

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS HIDRO E LIPOSSOLÚVEIS EM COMPRIMIDOS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC)

Giulio Demetrius Creazzo d'Oliveira

Anápolis – GO
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MOLECULARES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS HIDRO E LIPOSSOLÚVEIS EM COMPRIMIDOS
POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC)

Giulio Demetrius Creazzo d'Oliveira

Orientadora: Prof.^a Dra. Caridad Noda Pérez

Anápolis – GO

2013

Ficha Catalográfica

D'Oliveira, Giulio Demetrius Creazzo.

Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Vitaminas Hidro e Lipossolúveis em Comprimidos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) – 2013.

125 Folhas: fig., tab.

Orientador: Prof. Dra. Caridad Noda Pérez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2013.

1. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. 2. Polivitamínico. 3. Validação de Metodologia Analítica. I. Título.

Espaço reservado para a folha de aprovação.

*Aos meus pais Dimas e
Climery, minha esposa Bruna e
meus irmãos Igor, Dimas e Mônia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as portas que me foram abertas.

Aos meus pais pelo amor dispensado, educação e condições para que eu me dedicasse a isso.

Ao Igor e ao Dimas pelo auxílio.

À minha esposa Bruna por estar do meu lado nessa caminhada, me auxiliando e motivando a continuar.

À minha orientadora Dr^a. Sci. Caridad Noda Pérez por ter me aceitado em orientação apesar das adversidades.

Ao Fábio, Elvis e Cleber, meus supervisores no setor que trabalho, por terem aberto a porta para a extensão.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE VITAMINAS HIDRO E LIPOSSOLÚVEIS EM COMPRIMIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA (UPLC). O desenvolvimento e validação de metodologias analíticas voltadas para o controle de qualidade de medicamentos é um item imprescindível para seu registro e comercialização. No presente trabalho foram desenvolvidos e validados métodos cromatográficos para quantificação de vitaminas em comprimidos de polivitamínico por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência em três condições analíticas diferentes: as vitaminas tiamina, riboflavina, nicotinamida e piridoxina foram bem resolvidas em um tempo total de análise de 2,5 minutos, por eluição com gradiente, empregando a coluna Acquity UPLC BEH Amida; a análise do acetato de tocoferol foi feita por eluição isocrática, com tempo de análise de 2,5 minutos, usando uma coluna Acquity UPLC BEH C18 e a cianocobalamina foi quantificada na mesma coluna empregando outras condições de análise e tempo total da análise de 2,5 minutos. Esses tempos de análise foram inferiores quando comparados com os reportados na literatura para métodos similares. As três metodologias foram submetidas aos testes de validação e os resultados obtidos demonstram que as técnicas analíticas propostas são específicas, sensíveis, precisas, exatas e robustas para a quantificação de nicotinamida, piridoxina, riboflavina, tiamina, cianocobalamina e acetato de tocoferol em comprimidos. O trabalho foi integralmente desenvolvido no laboratório de controle de qualidade de uma indústria farmacêutica de grande porte no Distrito Agro-Industrial de Anápolis (DAIA), na qual o produto é fabricado.

Palavras chave: cromatografia líquida de ultra eficiência, polivitamínico, validação de metodologia analítica.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF WATER AND FAT SOLUBLE VITAMINS IN TABLETS BY ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC). The development and validation of analytical methodology focused on the quality control of medicines is an essential item for registration and marketing. In this work we developed and validated chromatographic methods for quantification of vitamins in multivitamins tablets by ultra performance liquid chromatography in three different analytical conditions: vitamins thiamin, riboflavin, nicotinamide and pyridoxine were well resolved in total analysis time of 2.5 minutes, by gradient elution, employing the column Acquity UPLC BEH Amide; analysis of tocopherol acetate was performed by isocratic elution, in total analysis time of 2.5 minutes, employing the column Acquity UPLC BEH C18 and cyanocobalamin was quantified in the same column employing other analytical conditions and the total analysis time was 2.5 minutes. Such analysis time was lower than those ones of similar methods reported in the literature. The three methods were subjected to validation tests and the results demonstrated that the proposed analytical techniques are specific, sensitive, accurate, exact and robust for the quantification of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin, thiamine, and cyanocobalamin tocopherol acetate in multivitamins tablets. The work was fully developed in the quality control laboratory of a large pharmaceutical industry in the Distrito Agro-Industrial Anápolis (DAIA), in which the product is manufactured.

