



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAROLINA PÔRTO CALDAS

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA
DETERMINAÇÃO DE TEOR E SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS DE ÁCIDO
ASCÓRBICO EM VITAMINA C 500 MG POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

Recife

2023

Carolina Pôrto Caldas

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA
DETERMINAÇÃO DE TEOR E SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS DE ÁCIDO
ASCÓRBICO EM VITAMINA C 500 MG POR CROMATOGRRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para a conclusão da
Graduação em Farmácia, do Centro de
Ciências da Saúde, da Universidade Federal
de Pernambuco.

Orientador: Luiz Alberto Soares

Coorientador: Bruno Aires dos Santos

Recife

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Caldas, Carolina Pôrto.

Validação de método indicativo de estabilidade para determinação de teor e substâncias relacionadas de ácido ascórbico em vitamina C 500mg por cromatografia líquida de alta eficiência / Carolina Pôrto Caldas. - Recife, 2023.
45, tab.

Orientador(a): Luiz Alberto Lira Soares

Cooorientador(a): Bruno Aires dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Validação analítica. 3. Vitamina C. 4. Controle de qualidade.

5. HPLC. 6. Ácido ascórbico. I. Soares, Luiz Alberto Lira. (Orientação). II. Santos, Bruno Aires dos. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CURSO DE
BACHARELADO EM FARMÁCIA**



Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIZ ALBERTO LIRA SOARES
Data: 11/05/2023 10:06:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. Luiz Alberto Lira
Soares (Presidente e
Orientador) Universidade
Federal de Pernambuco**

Documento assinado digitalmente
gov.br MAGDA RHAYANNY ASSUNCAO FERREIRA
Data: 11/05/2023 09:58:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. Magda Rhayanny Assunção Ferreira
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco**

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCAS OLIVEIRA DA SILVA
Data: 11/05/2023 10:08:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Lucas Oliveira da Silva
(Examinador)
Hospital da Restauração Governador Paulo Guerra**

Documento assinado digitalmente
gov.br BRUNA MARIA TAVARES DE MELO
Data: 13/05/2023 13:22:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Bruna Maria Tavares de
Melo (Suplente)
Laboratório Farmacêutico do Estado de
Pernambuco**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por todas as bênçãos concedidas na minha caminhada até aqui. Por toda a força que me deu durante esses cinco anos de luta, Por ter me ajudado a não desistir em momentos de insegurança, por ter me ensinado a ir mesmo com medo e supera-lo.

Agradeço aos meus pais, Kellyane e André, por todo o sacrifício realizado em prol da minha educação, todo apoio e torcida que tiveram desde a realização da prova do ENEM, além de sempre me confortarem nos momentos mais complicados da graduação. Agradeço também a minha irmã Jéssica, pelo apoio, companheirismo e paciência para me escutar falar muito sobre as disciplinas cursadas. Agradeço a minha tia Ângela por me apoiar desde a realização da prova do vestibular, fazendo meu “kit enem” e toda a confiança colocada em mim, quando me faltava. Agradeço também a minha tia Roza, por ter sido essencial no meu caminho até aqui.

Agradeço aos amigos que fiz durante o curso, em especial a Suzana, Stella, Lucas e Erika, por todo o companheirismo nos momentos bons e ruins, risadas, conselhos e ensinamentos compartilhados durante esses anos. Digo com toda a certeza que não conseguiria finalizar a graduação sem ter vocês comigo. Agradeço a minha amiga de longa data, Stephanie, que estava comigo desde a preparação, no cursinho pré-vestibular, até a aprovação e continuou me dando força e apoio durante os anos de graduação.

Agradeço ao LAFEPE pela oportunidade de estágio que foi uma experiência divisora de águas para a minha formação. Agradeço aos farmacêuticos Bruno Aires, Déborah Bezerra e Aíla Santana por toda a orientação concedida. Agradeço a Ivo, João, Cecília e Jadon por todos os ensinamentos, experiências trocadas, conselhos e amizade durante a realização do estágio. Agradeço também a João victor, Laryssa, Bruna, Rafaela e Matheus, que realizaram o estágio comigo, pelo companheirismo, troca de conhecimentos e amizade.

Por fim, agradeço a todos que passaram na minha vida durante a minha formação, e auxiliaram de qualquer forma, direta ou indiretamente na conclusão deste ciclo tão importante da minha vida.

“Sempre acredite em si mesmo. Faça isso e não importa onde você esteja, não terá nada a temer. ”

(Banon- O reino dos gatos, Estúdios Ghibli)

RESUMO

O ácido ascórbico, é uma substância detentora de várias funções essenciais para o organismo humano, como a otimização do sistema imunológico, inativação de espécies reativas de oxigênio, participação na produção do colágeno entre outras. Para a produção de tal suplemento em uma indústria farmacêutica, é necessário a realização do controle de qualidade. Com isso, a validação de método analítico convém para comprovar que os testes aplicados atendam aos requisitos para a sua utilização na rotina laboratorial. Este trabalho teve como objetivo a realização da validação total de um método de doseamento do comprimido de vitamina C 500 mg por CLAE, a fim de garantir que sua utilização no LAFEPE será adequada. Os parâmetros avaliados foram: Seletividade, Linearidade, Exatidão, Precisão e Robustez e os resultados obtidos para os mesmos, estão dentro dos requisitos especificados. Portanto, segundo a ICH Q2 (R1), a metodologia apresentada demonstrou ser seletiva, exata, precisa, linear e robusta.

Palavras-chave: Vitamina C, ácido ascórbico, validação analítica, controle de qualidade, CLAE.

ABSTRACT

Ascorbic acid is a substance that has several essential functions for the human body, such as the optimization of the immune system, inactivation of reactive oxygen species, participation in the production of collagen, among others. For the production of such a supplement in a pharmaceutical industry, quality control is required. Thus, the validation of the analytical methods is adequate to prove that the application of these tests meet the requirements for its use in the laboratory routine. The aim of this work was to perform the complete validation of a dosage method of the 500 mg vitamin C tablet by HPLC, in order to ensure that its use in LAFEPE is appropriate. The evaluated parameters were: Selectivity, Linearity, Accuracy, Precision and Robustness, and the results obtained are within the specified requirements. Therefore, according to ICH Q2 (R1), the presented methodology proved to be selective, accurate, precise, linear and robust.

Keywords: Vitamin C, ascorbic acid, analytical validation, quality control, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Oxidação do ácido ascórbico em ácido dehidroascórbico	13
Figura 2- Componentes essenciais do sistema de CLAE.....	16
Figura 3- Cromatograma da solução padrão ácido ascórbico.....	28
Figura 4- Cromatograma da solução amostra	28
Figura 5- Cromatograma da solução padrão misto	28
Figura 6- Cromatograma do diluente	29
Figura 7- Cromatograma da solução placebo.....	30
Figura 8- Gráficos da linearidade para as curvas 1,2 e 3.....	30
Figura 9- Gráfico do valor médio obtido da linearidade.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas.....	21
Tabela 2 - Procedimento da Linearidade.....	24
Tabela 3 - Critérios de aceitação da Precisão.....	25
Tabela 4 - Procedimento da exatidão	26
Tabela 5 - Critérios de aceitação da exatidão	27
Tabela 6 - Resultado da linearidade.....	31
Tabela 7 - Resultado da ANOVA.....	32
Tabela 8 - Resultados da repetibilidade.....	33
Tabela 9 - Resultados da precisão intermediária	34
Tabela 10 - Resultado da exatidão (Teor)	36
Tabela 11 - Resultado da exatidão (Recuperação)	36
Tabela 12 - Resultado da robustez, Teste 1- Temperatura (Teor).....	37
Tabela 13 - Resultado da robustez, Teste 1- Temperatura (Recuperação)	38
Tabela 14 - Resultado da Robustez Teste 2 - Fluxo (Teor).....	38
Tabela 15 - Resultado da Robustez Teste 2 - Fluxo (Recuperação)	39

1	INTRODUÇÃO.....SUMÁRIO	9
2	JUSTIFICATIVA.....	11
3	OBJETIVOS.....	12
3.1	Objetivo geral.....	12
3.2	Objetivos específicos	12
4	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
4.1	Vitamina C	13
4.2	Desafios nutricionais	15
4.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	15
4.4	Controle de qualidade na indústria farmacêutica.....	17
4.5	Validação de método analítico na indústria farmacêutica.....	18
4.6	Método Indicativo de Estabilidade	19
5	METODOLOGIA	20
5.1	Condições de análise	20
5.2	Preparo das soluções.....	21
5.2.1	Solução Tampão Acetato de Amônio 100 Mm.....	21
5.2.2	Fase móvel.....	21
5.2.3	Solução padrão Ácido Ascórbico	22
5.2.4	Solução padrão misto	22
5.2.5	Solução amostra	22
5.3	Parâmetros avaliados para validação da metodologia analítica	22
5.3.1	Seletividade.....	23
5.3.2	Linearidade	23
5.3.3	Precisão	25
5.3.4	Exatidão	26
5.3.5	Robustez	27
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

6.1 Seletividade	SUMÁRIO	27
6.2 Linearidade.....		30
6.3 Precisão		33
6.3.1 Repetibilidade		33
6.3.2 Precisão intermediária		34
6.4 Exatidão		35
6.5 Robustez.....		37
7 CONCLUSÃO		40
REFERÊNCIAS		41

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, em que uma nova doença surge e se dissemina a ponto de virar uma pandemia, torna-se cada vez mais propícia a procura pelo uso de substâncias que auxiliam o nosso corpo a combater agentes infectantes (OLIVEIRA *et al*, 2021; JESUS *et al*, 2021). Em paralelo, a pesquisa, desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos são capazes de garantir o controle de qualidade na fabricação de produtos farmacêuticos, comprovando que são adequados para garantir a confiabilidade nas análises e consequentemente na qualidade produto final (SANTOS, BARROS E OLIVEIRA, 2016).

