

Projeto

Mestrado em Gestão de Qualidade e Segurança Alimentar

***Validação do método analítico para a identificação
do flavonóide rutina num suplemento alimentar
multivitamínico por HPLC***

Jessica Viviana Arguello Carrera

Peniche, Mês novembro de Ano 2020

Projeto

Mestrado em Gestão de Qualidade e Segurança Alimentar

***Validação do método analítico para a identificação
do flavonide rutina num suplemento alimentar
multivitamínico por HPLC***

Jessica Viviana Arguello Carrera

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Alexandra Augusta Ramos Lopes da Cruz, Professora da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria e coorientação da Engenheira Jhennifer Paola Pepinosa, Jefe de Validações na empresa GINSBERG ECUADOR S.A.

Leiria, *Mês* novembro de *Ano* 2020

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Dedicat3ria

Este logro se lo dedico en primer lugar a Dios. A mis padres por el esfuerzo y dedicaci3n para otorgarme mi mejor herencia que ha sido el estudio. A mi hermano Eli3n, por haber sido mi impulso y motivaci3n. A mis amigas por no dejarme decaer y a todas las personas que estuvieron conmigo haciendo mis d3as m3s f3ciles mientras estuve fuera de casa.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Agradecimentos

Agradeço aos professores que me acompanharam ao longo de todo o curso, em especial à professora Alexandra Lopes da Cruz por ter me orientado, por o seu tempo e dedicação apesar da distância.

A la ingeniera Jhennifer Pepinosa, Jefe de Validaciones de la empresa GINSBERG ECUADOR S.A, por haber sido mi guía y haberme compartido sus conocimientos, sin su ayuda y amistad esto no hubiera sido posible.

A la empresa GINSBERG ECUADOR S.A. por haberme permitido realizar este proyecto bajo sus recursos e instalaciones.

Estar fora de casa não é fácil, mas Portugal e a sua gente fez da estadia uma experiência maravilhosa. Obrigada Portugal!

Sem vocês nada disso teria sido possível.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi validar o método analítico para a determinação da "Rutina" (um flavonóide encontrado em uma grande quantidade de alimentos) em um suplemento alimentar, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a fim de garantir a qualidade e segurança do produto, através do cumprimento dos objetivos de validação. O presente trabalho atendeu aos parâmetros de validação estabelecidos na Farmacopéia dos Estados Unidos (USP 42). O procedimento consiste em uma separação de fase reversa por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) usando como fase móvel uma mistura de ácido acético, acetonitrilo (70:30), uma coluna C18 a 35 ° C e detecção em um comprimento de onda de 257 nm. O método foi considerado seletivo, linear e preciso. Essas características aliadas à sua simplicidade tornam o método adequado e conveniente para o objetivo proposto. A robustez da metodologia também foi investigada.

Palavras-chave: HPLC, validação, rotina, flavonoide, farmacopéia

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Abstract

The objective of this research was to validate the analytical method for determining "Rutin" (a flavonoid found in a large amount of food) in a food supplement, using high performance liquid chromatography (HPLC), in order to guarantee the quality and product safety, through the fulfillment of the validation objectives. The present study was based on the validation parameters established in the United States Pharmacopoeia (USP 42). The procedure consisted of a reverse phase separation by high performance liquid chromatography (HPLC) using as a mobile phase a mixture of acetic acid, acetonitrile (70:30), a C18 column at 35 ° C and detection at a wavelength of 257 nm. The method was considered selective, linear and precise. These characteristics combined with the simplicity make the method suitable and convenient for the proposed objective. The robustness of the methodology was also investigated.

Keywords: HPLC, validation, routine, flavonoid, pharmacopoeia

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura geral de flavonóides, quercetina e rutina.

Figura 2. Esquema dos componentes fundamentais de um cromatógrafo de alta eficiência. a) Reservatório da fase móvel; b) Desgaseificador; c) Bomba; d) Injetor de amostra; e) Compartimento de colunas termostaticado; f) Coluna de separação; g) Detector; h) Processador de dados.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Lista de tabelas

Tabela 1. Clasificação dos flavonóides e a suas fontes e características.

Tabela 2. Preparação das soluções para a linearidade em 5 níveis percentuais.

Tabela 3. Preparação das soluções para a exatidão em 3 níveis percentuais.

Tabela 4. Preparação das soluções para a precisão em 3 níveis percentuais.

Tabela 5. Preparação das soluções para o limite de detecção e quantificação em 4 níveis percentuais

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Lista de siglas

HPLC: High Performance Liquid Chromathographic

USP: United States Pharmacopoeia

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Índice

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE SIGLAS	XVII
ÍNDICE	XIX
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Flavonóides	2
1.2. Rutina	4
1.3. Benefícios da Rutina	6
1.4. Validação	7
1.5. Tipos de Validação	7
1.5.1. Validação prospetiva	7
1.5.2. Validação Retrospetiva	8
1.5.3. Revalidação	8
1.6. Validação de métodos analíticos	8
1.6.1. Especificidade	9

1.6.2.	Limite de detecção	9
1.6.3.	Precisão	9
1.6.4.	Exactitude (viés)	10
1.6.5.	Lineridade	10
1.6.6.	Incerteza	11
1.6.7.	Estabilidade	11
1.7.	Cromatografia de alta Eficiência (HPLC)	12
2.	OBJETIVOS	13
2.1.	Objetivo principal	13
2.2.	Objetivos específicos	13
3.	DESENVOLVIMENTO	14
	BIBLIOGRAFIA	26
	ANEXOS	30
	GLOSSÁRIO	12

1. Introdução

1.1. Flavonóides

Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos gerados a partir do metabolismo secundário das plantas através do caminho do ácido shikimico e da rota dos policetídeos. (López, 2002). Flavo vem do latino “flavus” e significa cor entre amarelo e laranja. Os flavonóides são pigmentos heterocíclicos que contêm oxigênio, responsáveis pela coloração amarela, vermelha e azul das plantas e frutos. Encontram-se em vários produtos alimentares, como frutas, legumes, cacau, café, chá preto, vinho tinto e cerveja. Os seus pesos moleculares são variados, desde moléculas fenólicas de baixo peso a compostos altamente polimerizados com pesos moleculares superiores a 30.000 Da. Existem aproximadamente 5000 compostos pertencentes ao grupo flavonoide (Escamilla *et al.*, 2003) (Estrada *et al.*, 2012).

Têm uma atividade antioxidante devido à sua capacidade de prevenir reações catalisadoras dos radicais livres ($\text{Flavonóide-OH} + \text{r-O} + \text{R-H} \rightarrow \text{Flavonóide-r-R} + \text{H}_2\text{O}$). Além de se obterem vantagens no seu consumo pelas suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorais e anticancerígenas (Baviera, 1993).

Geralmente, os flavonóides são solúveis em solventes orgânicos polares, água e álcool, no entanto, quando estão no estado livre, é dizer como heterosídeos, sua solubilidade na água é baixa.

Os flavonóides encargam-se de regular os níveis de auxinas (hormonas vegetais reguladoras do crescimento) e estão envolvidos na diferenciação das plantas e

no aumento da polinização conferindo coloração. Podemos encontrá-los nos seguintes grupos:

Tabela 1. Classificação dos flavonóides e a suas fontes e características.

Grupo de Flavonóide	Origem ou fonte	Característica	Referência
Ácido elágico	Uvas, morangos e legumes	Diminui a proliferação de células tumorais	Moreno et al., (2009)
Antocianinas	Frutos vermelhos	São antivirais e apoiam o sistema cardiovascular	Mendoza et al., (2017)
Catequina	chá preto e verde	Antiinflamatório e dietético	Ortiz et al., (2019)
Citroflavonóides	Laranja, limão e clementina	Melhoram a saúde cardiovascular e neurológica. Anti-histamínicos	Edeas, M. (2007)
Isoflavonóides	Soja, tofu, leite, feijão, proteína vegetal, miso e farinha	Reduz os sintomas da menopausa e melhora a saúde óssea	Silva et al., (2019)
Kaempferol	brócolos, alho-porro, endibias, beterraba vermelha e radibas	Reduzem o risco de cancro pancreático.	PubChem, (2020)
Proantocianidinas	sementes das uvas, no extrato de casca de pinheiro do mar e no vinho tinto	Evite infecções do trato urinário. É diurético	Barnoiu et al., (2015)

O valor médio da ingestão de flavonóides é de 23 mg por dia. (Grotewold, 2006)

Um dos favonoids mais representativos pelas suas propriedades e a sua abundância nos alimentos é a Rutina .

