Total			8996569	

Anexo XXXIX: Teste de Precisão, Analista 2, Amostra 6-6

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

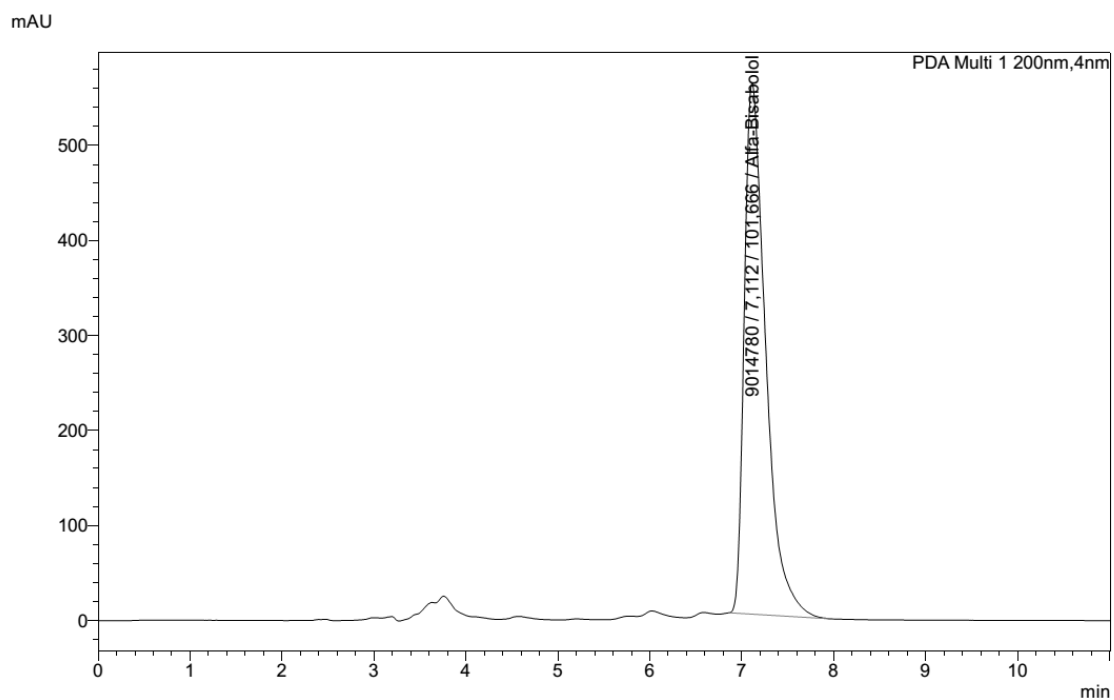
Arquivo: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Precisão Analist

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Precisão Analista 2 Amostra 6

Data de Aquisição: 14/11/2014 05:09:20

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,112	9014780	101,666
Total			9014780	

Anexo LX: Teste de Robustez, Solução Padrão com 0,0008M de HCL 1-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

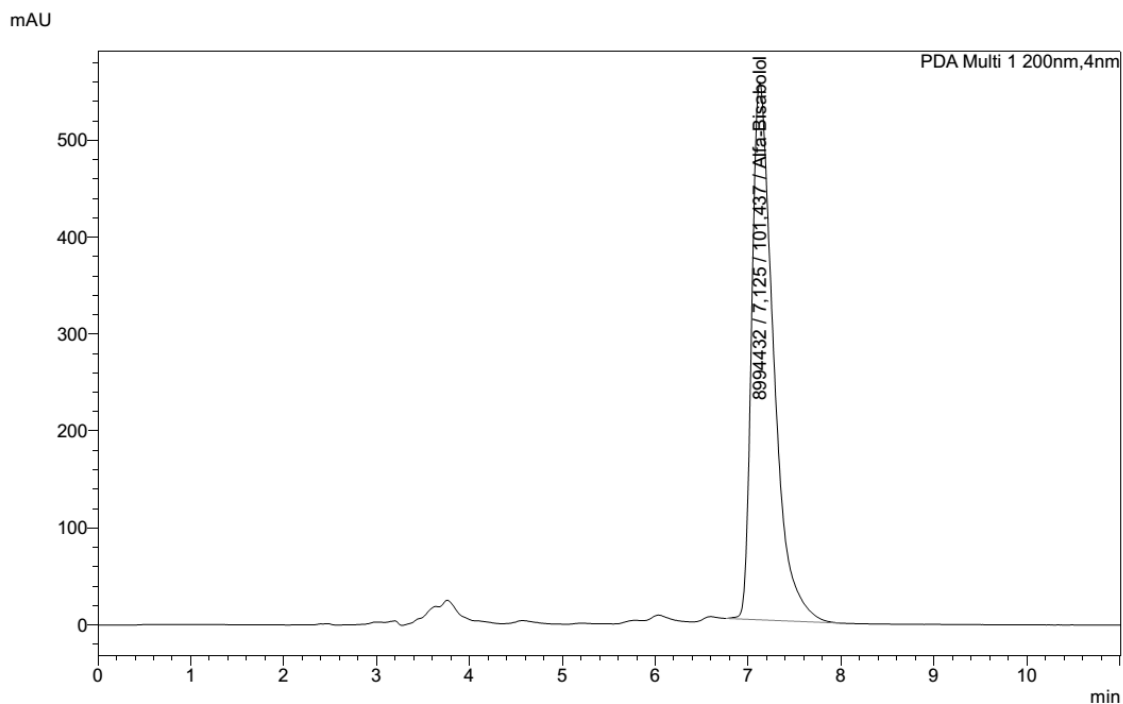
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,(

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,0008 M Padrão

Data de Aquisição: 14/11/2014 03:24:35

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,125	8994432	101,437
Total			8994432	

Anexo LXI: Teste de Robustez, Amostra com 0,0008M de HCL 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