A vitamina C está entre os compostos bioativos importantes para o fortalecimento do sistema imunológico, juntamente com as vitaminas B6, B12, D e E. Tais substâncias desempenham ação na imunidade adaptativa e inata e, consequentemente, exerce papel preventivo contra infecções do trato respiratório (CALDER *et al*, 2020), como a causada pelo vírus SARS-CoV-2.

Na literatura, estudos demonstraram a participação deste micronutriente em vários outros sistemas do organismo humano. No metabolismo, se apresenta como cofator em reações de biossíntese de catecolaminas, aminoácidos, colesterol e hormônios peptídeos. Já no sistema vascular, foi encontrada a sua capacidade de redução da taxa do desenvolvimento de aterosclerose. Na pele, promove a estimulação da síntese de colágeno e proteção antioxidante contra os raios ultravioletas. No sistema reprodutor, foi evidenciado o aumento da fertilidade em homens em suplementação de vitamina C. Ademais, também foi retratado o possível efeito da substância contra toxicidade de metais pesados (ANG *et al.*, 2018; ZIYAE *et al.*, 2013; PULLAR, CARR e VISSERS, 2017; SHARMA *et al.*, 2013, LIGHT, 2015, MOHAMMED *et al.* 2013 e WIETEM *et al.* 2013).

Para que as células imunológicas sejam ativadas eficientemente, é necessário a obtenção de aporte adequado de nutriente, já que o déficit nutricional pode modificar a normalidade do sistema imune, para isso é preciso uma alimentação saudável para o ideal funcionamento do sistema em questão (CHEN *et al.*, 2021). Entretanto, a industrialização colaborou para que houvesse uma mudança nos padrões alimentares (GILL M *et al*, 2015), e durante a pandemia da COVID-19, houve o aumento do consumo de alimentos industrializados como: Comida congelada, salgadinhos, chocolate e biscoitos (MALTA e GRACIE, 2020). Tal fato, concretiza uma alimentação inadequada, prejudicando a saúde e proporcionando a deficiência de substâncias

como as vitaminas. Com isso, a suplementação da vitamina C se torna de grande valia para a saúde humana.

O surgimento da Política Nacional de Medicamentos e a chegada dos genéricos no Brasil, possibilitou o maior acesso à medicamentos pela população e consequentemente, causou a elevação da competitividade no mercado farmacêutico, e das preocupações para os órgãos sanitários, os quais exigiram de forma mais árdua a certificação de que os fabricantes estão produzindo produtos seguros e eficazes (ARAÚJO, *et al*, 2010 e QUENTAL, *et al*, 2008). Por isso, a qualidade das atividades analíticas é de suma importância, pois está presente em todas as etapas que o medicamento é submetido desde a sua fabricação, até o produto acabado.

A validação de um método analítico, se baseia em ensaios que são realizados para comprovar que tal método é capaz de cumprir os requisitos mínimos para seu funcionamento requerido. Este procedimento utiliza de alguns parâmetros para avaliar o desempenho do que está sendo testado. São eles: precisão, seletividade, robustez, exatidão e a linearidade (BRASIL, 2017).

Dada a importância deste insumo para diversas aplicações, neste trabalho, buscou realizar o doseamento deste micronutriente com uso da Cromatografia Líquida De Alta Eficiência (CLAE) por meio de validação e desenvolvimento de metodologia analítica, no Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE).

2 JUSTIFICATIVA

Com a intensa globalização e o aumento da competitividade, a indústria farmacêutica enfrenta novos desafios para se destacar no mercado mundial. Ademais, a fim de assegurar a segurança, eficácia e qualidade dos produtos que chegam ao consumidor é de suma importância a existência do controle de qualidade neste ramo (ROCHA e GALENDE, 2014).

Segundo a RDC nº 658 de março de 2022, o Controle de Qualidade (CQ) é a parte das boas práticas de fabricação referente à coleta de amostras, às especificações e à execução de testes, além da organização, à documentação e aos procedimentos que garantam que os testes necessários sejam executados, e que os produtos não sejam liberados para uso, até que a sua qualidade tenha sido considerada satisfatória. Na sua seção III, artigo 14, alega que um dos requerimentos básicos para a realização do CQ, é que os métodos analíticos sejam validados (Inciso III).

Os métodos analíticos desempenham papel fundamental na rotina do controle de qualidade, já que permitem avaliar a conformidade dos resultados de identificação e quantificação dos analitos com as especificações definidas de acordo com o produto ou processo. Para que um método seja implementado na rotina, ele deve ser validado. A validação de um método analítico é o processo que atesta que o mesmo é adequado ao fim a que se destina (LEITE, 2008; BRASIL, 2017).

O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), planeja a produção do suplemento alimentar de ácido ascórbico na forma de comprimido de 500 mg do ativo. Com isso, para a realização do controle de qualidade do produto acabado, a utilização de método analítico baseado na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) na rotina laboratorial, se torna apropriada, visto que tal método possui tempo reduzido de análise, alta eficiência, automação, dentre outras vantagens.

A validação total do método de doseamento do suplemento alimentar Vitamina C 500 mg, seguirá os parâmetros do documento ICH Q2 (R1), o qual dispõe sobre a validação analítica de medicamentos e suplementos alimentares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comprovar que a metodologia para doseamento do teor do produto acabado (Vitamina C 500 mg comprimido revestido) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), atende aos parâmetros da validação para suplementos alimentares, de acordo com o documento ICH Q2 (R1).

3.2 Objetivos específicos

Analisar os seguintes parâmetros da validação do método cromatográfico para doseamento do produto acabado Vitamina C 500 mg comprimido revestido:

- Seletividade;
- Linearidade;
- Precisão;
- Exatidão;
- Robustez.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Vitamina C:

A vitamina C mostrou a sua importância ao mundo com o aparecimento do escorbuto, foi descrito pela primeira vez em 500 a.C. por Hipócrates. Várias descrições acerca da doença a qual se caracteriza por hemorragias, alterações das gengivas e queda da resistência a infecções, ou seja, deficiência no sistema imunológico, causadas pela inadequada ingestão de vitamina C, foram encontradas em hieróglifos egípcios datados de cerca de 300 a.C (VANNUCCHI e ROCHA 2012)

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é um antioxidante hidrossolúvel, o qual exerce papel imprescindível para a fisiologia do corpo humano. No organismo, encontra-se na forma reduzida, o próprio ácido ascórbico que no pH fisiológico está na forma de ânion ascorbato, e a oxidada, o ácido dehidroascórbico (DHA) (KOCOT et.al, 2017) como indica na figura 1:



Fonte: RABELO, 2016

A maior parte da vitamina C adquirida na dieta é proveniente de frutas e vegetais, sendo suas principais fontes as frutas cítricas, como acerola, laranja, tangerina, limão, etc. Também está presente em legumes como o tomate, couve, pimentão e brócolis (RIGHETTO, 2003; PINEDO, 2007; LEE et al., 2000).

É importante salientar, que grande parte das vitaminas hidrossolúveis, incluindo o ácido ascórbico, não são armazenadas no corpo, sendo eliminadas através da urina sob forma inalterada, bem como, quantidades pequenas são eliminadas nas fezes,

pelo suor e por via respiratória, através do CO₂ (CAVALARI et.al, 2018). Consequentemente, existe a necessidade da administração diária destas substâncias.

A vitamina C tem efeito protetor na oxidação celular, já que é capaz de reduzir os radicais livres produzidos durante processos metabólicos. Tal propriedade, se deve ao fato da alta capacidade de doar elétrons, ou seja, de oxidar, e poder voltar a sua forma reduzida, que é a sua forma ativa (HUAMANI et al, 2018).

Tal substância tem mostrado efeito modulatório do sistema imunológico (OUDEMANS et al, 2014). Dentre todas as vitaminas, o Ácido Ascórbico (AA) fornece um dos mais significativos efeitos sobre o sistema imune. Estudos relataram que o micronutriente pode aumentar os níveis plasmáticos de imunoglobulinas do tipo IgG e IgM (YAO, 2014). Além do mais, pesquisas revelam que as suas ações reguladoras de genes, podem desempenhar um papel importante na função imunomoduladora dos linfócitos (CARR e MAGGINI, 2017).

Os estudos referentes aos efeitos da ingestão da vitamina em questão no sistema imunológico foram iniciados por Linus Pauling. Ele realizou ensaios clínicos e metanálises que indicaram grande influência da substância na prevenção e redução de sintomas do resfriado comum, reforçando então o seu papel na imunidade (SANTOS et al., 2017).

Foi relatado em estudo, que devido ao efeito antioxidante da vitamina e a sua capacidade de reduzir infecções no trato respiratório, seu uso pode trazer benefícios no tratamento de pacientes com COVID-19 (Lima *et al.*, 2020). Na análise de 12 estudos com 1766 pacientes internados em UTI, foi possível observar que este micronutriente reduziu a duração da internação em 8%. Já em outra análise, oito estudos relataram que a vitamina reduziu o período de ventilação mecânica (JESUS et al, 2021).

O ácido ascórbico atua como cofator para a enzima dopamina beta-hidroxilase na via de síntese das catecolaminas, a qual é responsável pela conversão de dopamina e adrenalina. Outra enzima que sofre o efeito desta substância, é a tirosina hidroxilase, que sofre aumento na sua formação, e consequentemente, das quantidades de dopamina no organismo. Portanto, a vitamina C interfere de forma ativa na produção de tais catecolaminas, que são indispensáveis para a contração do músculo cardíaco (POURMAND; MAZER-AMIRSHAHI, 2018).