1.2. Rutina

A rutina também é chamada também quercentina-3-rutinósido ou rutósido. Pertence ao grupo dos flavonóides do tipo glicosides. Está presente em vários vegetais que estão incluídos na nossa dieta diária como as alcaparras, farinha de trigo, espargos, chá verde, frutos vermelhos e tomates. Através da hidrólise enzimática da rutina pode derivar compostos como rutinosa e quercentina, um dissacarídeo e um flavonóide, respectivamente. A rutina tem o nome de uma planta chamada Ruda, por ter sido extraído pela primeira vez desta planta. No entanto, a rutina é encontrada em maior quantidade em outras plantas em comparação com a Ruda (Kraujalis, Venskutonis, Ibáñez, & Herrero, 2014).

A rutina é conhecida por ter uma vasta bioatividade, incluindo propriedades antialérgicas, anti-inflamatórias, antiproliferativas e anticancerígenas. A ingestão média diária numa dieta normal é superior a 1 g por dia. Embora os flavonóides não tenham o valor nutricional clássico, são cada vez mais vistos como componentes dietéticos benéficos que atuam como potenciais protetores contra doenças humanas como doenças cardíacas coronárias, cancro e doença inflamatória intestinal. A rutina funciona como um libertador quercetina para o intestino grosso; este flavonóide apresenta efeitos terapêuticos tais como a produção de mediadores pró-inflamatórios envolvidos na progressão da inflamação intestinal (Heejung *et al.*, 2005).

A rutina e a quercetina podem ser encontrados em concentrações elevadas nos resíduos industriais da uva na produção de vinho no bagaço. Estes compostos podem ser incorporados indiretamente nos alimentos através da

matriz polímera do recipiente, a ser libertado gradualmente durante o armazenamento por processos de difusão, dissolução e equilíbrio (Catalá e Gavara, 2002). Flavonóides como a rutina, isoquercetina e quercetina caracterizam-se pela sua capacidade de estabilizar os radicais livres por dois mecanismos: a transferência de um átomo de hidrogénio e a transferência de eletrões individuais (Chiodo *et al.*, 2010). Outra característica importante destes flavonóides é a capacidade de quelar catiões de metais de transição, como ferro, chumbo e alumínio. Por conseguinte, estas características em conjunto conferem a estes flavonóides uma elevada capacidade de estabilização radical livre e, portanto, uma elevada capacidade antioxidante (Matsumoto *et al.*, 2002).

A rutina caracteriza-se pela inativação dos radicais livres com uma eficácia superior à vitamina C, apresentando um potencial antioxidante de 2,4 mM em equivalentes trolox e 67,6% de inibição da oxidação (Frankel e Meyer, 2000; Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Este composto tem efeito sinérgico com vitamina C permitindo a sua regeneração e, assim, fornece aos alimentos um período de proteção antioxidante mais longo (Guo e Wei, 2008). O elevado efeito potencial antioxidante da rutina foi demonstrado na inibição da peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), bem como na elevada atividade antioxidante contra as reações de Fenton (Caillet *et al.*, 2007).

A rutina é comumente chamada vitamina P. A letra "P" representa o fator "permeabilidade", denominação atribuída a este grupo de nutrientes porque apoiam a integridade e permeabilidade dos capilares e dos vasos sanguíneos.

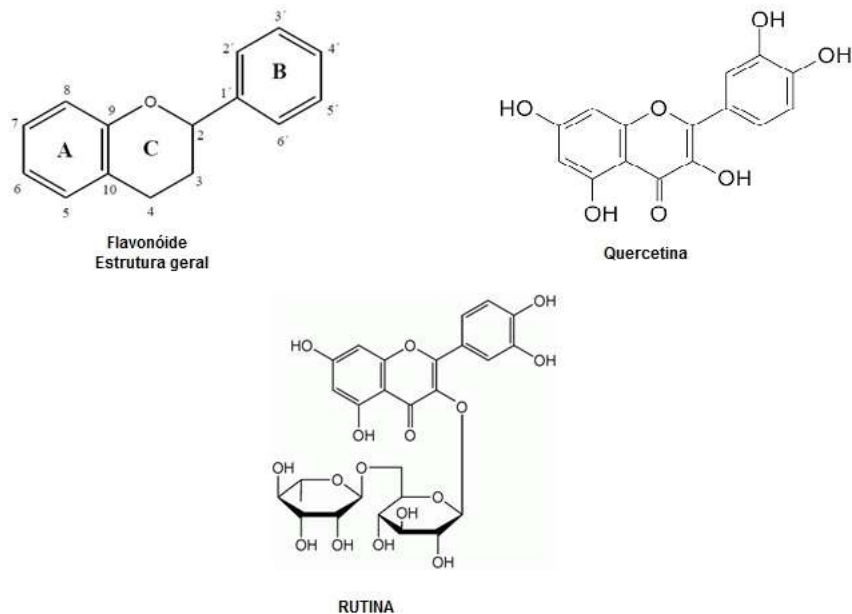


Figura 1. Estrutura geral de flavonóides, quercetina e rutina. Retirado de Martínez-Valverde, (2000)

1.3. Benefícios da Rutina

As propriedades da rutina são várias, entre elas destaca principalmente os seus benefícios na circulação sanguínea, além disso previne o sangramento causado pelo enfraquecimento dos vasos sanguíneos, favorece a absorção de nutrientes, previne a fragilidade dos vasos sanguíneos e reduz a fragilidade e permeabilidade dos capilares, melhora o fluxo sanguíneo e reduz a vasodilatação. Por outro lado, atua na imunomodulação ativando o sistema imunitário (Al-Dhabi et al., 2015).

Num estudo realizado em ratinhos, determinaram que os efeitos antidepressivos da rutina se deviam a um aumento da disponibilidade de serotonina e norepinefrina na área sináptica. Após este estudo, foram publicados os efeitos antidepressivos de uma grande variedade de flavonóides, mostrando que

também interagem com outros sistemas de neurotransmissão (Machado, et al. 2008).

As técnica mais adequada à identificação e quantificação dos flavonóides totales é a espectrofotometria UV, mas quando é preciso a separação de compostos o mas recomendável é a cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

1.4. Validação

A validação de um método analítico é o processo pelo qual, através de estudo laboratorial, são estabelecidas as características de desempenho do método para satisfazer os requisitos das aplicações analíticas concebidas. As características de desempenho são expressas com base nos parâmetros analíticos. O objetivo da validação de um método analítico é deixar provas, através da documentação, do cumprimento das condições de precisão, exatidão e fiabilidade, bem como da integridade e recuperabilidade dos resultados dos ensaios efetuados. Isto demonstra que um método pode ser invocado para produzir o resultado esperado dentro dos limites definidos (WHO, 2002).

1.5. Tipos de Validação

1.5.1. Validação prospetiva

É realizado quando se trata da conceção ou adequação de um método de análise para um determinado produto ou processo.

1.5.2. Validação Retrospectiva

É realizado quando um método analítico que tem sido usado por um longo tempo, não tem a evidência experimental e documentada sobre a sua validade.

1.5.3. Revalidação

É efetuado quando um método validado foi modificado em qualquer uma das etapas do procedimento estabelecido, ou alterou qualquer um dos instrumentos, reagentes ou materiais originalmente utilizados.

1.6. Validação de métodos analíticos

As características de desempenho de um método analítico são expressas com base em parâmetros analíticos. Estes parâmetros analíticos considerados na validação são os seguintes: Exactitude, Precisão, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Especificidade, Seletividade e Linearidade (Madruga, 2012). Algumas autoridades fazem a distinção entre especificidade e seletividade. Ambos os termos referem-se à capacidade do método de fornecer um cálculo de análise na presença de outros componentes de uma amostra (FAO, 2019). A diferença é que a seletividade do método fornece precisão dos resultados para todas as análises de interesse, enquanto a especificidade refere-se à exatidão dos resultados para analisar uma substância sem que possam interferir outros compostos da amostra (USP 31, 2017).

