Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos

Development and validation of analytical methods: an important steep in the medicines production

Mônica Felts de La Roca[1], José Lamartine Soares Sobrinho[1], Lívio César Cunha Nunes[2] & Pedro José Rolim Neto[1]

RESUMO – Os medicamentos vêm sendo cada vez mais objetos de preocupação e de inúmeras pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade. Por tais razões, é de enorme importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados. A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irrecuperáveis. Assim, para conseguir alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessária a implantação de um sistema de garantia de qualidade que incorpore as normas de BPFC, sendo que as atividades de validação se mostram como prioritárias para o cumprimento destas práticas, aliadas à necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos, de acordo com os órgãos reguladores.

PALAVRAS-CHAVE – Método Analítico; Validação; Medicamentos; Controle de Qualidade.

SUMMARY *– Medicines becoming more and more objects of concern and innumerable researches are carried out world-wide, above all with relation to the quality control. For such reasons, the development of efficient and trustworthy analytical methods to quality control of commercialized medicines is of enormous importance. The necessity of showing the quality of the chemical analyses is being more recognized and demanded; therefore antrustworthy analytical datas can lead to disastrous decisions and irretrievable financial damages. Thus, to reach the objective of trustworthy quality, the implantation of a system of quality assurance that incorporates the GMPC norms is necessary, the activities of validation being the priority for the fulfilment of these practices, allied to the necessity of the development of analytical methods, in accordance with the regulating agencies.*

KEYWORDS *– Analytical Methods; Validation; Medicines; Quality Control.*

INTRODUÇÃO

Nas quatro últimas décadas, particularmente após a constatação de surtos de iatrogenia medicamentosa, dos quais o mais conhecido foi o da talidomida, a preocupação com o item "segurança" passou a ter importância igual ou maior que o relativo à "eficácia terapêutica", merecedor de atenção prioritária durante muito tempo (Barros, 2004).

A consciência dos riscos inerentes ao uso de medicamentos cada vez mais potentes está ligada, de forma mais visível, à morte de mais de 100 pessoas em 1937 nos EUA, por falência renal, em conseqüência do uso de um elixir de sulfanilamida contendo como veículo, o dietileno glicol e à epidemia de focomelia que, nos primeiros anos da década de 60 atingiu vários países onde a talidomida foi comercializada (Perini; Acurcio, 2001).

Os medicamentos vêm sendo cada vez mais ***motivo*** de preocupação e de inúmeras pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade. Por tais razões, é de enorme importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados, tornando-se imprescindível o desenvolvimento de rotinas de análises que, além de servirem para esse propósito, favoreçam sua implantação em comparação aos métodos usuais (Parisotto *et al.,* 2005).

A implantação da política de genéricos pela Lei n° 9787 (Brasil, 1999) tem colaborado para o aprimoramento da fabricação, controle e garantia de qualidade dos medicamentos no Brasil. A aplicação prática de conceitos como equivalência, biodisponibilidade e bioequivalência, aliada ao cumprimento das BPFC fornecem base técnica e científica para assegurar a intercambialidade entre genérico e o respectivo produto de referência (Storpirts *et al.,* 2004).

A necessidade de se mostrar a qualidade das análises químicas está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois, dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irrecuperáveis (RibaniI *et al.,* 2004). Para garantir que um método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra testada, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação (Lima *et al.,* 2006).

Recebido em 10/7/2007
[1]Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM - UFPE
[2]Núcleo de Tecnologia Farmacêutica - NTF – UFPI

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 laboratório de produtos farmacêuticos (Randau *et al.,* 2005). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (Brasil, 2003a).

O presente trabalho teve por objetivo traçar um panorama e, ***paralelamente***, discutir a importância e o impacto do desenvolvimento de metodologias analíticas e suas validações na produção de medicamentos.

DESENVOLVIMENTO

• *Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC)*

Boas Práticas de Fabricação e Controle é a parte da Garantia da Qualidade que assegura que os produtos são consistentemente produzidos e controlados com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. O cumprimento das BPFC está dirigido, primeiramente, à diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados através da realização de ensaios nos produtos terminados. Os riscos são constituídos essencialmente por: contaminação-cruzada, contaminação por partículas e troca ou mistura de produto (Brasil, 2003b).