Keywords: ultra performance liquid chromatography, multivitamin tablets, analytical methodology validation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE QUADROS	xviii
INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Vitaminas	3
1.1.1. Nicotinamida (Vitamina B ₃).....	4
1.1.2. Riboflavina (Vitamina B ₂).....	5
1.1.3. Tiamina (Vitamina B ₁)	7
1.1.4. Piridoxina (Vitamina B ₆).....	9
1.1.5. Cianocobalamina (Vitamina B ₁₂)	11
1.1.6. Acetato de Tocoferol (Vitamina E)	14
1.2. Cromatografia líquida: HPLC e UPLC.....	17
1.3. Métodos para Determinação de Vitaminas	24
1.4. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica	32
1.4.1. Especificidade.....	34
1.4.2. Linearidade	34
1.4.3. Limites de medição.....	35
1.4.4. Precisão.....	36
1.4.5. Exatidão (ou acurácia)	37
1.4.6. Estabilidade de solução	37
1.4.7. Robustez	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1. Amostra Teste e Placebo.....	39

2.2.	Reagentes	39
2.3.	Equipamentos.....	40
2.4.	Preparo das amostras	40
2.4.1.	Análise do teor de Acetato de tocoferol	40
2.4.2.	Análise do teor de Cianocobalamina	41
2.4.3.	Análise do teor das Vitaminas: Nicotinamida, Piridoxina, Riboflavina e Tiamina 41	
2.4.4.	Preparo das soluções placebo	42
2.5.	Condições Cromatográficas – análises por UPLC.....	42
2.6.	Testes para validação das metodologias de teor das vitaminas	43
2.6.1.	Adequação de sistema	43
2.6.2.	Especificidade.....	44
2.6.3.	Estabilidade das soluções	44
2.6.4.	Linearidade	44
2.6.5.	Precisão.....	45
2.6.6.	Exatidão	45
2.6.7.	Robustez	45
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
3.1.	Determinação de Nicotinamida, Piridoxina, Riboflavina e Tiamina.....	47
3.2.	Determinação de Acetato de Tocoferol	51
3.3.	Determinação de Cianocobalamina	54
3.4.	Validação das metodologias analíticas	57
3.4.1.	Adequação de Sistema.....	57
3.4.2.	Especificidade.....	58
3.4.3.	Estabilidade de Soluções	58
3.4.4.	Linearidade	61
3.4.5.	Precisão.....	68

3.4.6.	Exatidão	69
3.4.7.	Robustez das metodologias analíticas	72
4.	CONCLUSÕES	73
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
6.	ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da nicotinamida.	4
Figura 2 - Estrutura molecular da riboflavina.....	5
Figura 3 - Estrutura molecular da tiamina.	7
Figura 4 - Estrutura molecular da piridoxina.....	9
Figura 5 - Estrutura molecular genérica da cobalamina.	12
Figura 6 - Estrutura genéricas dos derivados de tocol.....	14
Figura 7 - Estrutura genérica dos derivados de tocotrienol.	15
Figura 8 - Estrutura molecular do acetato de tocoferol.	17
Figura 9 - Esquema dos componentes e funcionamento de um HPLC.	18
Figura 10 - Esquema do modo como ocorre a retenção dos diversos componentes contidos na amostra.	18
Figura 11 - Esquema de como se dá a formação do cromatograma.	19
Figura 12 - Ilustração da contribuição de cada termo da Equação de Van Deemter para a curva real da eficiência em função do fluxo linear.....	20
Figura 13 - Comparação do efeito dos caminhos múltiplos entre um empacotamento de partículas com tamanho uniforme e de outro empacotamento contendo partículas de tamanho desuniforme.	21
Figura 14 - Efeito da diminuição do tamanho das partículas de sílica na curva da equação de Van Deemter.....	22
Figura 15 – Cromatograma de método desenvolvido para análise de ingrediente ativo por HPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).....	23
Figura 16 - Cromatograma de método desenvolvido para análise de ingrediente ativo por UPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).....	23
Figura 17 - Cromatograma da análise de derivados de ácido cafeínico separado a partir de um derivado de Echinacea purpúrea por HPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).	24
Figura 18 - Cromatograma da análise de derivados de ácido cafeínico é separado a partir de um derivado de Echinacea purpúrea por UPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).	24
Figura 19 - Espectros extraídos das análises cromatográficas em Arranjo de Fotodiodo referente às vitaminas nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina.	49