1.6.1. Especificidade

Este parâmetro diz respeito ao grau em que outras substâncias interferem na identificação e quantificação do analito. Mede a capacidade do método de identificar/quantificar os analitos na presença de outras substâncias endógenas ou exógenas. A validação deve assegurar o bom funcionamento do método e distinguir os efeitos das impurezas, substâncias que reagem entre si, excipientes, etc., que possam estar presentes na amostra. (ONU, 2010)

1.6.2. Limite de detecção

Esta é a concentração de substâncias mínimas que pode ser detetada e identificada com um certo grau de certeza. O limite de detecção é também definido como a concentração mínima que pode ser distinguida do ruído de fundo com um certo grau de confiança. O limite de detecção não é um parâmetro robusto e pode ser afetado por pequenas alterações no sistema analítico (por exemplo, temperatura, pureza dos reagentes, condições instrumentais). Também mencionado dentro deste parâmetro está o limite de quantificação, que é a concentração mínima em que a substância a analisar pode não só ser detetada, também pode ser quantificada (ONU, 2010).

1.6.3. Precisão

A precisão mede o grau de acordo entre os resultados analíticos obtidos a partir de uma série de medições repetidas da mesma substância a analisar efetuadas nas condições previstas no método. A precisão reflete erros aleatórios que ocorrem quando um método é utilizado. As condições em que a precisão é

medida são divididas, em geral, em condições repetíveis e em condições reproduzíveis. A repetibilidade das condições existe quando o mesmo analista analisa amostras no mesmo dia e com o mesmo instrumento ou materiais e no mesmo laboratório. Qualquer alteração a estas condições implica que as condições serão reproduzíveis. A precisão é tipicamente medida em termos de coeficiente de variação ou desvio padrão relativo dos resultados analíticos obtidos com padrões de controlo preparados de forma independente. A precisão depende da concentração e deve ser medida em diferentes concentrações dentro do intervalo aceite, geralmente no baixo, médio e alto do intervalo. (ONU, 2010)

1.6.4. Exactitude (viés)

Medição da diferença entre os resultados esperados da análise e o valor de referência aceite, devido a um erro sistemático do método e do laboratório. É geralmente expresso em percentagem. A precisão e a precisão determinam o erro total da análise. A precisão é teoricamente determinada utilizando material de referência certificado (CRF) se possível, métodos de referência, estudos colaborativos ou em comparação com outros métodos. É normal estimar a precisão analisando amostras adicionadas com três concentrações distintas (baixas, médias e altas) que abrangem toda a gama de trabalho. Os critérios para aceitar a precisão devem ser semelhantes aos utilizados para medir a precisão. (ONU, 2010)

1.6.5. Linearidade

Se considera que um método é linear quando existe uma relação diretamente proporcional entre a resposta obtida quando o método é aplicado e a concentração do analito na matriz dentro do intervalo de concentrações a analisar (intervalo de

trabalho). O intervalo de trabalho é definido pelo objetivo do método e pode representar apenas uma parte de toda a linha reta. Os critérios de aceitação geralmente envolvem um teste de "bondade de ajuste". Um coeficiente de alta correlação (r) de 0,99 é frequentemente usado como um critério de linearidade. (ONU, 2010)

1.6.6. Incerteza

A incerteza aumenta a garantia de que os resultados e as conclusões obtidos com os métodos e programas analíticos utilizados permitem cumprir os objetivos fixados. Na metrologia, a incerteza é definida como probabilidade ou nível de confiança. Qualquer medição que façamos implicará um certo grau de incerteza, pelo que o intervalo de incerteza definido será o intervalo dentro do qual o valor real será colocado com um certo grau de confiança. A incerteza das medições geralmente tem muitos componentes. A incerteza é calculada estimando erros em diferentes fases da análise, tais como fase pré-analítica, homogeneização, pesagem, pipetagem, injeção, extração, derivação, recuperação e curvas de calibração. Os dados necessários para validação, por exemplo, precisão e exatidão em condições de repetibilidade/reprodutibilidade, já refletem muitos destes fatores e devem ser utilizados. As razões individuais para a incerteza, que representam menos de 20% da razão mais importante, têm pouco impacto na incerteza global e podem ser omitidas do cálculo. (ONU, 2010)

1.6.7. Estabilidade

Para validar um método, deve ser demonstrado até que ponto as substâncias a analisar permanecem estáveis durante todo o processo de análise, incluindo o seu

armazenamento antes e depois dele. Em geral, a medição é feita comparando padrões recém-preparados com uma concentração conhecida com padrões semelhantes armazenados durante diferentes períodos de tempo e em diferentes condições. A estabilidade é obtida através da análise da amostra após 24 horas de processamento, armazenadas à temperatura ambiente. (ONU, 2010)

1.7. Cromatografia de alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método físico de separação, baseado na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, uma estacionária e outra móvel. Em cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido que flui através de uma coluna contendo a fase estacionária. Então a amostra e a fase móvel é feita para fluir através da coluna por efeito da gravidade (UNAM, 2017).

É um tipo de cromatografia de coluna em que, pela ação de uma bomba, uma mistura de compostos é passada para um sistema solvente vulgarmente conhecido como fase móvel. A fase móvel passa por uma coluna cromatográfica, que contém a fase estacionária a um fluxo especificado. A separação dos compostos ocorre com base na sua interação com a fase móvel e a fase estacionária (Phenomenex, 2019).

É baseado no princípio de interações hidrofóbicas que resultam de as forças repulsivas entre um solvente relativamente polar, um composto relativamente apolar e uma fase estacionária apolar. O efeito hidrofóbico diminui com a adição de solvente apolar à fase móvel (García & Yusá, 2016).

A cromatografia, descrita pela primeira vez em 1906 pelo italiano de origem russa Mikhail Tswett, foi inicialmente utilizada para separar pigmentos vegetais, clorofilas e xantofilas, utilizando um tubo de vidro (vertical) repleto de carbonato de

cálcio em pó (fase estacionária) e utilizando o éter como um eluente (fase móvel). A solução percorreu o tubo e os componentes individuais da mistura migraram para baixo a diferentes velocidades; a coluna foi marcada com faixas horizontais de diferentes cores correspondentes a diferentes pigmentos. O resultado foi chamado cromatograma, justificando o nome dado à técnica: croma, do grego, que significa "cor", e graféia, que significa "escrever"» (Plou & Torres , 2011)

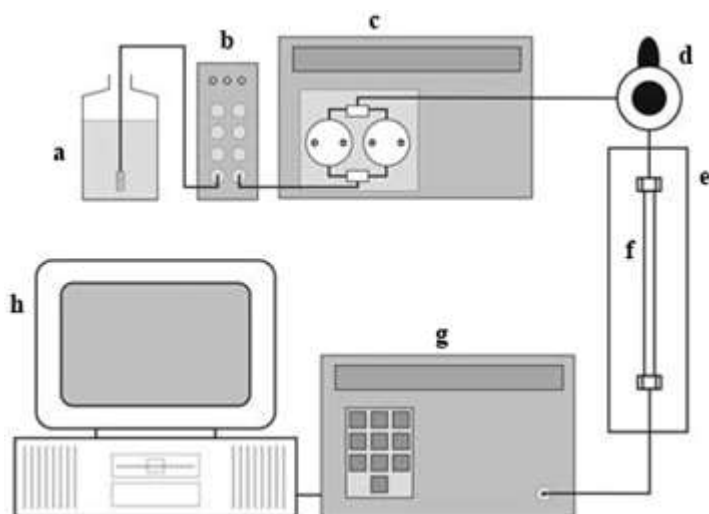


Figura 2. Esquema dos componentes fundamentais de um cromatógrafo de alta eficiência. a) Reservatório da fase móvel; b) Degaseificador; c) Bomba; d) Injetor de amostra; e) Compartimento de colunas termostaticado; f) Coluna de separação; g) Detector; h) Processador de dados. Retirado de Gomis, 2008

2. Objetivos

2.1. Objetivo principal

Validar o método analítico para a quantificação da RUTINA num suplemento alimentar desenvolvido por GINSBERG Equador S.A.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver o processo de validação do método analítico para a quantificação da rotina.

- Avaliar cada uma das características de desempenho analítica para a validação do método.
- Criar provas documentadas de que o método foi validado e está em conformidade com a utilização proposta.

3. Desenvolvimento

3.1. Justificação

O método analítico para avaliação da RUTINA no HEP AFLAX não está resumido nas farmacopéias aplicáveis, portanto, diante da necessidade de um método de quantificação, o método analítico desenvolvido deve ser validado para garantir sua implementação.