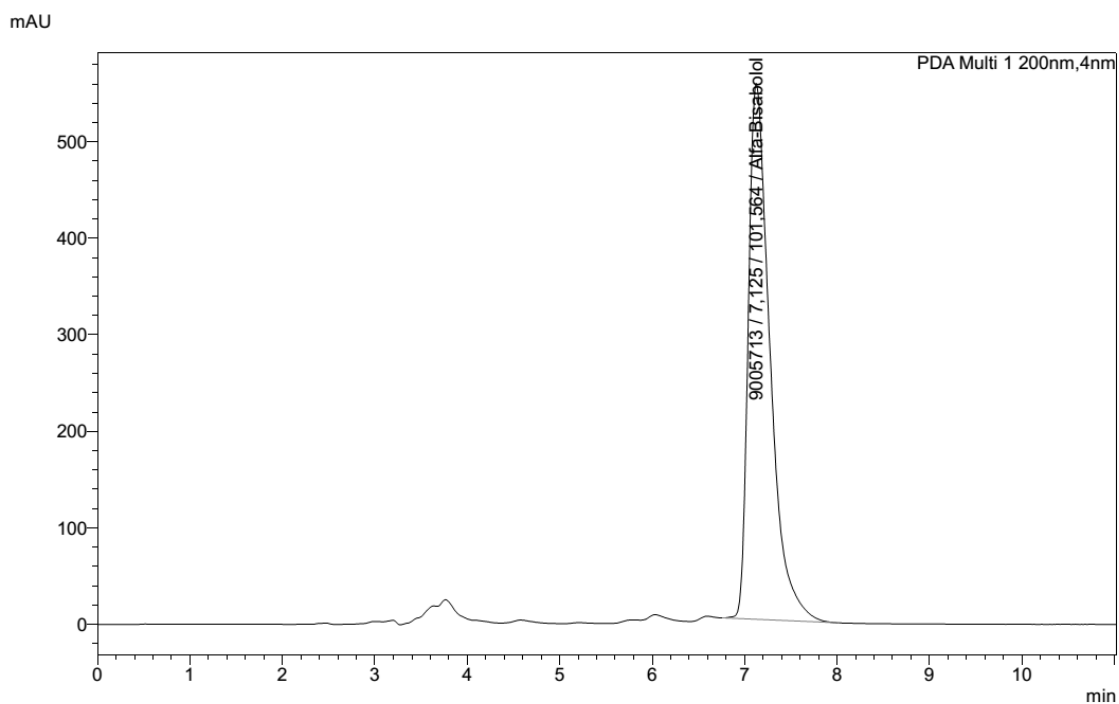
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,(

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,0008 M Amostra

Data de Aquisição: 14/11/2014 03:36:04

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,125	9005713	101,564
Total			9005713	

Anexo LXII: Teste de Robustez, Solução Padrão com 0,0012M de HCL 1-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

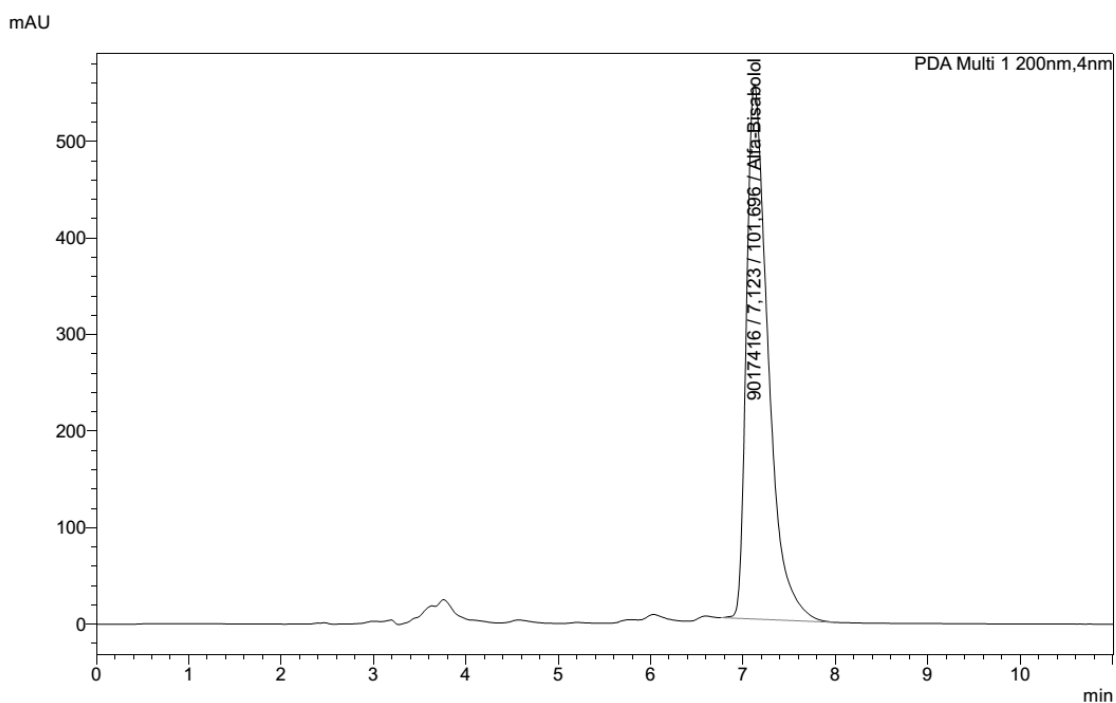
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,(

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,0012 M Padrão

Data de Aquisição: 14/11/2014 03:47:33

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,123	9017416	101,696
Total			9017416	

Anexo LXIII: Teste de Robustez, Amostra com 0,0012M de HCL 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Validação Alfa-Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