Figura 20 - Cromatogramas das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina.....	50
Figura 21 - Cromatogramas de varredura dos espectros das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina.	51
Figura 22 - Espectro extraídos das análises cromatográficas em Arranjo de Fotodiodo referente ao acetato de tocoferol.....	52
Figura 23 - Cromatogramas das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de acetato de tocoferol.....	53
Figura 24 - Cromatogramas de varredura dos espectros das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de acetato de tocoferol.....	54
Figura 25 - Espectro extraído das análises cromatográficas em Arranjo de Fotodiodo referente à cianocobalamina.	56
Figura 26 - Cromatogramas das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de cianocobalamina.	56
Figura 27 - Cromatogramas de varredura dos espectros das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de cianocobalamina.	57
Figura 28 - Esquema da degradação do anél tiazolio da tiamina em pH básico. O equilíbrio é deslocado para a direita.	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Estabilidade das soluções analíticas de nicotinamida (% x horas).....	59
Gráfico 2 - Estabilidade das soluções analíticas de piridoxina (% x horas).....	59
Gráfico 3 - Estabilidade das soluções analíticas de riboflavina (% x horas).....	59
Gráfico 4 - Estabilidade das soluções analíticas de tiamina (% x horas).	60
Gráfico 5 - Estabilidade das soluções analíticas de acetato de tocoferol (% x horas)..	60
Gráfico 6 - Estabilidade das soluções analíticas de cianocobalamina (% x horas).	60
Gráfico 7 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Nicotinamida	62
Gráfico 8 - Distribuição dos erros residuais - Nicotinamida	62
Gráfico 9 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Piridoxina.	63
Gráfico 10 - Distribuição dos erros residuais - Piridoxina.	63
Gráfico 11 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Riboflavina.	64
Gráfico 12 - Distribuição dos erros residuais - Riboflavina.	64
Gráfico 13 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Tiamina.....	65
Gráfico 14 - Distribuição dos erros residuais - Tiamina.....	65
Gráfico 15 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Acetato de Tocoferol.	66
Gráfico 16 - Distribuição dos erros residuais - Acetato de Tocoferol.....	66
Gráfico 17 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Cianocobalamina.	67
Gráfico 18 - Distribuição dos erros residuais - Cianocobalamina.....	67
Gráfico 19 - Representação gráfica dos valores da recuperação - nicotinamida.	70
Gráfico 20 - Representação gráfica dos valores da recuperação - piridoxina.	70
Gráfico 21 - Representação gráfica dos valores da recuperação - riboflavina.	70
Gráfico 22 - Representação gráfica dos valores da recuperação - tiamina.....	71
Gráfico 23 - Representação gráfica dos valores da recuperação - acetato de tocoferol.	71
Gráfico 24 - Representação gráfica dos valores da recuperação - cianocobalamina....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise do desvio padrão relativo (DPR) residual.	68
Tabela 2 - Resultados das precisões - Desvio padrão de múltiplas preparações.	69
Tabela 3 - Recuperação das vitaminas no teste de exatidão.	69
Tabela 4 - Resultados de adequação do sistema - Nicotinamida.	80
Tabela 5 - Resultados de adequação do sistema - piridoxina.	80
Tabela 6 - Resultados de adequação do sistema - riboflavina.	80
Tabela 7 - Resultados de adequação do sistema - tiamina.	80
Tabela 8 - Resultados de adequação do sistema - acetato de tocoferol.	80
Tabela 9 - Resultados de adequação do sistema - cianocobalamina.	81
Tabela 10 - Resultados de especificidade/seletividade - Nicotinamida.	81
Tabela 11 - Resultados de especificidade/seletividade - piridoxina.	81
Tabela 12 - Resultados de especificidade/seletividade - riboflavina.	81
Tabela 13 - Resultados de especificidade/seletividade - tiamina.	81
Tabela 14 - Resultados de especificidade/seletividade - acetato de tocoferol.	82
Tabela 15 - Resultados de especificidade/seletividade - cianocobalamina.	82
Tabela 16 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo – nicotinamida.	82
Tabela 17 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - piridoxina.	82
Tabela 18 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - riboflavina.	82
Tabela 19 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - tiamina.	82
Tabela 20 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - acetato de tocoferol.	83
Tabela 21 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo – cianocobalamina.	83
Tabela 22 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - nicotinamida.	83
Tabela 23 - Regressão linear dos dados da linearidade - Nicotinamida.	83
Tabela 24 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Nicotinamida.	84