3.2. Fundamento

A RUTINA em HEP AFLAX é quantificada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência, o API é extraído com solvente e com auxílio de ultrassom e aquecimento até a completa dissolução. As amostras e o padrão por razão de área são processados por HPLC em um comprimento de onda de 257 nm.

3.3. Aparatos e reagentes

- HPLC Waters Alliance
- Balança analítica Mettler Toledo
- Ultrassom Selecta
- Acetonitrilo grau HPLC. JT BAKER ≥99.9%

- Ácido acético JT.BAKER $\geq 99,7\%$
- Padrão de Rutina
- Amostra de HEPAFLAX (3 lotes)
- Água tipo I (da empresa)

3.4. Especificação de Rutina em HEPAFLAX

10,0 mg/comprimidos

9,0 – 15,0 mg/comprimidos

(intervalo de acetação , valor mínimo y máximo de rutina pelo cada comprimido)

90,0 – 150,0%

(intervalo de acetação em percentagem)

3.5. Condições de operação

COLUNA:	Phenomenex C18 5 μ 3.0 x 250 mm o su equivalente
DETECTOR:	UV-Vis
TIPO DE ELUIÇÃO:	Isocrático
COMPRIMENTO DE ONDA:	257 nm
FLUXO:	1 mL/min.
FASE MÓVEL:	Ácido acético 0.5% y acetonitrilo (70:30)
VOLUME DE INJEÇÃO:	20 μ L
SOLVENTE:	Metanol.
TEMPO DE CORRIDA:	6 minutos

3.6. Preparação do padrão

Pesar 20 mg de RUTINA padrão em um balão volumétrico de 50 mL, adicionar 30 mL de solvente, sonicar por 5 minutos ou até a dissolução completa, agitar mecanicamente por 1 minuto após a dissolução do padrão, aumentar o volume com solvente e depois tomar uma alíquota de 5 mL e transferir para um balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com solvente e homogeneizar.

C_{Pd} (Rutina): 0.080 mg/mL.

3.7. Preparação da amostra

Esmague os comprimidos de HEP AFLAX y pesar 596 mg de pó equivalente a 20 mg de RUTINA em um balão volumétrico de 50 mL, adicionar 30 mL de solvente, ultrassom por 30 minutos, arrefecer a solução à temperatura ambiente, complete com solvente, em seguida, tome uma alíquota de 5 mL e transferir para um balão volumétrico de 25 mL e completar o volumen com solvente y homogeneizar.

C_{Ams} (Rutina): 0.080 mg/mL.

Filtrar a última mistura com um filtro de 0,45 μ m. Injete 20 μ L da amostra e do padrão em um comprimento de onda de 257 nm e imprimir os cromatogramas. Fazer os cálculos necessários.

3.8. Cálculos

$$C_{Pd} = \frac{W_{Pd}}{V_{total}} \times \frac{V_{aliquota}}{V_{total}} \times \frac{\%P_{Pd}}{100} \rightarrow \text{Concentração do padrão}$$

$$C_{Ams} = \frac{W_{Ams}}{V_{total}} \times \frac{V_{aliquota}}{V_{total}} \rightarrow \text{Concentração da amostra}$$

Donde:

- W_{Pd}** = Peso do padrão
- W_{Ams}** = Peso da amostra
- %P_{Pd}** = Potência "asis"

$$\frac{mg}{comp.} RUTINA = \frac{A_{Ams} \times C_{Pd} \times PM}{A_{Pd} \times C_{Ams}} \rightarrow \text{mg de rutina por cada comprimido}$$

Donde:

- A_{Ams}** = Área da amostra
- A_{Pd}** = Área do padrão
- C_{Ams}** = Concentração da amostra
- C_{Pd}** = Concentração do padrão
- PM** = Peso médio

$$\% RUTINA = \frac{mg}{comp.} RUTINA \times \frac{100}{10} \rightarrow \text{Porcentagem de rutina segundo os mg obtidos}$$

3.9. Resultados

- **ESPECIFICIDADE**

Nem o solvente nem a fase móvel têm áreas significativas que interferem com a substância valorizada.

- **LINEARIDADE**

A normalização da curva de calibração é realizada, definindo uma gama de trabalho. Para a regressão linear, foram realizadas cinco soluções de 60%, 80%, 100%, 120% e 140%.

As áreas médias obtidas para a RUTINA com base nas concentrações foram traçadas. Os gráficos das linearidades RUTINA estão representados no Anexo 1, respectivamente, na gama estudada o coeficiente de correlação de 1.0 foi obtido.

O erro de calibração foi 0.00000000002152, para a inclinação 323376.9 e para interceção o intervalo é (0.0000000000278) - (0.00000000000002516), esses dados encontram-se no Anexo 1.

Tabela 2. Preparação das soluções para a linearidade em 5 níveis percentuais.

PERCENTAGEM (%)	RUTINA	
	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	ALÍQUOTA (mL)
140	0.112	7
120	0.096	6
100	0.080	5
80	0.064	4
60	0.048	3

- **EXACTIDÃO**

Foram preparadas 5 soluções a 60%, 100% e 140% adicionando placebo mais substâncias ativas e o procedimento normal de avaliação foi seguido, foram também realizadas 5 soluções padrão; Os resultados são tabulados no Anexo 5 ao Anexo 8 e os resultados são os seguintes:

- %recuperação (60%) 99.19 %
- %recuperação (100%) 99.99 %
- %recuperação (140%) 99.98 %
- %recuperação (MRC) 99,99 %

Tabela 3. Preparação das soluções para a exatidão em 3 níveis percentuais

PERCENTAGEM (%)	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	ALÍQUOTA (mL)
140	0.112	7
100	0.080	5
60	0.048	3

- **PRECISÃO**

Los resultados para la obtención de la precisión se realizaron a través del cálculo del ANOVA de un factor para la obtención de la repetibilidad y reproducibilidad. Se preparó 5 soluciones al 60 %, 100 % y 140 % y del material de referencia.

Tabela 4. Preparação das soluções para a precisão em 3 níveis percentuais

PERCENTAGEM (%)	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	ALÍQUOTA (mL)
140	0.112	7
100	0.080	5
60	0.048	3

- ***Repetibilidade.***

Precisão obtida nas mesmas condições de funcionamento num curto intervalo de tempo (mesmo dia), pelo mesmo analista, na mesma amostra homogênea e no mesmo equipamento.

O desvio padrão da repetibilidade foi calculado, os resultados são tabulados no Anexo 8.

- ***Reprodutibilidade***

Precisão obtida em diferentes condições. Foram comparados lotes versus repetições para o cálculo da reprodutibilidade para o qual foi determinado o desvio de reprodutibilidade padrão (Anexo 9)

Foi igualmente efetuado um ensaio de importância, utilizando o cálculo F de Fisher, no qual foi obtido a partir do F calculado, é inferior ao F tabulado, ou seja, não existem diferenças significativas entre os lotes e as suas repetições.

Os resultados obtidos a cada nível percentual e no MRC são apresentados abaixo:

RUTINA ao 60%

- *Desvio de repetibilidade padrão: 0,001 %*
- *Desvio padrão da reprodutibilidade: 0,001 %*

- *Percentagem de desvio: 0,010 %*

RUTINA ao 100%

- *Desvio de repetibilidade padrão: 0,001 %*
- *Desvio padrão da reprodutibilidade: 0,001 %*
- *Percentagem de desvio: 0,009 %*

RUTINA ao 140%

- *Desvio de repetibilidade padrão: 0,001 %*
- *Desvio padrão da reprodutibilidade: 0,001 %*
- *Percentagem de desvio: 0,006 %*

MRC

- *Desvio de repetibilidade padrão: 0,001 %*
- *Desvio padrão da reprodutibilidade: 0,001 %*
- *Percentagem de desvio: 0,008 %*

A reprodutibilidade foi efetuada entre analistas(anexo 9),os resultados obtidos são apresentados abaixo:

RUTINA a 60%

- *Desvio padrão relativo 0,011 %*

100% RUTINA

- *Desvio relativo da norma: 0,009 %*

RUTINA a 140%

- *Desvio padrão relativo: 0,033 %*

LIMITE DE DETEÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOC)

Foram analisadas três soluções para cada uma das seguintes percentagens: 10%, 20%, 30% e 40%.