• *Controle de Qualidade*

O Controle de Qualidade é a parte das BPFC referente à amostragem, especificações, ensaios, procedimentos de organização, documentação e procedimentos de liberação que asseguram que os ensaios necessários e relevantes sejam executados e que os materiais não são liberados para uso, nem os produtos liberados para venda ou fornecimento, até que ***a sua*** qualidade seja julgada satisfatória. O controle de qualidade não deve limitar-se às operações laboratoriais; deve estar envolvido em todas as decisões relacionadas à qualidade do produto (Brasil, 2003b).

• *Desenvolvimento de Métodos Analíticos*

A qualidade de um método analítico é determinada pela qualidade de suas etapas, com seus erros experimentais. Por um lado, essa qualidade depende da técnica de amostragem com a qual se seleciona uma fração presumivelmente representativa da amostra primária (Gonçalves, 2005).

Nessa fração deve-se identificar e quantificar os analitos, que são os componentes químicos que, presumivelmente, também ***os*** definem. É comum não se analisar quimicamente matrizes na forma bruta, pois elas costumam ter e gerar interferências e incompatibilidades com equipamentos analíticos (Valente; Augusto, 2000).

Para contornar tais problemas são empregados procedimentos de *preparo da amostra,* com os quais se procura isolar e concentrar os analitos a níveis adequados e obter um nível de limpeza da amostra que não comprometa a sua análise química. Portanto, o preparo da amostra também inclui a sua compatibilização com a técnica que fornecerá os dados químicos (Bedor, 2007).

Milhões de medições analíticas são efetuadas a cada dia em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Uma forte infra-estrutura internacional de medições está sendo ***utilizada, constatando-se*** a necessidade progressiva de dados analíticos comparáveis e consistentes, para a eliminação de barreiras técnicas entre os países. (Barros, 2002).

Para atingir esse processo de reconhecimento mútuo a nível internacional, em que uma vez efetuada a medição esta é aceita em qualquer país, requisitos legais de certificação e de credenciamento, devem ser observados. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido (ICH, 2005; INMETRO, 2003).

• *Validação de Métodos Analíticos*

A validação de métodos é um aspecto vital da garantia da qualidade analítica. Os métodos de ensaios usados para avaliar a conformidade de produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de exatidão, precisão e confiabilidade (Silva *et al.,* 2006; Alencar *et al.,* 2004).

Segundo a Resolução 899 da ANVISA (2003), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para a farmacopéia americana (*United States Pharmacopeia Convention*, 2006) a validação de métodos analíticos assegura a ***sua*** credibilidade durante o uso rotineiro.

Diante das exigências feitas pelos órgãos reguladores, além dos aspectos técnicos e comerciais, os laboratórios que realizam análises químicas devem se submeter a um credenciamento ***junto à*** agências credenciadoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO).

Os parâmetros analíticos devem ser pautados de acordo com o uso do método ***onde se podem*** encontrar diferenças significativas nos parâmetros avaliados entre diferentes métodos e suas respectivas finalidades (Nunes *et al.,* 2005).

Os parâmetros analíticos geralmente encontrados para validação de métodos analíticos são:

- seletividade
- linearidade,
- precisão,
- exatidão,
- *limite de detecção e quantificação* e
- *robustez* (Monteiro *et al.,* 2006).

A *seletividade* é o passo primordial no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser avaliada continuamente durante a validação e subseqüente uso do método. Uma forma de verificação da seletividade é a observação de ausência de picos em amostra placebo (Grangeiro Júnior *et al.,* 2004).