Tabela 25 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Piridoxina.	84
Tabela 26 - Regressão linear dos dados da linearidade - Piridoxina.	85
Tabela 27 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Piridoxina.	85
Tabela 28 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Riboflavina.	85
Tabela 29 - Regressão linear dos dados da linearidade - Riboflavina.	86
Tabela 30 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Riboflavina.	86
Tabela 31 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Tiamina.	86
Tabela 32 - Regressão linear dos dados da linearidade - Tiamina.	87
Tabela 33 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Tiamina.	87
Tabela 34 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Acetato de Tocoferol.	88
Tabela 35 - Regressão linear dos dados da linearidade - Acetato de Tocoferol.	88
Tabela 36 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Acetato de Tocoferol.	88
Tabela 37 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Cianocobalamina.	89
Tabela 38 - Regressão linear dos dados da linearidade - Cianocobalamina.	89
Tabela 39 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Cianocobalamina.	89
Tabela 40 - Resultados de precisão - repetibilidade - Nicotinamida (1° dia - Analista 1).	90
Tabela 41 - Resultados de precisão - repetibilidade - Nicotinamida (2° dia - Analista 2).	90
Tabela 42 - Resultados de precisão intermediária - Nicotinamida.	91
Tabela 43 - Resultados de precisão - repetibilidade - Piridoxina (1° dia - Analista 1).	91
Tabela 44 - Resultados de precisão - repetibilidade - Piridoxina (2° dia - Analista 2).	91
Tabela 45 - Resultados de precisão intermediária - Piridoxina.	92

Tabela 46 - Resultados de precisão - repetibilidade - Riboflavina (1° dia - Analista 1).	92
.....	
Tabela 47 - Resultados de precisão - repetibilidade - Riboflavina (2° dia - Analista 2).	92
.....	
Tabela 48 - Resultados de precisão intermediária - Riboflavina.	93
Tabela 49 - Resultados de precisão - repetibilidade - Tiamina (1° dia - Analista 1)....	93
Tabela 50 - Resultados de precisão - repetibilidade - Tiamina (2° dia - Analista 2)....	93
Tabela 51 - Resultados de precisão intermediária - Tiamina.....	94
Tabela 52 - Resultados de precisão - repetibilidade - Acetato de Tocoferol (1° dia - Analista 1).	94
Tabela 53 - Resultados de precisão - repetibilidade - Acetato de Tocoferol (2° dia - Analista 2).	94
Tabela 54 - Resultados de precisão intermediária - Acetato de Tocoferol.....	95
Tabela 55 - Resultados de precisão - repetibilidade - Cianocobalamina (1° dia - Analista 1).	95
Tabela 56 - Resultados de precisão - repetibilidade - Cianocobalamina (2° dia - Analista 2).	95
Tabela 57 - Resultados de precisão intermediária - Cianocobalamina.....	96
Tabela 58 - Exatidão (grau de recuperação) - nicotinamida.....	96
Tabela 59 - Exatidão (grau de recuperação) - piridoxina.	96
Tabela 60 - Exatidão (grau de recuperação) - riboflavina.	97
Tabela 61 - Exatidão (grau de recuperação) - tiamina.....	97
Tabela 62 - Exatidão (grau de recuperação) - acetato de tocoferol.	98
Tabela 63 - Exatidão (grau de recuperação) - cianocobalamina.....	98
Tabela 64 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Nicotinamida.	98
Tabela 65 - Robustez - Resultados da variação na composição da fase móvel - Nicotinamida.	99
Tabela 66 - Robustez - Resultados da variação de diferentes lotes de coluna - Nicotinamida.	99
Tabela 67 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Nicotinamida.	99
Tabela 68 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Nicotinamida.	100
.....	

Tabela 69 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Piridoxina.	100
Tabela 70 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Piridoxina.	100
Tabela 71 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Piridoxina.	101
Tabela 72 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Piridoxina.	101
Tabela 73 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Piridoxina.	101
Tabela 74 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Riboflavina.	102
Tabela 75 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Riboflavina.	102
Tabela 76 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Riboflavina.	102
Tabela 77 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Riboflavina.	102
Tabela 78 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Riboflavina.	103
Tabela 79 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Tiamina.	103
Tabela 80 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Tiamina.	103
Tabela 81 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Tiamina.	104
Tabela 82 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Tiamina.	104
Tabela 83 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Tiamina.	104
Tabela 84 - Robustez - Variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Acetato de Tocoferol.	105
Tabela 85 - Robustez - Variação de lotes de coluna - Acetato de Tocoferol.	105
Tabela 86 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Acetato de Tocoferol.	105
Tabela 87 - Robustez - Variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Cianocobalamina.	106
Tabela 88 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Cianocobalamina.	106
Tabela 89 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Cianocobalamina.	106
Tabela 90 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Cianocobalamina.	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nome dos tocóis e tocoferóis segundo os seu radicais.....	15
Quadro 2 - Atividade de vitamina E de diversos tocoferóis e tocotrieno.....	15
Quadro 3 - Características do desempenho analítico.....	33
Quadro 4 - Faixas recomendadas para o teste de linearidade (em preparações farmacêuticas).....	35
Quadro 5 - Reagentes usados e os respectivos fabricantes.....	40
Quadro 6 - Variação das condições empregada na avaliação da robustez.....	46