Foi efetuada uma curva de calibração entre a concentração da substância ativa vs áreas (Figura 2). A equação da linha foi determinada e as respostas de concentração (Ybl) foram extrapoladas, o desvio-padrão do alvo também foi determinado, para os cálculos foram utilizadas as seguintes fórmulas.

$$\text{Limite de quantificação} \dots\dots\dots \frac{Y_{bl}+10S_{bl}}{b}$$

$$\text{Limite de detecção} \dots\dots\dots \frac{Y_{bl}+3S_{bl}}{b}$$

Os resultados obtidos encontram-se no Anexo 10 e são os seguintes:

Coeficiente de correlação: 1

Limite de detecção: 0.000000884623 g/mL

Limite de quantificação: 0.0000254464 g/mL

Tabela 5. Preparação das soluções para o limite de detecção e quantificação em 4 níveis percentuais

PERCENTAGEM (%)	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	ALÍQUOTA (mL)
40	0.032	2.0
30	0.024	1.5
20	0.016	1.0
10	0.008	0.5

• **ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS**

Foram analisadas cinco soluções de amostra lidas após 24 horas de armazenamento à temperatura ambiente dos três lotes (Anexo 12 - Anexo 15), os resultados médios são apresentados abaixo:

Desvio padrão: 0,218 %

% de recuperação: 100,64 %

- **Incerteza**

Para o cálculo da Incerteza, foram determinadas as fontes de incerteza (Figura 3), que eram as incertezas da Curva de Calibração, material de referência certificado, veracidade e precisão, o mesmo q foi utilizado para o cálculo da Incerteza Global, a partir da seguinte fórmula:

$$U_{por\ nivel} = 2 * \sqrt{u_{patrón}^2 + u_{Ci}^2 + u_{SR}^2 + uv^2}$$

Obtenção dos seguintes resultados:

RUTINA a 60%

% Incerteza Total : 0,14 %

100% RUTINA

% Incerteza Total : 0,08 %

RUTINA a 140%

% Incerteza Total : 0,06 %

ESPECIFICIDADE DO MÉTODO

Foi trabalhada uma solução placebo preparada em condições iguais à da amostra, não havendo áreas significativas que interferissem com a substância ativa valorizada RUTINA.

O solvente não tem áreas significativas que interfiram com as substâncias valorizadas

Robustez:

Capacidade do método analítico de não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de procedimento indicados no protocolo.

A robustez é medida através da alteração da temperatura das amostras e da coluna, a execução é feita a partir do padrão e da amostra para 100%.

Temperatura com a qual foi trabalhada a validação:

Amostras: 25°C

Coluna: 35°C

Temperatura com que foi trabalhado trabalho para demonstrar a robustez da metodologia:

Amostras: 20°C

Coluna: 30°C

3.10. Conclusões

Estabeleceu-se que o método analítico para avaliação da RUTINA, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta precisão, atende aos parâmetros especificados, visto que o coeficiente de correlação da regressão linear é 1,00, o desvio padrão relativo analisado é $\leq 2,0$, portanto Conclui-se que o método é específico, linear, exato, preciso, robusto e estável, resultado que foi verificado com o teste de Fisher, obtendo que nosso F calculado é menor que o F tabulado, ou seja, não há diferenças significativas entre os dados obtidos para os 3 lotes analisados. A estabilidade após 24 horas manteve um percentual de recuperação entre (90% - 150%), portanto, atende aos requisitos e critérios de aceitação, sendo considerada validada, podendo ser utilizada no processo de controle de qualidade e estudos de estabilidade de este ingrediente ativo.

Bibliografía

- Al-Dhabi, N., Arasu, M., Park, C., Park, S. (2015). An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. EXCLI, <http://dx.doi.org/10.17179/excli2014-663>.
- Barnoiu, O. S., Sequeira-García del Moral, J., Sanchez-Martínez, N., Díaz-Molina, P., Flores-Sirvent, L., & Baena-González, V. (2015). Valor preventivo adyuvante del arándano rojo americano (proantocianidinas 120mg) en las infecciones del tracto urinario tras la colocación de catéter ureteral. *Actas Urológicas Españolas*, 39(2), 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2014.07.003>
- Baviera, M. T. (1993). Mecanismo de acción de flavonoides antiinflamatorios a nivel de función leucocitaria. Recuperado el 6 de 6 de 2020, de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=227040>
- Catalá, R. y Gavara, R. (2002) Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos. España. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 346 p
- Chiodo, S. G., Leopoldini, M., Russo, N. y Toscano, M. (2010). The inactivation of lipid peroxide radical by quercetin. A Theoretical Insight. *Physical Chemistry*. 12:7662-7670. (Matsumoto et al., 2002)
- Edeas, M. (2007). Citroflavonoïdes. *Phytothérapie*, 5(4), 210-211. <https://doi.org/10.1007/s10298-007-0254-2>
- Escamilla, C., Cuevas, E., & Guevara, J. (2003). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. Facultad de Medicina. UNAM, 73.
- Estrada Reyes, R., Ubaldo Suárez, D., & Araujo Escalona, A. G. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental*, 375-384.
- Frankel, E. N. y Meyer, A. S. (2000). The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:1925-1941.
- García, A. Yusá, D. (2016). HPLC Instrumental. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. ISBN 8490483574, 9788490483572.

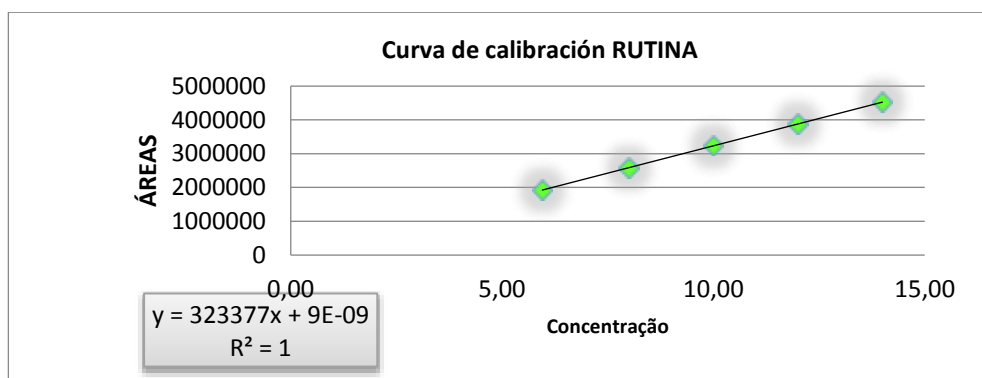
- Gomis, V. (2008). Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial.
- Grotewold, E. (2006). The science of flavonoids. New York: Springer.
- Guo, R. y Wei, P. (2008). Studies on the antioxidant effect of rutin in the microenvironment of cationic micelles. *Microchimica Acta*. 161:233-239
- Heejung, K., Hyesik, K., Youngwook, Y., Youngmi, K., Mi Jung, L., Len, N., & Yunjin, J. (2005). Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease. PubMed.
- Komen, S., 2020. *Quercetin*. [online] Ww5.komen.org. Available at: <<https://ww5.komen.org/Espanol/Quercetin.html>> [Accessed 7 June 2020].
- Kraujalis, P., Venskutonis, P. R., Ibáñez, E., & Herrero, M. (2014). Optimisation of rutin isolation from different anatomical parts of *Amaranthus paniculatus* using accelerated extraction with green solvents. Recuperado el 7 de 6 de 2020, de <https://digital.csic.es/handle/10261/109786>.
- López, M. T. (2002). Flavonoides. Elsevier, 108-113.
- Machado D, Bettio L, Cunha M, Santos A et al. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *Eur J Pharmacol* 2008;587:163-168
- Madruga, D. (2012). Validación de métodos analíticos. Implementación al análisis rutinario. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 12. 882-888.
- Mendoza-Rodríguez, M. N., Castillo-Guevara, C., Díaz-Godínez, R., Nieto-Camacho, A., & Méndez-Iturbide, D. (2017). Antocianinas como colorantes alimentarios. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(1), 101-113. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.101>
- ONU. (2010). Directrices para la validación de métodos analíticos. New York: UNODC. Obtenido de Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. (2019). "Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para