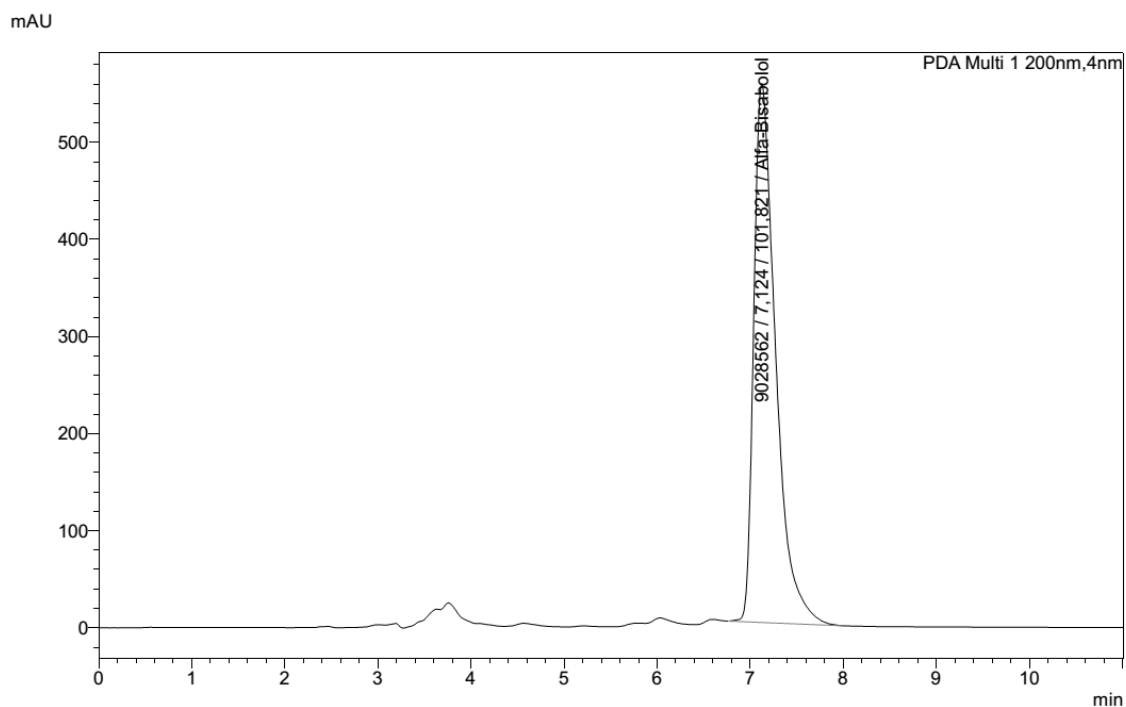
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,(

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Robustez HCL 0,0012 M Amostra

Data de Aquisição: 14/11/2014 03:59:02

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



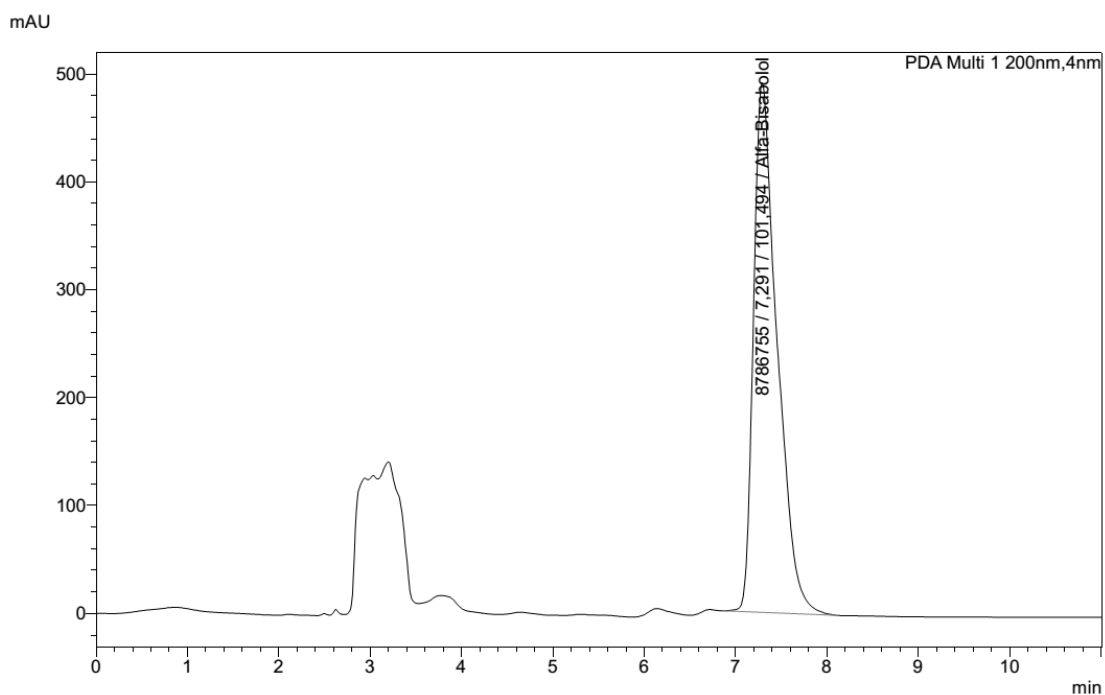
PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,124	9028562	101,821
Total			9028562	

Anexo LXIV: Teste de Robustez, Padrão de Bisabolol em etanol 1-2

Método: Bisabolol.lcm
Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol.lcb
Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Padrão 1-2.lcd
Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Padrão 1-2
Data de Aquisição: 30/12/2014 18:30:16
Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,291	8786755	101,494
Total			8786755	

Anexo LXV: Teste de Robustez, Padrão de Bisabolol em etanol 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