4.2 Desafios nutricionais

Um dos grandes problemas da população mundial na atualidade é a deficiência de nutrientes, conhecida como “fome oculta”. Em um estudo foi realizada a avaliação do custo benefício dos nutrientes presentes nos alimentos consumidos no Brasil. Foi constatado que a vitamina C foi o nutriente mais barato a ser inserido na dieta brasileira, e com R\$ 0,01 é possível suprir 30% das necessidades diárias dessa substância (SIQUEIRA et al., 2020).

O acesso a alimentos saudáveis está relacionado às condições financeiras familiares. Ademais, uma nutrição adequada depende, entre outros aspectos, do conhecimento dos tipos e características dos alimentos que os tornam menos saudáveis, o fácil acesso e proximidade com os mercados, os hábitos alimentares desenvolvidos durante a vida baseado nas preferências do paladar e problemas de saúde (BRASIL, 2014).

No contexto da pandemia causada pelo vírus SARS- coV-2, a comercialização e o acesso aos alimentos ficaram enfraquecidos, já que foram tomadas medidas preventivas de distanciamento social. Isso acabou impactando a população mais vulnerável em relação à oferta de alimentos in natura e minimamente processados (SINHA et al, 2020). Em situação de fragilidade econômica, a população recorre a escolha de alimentos mais baratos, normalmente os ultraprocessados, possuidores de alto teor de gordura e açúcares, porém deficientes de nutrientes benéficos à saúde (ZAGO, 2021), como o ácido ascórbico.

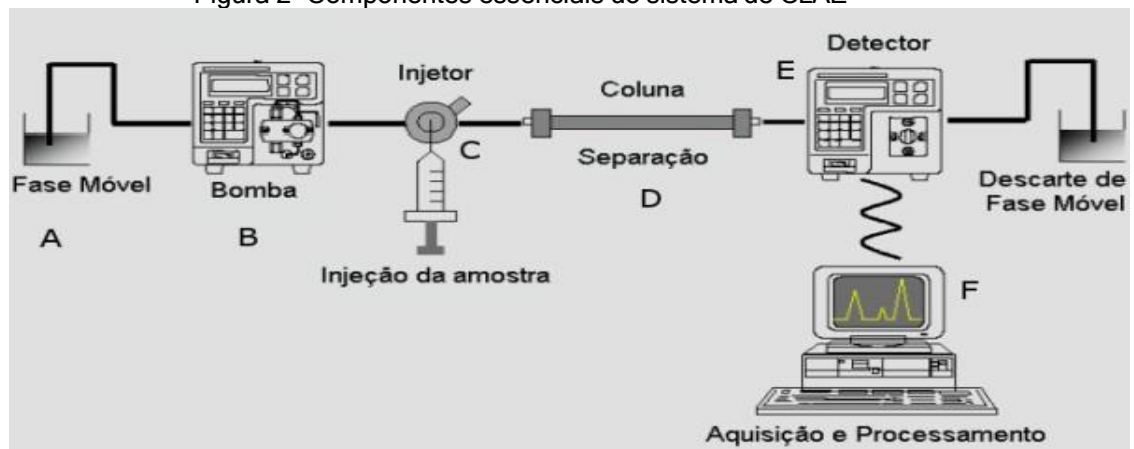
4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consiste na utilização de colunas com partículas micrométricas na fase estacionária, 3 a 10 µm, para que assim a área superficial seja grande e, conseqüentemente, ocorra o aumento da eficiência das separações. A passagem da fase móvel passa agora a ter o aumento da resistência por conta do tamanho das partículas, sendo necessário então, o uso de um sistema de bombeamento pressurizado, pressões de 1 a 40 MPa, para que a fase móvel alcance uma boa vazão e se obtenha separações com ótima resolução (SKOOG e colaboradores, 2006).

A fase estacionária consiste em pequenas partículas presentes no interior das colunas cromatográficas (cilindros que podem ser de aço ou de vidro). Já a fase móvel, é composta por solventes devidamente selecionados e eluídos, que arrastam a

amostra em análise em direção à coluna e posteriormente ao detector. As amostras vão possuir maior ou menor afinidade pela a fase estacionária em detrimento da fase móvel por conta das suas características, o que resulta em diferentes tempos de retenção das mesmas dentro da coluna, ocorrendo a separação que se deseja. (LANÇAS, 2009). Os componentes essenciais do sistema de um sistema de CLAE estão na figura 2:

Figura 2- Componentes essenciais do sistema de CLAE



Legenda: A) Reservatório de fase móvel; B) Bomba de alta pressão; C) Injetor de amostra; D) Coluna cromatográfica; E) Detector; F) Sistema de aquisição de dados (BEDOR, 2007).

Em relação às eluições em CLAE, existem dois tipos: isocrática, em que a composição da fase móvel não é alterada e gradiente, onde a composição da fase móvel varia com o tempo. A primeira é mais simples, já que um sistema de instrumental simples de CLAE pode utilizá-lo, além de que as linhas base do cromatograma são mais estáveis, e o tempo de condicionamento das colunas é menor. Já a eluição gradiente requer um sistema de bombeamento mais sofisticado, para que permita mudança nas vazões, ou proporções, dos solventes, e o tempo de condicionamento da coluna é maior (RESQUE, 2022).

A HILIC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography ou cromatografia de interações hidrofílicas, é uma forma de cromatografia que utiliza uma fase estacionária polar, ou como por exemplo, a sílica pura, e uma fase móvel contendo uma mistura de água e um solvente orgânico, normalmente acetonitrila é o mais utilizado. Neste método, a água se torna o solvente com maior força de eluição e, conseqüentemente, o aumento do teor de água na fase móvel, diminui os tempos de retenção dos analitos, diferindo da Cromatografia em Fase Reversa (CRF). Com isso, grande número de

compostos que apresentam pouca ou nenhuma retenção na CRF podem ser isolados por HILIC. Outras vantagens da HILIC podem ser citadas, como a maior preservação da fase estacionária pelo uso de menor quantidade de água na fase móvel, evitando deterioração da sua superfície e a diminuição da pressão do sistema visto que a fase móvel possui alta concentração de solvente orgânico, diminuindo a sua viscosidade (MCCALLEY, 2010; PESEK, 2011).

Os detectores mais utilizados na CLAE são os espectrofotométricos (UV/Vis) , como o utilizado no presente trabalho. Tais detectores detectam substâncias com grupamento cromóforo, os quais, são grupos funcionais orgânicos e inorgânicos insaturados que absorvem na região do infravermelho, ultravioleta ou visível. Consistem de uma célula de fluxo localizada após a coluna cromatográfica, a qual é atravessada constantemente por radiação UV e é recebida no detector. As substâncias são então, eluídas da coluna, passam pela célula de fluxo e absorvem a radiação, o que resulta em alterações mensuráveis no nível de energia (BRASIL, 2022).

Esta técnica tem sido muito explorada nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e químicas, por conta de sua vasta aplicabilidade no desenvolvimento e controle de qualidade de diversos produtos (MALDANER, COLLINS e JARDIM, 2010). A miniaturização dos componentes dos sistemas cromatográficos, bem como a divisão em módulos, proporcionou o barateamento dos equipamentos, o que facilitou a aquisição destes pela indústria farmacêutica, assegurando que a CLAE se tornasse uma das principais técnicas de quantificação de substâncias nesta área (VALÊCIO, 2018).

4.4 Controle de qualidade na indústria farmacêutica

O controle de qualidade faz parte das boas práticas de fabricação, sendo responsável pela realização de testes e liberação ou reprovação de um determinado lote de medicamentos. Com sua realização, é possível comprovar que tal produto possui qualidade através da comparação com os valores padronizados nas especificações farmacopeicas (RDC 658- ANVISA).

A avaliação da qualidade de formas farmacêuticas sólidas envolve a determinação do teor do princípio ativo presente no comprimido, ou seja, a quantidade do fármaco que está no produto acabado. Outro teste que também deve ser realizado é a uniformidade de dose, a fim de avaliar a quantidade do componente ativo em

unidades individuais do lote e verificar se tal quantidade é uniforme nas unidades testadas. Tais avaliações são de extrema importância, já que quantidades muito baixas do ativo podem representar dose subterapêutica, bem como quantidades muito elevadas podem levar a casos de intoxicação medicamentosa (ANVISA, 2019).

O ICH, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceutical for Human Use, ou em português, Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos de uso humano, consiste em uma iniciativa de harmonização regulatória global de requisitos técnicos para medicamentos de uso humano com a participação principal de autoridades regulatórias, incluindo a ANVISA, indústrias e várias organizações internacionais. O ICH Q2 (R1), é um guia que discute as características a se considerar durante a validação analítica (ICH, 2022).

4.5 Validação de método analítico na indústria farmacêutica

Segundo a RDC 166 de 2017, a validação analítica consiste na avaliação sistemática de um método através de ensaios experimentais para a confirmação e de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos. Deve demonstrar então, que o método analítico produz resultados confiáveis, sendo adequado para a sua utilização à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.

A necessidade de garantir a qualidade dos resultados obtidos através de uma metodologia analítica e sua eficiência no dia a dia laboratorial, está relacionada com a confiabilidade que está sendo cada vez mais exigida pelos órgãos sanitários, e é confirmada pela validação (RIBANI et al., 2004).

A realização da validação é de extrema importância dentro da indústria farmacêutica, sendo a sua execução uma atribuição da produção e controle de qualidade (RDC 658). Em um programa de garantia de qualidade estruturado, a realização de tal procedimento representa um fator crítico na validação do processo de produção (SOARES et al., 2005).

No trabalho em questão, foi realizada uma validação total do método de determinação de teor de ácido ascórbico em comprimidos, através da CLAE, a fim de avaliar as condições laboratoriais para a realização da técnica no LAFEPE. São avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Se o método existisse em compêndio oficial, poderia ser realizada uma

validação parcial, avaliando pelo menos a seletividade, precisão e exatidão (RDC 166).