- Ortiz S., J., Chungara, M., Ibieta, G., Alejo, I., Tejeda, L., Peralta, C., Aliaga-Rossel, E., Mollinedo, P., & Peñarrieta, J. M. (2019). DETERMINACIÓN DE TEOBROMINA, CATEQUINA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL Y CONTENIDO FENÓLICO TOTAL EN MUESTRAS REPRESENTATIVAS DE CACAO AMAZÓNICO BOLIVIANO Y SU COMPARACIÓN ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN. *Revista Boliviana de Química*, 1(36.1), 2-3. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.36.1.4>
- P. (2020). *Kaempferol*. PubChem.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Kaempferol>
- Phenomenex. (2019). ¿Qué es el HPLC y cómo funciona? Obtenido de <https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/?pdf=8140>
- Plou, F., & Torres, P. (2011). Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (CSIC).
- Salinas-Moreno, Y., Almaguer-Vargas, G., Peña-Varela, G., & Ríos-Sánchez, R. (2009). ÁCIDO ELÁGICO Y PERFIL DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS DE FRAMBUESA (*Rubus idaeus* L.) CON DIFERENTE GRADO DE MADURACIÓN. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(1), 97-101. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2009.15.013>
- Silva, L. F., Jordan-Sinisterra, M., & Lanças, F. M. (2019). Métodos analíticos para determinação de isoflavonas em matrizes complexas. *Scientia Chromatographica*, 10(4), 1-3. <https://doi.org/10.5935/sc.2019.001>
- Universidad Autónoma de México UNAM. (2017). Técnicas cromatográficas. p.47
- USP 31 –NF 26, Capítulo General Validación de métodos farmacopéicos
- WHO. (2002). Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico Anexo 3 informe 36.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Anexos

ANEXO 1: Curva de calibración de RUTINA



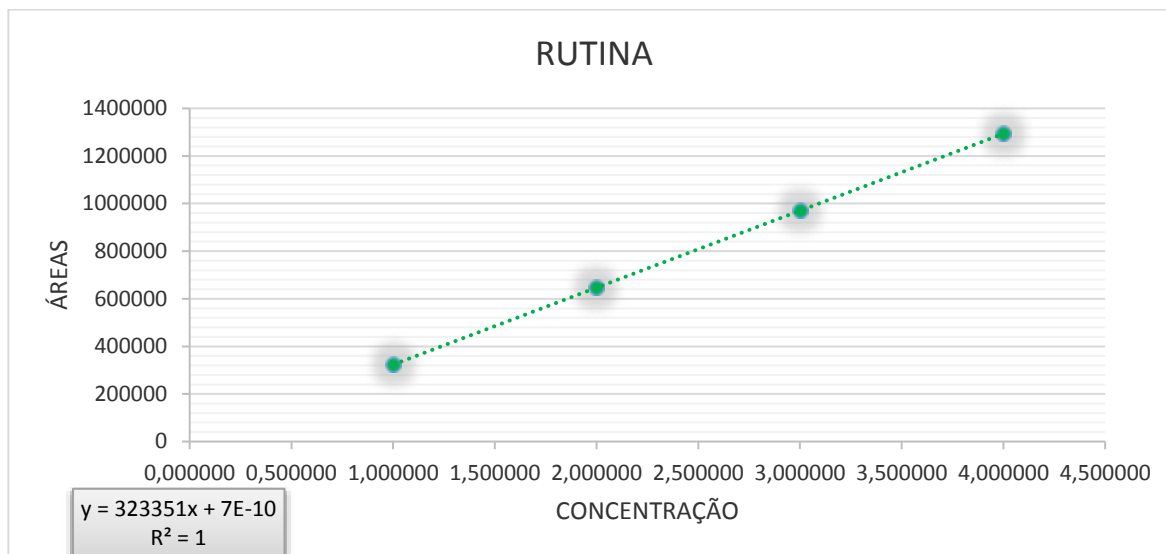
Datos de la curva de calibración

No. deter.	x mg/comp	y _i ÁREAS
1	0	0
2	5,951	1924567
3	7,998	2586498
4	9,999	3233479
5	12,000	3880546
6	13,997	4526341

b;a	323376,9	1,39698E-09
S _b ; S _a	3,38659E-11	3,517E-10
r ² ; S _y	1,0000	2,152E-10
gl _{res}	9,11785E+31	3
t(gl 0,05)		3,18
r	1,0000	

b mín.	b máx.
323376,9000	323376,9000
a mín.	a máx.
2,78E-10	2,516E-9

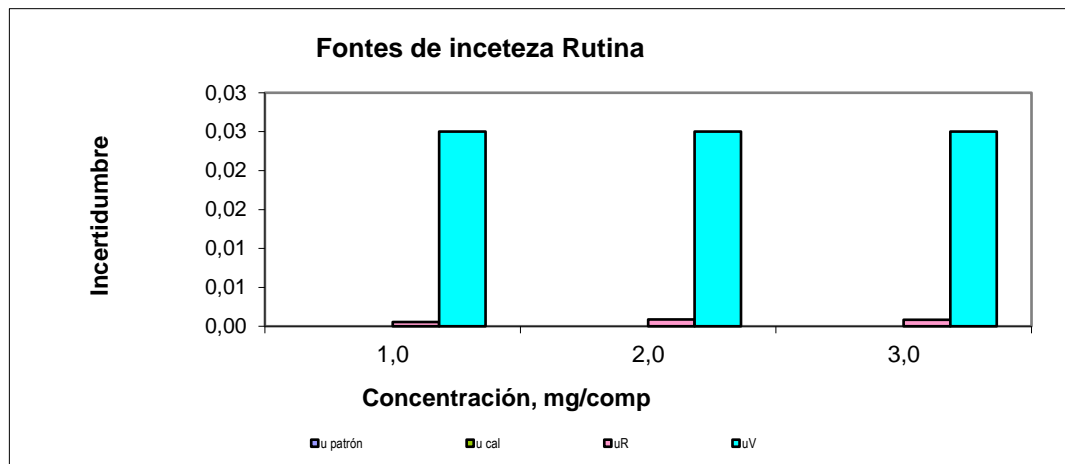
ANEXO 2: Curva de calibração para o limite de Detecção y Cuantificación



Datos de la curva de calibração

No. deter.	x	y _i
N	mg/comp	ÁREAS
1	1,001820	323939
2	1,999040	646391
3	3,001185	970436
4	4,001612	1293924
b;a	323350,8	2,32831E-10
S_b; S_a	6,63568E-11	1,82E-10
r²; S_y	1,0000	1,48E-10
gl_{res}	2,37452E+31	2
t(gl 0,05)		4,30

ANEXO 3: Fuentes de incerteza RUTINA



%	U	%
60	0,05	0,14
100	0,05	0,08
140	0,05	0,06

ANEXO 4: Resúmen da curva de calibração dos três lotes

PARÁMETROS / LOTES	Coeficiente de correlação r	Coeficiente de determinação r ²	Pendiente b	Pendiente mínima b _{mín}	Pendiente máxima b _{máx}	Interceção a	Interceção mínima a _{mín}	Interceção máxima a _{máx}	Erro de calibração Sy	Incerteza de calibração u _{ci}
LOTE 14346	1,00000	1,00000	323376,900	323.376,900	323376,900	1,40E-9	2,8E-10	2,516E-9	2,15185E-10	8,43E-16
LOTE 14347	1,00000	1,00000	323376,900	323376,900	323376,900	1,40E-9	2,8E-10	2,516E-9	2,15185E-10	8,42E-16
LOTE 14349	1,00000	1,00000	323376,900	323376,900	323376,900	1,40E-9	2,8E-10	2,516E-9	2,15185E-10	8,42E-16
MÉDIA			323376,9000			1,40E-9				

ANEXO 5: Avaliação estatística da precisão do método analítico RUTINA em três níveis percentuais do MRC do lote 14346 (60%, 100% y 140%).

No. Determ.	x mg/comp	y área	y - Blanco	x estim.	% Rec.	Média X estim.	% Rec. Média
1	6,00	1924389	1924389,0000	5,95	99,18	5,95	99,19
2	6,00	1924697	1924697,0000	5,95	99,20		
3	6,00	1924856	1924856,0000	5,95	99,21		
4	6,00	1924566	1924566,0000	5,95	99,19		
5	6,00	1924329	1924329,0000	5,95	99,18		
6	10,00	3233703	3233703,0000	10,00	100,00	10,00	99,99
7	10,00	3233150	3233150,0000	10,00	99,98		
8	10,00	3233869	3233869,0000	10,00	100,00		
9	10,00	3233117	3233117,0000	10,00	99,98		
10	10,00	3233558	3233558,0000	10,00	99,99		
11	14,00	4526024	4526024,0000	13,996	99,97	14,00	99,98
12	14,00	4526307	4526307,0000	13,997	99,98		
13	14,00	4526339	4526339,0000	13,997	99,98		
14	14,00	4526932	4526932,0000	13,999	99,99		
15	14,00	4526105	4526105,0000	13,996	99,97		

MRC

1	10,00	3233849	3233849,0000	10,00	100,00	10,00	100,00
2	10,00	3233879	3233879,0000	10,00	100,00		
3	10,00	3233698	3233698,0000	10,00	100,00		
4	10,00	3233456	3233456,0000	10,00	99,99		
5	10,00	3233966	3233966,0000	10,00	100,01		

ANEXO 6: Avaliação estatística da precisão do método analítico RUTINA em três níveis percentuais do MRC do lote 14347 (60%, 100% y 140%).