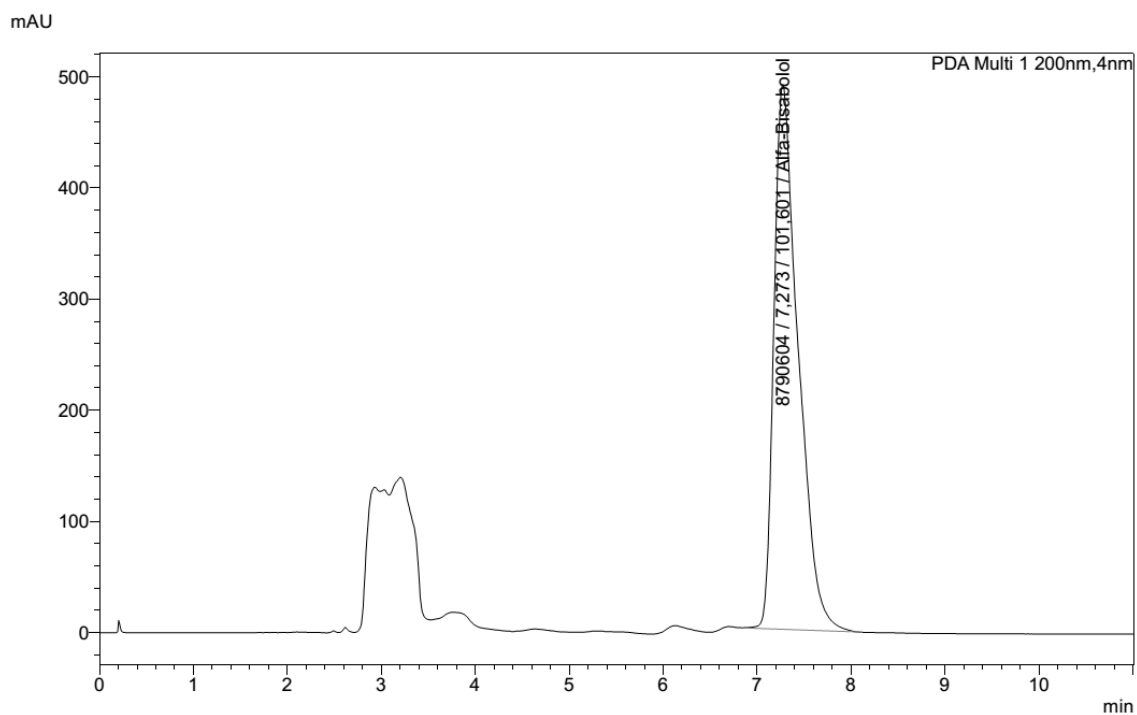
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Padrão 2-2.lcd

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Padrão 2-2

Data de Aquisição: 30/12/2014 18:41:45

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,273	8790604	101,601
Total			8790604	

Anexo LXVI: Teste de Robustez, Padrão de Bisabolol em etanol fluxo 0,9

Método: Bisabolol 0.9.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Val. Met. Bisabolol Robustez Flu

Identificação da Amostra: Validação de Bisabolol

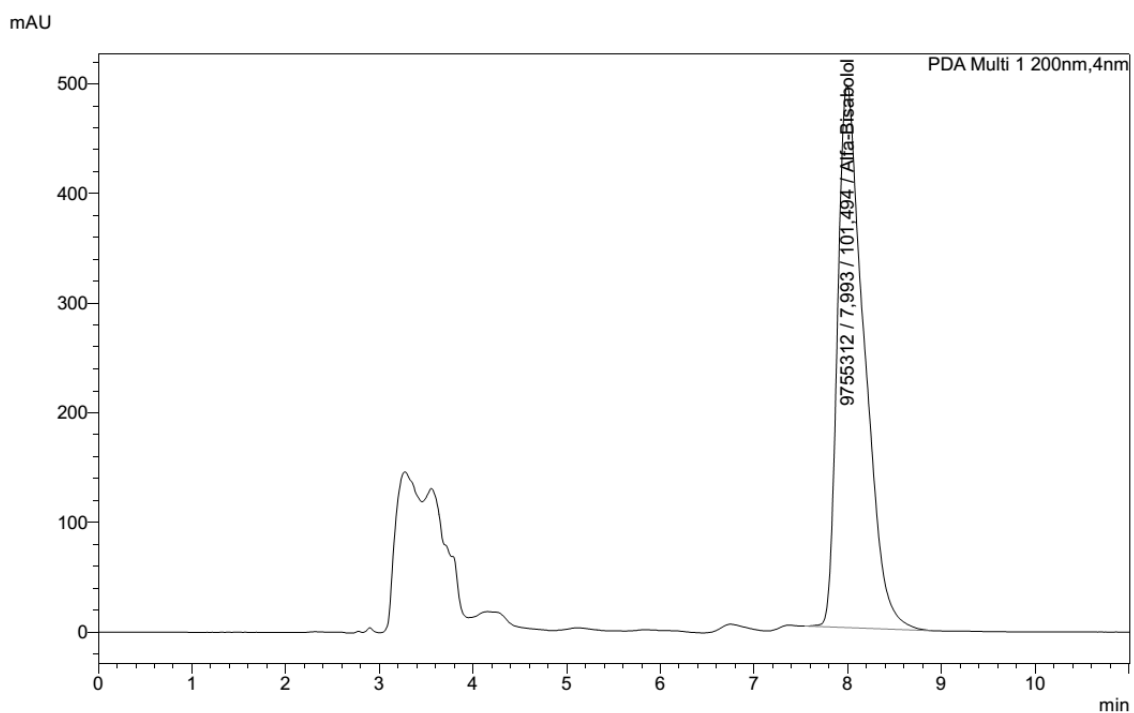
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Val. Met. Bisabolol Robustez Fluxo