4.6 Método Indicativo de Estabilidade

Os Métodos Indicativos de Estabilidade (MIEE), são indicados para a realização de análise de amostras de estabilidade, capazes de detectar ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas de uma substância e mensuram com exatidão o teor do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência (BRASIL, 2012).

Estes, devem ser utilizados nas análises de estabilidade, que são estudos projetados para testar e prover evidência quanto à variação da qualidade do IFA ou medicamento em função do tempo, sofrendo influência de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, bem como as propriedades físicas e químicas do IFA e excipientes, a fim de estabelecer o prazo de reteste ou o prazo de validade do IFA e do medicamento (BRASIL, 2019).

A RDC Nº 412, de agosto de 2020, traz definições dos tipos de estudo de estabilidade, são eles:

- I- Estudos de estabilidade acelerada: Ocorre aumento da taxa de degradação química ou mudança física da substância ativa ou produto acabado através do armazenamento em condições críticas.
- II- Estudo de estabilidade de acompanhamento: Realizado para assegurar que o produto mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, seguindo os resultados obtido nos estudos de longa duração.
- III- Estudo de estabilidade de longa duração: O produto fica sob as condições de armazenamento recomendadas, considerado o prazo de validade.
- IV- Estudo de estabilidade em uso: Realizado através da simulação das condições reais de uso do produto, para assegurar que a sua qualidade seja mantida nas condições de armazenamento e período recomendados pelo fabricante.

Com isso, a monitorização da estabilidade é um dos métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto

durante seu tempo de validade na indústria farmacêutica, a estabilidade de medicamentos e produtos farmacêuticos é imprescindível para garantir a eficácia, qualidade, e segurança ao longo da sua vida útil.

5 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado dentro do laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento pertencente ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), dispondo de equipamentos e reagentes necessários para a realização do processo de validação. A técnica utilizada foi a de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

5.1 Condições de análise

Para a realização do doseamento do comprimido revestido de vitamina C 500 mg através da técnica da CLAE, foram ajustadas as seguintes condições cromatográficas: a fase estacionária, a fase móvel, fluxo da fase móvel, volume de injeção (quantidade da amostra que foi injetada), temperatura da coluna/amostrador, tipo de detector, o comprimento de onda utilizado, tempo de corrida, tempos de retenção do ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico. Tais informações estão contidas na Tabela 1:

Tabela 1 - Condições cromatográficas

Característica	Descrição
Técnica	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
Fase estacionária	ZIC ® HILIC, PEEK (150 mm x 4.6 mm - 5 µm, 200 Å)
Fase móvel	Acetonitrila: Tampão Acetato de Amônio 100 mM (70:30)
Fluxo	0,5 mL/min.
Volume de injeção	5,0 µL
Tempo de corrida	12 minutos
Tempos de retenção	Dehidroascorbato: cerca de 5,4 minutos; Ácido ascórbico: cerca de 8,2 minutos;
Temperatura da coluna/ amostrador	25°C
Detector	UV 240 nm

Fonte: Autoria própria

5.2 Preparo das soluções:

5.2.1 Solução Tampão Acetato de Amônio 100 Mm:

- Pesou-se analiticamente 7,71 g de acetato de amônio e transferiu-se para balão volumétrico de 1000mL;
- Dissolveu-se em cerca de 800 mL de água ultrapurificada;
- Completo-se o volume com água.

5.2.2 Fase móvel:

- Foi preparada uma solução de 700 mL de acetonitrila e 300 mL da solução tampão de acetato de amônio 100 mM. No caso, esta proporção é para um litro de solução;
- A solução preparada foi então homogeneizada, filtrada em membrana de 0,45 µm e degaseificada.

5.2.3 Solução padrão Ácido Ascórbico:

- a) Pesou-se analiticamente 62,5 mg do padrão de Ácido Ascórbico e transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 25,0 mL;
- b) Foram adicionados 10,0 mL de diluente, que consiste na fase móvel, e sonicou-se por 10 minutos;
- c) Completou-se o volume com diluente;
- d) 5,0 mL da solução preparada anteriormente foram retirados, com auxílio de pipeta volumétrica, e foram transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL e completou-se o volume com diluente para obter a concentração final de 500 µg/ mL.

5.2.4 Solução padrão misto:

- a) Pesou-se analiticamente 62,5 mg do padrão de Ácido Ascórbico e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25,0 mL;
- b) Adicionou-se 10,0 mL de diluente, a fase móvel, e sonicou-se por 10 minutos;
- c) Completou-se o volume com diluente;
- d) Pipetou-se 5,0 mL da solução anterior para balão volumétrico de 25,0 mL e adicionou-se 175,0 mg do padrão de Ácido Dehidroascórbico;
- e) Adicionou-se 10,0 mL de diluente, a fase móvel e sonicou-se por 10 minutos;
- f) Completou-se o volume com diluente para obter a concentração final de 500 µg/ mL de Ácido Ascórbico e 7000 µg/ mL de Ácido Dehidroascórbico.

5.2.5 Solução amostra:

- a) Pesou-se 250,00 mg de amostra do ativo;
- b) Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 50 mL de diluente, a fase móvel, e sonicou-se por 10 minutos;
- c) Completou-se o volume com diluente e a solução foi filtrada;
- d) Pipetou-se 5,0 mL da solução anterior para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com diluente para obter a concentração final de 500 µg/ mL.

5.3 Parâmetros avaliados para validação da metodologia analítica

A metodologia descrita para quantificação da dissolução de ácido ascórbico (vitamina C) na concentração de 0,50 mg/ mL ou 500 µg/mL será considerada

validada, desde que sejam avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, robustez e exatidão; conforme descrito no guia Q2 (R1) do ICH.

5.3.1 Seletividade

A seletividade da metodologia analítica deve ser demonstrada através da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, de forma inequívoca, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra e que possam interferir na análise, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ICH Q2 (R1)).

Foi verificada a seletividade do método através da comparação dos cromatogramas obtidos de: fase móvel, solução padrão ácido ascórbico, solução padrão misto, solução amostra e solução placebo, com base nas mesmas condições definidas pelo método, a fim de identificar possíveis fatores que podem interferir na interpretação dos cromatogramas.

5.3.2 Linearidade

Este parâmetro consiste na habilidade do método analítico em produzir resposta analítica diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa (ICH Q2 (R1)).

A linearidade para este método foi determinada analisando cinco diferentes concentrações (70%, 90%, 100%, 110% e 130%) de ácido ascórbico, em triplicata, a fim de se obter 3 curvas. Cada curva foi tratada por Análise de Variância (ANOVA) para obtenção da equação de reta. Com isso, foi verificado se a curva é linear e se há falta de ajuste. O procedimento está descrito na Tabela 2:

Tabela 2 - Procedimento da Linearidade

[] (%)	[] (mg/ mL)	Ácido ascórbico (mg)	Placebo (mg)	1° diluição	Pipeta coleta da 1ª diluição	2ª diluição
70%	0,35	500	450	50,0	7,0	50,0
90%	0,45				9,0	50,0
100%	0,50				5,0	25,0
110%	0,55				11,0	50,0
130%	0,65				13,0	50,0

Legenda: []- Concentração

Fonte: Autoria própria

Inicialmente foi realizado o preparo da solução mãe, ou seja, a solução que irá dar origem às soluções filhas a partir da retirada de alíquotas da mesma. Para o seu preparo, foram pesados analiticamente 500 mg de ativo, ácido ascórbico e 450 mg de placebo. Transferiu-se então, para balão volumétrico de 200 mL e o volume foi completado com diluente.

Para o preparo das soluções filhas, pipetou-se a quantidade indicada na tabela 2, da solução mãe anteriormente preparada para o balão correspondente. Para os níveis de 70%, 90%, 110% e 130%, foram acrescentados 25 mL do diluente, sonicou-se por 10 minutos e posteriormente completou-se o volume com diluente. Já para o nível 100%, acrescentou-se cerca de 15 mL, e o restante do procedimento foi igual aos outros níveis.

O ensaio da linearidade foi realizado então, seguindo os passos subsequentes:

- Preparação das 3 amostras para cada nível de concentração de acordo com a tabela 2;
- Efetuação da leitura em HPLC das amostras sintéticas nas diferentes concentrações propostas;
- Calcular a concentração (mg/mL) de ácido ascórbico nas amostras sintéticas;
- Tratar cada curva por Análise de Variância (ANOVA) para obtenção da equação de reta.
- Verificar se a curva é linear e também se não há falta de ajuste.

5.3.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos provenientes de uma amostragem múltipla da mesma amostra (ICH Q2 (R1)). Tal parâmetro foi avaliado nos seguintes níveis:

Repetibilidade: Verificada com 6 replicatas a 100% da concentração do teste individualmente preparadas, sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.

Precisão intermediária: Verificada por meio da proximidade dos resultados obtidos no mesmo laboratório, em dias e com analistas diferentes, com 6 determinações a 100% da concentração do teste.

Segundo a Resolução vigente, a precisão de um método analítico deverá ser expressa em desvio padrão relativo (DPR), segundo a equação:

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

Onde, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada. O valor máximo aceitável será determinado após utilização da equação de Horwitz:

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Onde C é a concentração do analito na solução.

Além disso, a precisão intermediária deverá ser avaliada através do teste T, no qual o T calculado deverá ser menor do que o T tabelado.