INTRODUÇÃO

O conhecimento da existência de substâncias indispensáveis na nossa alimentação que estão fora do grupo daquelas que devem ser consumidas em grande quantidade (proteínas, carboidratos, lipídios, minerais e água) consistiu num marco para a área da nutrição e por sua vez da saúde. Dentre essas substâncias estão as vitaminas, e os primeiros indícios de suas existências se deram no período das grandes navegações. Por causa das viagens longas, a tripulação era submetida a uma dieta pobre, sem frutas, verduras e perecíveis em geral, e por isso desenvolviam doenças mesmo alimentando-se bem do que tinham disponível. Na época conseguiram relacionar tais doenças com essa alimentação pobre.

Os avanços das ciências básicas no século XIX tornaram viável a descoberta das vitaminas, suas principais fontes, muitas doenças relacionadas à sua carência, e por fim o estabelecimento de suplementos artificiais que possam complementar a ingestão de tais compostos. As vitaminas são empregadas para tratar sintomas de escassez por mau hábito do indivíduo, por decorrência de alguma doença que debilite sua absorção normal, ou mesmo quando por outros motivos é obrigado a seguir uma dieta restrita por um período. Para esses fins as vitaminas podem ser comercializadas em diversas formas farmacêuticas, isoladas ou combinadas na formulação, e com diferentes prescrições de aplicação.

Para confirmar a segurança e eficácia dos produtos comercializados, os fabricantes devem avaliar *in vitro* as suas características físico-químicas, com uma amostragem relevante e procedimentos cuja veracidade seja previamente comprovada por meio de estudos. Dentre esses procedimentos se destaca o teste de determinação da quantidade de ativos, nesse caso vitaminas, a fim de assegurar ao consumidor a identidade, qualidade e segurança do produto adquirido.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *high-performance liquid chromatography*) em fase reversa e detecção UV/VIS é comumente usada como técnica analítica para a quantificação de vitaminas em formulações de polivitamínicos. Alguns métodos de análise por HPLC foram relatados para a determinação simultânea de diversas vitaminas hidro e lipossolúveis, somente de algumas hidrossolúveis, somente de lipossolúveis, ou de cada vitamina isoladamente. No entanto, esses métodos possuem algumas desvantagens, como: (a) tempos de análise cromatográfica da ordem de 30 minutos, (b) separação incompleta de algumas vitaminas, (c) emprego de pareadores iônicos e sais inorgânicos, que são incompatíveis com a detecção por espectrometria de massa, (d) além de

não terem sido devidamente validados em muitos casos. A inexistência de um método descrito na literatura no qual essas desvantagens não estejam presentes e que pudesse ser aplicado a uma formulação específica de polivitamínicos motivou o desenvolvimento da atual pesquisa.

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram desenvolver e validar métodos analíticos para o controle de qualidade de uma formulação de polivitamínico composta por nicotinamida, piridoxina, riboflavina, tiamina, cianocobalamina e acetato de tocoferol. Para aperfeiçoar o tempo de análise cromatográfica ao mínimo empregou-se a análise por cromatografia líquida de ultra performance (*Ultra-performance liquid chromatography – UPLC*); e somente aditivos de fase móvel compatíveis com a detecção por espectrometria de massa foram usados para que haja a possibilidade do emprego dessa técnica ao método.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Vitaminas

As vitaminas são nutrientes requeridos em muitas funções fisiológicas essenciais para a vida. Como suas aplicações são altamente específicas, são requisitadas em pouquíssimas quantidades para o funcionamento normal do organismo. Muitas vitaminas funcionam como cofatores (isto é, substâncias necessárias para o funcionamento de enzimas), por exemplo: all-trans retinol (vitamina A), vitaminas K₁, K₂ e K₃, ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina, piridoxina (vitamina B₆), biotina (vitamina H), ácido pantotênico, folato, cianocobalamina (vitamina B₁₂) e acetato de tocoferol (vitamina E). Enquanto outras atuam como antioxidantes: vitaminas E e C. Duas vitaminas funcionam como hormônio (vitaminas A e D), e uma age como cofator de fotorecepção na visão (vitamina A) (COMBS, 2008).