Identificação da Amostra: Val. Bisabolol Fluxo 0,9 Padrão

Data de Aquisição: 30/12/2014 20:33:16

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,993	9755312	101,494
Total			9755312	

Anexo LXVII: Teste de Robustez, Amostra em etanol fluxo 0,9

Método: Bisabolol 0.9.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Val. Met. Bisabolol Robustez Fluxo

Identificação da Amostra: Validação de Bisabolol

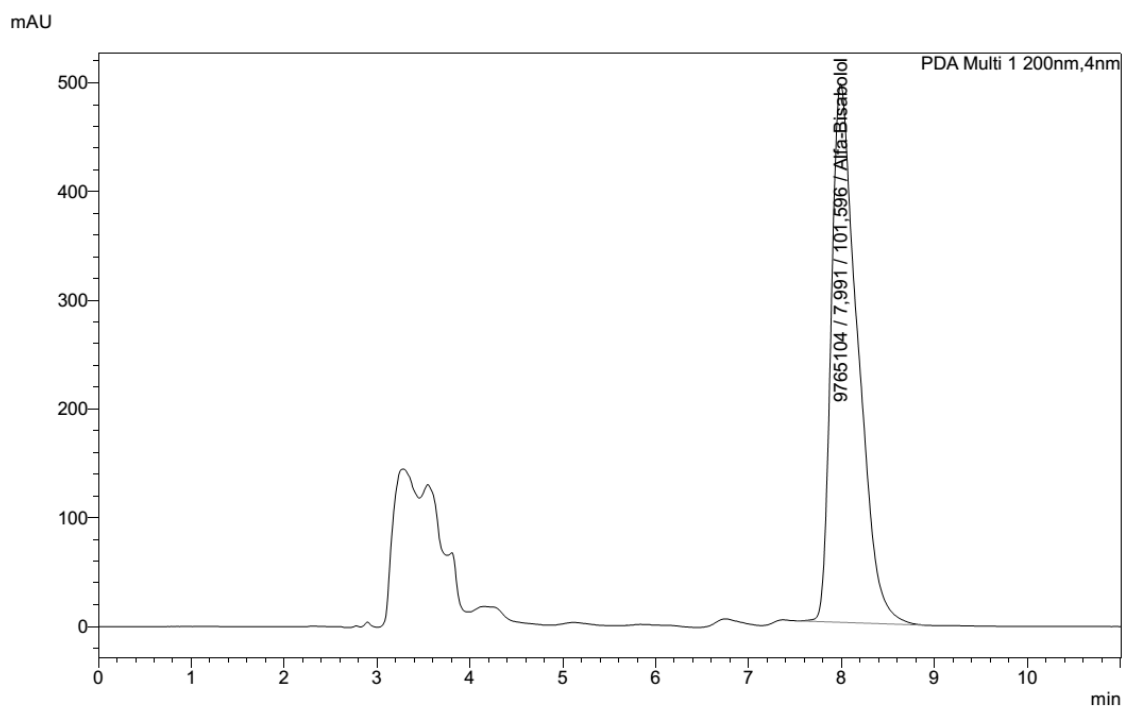
Arquivo: C:\LabSoluti as\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Val. Met. Bisabolol Robustez Fluxo C

Identificação da Amostra: Val. Bisabolol Fluxo 0,9 Amostra

Data de Aquisição: 30/12/2014 20:44:45

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,991	9765104	101,596
Total			9765104	

Anexo LXVIII: Teste de Robustez, Padrão de Bisabolol em etanol fluxo 1,1

Método: Bisabolol 1,1.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Bisabolol Robustez Fluxo 1,1.lcl

Identificação da Amostra: Validação de Bisabolol

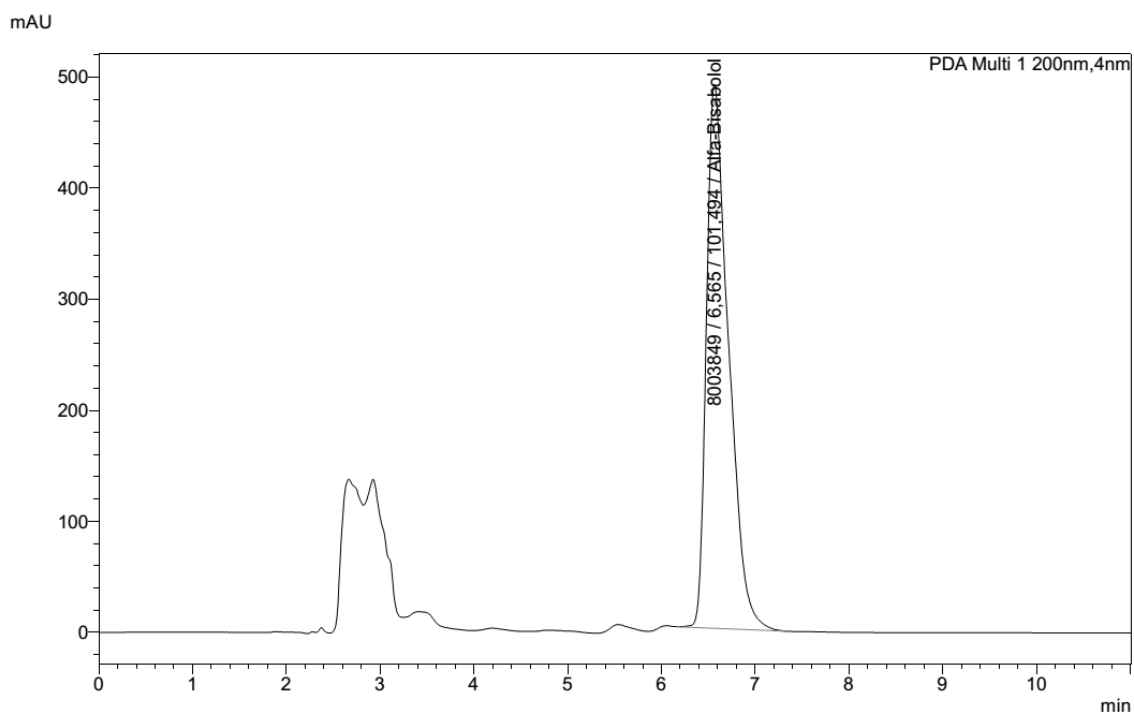
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Val. Bisabolol Fluxo 1,1 Padrão.lcd