Para a avaliação repetibilidade, calculou-se a concentração (%) de ácido ascórbico nas soluções amostra e a média, desvio padrão e o desvio padrão relativo dos valores obtidos (n=6). Já para a avaliação da precisão intermediária o procedimento foi o mesmo, porém em dois dias e dois analistas diferentes. Os critérios de aceitação para o procedimento estão descritos na Tabela 3:

Tabela 3 - Critérios de aceitação da Precisão

Parâmetro	Critério de aceitação
Desvio padrão relativo (DPR) (n=6)	Máximo 4,19%
Desvio Padrão Relativo (DPR) entre a média dos resultados do primeiro dia e do segundo dia	Máximo 6,28%

Fonte: Autoria própria

5.3.4. Exatidão

Este parâmetro deve ser obtido através do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ICH Q2 (R1)).

A exatidão foi preparada considerando as seguintes concentrações em triplicata:

- Nível baixo: 0,35 mg/ mL (70%);
- Nível médio: 0,50 mg/ mL (100%) e
- Nível alto: 0,65 mg (130%) para o ácido ascórbico.

As amostras para avaliação da exatidão foram preparadas de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da Substância Química de Referência (SQR). O procedimento está descrito na Tabela 4:

Tabela 4 - Procedimento da exatidão

[] (%)	[] (mg/mL)	Ácido ascórbico (mg)	Placebo (mg)	Primeira diluição	Pipeta coleta da 1ª diluição (mL)	Balão volumétrico (mL)
70%	0,35	500	450,0	50	7,0	50,0
100%	0,50				5,0	25,0
130%	0,65				13,0	50,0

Fonte: Autoria própria

Foram preparadas 3 amostras para cada nível de concentração de acordo com a tabela citada acima. Foram injetadas 3 amostras sintéticas no nível baixo, 3 amostras sintéticas no nível médio e 3 amostras sintéticas no nível alto e calculou-se a concentração (mg/comp) de ácido ascórbico nas amostras sintéticas. Os critérios de aceitação para a exatidão estão descritos na Tabela 5:

Tabela 5 - Critérios de aceitação da exatidão

Parâmetro	Critério de aceitação
Desvio padrão Relativo (DPR) entre as corridas	Nível baixo (70%)- 4,42%
	Nível médio (100%)- 4,19%
	Nível alto (130%)- 4,02%
Média de recuperação em cada nível e recuperação individual	Nível baixo (70%)- 90% a 107%
	Nível médio (100%)- 90% a 107%
	Nível alto (120%)-90% à 107%

Fonte: Autoria própria

5.3.5 Robustez

A robustez é um parâmetro que indica a capacidade do método analítico em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (ICH Q2 R1). No caso de métodos qualitativos, deve ser verificado se as variações propostas interferem na resposta analítica. As condições para a avaliação da robustez foram então, a variação da temperatura do forno 25,0°C + 1° C (24° e 26°C) e variação do fluxo da fase móvel 0,5 mL/ minuto + 3% (0,484 e 0,515 mL/ minuto).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

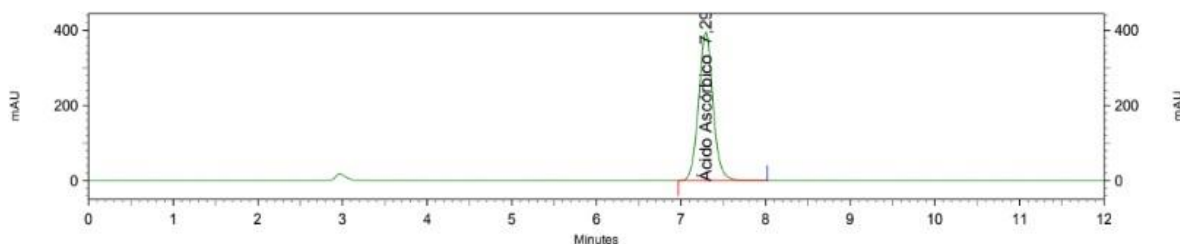
6.1 Seletividade

Como a seletividade tem o objetivo de identificar a existência de outras substâncias presentes na matriz da amostra no analito de interesse, os cromatogramas obtidos não devem apresentar picos significativos que representem interferências no tempo de retenção do produto em estudo. Consiste em uma base crítica para um procedimento analítico, já que sem seletividade suficiente, os outros parâmetros de performance perdem o sentido.

Tal parâmetro, é de extrema importância para a determinação dos Métodos Indicativos de Estabilidade (MIE), já que são capazes de quantificar os analitos de interesse sem que haja interferência dos produtos de degradação, impurezas ou excipientes (CHAVES 2019). Ou seja, de modo que os sinais de cada componente

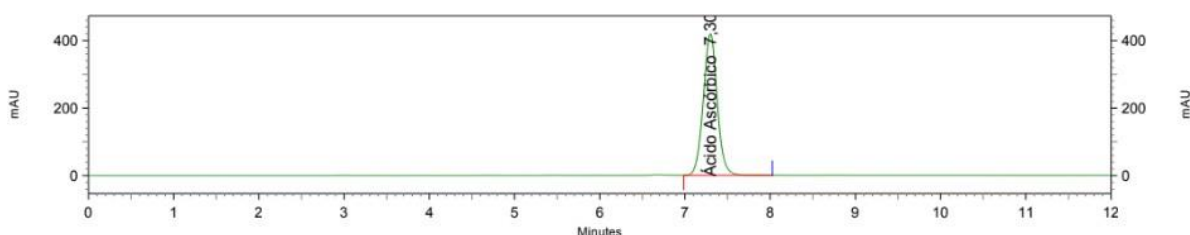
não sejam revelados da mesma forma, facilitando a diferenciação entre eles. Para a comprovação da seletividade, foi realizada a comparação dos cromatogramas obtidos separadamente de: Solução padrão ácido ascórbico, solução padrão misto, solução amostra, diluente e solução placebo (Fig.3 - 7).

Figura 3- Cromatograma da solução padrão ácido ascórbico



Fonte: Autoria própria

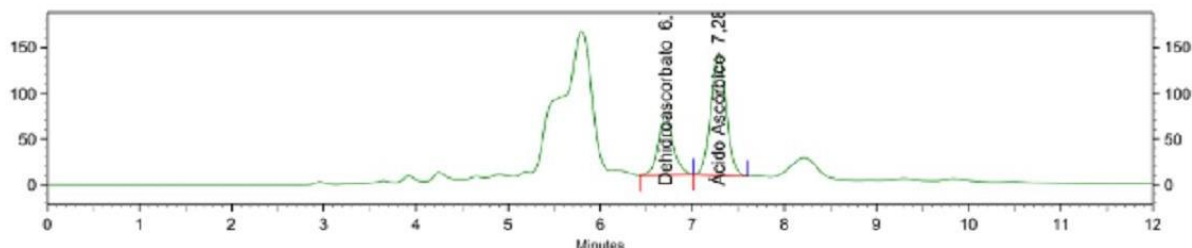
Figura 4- Cromatograma da solução amostra



Fonte: Autoria própria

Nas imagens 3 e 4, pode-se constatar a semelhança entre os tempos de retenção da solução padrão, a nossa referência; e o da amostra, contendo o Insumo Farmacêutico Ativo e excipientes. Observa-se que os tempos de retenção dos picos referentes ao ácido ascórbico são equivalentes. Não houve o aparecimento de picos próximos ou no mesmo tempo de retenção do ácido ascórbico, o que nos assegura a ausência de interferência de outros componentes na resposta analítica.

Figura 5- Cromatograma da solução padrão misto



A leitura da análise por HPLC é realizada por meio de cromatograma que exhibe, de forma ideal, o pico da substância ativa e do produto de decomposição em diferentes tempos de retenção. No cromatograma da solução padrão misto, apresentado na figura acima, é possível observar a presença dos picos do ácido dehidroascórbico em

6,70 minutos e a do ácido ascórbico em 7,26 minutos. Como a resolução foi de 2,07, indica que houve uma boa separação, e o método foi capaz de distinguir ambas as substâncias de forma inequívoca.

Quadro 1- Parâmetros cromatográficos

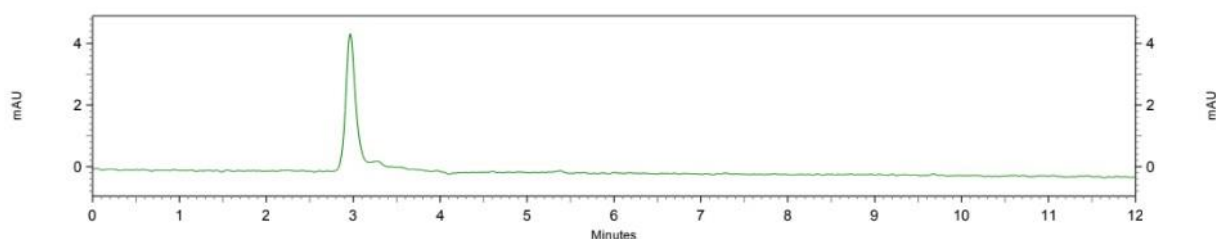
	Ácido ascórbico	Ácido dehidroascórbico
Pratos teóricos	9621	9192
Assimetria	1,21	1,02
Resolução	2,07	

Fonte: Autoria própria

No quadro 1, estão indicados três parâmetros cromatográficos importantes, obtidos a partir dos picos do ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico na solução padrão misto.

O número de pratos teóricos (N) é indicativo da eficiência da coluna. Uma coluna com um valor N alto terá um pico mais estreito do que uma coluna com um número mais baixo. O seu valor depende da substância a ser analisada e das condições de análise, como fase móvel, temperatura e fase estacionária. Já a resolução (R), indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura e quanto maior for o seu valor, melhor será a separação (ANVISA, 2019). Segundo parâmetros internos, foram aceitos como valores mínimos: 1,5 de resolução e 2000 de pratos teóricos. Com isso, podemos observar que ambos os parâmetros estão dentro dos valores aceitáveis.