A concepção moderna de vitamina engloba moléculas que possuem as seguintes características:

- compostos orgânicos distintos das gorduras, carboidratos e proteínas;
- componente natural de alimentos, nos quais estão presentes em mínimas quantidades;
- fundamentais em quantidades mínimas, para o funcionamento normal das funções fisiológicas;
- sua ausência, ou baixo consumo, causa síndromes de deficiência específicas;
- não é sintetizada pelo hospedeiro em quantidades adequadas.

Nesse sentido, algumas moléculas podem ser vitaminas para umas espécies e não ser para outra que tenha um mecanismo de síntese. O ácido ascórbico, por exemplo, pode ser sintetizado pela maioria das espécies. Somente as espécies que não possuem a enzima L-gulonolactona oxidase, é o caso do homem, são incapazes de sua autoprodução (COMBS, 2008).

Além disso, uma molécula pode atuar como vitamina apenas em determinadas condições ambientais e dietas específicas. A vitamina D, por exemplo, é considerada vitamina para o homem apenas quando o indivíduo despense a maior parte do seu tempo confinado, sem exposição à luz ultravioleta, nesse caso requerendo a ingestão de fontes desta vitamina por meio da alimentação (COMBS, 2008).

1.1.1. Nicotinamida (Vitamina B₃)

Nicotinamida, niacinamida e 3-piridincarboxamida são sinônimos. Esta substância no estado puro é um pó branco, com odor característico fraco, solúvel em água (cerca de 70 g/100 mL a 20 °C) e etanol, solúvel em glicerol e levemente solúvel em éter (BASF, 2003). A estrutura molecular da nicotinamida é apresentada na Figura 1.

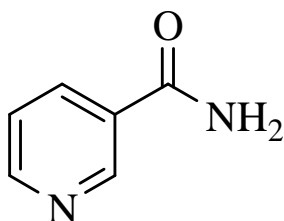


Figura 1 - Estrutura molecular da nicotinamida.

A nicotinamida é muito estável em alimentos, em presença do oxigênio atmosférico, aquecimento e luz, tanto no estado sólido quanto em solução aquosa, e por isso é usada tanto em formas farmacêuticas líquidas como em sólidas (BASF, 2003).

A nicotinamida, o ácido nicotínico e diversas moléculas derivadas dessas duas, fazem parte das chamadas niacinas (COMBS, 2008). Estas substâncias são em geral essenciais na formação das coenzimas nicotinamida adenosina dinucleotídeo (NAD) e nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADP), nas quais a nicotinamida age como um doador de elétrons em muitas reações biológicas redox. Estão envolvidos na geração de energia a partir de carboidratos, proteínas e lipídeos, e em reações não redox envolvendo o reparo do DNA (ANYAKORA, AFOLAMI, *et al.*, 2008).

Gazanion investigou a atividade de nicotinamida isoladamente e em associação com outras drogas já empregadas no tratamento de várias formas de Leishmaniose. Quando usado em concentrações inferiores a 20 mmol/L no meio de cultura a nicotinamida apresentou atividade antileishmanial, enquanto que seu uso em concentrações superiores induziram à morte do parasita. O efeito da combinação da vitamina com as drogas antimônio pentavalente (SbV), tartarato de potássio e antimônio tri-hidrato (SbIII), pentamida e anfotericina também foi estudado e os resultados mostram que a SbV e a SBIII apresentam um sinergismo moderado, isto é, aumentam significativamente a atividade dessas drogas contra parasitas intracelular. A pentamida apresentou um efeito antagonista com relação à presença de nicotinamida, e a anfotericina mostrou apenas um efeito de atividade aditivo. Essas

associações são importantes porque apresentam alternativas para a redução do custo, da toxicidade e da duração do tratamento (GAZANION, VERGNES, *et al.*, 2011).

Todos os vegetais e animais podem ser fontes da nicotinamida, que ocorre como NAD e NADP devido a sua função tão geral. Fontes ricas das niacinas são os fermentos, vísceras (rins, fígado e coração), assim como o músculo e a farinha integral (BASF, 2003). A niacina não é uma vitamina clássica, uma vez que o corpo pode sintetizar parte da demanda diária a partir do aminoácido essencial triptofano. Apenas se a dieta de nicotinamida e triptofano forem insuficientes é que irão aparecer os sintomas (COMBS, 2008).