Identificação da Amostra: Val. Bisabolol Fluxo 1,1 mL/min Padrão

Data de Aquisição: 30/12/2014 21:07:24

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	6,565	8003849	101,494
Total			8003849	

Anexo LXIX: Teste de Robustez, Amostra em etanol fluxo 1,1

Método: Bisabolol 1,1.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Bisabolol Robustez Fluxo 1,1.lct

Identificação da Amostra: Validação de Bisabolol

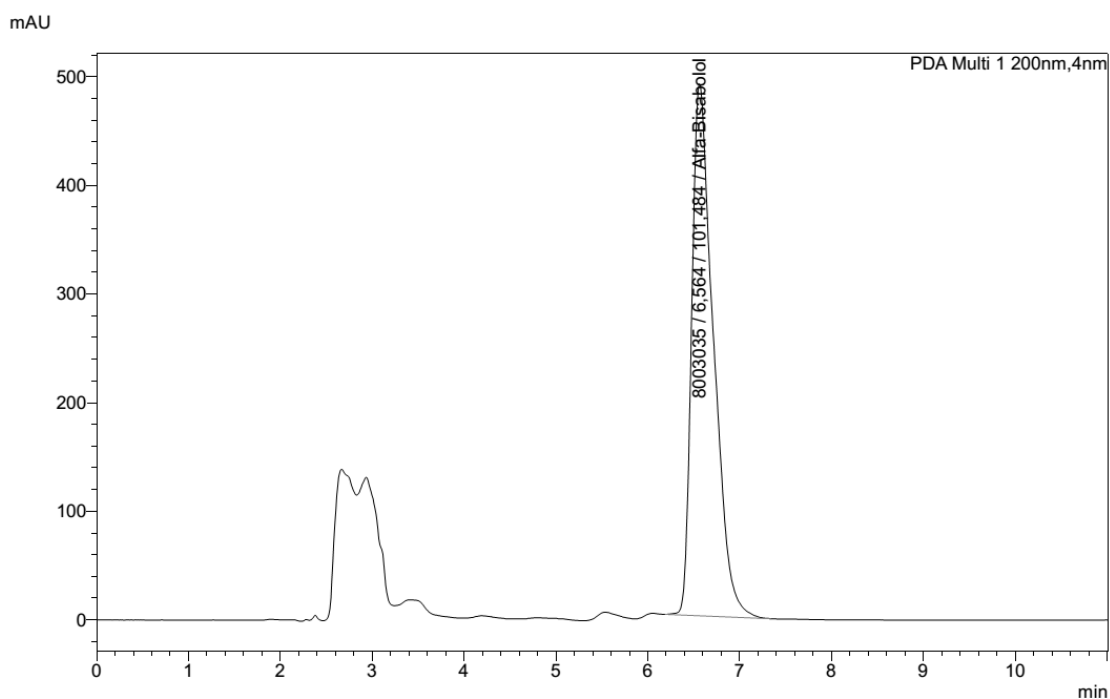
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Nova pasta\Val. Bisabolol Fluxo 1,1 Amostra.lc

Identificação da Amostra: Val. Bisabolol Fluxo 1,1 mL/min Amostra

Data de Aquisição: 30/12/2014 21:18:54

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	6,564	8003035	101,484
Total			8003035	

Anexo L: Teste de aplicabilidade, Cromatograma do óleo do candeeiro em etanol 1-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

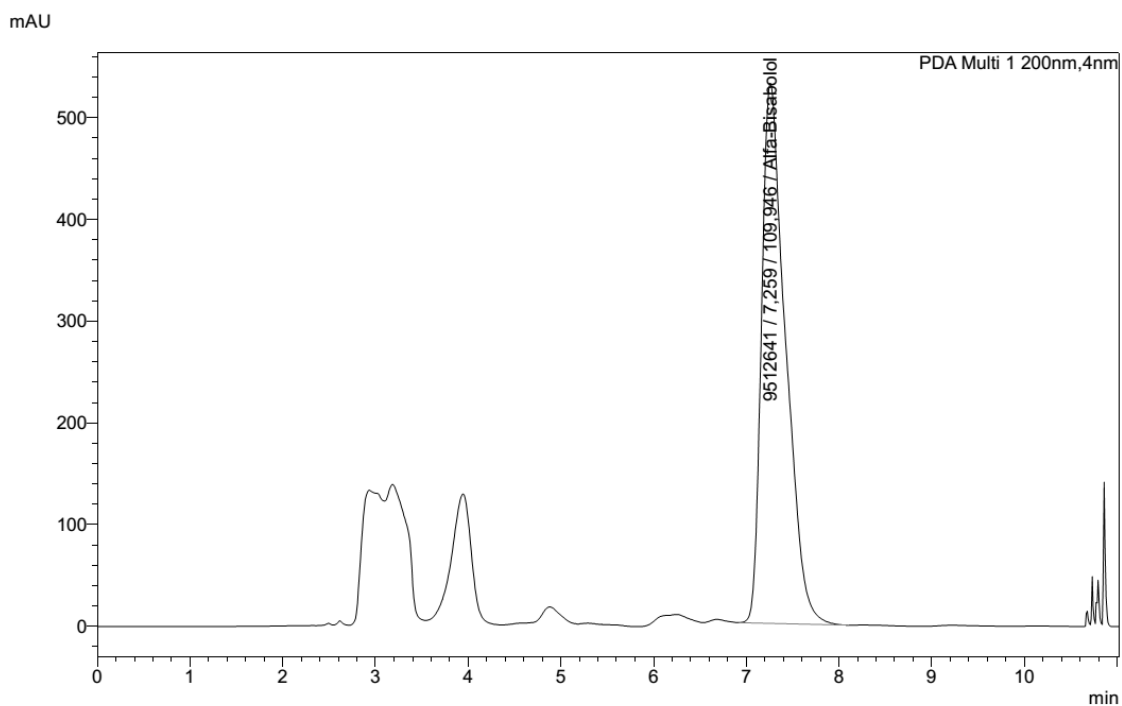
Arquivo: C:\LabSoluti os\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Óleo Candeeiro 1