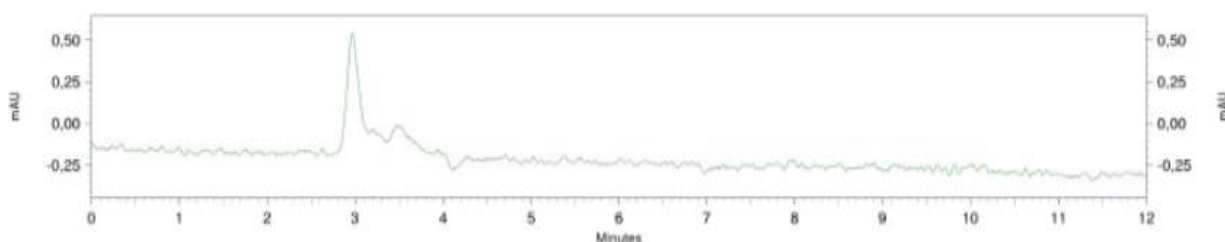
Figura 6- Cromatograma do diluente



Fonte: A autora

No cromatograma do diluente, a fase móvel, não houve surgimento de pico significativo no tempo de retenção do analito, indicando que a composição da solução analisada não interfere na leitura da amostra.

Figura 7- Cromatograma da solução placebo



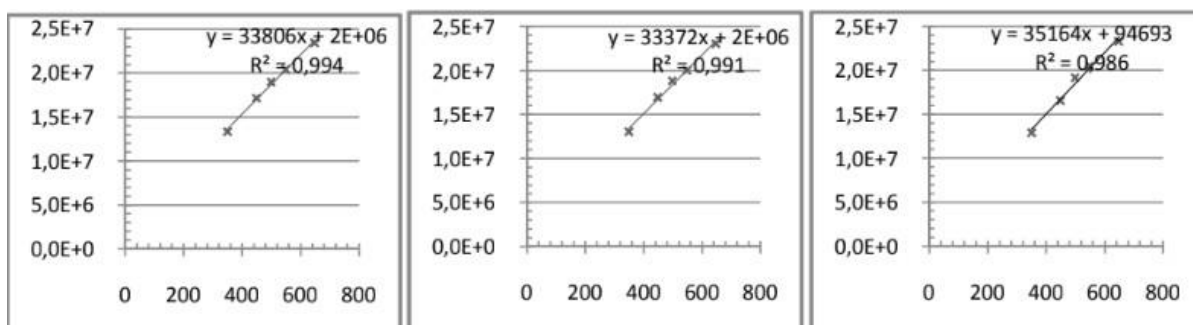
Fonte: A autora

Por fim, no cromatograma do placebo, excipientes sem o princípio ativo, não apareceram picos significativos no tempo de retenção do ácido ascórbico, o que indica que as substâncias presentes na matriz do comprimido não afetam a leitura da amostra.

6.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da análise de cinco diferentes níveis de fortificação (70%, 90%, 100%, 110% e 130%) de ácido ascórbico, sendo os níveis de fortificação, a concentração do analito que foi adicionada na amostra. Na figura 7 estão os gráficos obtidos em triplicata, e na figura 8, o gráfico obtido com os valores médios.

Figura 8- Gráficos da linearidade para as curvas 1,2 e 3



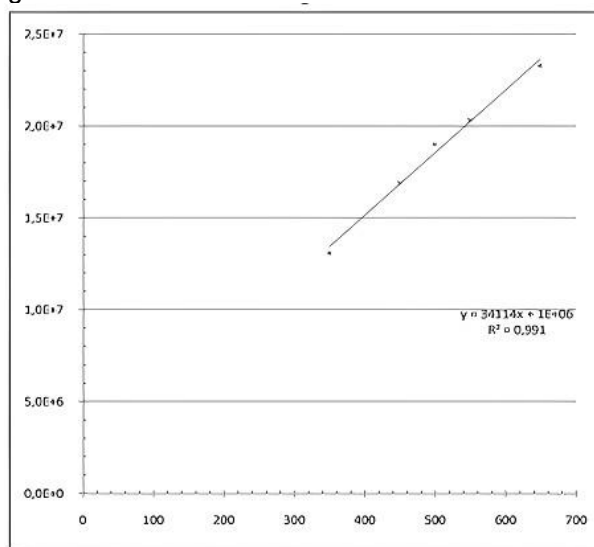
O Coeficiente de Determinação (R^2), é uma medida estatística usada para avaliar a qualidade do ajuste de um modelo de regressão. Ele representa a porcentagem da variação nos dados que é explicada pelo modelo e pode ser interpretado como a proporção da variação de Y que está associada à variável X. Quando os pontos estão alinhados, o valor deste coeficiente é igual a um, já quando não há nenhuma relação linear entre X e Y, R^2 é igual a 0 (KUTNER et al, 2005).

É possível observar na Figura 7, que a relação é linear e que a resposta obtida pelo método analítico é diretamente proporcional a concentração do analito na amostra, ou seja, quanto maior for a concentração, maior vai ser a área do pico

cromatográfico, a resposta analítica. Como os valores obtidos de R^2 foram próximos de um, o modelo não apresentou falta de ajuste e, apresentou linearidade.

Na figura 8, está representado o gráfico da média das 3 curvas apresentadas na Figura 7.

Figura 9- Gráfico do valor médio obtido da linearidade



Fonte: Autoria própria

Podemos observar na figura acima, que o valor de R^2 , foi próximo de um, indicando que não há falta de ajuste no modelo, e a relação é então, linear.

Na tabela 5, está a equação da reta, o coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de correlação da reta (R) e a média das três curvas, obtidos após tratamento estatístico, além do Limite de Quantificação (LQ) e Limite de Detecção (LD).

Tabela 6 - Resultado da linearidade

	Equação da reta	R^2	R	LQ (mg/mL)	LD (mg/mL)
Curva 1	$Y = 33806x + 2 \cdot 10^6$	0,994	0,997		
Curva 2	$Y = 33372x + 2 \cdot 10^6$	0,991	0,995		
Curva 3	$Y = 35164x + 94693$	0,986	0,993		
Média	$Y = 34114x + 1,49 \cdot 10^6$	0,991	0,995	0,1389	0,0417

Fonte: A autora

Outra medida estatística utilizada na avaliação da linearidade de um método, é o coeficiente de correlação de Pearson (R). O mesmo consiste em uma medida de associação linear entre variáveis e tal correlação exige um compartilhamento de variância e que essa variação seja distribuída linearmente (DALSON e JÚNIOR, 2009). Seu valor varia de menos um a um, e o sinal indica direção positiva ou negativa do relacionamento, quanto mais próximo de um, mais forte é a associação positiva entre as variáveis (MARTINS, 2014). Segundo a RDC 166 de 2017, o valor de R deve estar acima de 0,990.

Como podemos observar na Tabela 6, todos os valores de R foram acima de 0,990, indicando associação positiva forte entre as variáveis.

A ANOVA, é uma metodologia estatística utilizada para testar a igualdade de três ou mais médias populacionais baseado na análise das variâncias amostrais. Nesse método, comparação de médias é realizada através do teste F, o qual é considerado o teste paramétrico mais adequado para tal propósito (SIEGEL; CASTELLAN, 2006). O resultado da ANOVA está apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultado da ANOVA			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Média	$1,87 \cdot 10^6$	$1,84 \cdot 10^6$	$1,85 \cdot 10^6$
Variância	$1,43 \cdot 10^{13}$	$1,40 \cdot 10^{13}$	$1,56 \cdot 10^{13}$
F		0,007	
F crítico		3,885	

Fonte: A autora

Através da ANOVA, com 95% de confiança, verificou-se que o F calculado de 0,007 foi menor do que o F tabelado de 3,885, evidenciando assim que não há diferença significativa entre as três curvas e que não há falta de ajuste. Com isso, o método foi considerado linear para o doseamento do teor do ácido ascórbico.

6.3 Precisão

Este parâmetro deve ser considerado em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Se a precisão intermediária for realizada, não é necessária a realização da reprodutibilidade.

6.3.1 Repetibilidade:

A repetibilidade foi determinada utilizando-se seis amostras a 100% da formulação da Vitamina C 500mg comprimido revestido na concentração de 0,500 mg/mL ou 500µg/ mL de ácido ascórbico, sob as mesmas condições de teste, em um curto intervalo de tempo e preparadas pelo mesmo analista. Na tabela 8 seguem os resultados da repetibilidade com o teor e percentual de recuperação das seis amostras, além da média, Desvio Padrão (DPR%) e Desvio Padrão aceitável (DPR% aceitável), obtidos após tratamento estatístico.

Tabela 8 - Resultados da repetibilidade

Repetibilidade	mg/mL	Recuperação %
Amostra 001	0,4927	98,54
Amostra 002	0,4752	95,05
Amostra 003	0,4727	94,54
Amostra 004	0,4709	94,18
Amostra 005	0,4731	94,62
Amostra 006	0,4658	93,15
Média	0,4751	95,01
Desvio Padrão	0,009	1,800
DPR%	1,94	-
DPR% Aceitável	4,19	-
Mínimo	0,4658	93,15
Máximo	0,4927	98,54

Fonte: A autora

Como na precisão precisamos avaliar o quão distante ou próximos estão os resultados obtidos, analisamos o desvio padrão relativo (DPR%) dos dados, já que o mesmo é uma medida estatística que descreve a distribuição dos valores. Pode-se observar que a repetibilidade atende às especificações para a quantificação do ácido ascórbico, visto que, apresentou o DPR% de 1,94%, sendo inferior ao DPR% aceitável

de 4,19%. O que nos mostra que os valores não possuem diferença significativa entre si.