No. Determ.	x mg/comp	y área	y - Blanco	x estim.	% Rec.	média X estim.	% Rec. média
1	6,000	1924634	1924634,000	5,95	99,19	5,95	99,20
2	6,000	1924796	1924796,000	5,95	99,20		
3	6,000	1924544	1924544,000	5,95	99,19		
4	6,000	1924879	1924879,000	5,95	99,21		
5	6,000	1924568	1924568,000	5,95	99,19		
6	10,000	3233124	3233124,000	10,00	99,98	10,00	99,99
7	10,000	3233679	3233679,000	10,00	100,00		
8	10,000	3233641	3233641,000	10,00	100,00		
9	10,000	3233449	3233449,000	10,00	99,99		
10	10,000	3233132	3233132,000	10,00	99,98		
11	14,000	4526387	4526387,000	13,997	99,98	14,00	99,98
12	14,000	4526385	4526385,000	13,997	99,98		
13	14,000	4526357	4526357,000	13,997	99,98		
14	14,000	4526358	4526358,000	13,997	99,98		
15	14,000	4526147	4526147,000	13,997	99,98		

MRC

1	10,00	3233158	3233158,000	10,00	99,98	10,00	99,99
2	10,00	3233164	3233164,000	10,00	99,98		
3	10,00	3233672	3233672,000	10,00	100,00		
4	10,00	3233960	3233960,000	10,00	100,01		
5	10,00	3233741	3233741,000	10,00	100,00		

ANEXO 7: Avaliação estatística da precisão do método analítico RUTINA em três níveis percentuais do MRC do lote 14349 (60%, 100% y 140%).

No. Determ.	x mg/comp	y Áreas	y - Blanco	x estim.	% Rec.	Média X estim.	% Rec. Média
1	6,0000	1924598	1924598,000	5,952	99,19	5,951	99,19
2	6,0000	1924566	1924566,000	5,951	99,19		
3	6,0000	1924368	1924368,000	5,951	99,18		
4	6,0000	1924574	1924574,000	5,951	99,19		
5	6,0000	1924302	1924302,000	5,951	99,18		
6	10,0000	3233089	3233089,000	9,998	99,98	9,998	99,98
7	10,0000	3233531	3233531,000	9,999	99,99		
8	10,0000	3233124	3233124,000	9,998	99,98		
9	10,0000	3233547	3233547,000	9,999	99,99		
10	10,0000	3233002	3233002,000	9,998	99,98		
11	14,0000	4526301	4526301,000	13,997	99,98	13,997	99,98
12	14,0000	4526128	4526128,000	13,996	99,97		
13	14,0000	4526003	4526003,000	13,996	99,97		
14	14,0000	4526964	4526964,000	13,999	99,99		
15	14,0000	4526302	4526302,000	13,997	99,98		

MRC

1	10	3233661	3233661,000	10,000	100,00	10,00	99,99
2	10	3233614	3233614,000	10,000	100,00		
3	10	3233610	3233610,000	10,000	100,00		
4	10	3233541	3233541,000	9,999	99,99		
5	10	3233116	3233116,000	9,998	99,98		

ANEXO 8: Resumo da avaliação estatística da exatidão do método analítico para o RUTINA a três níveis percentuais e do MRC nos 3 lotes (60%, 100% y 140%).

mg/comp	14346	14347	14349
6,000	99,2	99,2	99,2
10,000	100,0	100,0	100,0
14,000	100,0	100,0	100,0
10,000	100,0	100,0	100,0

	14346	14347	14349
Desvío	0,00	0,00	0,00
u	0,025	0,025	0,025
Desvío mín	-0,051	-0,051	-0,050
desvio max	0,049	0,049	0,050
Desvío relativo	-0,01	-0,01	0,00

% de Recuperação				
60,0	99,2	99,2	99,2	99,19
100,0	100,0	100,0	100,0	99,99
140,0	100,0	100,0	100,0	99,98
MRC	100,0	100,0	100,0	99,99

ANEXO 9: Avaliação estatística da precisão (Lotes vs. Repetições) calculando a ANOVA para avaliação de RUTINA.

x estimadas		
14346	14347	14349
mg/comp	mg/comp	mg/comp
5,9516	5,9517	5,9509
5,9515	5,9522	5,9519
5,9509	5,9514	5,9524
5,9515	5,9524	5,9515
5,9506	5,9515	5,9507
9,9979	9,9980	9,9998
9,9993	9,9997	9,9981
9,9980	9,9996	10,0003
9,9993	9,9990	9,9980
9,9976	9,9980	9,9993
13,9970	13,9972	13,9961
13,9964	13,9972	13,9970
13,9961	13,9972	13,9971
13,9990	13,9972	13,9989
13,9970	13,9965	13,9964
9,9997	9,9981	10,0002
9,9995	9,9981	10,0003
9,9995	9,9997	9,9998
9,9993	10,0006	9,9990
9,9980	9,9999	10,0006

Media del grupo	DCM _w Varianza de repetib.	DCM _b Varianza de Reprod.	VL Varianza interlab	Valores (-) se consideran 0	VR Varianza de Reprod.Total	SRT _{total}	%SRD	Sr
5,9515	0,0000003	0,00000049	0,000000432	0,000000432333	0,0000003215	0,001	0,010	0,001
9,9988	0,0000008	0,00000060	-0,000000393	0,000000000000	0,0000008002	0,001	0,009	0,001
13,9971	0,0000009	0,00000000	-0,0000001745	-0,000000174504	0,0000007010	0,001	0,006	0,001
9,9995	0,0000007	0,00000097	0,0000000545	0,000000000000	0,0000007026	0,001	0,008	0,001
						SR: Fuente de u por Reprod.		

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9,88956E-07	2	4,94478E-07	1,776707024	0,210927437	3,885293835
Dentro de los grupos	3,33974E-06	12	2,78312E-07			
Total	4,32869E-06	14				

ANEXO 10. Avaliação estatística da reprodutibilidade entre analistas do método analítico para o RUTINA a três níveis percentuais (60%, 100%, 140%).

PERCENTAGE M %	ÁREAS						MÉDIA ANALISTA A	MÉDIA ANALISTA B
	PRECISÃO DÍA 1		PRECISÃO DÍA 2		PRECISÃO DÍA 3			
	ANALISTA A	ANALISTA B	ANALISTA A	ANALISTA B	ANALISTA A	ANALISTA B		
60	1924389	1924785	1924634	1924489	1924598	1924547	1924578	1924468
60	1924697	1924563	1924796	1924578	1924566	1924610		
60	1924856	1924551	1924544	1924789	1924368	1924103		
60	1924566	1924112	1924879	1924124	1924574	1924753		
60	1924329	1924555	1924568	1924258	1924302	1924201		
100	3233703	3233666	3233124	3233546	3233089	3233120	3233381	3233419
100	3233150	3233563	3233679	3233910	3233531	3233485		
100	3233869	3233997	3233641	3233009	3233124	3233115		
100	3233117	3233674	3233449	3233512	3233547	3233473		
100	3233558	3233128	3233132	3233005	3233002	3233084		
140	4526024	4526321	4526387	4526993	4526301	4530224	4526336	4527784
140	4526307	4526338	4526385	4526386	4526128	4530125		
140	4526339	4526935	4526357	4526007	4526003	4530032		
140	4526932	4526789	4526358	4526942	4526964	4530879		
140	4526105	4526387	4526147	4526386	4526302	4530022		

PERCENTAGEM	CONCENTRAÇÃO	MÉDIA ÁREA		MÉDIA TOTAL	%RSD
		ANALISTA A	ANALISTA B		
60	6	59,52	59,51	59,52	0,011
100	10	99,99	99,99	99,99	0,009
140	14	139,98	140,02	140,00	0,033

ANEXO 11. Avaliação do Limite de Detecção (LOD) e Limite de Quantificação (LOC) de RUTINA.