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). Pode-se observar de acordo com a Figura 1 que a linearidade pode ser confirmada com a regressão linear dos métodos dos mínimos quadrados dos pontos médios de três

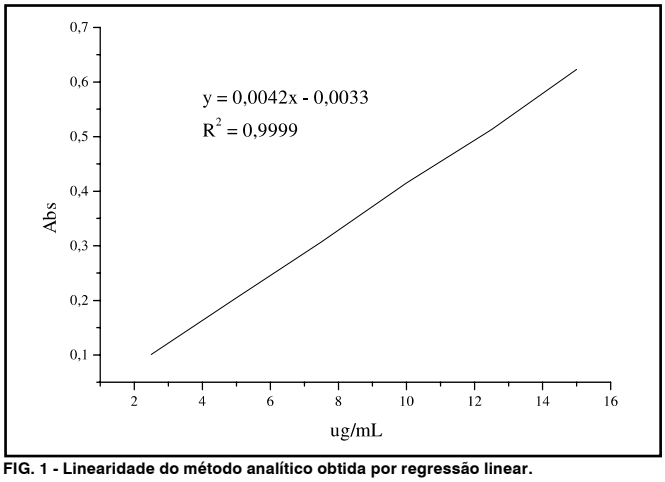

FIG. 1 - Linearidade do método analítico obtida por regressão linear.

curvas autênticas com no mínimo 5 pontos em concentrações previamente definidas (Soares Sobrinho *et al.,* 2005).

A *precisão* em validação de métodos representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra (ICH, 2005). Pode ser considerada em três níveis diferentes: precisão intermediária, repetitividade e reprodutibilidade, sendo facultada a realização de dois níveis (Soares Sobrinho *et al.,* 2006a).

A *exatidão* representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003). Um processo bastante utilizado para avaliação da exatidão de um método é o ensaio de recuperação como demonstrado por Bedor e colaboradores (2004).

Os *limites de detecção e quantificação* (LD e LQ) representam a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada e quantificada respectivamente (ICH, 2005; INMETRO, 2003). Demonstra a sensibilidade ao princípio ativo conforme realizado por Soares Sobrinho e colaboradores (2006b).

A *robustez* de um método mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas e deliberadas variações. Pode ser avaliado pela variação de parâmetros como marca e concentração de solvente e tipo de agitação (Soares Sobrinho *et al.,* 2005).

A estatística ***se constitui numa*** ferramenta fundamental no tratamento dos resultados gerados no processo de validação de método analítico. Ferramentas como coeficiente de variação, análise de variância ANOVA, teste *t Student* são alguns testes utilizados nesse tratamento afim de dar embasamento científico-matemático aos experimentos realizados (Alencar *et al.,* 2006a; Alencar *et al.,* 2006b; Monteiro *et al.*, 2005; Leite *et al.,* 2000).

CONCLUSÃO

A indústria farmacêutica deve se responsabilizar pela qualidade dos produtos farmacêuticos, assegurando a sua ***adequação*** com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos e cumprir com as exigências legais, não colocando os pacientes em risco em função de sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade ou eficácia.

Assim, para conseguir alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável é necessária a implantação de um sistema de garantia de qualidade que incorpore as normas de BPFC, sendo que as atividades de validação se mostram como prioritárias para o cumprimento dessas práticas, aliadas à necessidade do desenvolvimento e validação de métodos analíticos, componente importante dentro de todo o sistema de qualidade.

REFERÊNCIAS

1. Alencar, J. R. B. *et al.* Validação de limpeza de zidovudina: estratégia aplicada ao processo de fabricação de medicamentos anti-retrovirais. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1-8, jan./mar. 2004.

   a) Alencar, J. R. B. *et al.* Validação de limpeza de equipamentos numa indústria de medicamentos: estratégia para escolha do 'pior caso'. Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, v. 87, n. 1, p. 13-18, jan./mar. 2006.

   b) Alencar, J. R. B. *et al.* Validação de limpeza de equipamentos multipropósitos para formas farmacêuticas líquidas: caso da zidovudina xarope. Acta Farmaceutica Bonaerense, Buenos Aires, v. 25, n. 1, p. 35-42, jan./mar. 2006.
2. Barros, J. A. C. Políticas Farmacêuticas: a serviço dos interesses da saúde? Brasília: UNESCO, 2004. 400p.
3. Barros, C. B. Validação de Métodos Analíticos. Biólogo, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 175-177, jul./dez. 2002.
4. Bedor, D. C. G. Desenvolvimento e validação de métodos bioanalíticos para dosagem de antimicrobianos em plasma humano. 2007. 63fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
5. Bedor, D. C. G. *et al.* Validação de Método Analítico. Controle de Contaminação, São Paulo, n. 68, p. 32-36, dez. 2004.
6. Brasil, Lei nº. 9787, de 10 de fevereiro de 1999. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Dispõe sobre a vigilância sanitária, estabelece o medicamento genérico, dispõe sobre a utilização de nomes genéricos em produtos farmacêuticos e dá outras providências. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 fev. 1999.