A deficiência de nicotinamida é a causa principal da doença pelagra, que têm entre seus sintomas a demência de todos os tipos (inclusive Parkinson), atraso no desenvolvimento infantil, envelhecimento precoce, e manifestações intestinais e na pele devido a infecções crônicas. A pelagra também aumenta o risco de desenvolvimento de câncer, o que está ligado à função da nicotinamida no reparo do DNA (WILLIAMS, 2011).

1.1.2. Riboflavina (Vitamina B₂)

A riboflavina pura é um sólido cristalino de cor amarelo-alaranjado, com um odor suave. Apresenta solubilidade em água bastante limitada (70-80 mg/L), e é praticamente insolúvel em etanol, acetona e éter. Em solução alcalina é solúvel. A solução aquosa neutra de riboflavina apresenta coloração intensa de amarela a verde fluorescente (BASF, 2003). Na Figura 2 se apresenta a estrutura molecular da riboflavina.

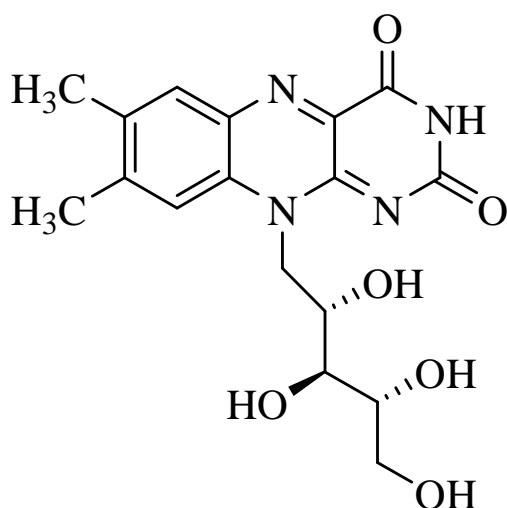


Figura 2 - Estrutura molecular da riboflavina.

A riboflavina é bastante estável na forma sólida pura se devidamente armazenada, e também em solução ácida na ausência de luz, mesmo se aquecida. Contudo, a riboflavina é

sensível em meios alcalinos, na presença de sais de metais pesados e exposta à luz. Sua aplicação geralmente está limitada a comprimidos e fortificantes em pó ou granulados (BASF, 2003).

Como flavina mononucleotídeo (FMN), ou como flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a riboflavina (também chamada de lactoflavina) é a coenzima para uma ampla variedade de enzimas respiratórias, conhecidas como flavoproteínas (ANYAKORA, AFOLAMI, *et al.*, 2008).

Algumas flavoproteínas desempenham um papel na transferência de átomos de hidrogênio na geração oxidativa de energia dentro das células, conhecidas como cadeia respiratória. Sendo assim, a riboflavina, bem como outras vitaminas do complexo B, agem como coenzimas no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos e na geração de energia via ATP. A riboflavina também está envolvida no metabolismo de outras vitaminas do complexo B e na produção de hormônio no córtex adrenal (BASF, 2003). Delgadillo e Ayala demonstraram que a riboflavina atua na formação da dentição em vertebrados. No trabalho desenvolvido por sua equipe ficou constatado que a ausência total de riboflavina na dieta materna de ratas provocou defeitos nos tecidos dento-alveolar durante o desenvolvimento dos embriões (DELGADILLO e AYALA, 2009).

Anand reportou um caso em que o quadro clínico da síndrome de Brown-Vialetto-Van Laere (BVVLS), uma condição genética causada por uma mutação no gene C20orf54, apresentou melhoras significativas após a administração de altas doses de riboflavina (150 mg duas vezes ao dia) a uma menina de 22 meses que apresentava essa síndrome. A autora sugeriu então que em todos os casos que essa síndrome for diagnosticada deveria ser considerado o tratamento com altas doses de riboflavina. Segundo a autora parte dos sintomas da BVVLS são devidos ao transporte deficiente de riboflavina pelo intestino (ANAND, HASAN, *et al.*, 2011).

A riboflavina ocorre na forma livre ou como FMN, em todos os organismos vegetais e animais. Fontes ricas desta vitamina incluem fermentados, leites e derivados do leite, ovos, carne (particularmente as vísceras), peixe, repolho, feijão e ervilha. Em grãos é encontrada principalmente no germe e na camada aleurona, de tal forma que a farinha branca, contém apenas o terço de riboflavina do total do grão. A maioria das frutas e dos vegetais contém pouca quantidade de riboflavina (COMBS, 2008).