No. Determ.	x mg/comp	ÁREAS		
		y, ÁREAS	média Blanco, B	Desv. St. Blanco, B
1	0,0000	0,00000	0,0560	0,0767
2	0,0000	0,00000		
3	0,0000	0,00000		
4	0,0000	0,14000		
5	0,0000	0,14000		

Limite de detecção			
Fórmula	ÁREA	Fórmula	Conc.
$y = \bar{y}B + 3SB$	0,286	$x = \frac{(y-a)}{b}$	0,000000884623
$y=a+3S_y$	0,000	$x = \frac{(y-a)}{b}$	0,000000000000
	$LD = \bar{X}_B + 3S_B$		8,84623E-7

Limite de quantificación			
Fórmula	ÁREAS	Fórmula	Conc.
$y = \bar{y}B + 10SB$	0,823	$x = \frac{(y-a)}{b}$	0,000002544641
$y=a+tS_y$	0,00000	$x = \frac{(y-a)}{b}$	0,000000000000
	$LC = \bar{X}_B + 10S_B$		2,54464E-6

ANEXO 12: Avaliação estatística da estabilidade das soluções analíticas para o RUTINA do lote 14346 após 24 horas de armazenamento

No. Determ.	x mg/comp	y Áreas	y - Blanco	x estim.	% Rec.	Média X estim.	% Rec. Média
1	10,00	3216774,000	3216774,000	9,95	99,47	10,04	100,44
2	10,00	3221415,000	3221415,000	9,96	99,62		
3	10,00	3252242,000	3252242,000	10,06	100,57		
4	10,00	3281587,000	3281587,000	10,15	101,48		
5	10,00	3267242,000	3267242,000	10,10	101,04		

ANEXO 13: Avaliação estatística da estabilidade das soluções analíticas para o RUTINA do lote 14347 após 24 horas de armazenamento.

No. Determ.	x mg/comp	y Áreas	y - Blanco	x estim.	% Rec.	Média X estim.	% Rec. Médio
1	10,00	3225804,000	3225804,000	9,98	99,75	10,06	100,61
2	10,00	3258176,000	3258176,000	10,08	100,75		
3	10,00	3298206,000	3298206,000	10,20	101,99		
4	10,00	3265723,000	3265723,000	10,10	100,99		
5	10,00	3220158,000	3220158,000	9,96	99,58		

ANEXO 14: Avaliação estatística da estabilidade das soluções analíticas para o RUTINA do lote 14349 após 24 horas de armazenamento.

No. Determ.	x mg/comp	y Áreas.	y - Blanco	x estim.	% Rec.	Média X estim.	% Rec. Médio
1	10,00	3276140,000	3276140,000	10,13	101,31	10,09	100,9
2	10,00	3250844,000	3250844,000	10,05	100,53		
3	10,00	3274887,000	3274887,000	10,13	101,27		
4	10,00	3229931,000	3229931,000	9,99	99,88		
5	10,00	3277911,000	3277911,000	10,14	101,37		

ANEXO 15: Resumo da Avaliação Estatística da estabilidade das soluções analíticas para a RUTINA de 3 lotes após 24 horas de armazenamento.

LOTE 14346		LOTE 14347		LOTE 14349	
mg/comp	% R	mg/ comp	% R	mg/ comp	% R
10,09	100,87	10,06	100,61	10,04	100,44

<i>Média mg/ comp</i>	10,06
<i>Média %R</i>	100,64
<i>Desviação padrão relativa</i>	0,218

ANEXO 16: Resumo dos parâmetros estatísticos na validação da rotina.

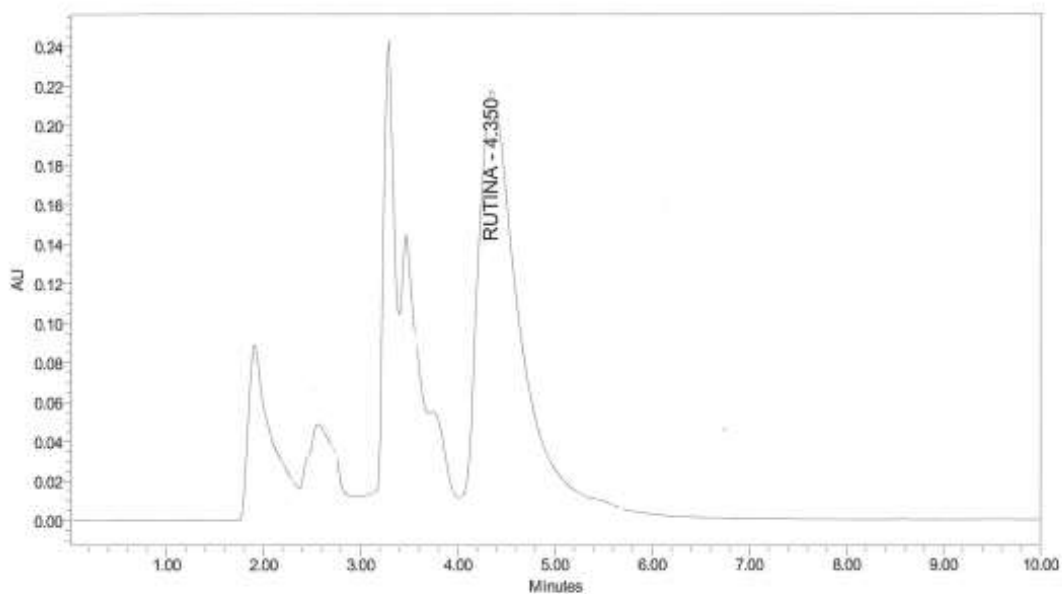
PARÂMETRO Validação	Medida	CRITÉRIO DE Aceitação	Valor Obtido
Linearidade método	R	≥ 0.999	1.00
	Erro de calibração (S_e)	$\leq 2.0\%$	0,000000000002152
	Inclinação(b)	N/A	323376,9
	Intervalo de interceção	N/A	(0,0000000000278) - (0,00000000002516))
Exatidão	% Recuperação (60%)	90-150%	99,19%
	% Recuperação (100%)	90-150%	99,99%
	% Recuperação (140%)	90-150%	99,98%
	% Recuperação (140%)	90-150%	99,99%
	% Recuperação (MRC)	N/A	(0,05)-(-0,05))
Precisão	Desviação max e min		
	(60%)		
	O Sr.	N/A	0,001 %
	O Sr.	N/A	0,001 %
	%SRD	$\leq 2.0\%$	0,010 %
	(100%)		
	O Sr.	N/A	0,001 %
	O Sr.	N/A	0,001 %
	%SRD	$\leq 2.0\%$	0,009 %
	(140%)		
	O Sr.	N/A	0,001 %
	O Sr.	N/A	0,001 %
	%SRD	$\leq 2.0\%$	0,006 %
	Mrc	N/A	
	O Sr.	N/A	0,001 %
O Sr.		0,001 %	
%SRD		0,008 %	
Reprodutibilidade entre analistas	60%		
	%SRD	$\leq 2.0\%$	0,0111 %
	100%		
	%SRD	$\leq 2.0\%$	0,009 %
	140%		
	%SRD	$\leq 2.0\%$	0,033 %

Limite de detecção	Ld	N/A	0.0000000884623 g/mL
Limite de quantificação	Lc	N/A	0.00000254464 µg/mL g
Estabilidade	% de recuperação %RSD	90.0 -150.0%.0% ≤ 2.0%	100,64 % 0,218 %
Incerteza	60% %U		0,14%
	100% %U	N/A	0,08 %
	140% %U		0,06%
Especificidade	N/A	Sim/Não	Sim
Robustez	N/A	Sim/Não	Sim

ANEXO 17: Cromatograma da rotina na amostra HEPAFLAX



RUTINA REPORTE



Sample Name MST RUTINA >C; Vial 2; Injection 1; Channel 2487Channel 1; Date Acquired 06-Feb-20 9:55:31 AM ECT

**ESPECIFICIDAD
MUESTRA 100%
Name: RUTINA**

Name	RT	Area	Units	Name
1 RUTINA	4.350	3246286		RUTINA

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Glossário

MRC: Material de Referência Certificado

Pd: Padrão

Ams: Amostra

HPLC: High Performance Liquid Chromatographic

USP: United States Pharmacopoeia