6.3.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada utilizando-se doze amostras por dois analistas em dias diferentes (seis amostras para o analista 1/ dia 1 e seis amostras para o analista 2/ dia 2), sob as mesmas condições, no mesmo laboratório, o COPED. Na tabela 9 e 10, seguem os resultados da precisão intermediária e teste t Student, respectivamente.

Tabela 9 - Resultados da precisão intermediária

Analista 1/ Dia 1	Mg/mL	Recuperação %	Analista 2/ Dia 2	mg/mL	Recuperação %
Amostra 1	0,4927	98,54	Amostra 1	0,5199	103,98
Amostra 2	0,4752	95,05	Amostra 2	0,4885	97,69
Amostra 3	0,4727	94,54	Amostra 3	0,4819	96,39
Amostra 4	0,4709	94,18	Amostra 4	0,4803	96,05
Amostra 5	0,4731	94,62	Amostra 5	0,4782	96,65
Amostra 6	0,4658	93,15	Amostra 6	0,4758	95,17
Média	0,4751	95,01	Média	0,4874	97,66
Desvio P.	0,009	1,800	Desvio P.	0,016	3,206
DPR%	1,94	-	DPR%	3,38	-
DPR% ac.	4,19	-	DPR% ac.	4,19	-
DPR% (Grupo)			2,96		
DPR% Aceitável (Grupo)			6,28		

Fonte: Autoria própria

Foi verificado que o DPR% para o Analista 1/dia 1 foi de 1,94%; e para o Analista 2/ dia 2 foi de 3,38%; ambos inferiores ao DPR% aceitável de 4,19% para as 6 amostras. Para o conjunto dos doze resultados obtidos pelos dois analistas, o DPR%

aceitável foi de 6,28% e o valor encontrado foi de 2,96%. Com isso, o método atende às especificações.

O teste t, consiste em um teste de hipótese que utiliza conceitos estatísticos para rejeitar ou não uma hipótese nula quando a estatística de teste segue uma distribuição t de student. Serve para confrontar médias ou grupos de médias. Quando o valor de T calculado é menor que o tabelado, o teste não é significativo, a hipótese nula não é rejeitada e, se conclui que as médias não possuem diferenças significativas entre si. Já se o valor de T for maior que o T tabelado, o teste é significativo, se rejeita a hipótese nula, e conclui-se que existe diferença significativa entre as médias (MCDONALD, 2014).

Após aplicação do teste t Student, o T calculado para o ácido ascórbico foi de -1,6066; valor inferior ao T tabelado de 2,3060; com 95% de confiança. Indicando ausência de diferença significativa entre as médias. Portanto, pode-se concluir que o método foi preciso para metodologia de teor e substâncias relacionadas do produto acabado Vitamina 500mg comprimido revestido por CLAE.

6.4 Exatidão

A exatidão refere-se à proximidade entre os resultados obtidos pelo método avaliado e um valor aceito como verdadeiro, utilizado como referência. Os processos mais utilizados para realizar a avaliação da exatidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, e, adição de padrão (BRASIL, 2017). No nosso caso, nossas referências foram os valores de fortificação, a quantidade do analito adicionada na amostra.

Para a análise deste parâmetro, foram consideradas as seguintes concentrações em triplicata: 70% (0,350mg/ mL); 100% (0,500mg/ mL) e 130% (0,650mg/ mL). Foi avaliada a capacidade de recuperação para cada concentração de 90% a 107% do valor teórico. O cálculo do DPR% aceitável foi obtido conforme indicado em documento de regulamentação interna da instituição para cada concentração de ácido ascórbico. Os resultados estão registrados na Tabela 11 e 12.

Na Tabela 11, está registrado os valores de teor obtidos nos três níveis de fortificação (70%, 100% e 130%), em que podemos observar a média, Desvio Padrão (DPR%) e Desvio Padrão aceitável (DPR% aceitável).

Tabela 10 - Resultado da exatidão (Teor)

[Teor mg/mL]			
Amostra	70%	100%	130%
1	0,3551	0,5066	0,6260
2	0,3470	0,5027	0,6157
3	0,3446	0,5115	0,6217
Média	0,3489	0,5069	0,6211
DPR%	1,58	0,86	0,84
DPR% Ac.	4,42	4,14	4,02

Fonte: A autora

Os valores de DPR% obtidos das três amostras, nos três níveis de fortificação foram abaixo dos valores de DPR% aceitável, indicando que não existe variação significativa entre os resultados.

Tabela 11 - Resultado da exatidão (Recuperação)

Recuperação %			
Amostra	70%	100%	130%
1	101,46	101,31	96,31
2	99,14	100,55	94,72
3	98,45	102,29	95,65
Média	99,68	101,38	95,56
LRI	90%	90%	90%
LRS	107%	107%	107%

Fonte: A autora

Já em respeito à capacidade de recuperação, retratada na Tabela 12, a proximidade entre a concentração do analito adicionada na amostra, nossa referência, e a concentração obtida pelo método de doseamento por CLAE, foi adequada. Ademais, o percentual obtido em cada nível em triplicata, estava acima do limite de recuperação inferior (LRI) e abaixo do limite de recuperação superior (LRS). Com isso, o método analítico foi considerado exato.

6.5 Robustez

A robustez consiste na capacidade de o método não ser afetado por pequenas e deliberadas modificações analíticas. Importante salientar, que quanto maior for a robustez de uma metodologia, maior será a confiança em relação à sua precisão (INMETRO, 2016). Se as variações estabelecidas estiverem dentro dos limites de exatidão, e precisão aceitáveis, então o método possui robustez e pode ser incorporado ao procedimento (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004). Para verificar este parâmetro foram feitas variações na temperatura do forno (Teste 1) e no fluxo da fase móvel (Teste 2).

No Teste 1, A temperatura do forno, parte do equipamento em que está localizada a coluna cromatográfica, sofreu variação de 24°C, 25°C e 26°C. O resultado do teste está representado nas tabelas 13 e 14.

Tabela 12 - Resultado da robustez, Teste 1- Temperatura (Teor)

[Teor mg/mL]			
Amostra	24° C	25° C	26°C
1	0,4803	0,4752	0,4814
2	0,4587	0,4727	0,4565
3	0,4665	0,4709	0,4709
Média	0,4685	0,4729	0,4696
DPR%	2,34	0,46	2,66
DPR% Ac.	4,19	4,19	4,19

Legenda: DPR%: Desvio Padrão Relativo, DPR% Aceitável: Desvio Padrão Relativo Aceitável

Fonte: A autora

Como é possível observar na tabela acima, o DPR% nas três amostras e nas três temperaturas aplicadas, foi abaixo do DPR% Aceitável. Com isso, não houve grandes diferenças nos teores calculados e as mudanças aplicadas no Teste 1 não atribuíram alterações significativas ao método.

Tabela 13 - Resultado da robustez, Teste 1- Temperatura (Recuperação)

Recuperação%			
Amostra	24°C	25°C	26°C
1	96,06	95,05	96,27
2	91,73	94,54	91,31
3	93,30	94,18	94,18
Média	93,70	94,59	93,92
LRI	90%	90%	90%
LRS	107%	107%	107%

Legenda: LRI- Limite de Recuperação Inferior, LRS-Limite de Recuperação Superior

Fonte: Autoria própria

A partir dos dados expostos na Tabela 14, é possível observar que os valores de recuperação obtidos, ou seja, a porcentagem do analito que foi possível recuperar nas amostras através do método de doseamento em questão, está dentro do intervalo de LRI e LRS. O que indica que a variação aplicada no Teste 1 não interferiu no método.

O resultado estatístico do teste 1 apresentou com 95% de confiança por ANOVA, que o F calculado foi de 0,174, inferior ao F tabelado de 5,143, relatando a homogeneidade das variâncias.

No Teste 2, o fluxo da fase móvel sofreu variação de 0,485mL/min, 0,500mL/min e 0,515mL/min. O resultado do teste está apresentado nas tabelas 15 e 16.

Tabela 14 - Resultado da Robustez Teste 2 - Fluxo (Teor)

[Teor ng/mL]			
Amostra	0,485mL/min	0,500mL/min	0,515mL/min
1	0,4808	0,4752	0,4806
2	0,4562	0,4727	0,4621
3	0,4776	0,4709	0,4820
Média	0,4715	0,4729	0,4749
DPR%	2,84	0,46	2,34
DPR% Aceitável	4,19	4,19	4,19

Legenda: DPR%- Desvio Padrão Relativo, DPR% Aceitável- Desvio Padrão Relativo Aceitável

Com o exposto na Tabela 10, o DPR% obtido nas três amostras e nas três variações de fluxo, foi abaixo do DPR Aceitável, indicando ausência de diferença significativa entre os valores obtidos pelo método de doseamento após a aplicação da variação do fluxo da fase móvel.

Tabela 15 - Resultado da Robustez Teste 2 - Fluxo (Recuperação)			
	Recuperação%		
Amostra	0,485mL/min	0,500mL/min	0,515mL/min
1	96,17	95,05	96,12
2	91,73	94,54	92,43
3	95,52	94,18	96,41
Média	94,31	94,59	94,98
LRI	90%	90%	90%
LRS	107%	107%	107%

Fonte: A autora

A partir dos dados expostos na Tabela 16, é possível observar que os valores de recuperação obtidos pelo método, estão dentro do intervalo de LRI e LRS. O que indica que a variação aplicada no Teste 2, não interferiu de forma significativa no método. O resultado estatístico do teste 2 apresentou com 95% de confiança por ANOVA, que o F calculado foi de 0,085 inferior ao F tabelado de 5,143.

Logo, pode-se concluir que mesmo com tais variações, o método proposto não apresentou variações significativas na resposta analítica, confirmando a sua robustez para as variações estudadas.