   a) Brasil, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

   b) Brasil, Resolução RE nº 210, de 04 de agosto de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 ago. 2003.
7. Gonçalves, T. M. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para o estudo farmacocinético comparativo de duas classes de fármacos (anti-retroviral e penicilínico) em indivíduos sadios. 2005. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.
8. Grangeiro Junior, S. *et al.* Validação da metodologia analítica de comprimido à base de nevirapina. Controle de Contaminação, São Paulo, n. 65, p. 24-28, set. 2004.
9. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008. 2003.
10. International Conference on Harmonisation: ICH Harmanised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), nov. 2005.
11. Leite, A. C. L. *et al.* Análise quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da zalcitabina produzida pelo LAFEPE. Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, v. 81, n.1/2, p. 29-30, 2000.
12. Lima, L. R. *et al.* Desenvolvimento e validação de metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápico contendo *Operculina macrocarpa* (L.). Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 562-567, out./dez. 2006.
13. Monteiro, D. B. *et al.* Desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento de matéria-prima lamivudina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 120-123, dez. 2006.
14. Monteiro, V. C. S. *et al.* Validação da Metodologia Analítica para Nelfinavir por CLAE. Controle de Contaminação, São Paulo, n. 75, p. 21-28, jul. 2005.
15. Nunes, L. C. C. *et al.* Análise de perigos na produção de comprimidos. Controle de Contaminação, São Paulo, n. 79, p. 24-28, nov. 2005.
16. Parisotto, G. *et al.* Analise exploratoria aplicada no estudo de medicamentos contendo piroxicam. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 499-505, out./dez. 2005.
17. Perini, E.; Acurcio, F. A. Ciências Farmacêuticas. *In:* Gomes, M. J. V. M.; Reis, A. M. M. (Org.). Uma abordagem em Farmácia Hospitalar, 1ª. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. cap. 5, p. 85-108.

18. Randau, K. P. *et al.* Desenvolvimento e validação analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT) - Matéria-Prima. Acta Farmaceutica Bonaerense, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 104-108, jan./mar. 2005.

19. Ribani, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, São P aulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out.2004.

20. Silva, R. M. F. *et al.* Desenvolvimento e validação da metodologia analítica para doseamento da matéria-prima e de cápsula de sulfato de indinavir por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Acta Farmaceutica Bonaerense, Buenos Aires, v. 25, n. 4, p. 578-82, out./dez. 2006.

21. Soares Sobrinho, J. L. *et al.* Validação de metodologias analíticas no mercado farmacêutico: Caso paracetamol. Controle de Contaminação, São Paulo, n. 73, p. 35-41, maio. 2005.

    a) Soares Sobrinho, J. L. *et al.* Desenvolvimento e validação do método analítico para o doseamento de benznidazol. Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, v. 87, n. 3, p. 78-80, jul./set. 2006.

    b) Soares Sobrinho, J. L. *et al.* Alternativa para o doseamento de metildopa comprimido: desenvolvimento e validação do método analítico. Controle de Contaminação, São Paulo, n. 82, p. 31-35, fev. 2006.

22. Storpirts, S. *et al*. Equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), abr. 2004. 19p.

23. United States Pharmacopeia Convention. Validation of Compendial Methods. *In:* US Pharmacopeia, 29th. ed., Rockville, 2006. cap. 1225.

24. Valente, A. L. P.; Augusto, F. Microextração por fase sólida. Química Nova, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 523-530, jul./ago. 2000.

Endereço para correspondência
Pedro José Rolim Neto
E-mail: pedro.rolim@pq.cnpq.br
Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos – LTM
Departamento de Ciências Farmacêuticas. Univ. Fed. de Pernambuco.
Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-521 – Recife/PE.
Tel/Fax (0xx81)3272-1383