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Óleo Candeeiro 1-2

Data de Aquisição: 30/12/2014 18:53:33

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,259	9512641	109,946
Total			9512641	

Anexo LI: Teste de aplicabilidade, Cromatograma do óleo do candeeiro em etanol 2-2

Método: Bisabolol.lcm

Sequencia: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol.lcb

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol

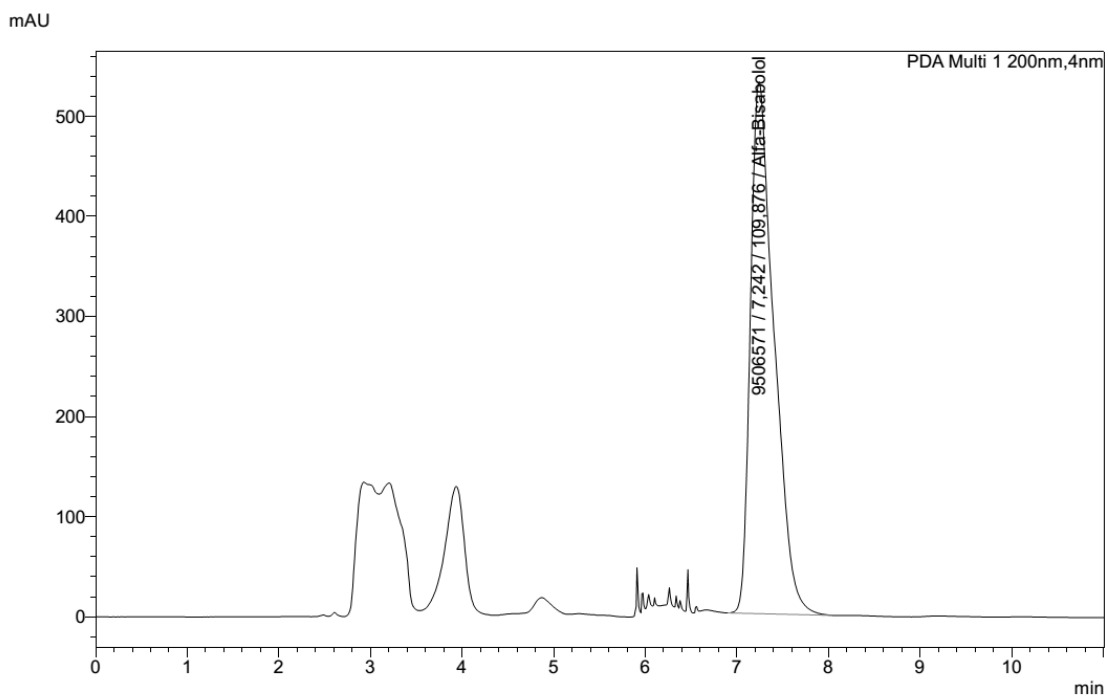
Arquivo: C:\LabSoluti\as\Data\Project1\Sequencias\Bisabolol\Val. Met. Bisabolol Óleo Candeeiro 2

Identificação da Amostra: Val. Met. Bisabolol Óleo Candeeiro 2-2

Data de Aquisição: 30/12/2014 19:05:02

Vol. Injeção: 20

Cromatograma



PDA Ch1 200nm

Pico	Amostra	Tempo de Retenção	Área	Concentração
1	Alfa-Bisabolol	7,242	9506571	109,876
Total			9506571	

Anexo LII: RE 899 de 2003 – Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos

título: Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003

ementa não oficial: Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002.

publicação: D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003

órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

alcance do ato: federal - Brasil

área de atuação: Medicamentos

relacionamento(s):

revoga:

- [Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002](#)



[Versão para impressão](#)



[Enviar por email](#)

RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003

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

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

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

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

DAVI RUMEL

ANEXO

GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E

BIOANALÍTICOS

MÉTODOS ANALÍTICOS

1. Considerações gerais

1.1. As informações contidas nesse Anexo apresentam as características a serem consideradas durante a validação de

procedimentos analíticos. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

1.2. Essas informações aplicam-se a:

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7.1. Especificidade e Seletividade

1.7.2. Linearidade

1.7.3. Intervalo

1.7.4. Precisão

1.7.5. Limite de detecção (sensibilidade)

1.7.6. Limite de quantificação

1.7.7. Exatidão

1.7.8. Robustez

1.8. No caso da transferência de metodologias da matriz para suas subsidiárias no Brasil e/ou das empresas nacionais para os centros de estudos de equivalência farmacêutica, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros de precisão, especificidade e linearidade. Cópia de toda a documentação original da validação

da metodologia deverá ser anexada, como prova de que a metodologia foi originalmente validada e deverá conter, no mínimo, todos os parâmetros relacionados no item 1.7.

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

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

Tabela 1. Classificação dos testes, segundo sua finalidade:

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

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

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

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
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 a comprovação da Precisão

Intermediária.