7 CONCLUSÃO

O ácido ascórbico desempenha papel importante em diversas funções do organismo humano, como a participação na biossíntese de catecolaminas, otimização do sistema imunitário e inativação de espécies reativas de oxigênio. Todavia, tal micronutriente não é armazenado no corpo, sendo seu excedente eliminado de forma inalterada na urina, por isso, é aconselhável a sua suplementação. A validação total do método analítico para doseamento do comprimido de Vitamina C 500 mg por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada com embasamento no documento ICH Q2 (R1). Os parâmetros avaliados foram a seletividade, precisão, exatidão, linearidade e robustez, com a realização de testes estatísticos. A metodologia foi considerada seletiva, pois não foram encontrados interferentes nos cromatogramas obtidos. Foi precisa, já que em ambos os níveis, repetibilidade e precisão intermediária, os valores de DPR% obtidos foram inferiores aos do DPR% aceitável. O valor de F foi menor que o F tabelado, confirmando a ausência de diferença significativa entre as variâncias e as médias foram homogêneas, já que o valor de T também foi menor que o T tabelado. O método foi considerado exato, pois o DPR% foi menor que o DPR% aceitável, e a capacidade de recuperação estava dentro dos limites especificados. Foi considerada linear, pois os valores de R^2 e R foram próximos de um. E por fim, foi considerada robusta, já que mesmo após as variações aplicadas os resultados não sofreram interferência significativa, já que o DPR% foi inferior ao DPR% aceitável, e a capacidade de recuperação estava dentro dos limites. Com isso, o método de doseamento do comprimido de Vitamina C 500 mg apresentado neste trabalho, está validado e apto para ser utilizado na rotina laboratorial do LAFEPE.

REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 6ª ed., 2019.

ANG, Abel; PULLAR, Juliet; CURRIE, Margaret; VISSERS, Margreet. Vitamin C and immune cell function in inflammation and cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 5, p. 59-1147, 2018.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 318**, de 06 de novembro de 2019. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0318_06_11_2019.pdf>. Acessado em: 15/05/2023.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 412**, de 20 de agosto de 2020. Disponível em:< > Acessado em: 15/05/2023.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 45**, de 09 de agosto de 2012. Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis> Acessado em: 15/05/2023.

Araújo J, Oliveira A, Vilela S, Warkentin S, Lopes C, Ramos E. **Da emergência de um novo vírus humano à disseminação global de uma nova doença**. Instituto de Saúde Pública da Universidade de Porto (ISPUP), 2020.

Araújo LU, Albuquerque KT, Kato KC, Silveira GS, Maciel NR, Spósito PA, et al. Medicamentos genéricos no Brasil: panorama histórico e legislação. **Panam Salud Publica**. 2010; 28(6):480-92

BRASIL, Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a População Brasileira**. Distrito Federal, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. Estabelece critérios para a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 658, de 30 de março de 2022, dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 de mar. 2022.

CARR, Anitra; MAGGINI, Silvia. Vitamin C and immune function. **Nutrients**, v. 9, n. 11, 2017.

CHAMBIAL, Shaija; DWIVEDI, Shailendra; SHUKLA, Kamla; JOHN, Placheril; SHARMA, Paveen. Vitamin C in Disease Prevention and Cure: An Overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 28-314, 2013.

CHAVES, Juliana. Método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para análise de comprimidos de cloridrato de metformina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Naval**, v. 80, n. 1, p. 8, 2019.

CHEN, Olivera et al. The Role of Oat Nutrients in the Immune System: A Narrative Review, **Nutrients**, v.13, n.4, p.1048, 2021.

FILHO, Dalson; JÚNIOR, José. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson, **Política Hoje**, v. 18, n. 1, 2009.

GIL, Margaret; FELICIANO, Diana; MACDIARMID, Jennie; SMITH, Pete. The environmental impact of nutrition transition in three case study countries, **Food Secur**, v. 7, p. 493-504, 2015.

GORKOM, Gwendolyn; WOLTERINK, Roel; ELSSEN, Catharina; WIETEN, Lotte; GERMERAAD, Wilfred; BOS, Gerard. Influence of Vitamin C on Lymphocytes: An Overview. **Antioxidants**, v. 7, n. 3, 2018.

ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH - Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology, 1995.

ICH. **Overview of ICH**, 2020. Disponível em: https://admin.ich.org/sites/default/files/2020-06/OverviewOfICH_2020_0605_0.pdf. Acesso em: 15/05/2023.

INMETRO. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos; DOQ-CGCRE, 2003.

JESUS, Michelle; ROCHA, Aline Cristine; CAMPOS, Stéphanie; SANTANA, Tâmara Fabíola; PLÁCIDO, Geovana. Vitamin C and the relationship with immunity and as a Preventive Agent for COVID- 19 (Sars -Cov2), **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, 2021.

KUTNER, Michael; NACHTSHEIM, Christopher; NETER, John; LI, William. **Applied Linear Statistical Models**. 5 ed. Boston: McGraw-Hill/Irwin, 2005.

LANÇAS, Fernando. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. São Paulo: Ed. Átomo, 2009.

LEITE, F. Validação em análises químicas. 5. ed. Campinas: Átomo, 2008.

LIGHT, Richard. **Disorders of the pleura**. edição 20. Harrison's Principles of Internal Medicine. Mcgraw Hill, 2015.

LIMA, Wenna Lúcia; BATISTA, Mara Cristina; SILVINO, Valmir; MOURA, Rayane; MENDES, Islanne; MOURA, Mayara; BATISTA, Nadya Kelly; SILVA, Kael Rafael; BARBOSA, Anne Karynne. Importância nutricional das vitaminas e minerais na infecção da COVID-19. **Research Society and Development**, v. 9, n. 8, 2020.

MALDANER, Liane; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, set. 2010.

MARTINS, M. Coeficiente de correlação amostral. **Ciência Elemental**, v. 2, n. 2, 2014.

MCCALLEY. The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: some possible approaches for improved separations. **Journal of Chromatography A**. v. 1217, n. 6, 858-80, 2010.

MCDONALD JH. **Manual de Estatística Biológica**. 3 ed. Baltimore, Maryland, EUA: Sparky House Publishing, 2014.

MOHAMMED, Bassem; FISHER, Bernard; KRASKAUSKAS, Donatas; FARKAS, Daniela; BROPHY, Donald; FOWLER, Alpha; NATARAJAN, Ramesh. Vitamin C: A novel regulator of neutrophil extracellular trap formation. **Nutrients**. v. 243, n. 1, p. 111-122, 2013.

OLIVEIRA, Dandara Hillary; SILVA, Maria Izabele; FONSECA, Rita; FERREIRA, José Carlos. The importance of healthy eating as a way to increase immunity through vitamins and minerals. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, 2021.

PARANHOS, R.; FIGUEIREDO FILHO, D. B.; ROCHA, E. C. da; SILVA JÚNIOR, J. A. da; NEVES, J. A. B.; SANTOS, M. L. W. D. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson: o Retorno. **Leviathan (São Paulo)**, [S. l.], n. 8, p. 66-95, 2014.

PESEK, J. J., MATYSKA, M. T.; **Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications**; CRC Press: Boca Raton, 2011.

PULLAR, Juliet; CARR, Anita; VISSERS, Margreet. The roles of vitamin C in skin health, **Nutrients**, Vol. 9, n. 8, 2017.

QUENTALI, C., ABREU, J. C. de, BOMTEMPO, J. V., & GADELHA, C. A. G. Medicamentos genéricos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 1, 619-628, 2008.

RESQUE, Ian Santana. **Cromatografia líquida de alta eficiência, extração líquido-líquido e derivatização com DANSYL para quantificação de aminas biogênicas em queijos**. 2022. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H. JARDIM, E. C. S. F., MELO, L. F. C. **Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, T. G.; GALENDE, S. B. A Importância do Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica. **Uningá Review**, v. 20, n. 2, 2014.

SANTOS, Enicy Cecília; BARROS, David Antônio; OLIVEIRA, Stela Ramirez. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. **SAUDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 2, n. 1, 2016.

SHARIAT, Seyed; MOSTAFAVI, Seyed; KHAKPOUR, Farzad. Antioxidant Effects of Vitamins C and E on the Low-Density Lipoprotein Oxidation Mediated by Myeloperoxidase, **Iranian Biomedical Journal**, v. 17, n. 1, p. 8-22, 2013.

SIEGEL, S.; CASTELLAN, N. J. Jr. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Sinha IP, Lee A, Bennett D, McGeehan, Abrams EM, Mayell SJ, et al. The Child poverty, food insecurity, and respiratory health during the COVID-19 pandemic. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 8, 762-763, 2020.

SKOOG, Douglas; WEST, Donald; HOOLER, James; CROUCH, Stanley. **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8ª ed. norte americana: editora Thomson, 2006.

STRAATEN, Heleen; MAN, Angelique; WAARD, Monique. Vitamin C revisited. **Critical Care**, v. 18, n. 4, 2014.

VALÊCIO, Marcelo. **Como escolher um HLC para o controle de qualidade na indústria farmacêutica**. Instituto de Ciência, tecnologia e qualidade, Janeiro 2018. Disponível em: <https://ictq.com.br/industria-farmaceutica/641-como-escolher-um-hplc-para-o-controle-de-qualidade-na-industria-farmaceutica>. Acesso em: 03/03/2023.

YAO, B.B. On serum immunoglobulin A and G influenced by the intake of vitamin C after aerobic exercise exhaustion: A case study of martial arts. **Journal of Shijiazhuang University**, v. 3, p. 171-173, 2014.

ZAGO, M. A. V. As implicações do cenário pandêmico do COVID-19 frente a Segurança Alimentar e Nutricional: uma revisão bibliográfica. **Segurança Alimentar e Nutricional**, São Paulo, 2021.