1.12. metodologia analítica deverá ser revalidada nas seguintes circunstâncias:

1.12.1. mudanças na síntese da substância ativa;

1.12.2. mudanças na composição do produto acabado;

1.12.3. mudanças no procedimento analítico.

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

2. Metodologia

2.1. Especificidade e Seletividade

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

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

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

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

2.2. Linearidade

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

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

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

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

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

2.3. Intervalo

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

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

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

2.4. Precisão

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

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

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

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



$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

2.5. Limite de Detecção

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

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

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

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



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

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

2.6. Limite de Quantificação

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

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



$$LD = \frac{DP_n \times 10}{IC}$$

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

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

2.7. Exatidão

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

Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

2.7.1. Fármaco

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

referência);

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

2.7.2. Forma Farmacêutica

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

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

2.7.3. Impurezas

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

2.7.3.2. no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

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



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

2.8. Robustez

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

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

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

Preparo das Amostras	· Estabilidade das soluções analíticas
	· Tempo de extração
Espectrofotometria	· Variação do pH da solução
	· Temperatura

	· Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	· Variação do pH da fase móvel
	· Variação na composição da fase móvel
	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	· Temperatura
	· Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	· Temperatura
	· Velocidade do gás de arraste

MÉTODOS BIOANALÍTICOS

1. Definições

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

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

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

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

Amostra desconhecida - amostra biológica que é objeto de análise.

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

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

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

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

Exatidão - representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência. Faixa de quantificação - corresponde a uma faixa de concentração, incluindo o LSQ e o LIQ, que pode ser confiável e reprodutivelmente quantificada com exatidão e precisão, por meio da relação concentração-resposta.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Considerações gerais

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

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

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

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

2.5. Deve ser realizada validação total antes da implementação de um método bioanalítico para a quantificação de um

fármaco e/ou metabólitos.

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

- 2.6.1. transferências de métodos entre laboratórios e analistas;
- 2.6.2. mudanças na metodologia analítica, por exemplo, substituição do sistema de detecção;
- 2.6.3. mudança de anticoagulante na coleta das amostras;
- 2.6.4. mudança de matriz, por exemplo, de plasma para urina;
- 2.6.5. mudança no procedimento de preparação da amostra;
- 2.6.6. mudanças relevantes na faixa de concentração;
- 2.6.7. mudanças de instrumentos e/ou "softwares";
- 2.6.8. demonstração de seletividade do analito na presença de medicações concomitantes;
- 2.6.9. demonstração de seletividade do analito na presença de metabólitos específicos.

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

Exemplos de variações:

- 2.7.1. estabilidade das soluções analíticas.
- 2.7.2. tempo de extração.

Variações típicas em cromatografia líquida:

- 2.7.3. influência da variação de pH da fase móvel.
- 2.7.4. influência da variação da composição da fase móvel.
- 2.7.5. diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes).
- 2.7.6. temperatura.
- 2.7.7. velocidade de fluxo.

Variações típicas em cromatografia gasosa:

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

2.7.10. velocidade de fluxo.

3. Validação pré - estudo

3.1. Especificidade

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

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

3.1.3. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, metabólitos, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo. A interferência da nicotina, cafeína, produtos de venda isenta de prescrição e metabólitos deve ser considerada sempre que necessário.

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

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

3.2. Curva de calibração/linearidade

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

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

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

3.2.4. Critérios de aceitação da curva de calibração:

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

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

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

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

3.3. Precisão

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

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

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



$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

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

3.4. Exatidão

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

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

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

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



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

3.5. Limite inferior de quantificação (LIQ)

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

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

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

retenção do fármaco.

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

3.6. Limite de detecção (LD)

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

3.7. Recuperação

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

3.7.1. Este teste deve ser realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras extraídas a partir de três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, com os resultados obtidos com soluções padrão não extraídas, que representam 100% de recuperação.

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

3.8. Controle de qualidade (CQ)

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

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

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

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

3.9. Estudo de estabilidade do fármaco em líquidos biológicos:

3.9.1. Considerações específicas relevantes Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, limite de variação e robustez, previamente validados. A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. A estabilidade determinada para um tipo de matriz e de material de acondicionamento específico não pode ser extrapolada para outros.

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas. As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz biológica isenta de interferência.

3.9.2. Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento

Deve-se testar a estabilidade do fármaco após três ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se, no

mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico, nas seguintes condições: as amostras devem ser congeladas à temperatura indicada para o armazenamento e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, as amostras devem ser novamente congeladas à temperatura indicada para o armazenamento, por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos, quantificando-se o fármaco nas amostras após o terceiro ciclo. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

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

3.9.4. Estabilidade de longa duração

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

3.9.4.2. A temperatura utilizada no ensaio deve reproduzir a recomendada para armazenamento das amostras, normalmente igual a -20 °C.

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

3.9.5. Estabilidade pós-processamento Em caso de utilização de equipamentos que empregam sistemas automáticos de amostragem/injeção, deve-se realizar estudo de estabilidade do fármaco, na amostra processada para análise, incluindo o adrião interno, na temperatura sob a qual o teste será realizado e por período de tempo superior à duração da corrida analítica. Utiliza-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. Os resultados devem ser comparados com aqueles obtidos da análise das amostras recém-preparadas.

3.9.6. Estabilidade das soluções-padrão

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

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

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

3.9.7. Análise dos resultados As amostras serão consideradas estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras recém-preparadas, com exceção do LIQ, para o qual se aceita desvio de até 20%. Qualquer que seja o método estatístico utilizado para avaliar os resultados dos estudos de estabilidade, este deverá estar descrito claramente no procedimento operacional padrão (POP).

4. Critérios de aplicação do método bioanalítico validado

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

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

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

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

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

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

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



[Versão para impressão](#)



[Enviar por email](#)