1.1.3. Tiamina (Vitamina B₁)

A tiamina é uma molécula carregada positivamente, por este motivo encontra-se no mercado nas formas de sais de nitrato ou cloreto. Ambas as formas são pós quase branco e com leve odor característico. O hidrocloreto de tiamina é muito solúvel em água (aproximadamente 100 g em 100 ml de água a 25 °C), solúvel em glicerol, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter, acetona, tolueno e clorofórmio. O nitrato de tiamina é solúvel em água fervente e menos solúvel em água fria (3 g em 100 ml a 25 °C) (BASF, 2003). A estrutura molecular da tiamina é mostrada na Figura 3.

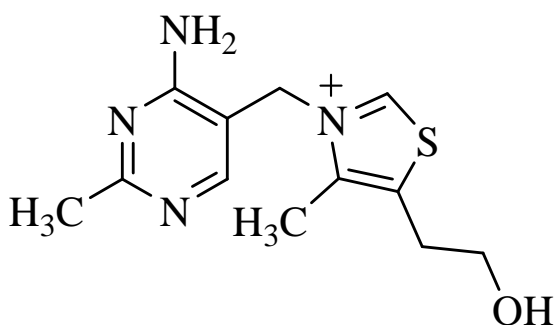


Figura 3 - Estrutura molecular da tiamina.

A resistência ao aquecimento e presença de oxigênio é melhor em soluções ácidas (valores de pH menor que 4,5) do que em soluções neutras ou alcalinas, onde decompõem muito rápido, particularmente sob influência da luz. Agentes oxidantes e redutores em solução também aceleram a decomposição da tiamina em solução (BASF, 2003).

A forma hidrocloreto pode ser usada em quase todas as apresentações (preparações na forma de cápsulas, comprimidos e drágeas, comprimidos efervescentes, granulados, xaropes, soluções, etc) com propósitos preventivos e terapêuticos. Em preparações líquidas é preferível a que o nitrato de tiamina devido a sua melhor solubilidade em água. Ao passo que a forma nitrato é preferível em formas sólidas, devido a que o baixo conteúdo de água que o material sólido pode absorver confere maior estabilidade (BASF, 2003).

Na sua forma biológica ativa, tiamina difosfato (thiamine diphosphate – TDP), a tiamina desempenha um papel importante como coenzima em reações chaves para converter lipídios e carboidratos em energia (VIÑAS e LÓPEZ, 2012). A tiamina também têm certas funções no sistema nervoso central, na geração de impulsos e na regeneração de nervos periféricos (LU e FRANK, 2008).

A tiamina pode ser encontrada em alimentos vegetais e animais, embora em diferentes formas e em pequenas quantidades. Nos tecidos animal está presente principalmente como TDP, que deve ser previamente clivada antes que possa ser absorvida pelos organismos. As plantas contém a forma livre, não fosfatada, da vitamina, diretamente disponível (BALL, 2004).

Cereais e seus derivados são as principais fontes dessa vitamina para o homem. Como a riboflavina, a tiamina está mais concentrada nos germes e na camada aleurona (ou tegumento, é uma fina camada que reveste a amêndoa ou endosperma), de tal forma que no arroz polido e na farinha branca está presente em poucas quantidades. Boas fontes dessas vitaminas são a farinha integral e produtos derivados, batatas, leguminosas, carne de porco, leite e derivados (VIÑAS e LÓPEZ, 2012).

A falta da vitamina B₁ pode se manifestar em dois conjuntos diferentes de sintomas, relacionados às suas duas principais funções bioquímicas (BASF, 2003):

- Desordem cardiovascular como a dispneia, aperto no peito, dor precordial, taquicardia, edema, alterações no eletrocardiograma e quedas repentinas na pressão sanguínea.
- Desordem neurológica como as desordens nervosas com parestesia, hiperestesia ou anestesia, sensação de ardência nos pés, fraquezas musculares, dores, cólicas, paralisias, desordem na coordenação de origem cerebral, alterações psicológicas como irritabilidade, lassitude, depressão, e ansiedade.

A manifestação clínica da carência de tiamina, conhecida como beribéri, se caracteriza por uma maciça disfunção neurológica, desgastes dos músculos esqueléticos, fraqueza nos músculos do coração e edema, ambos juntos ou separadamente, dependendo do avanço da doença e da deficiência de outros nutrientes. O beribéri ainda é bastante frequente em países subdesenvolvidos, sendo a maior causa de mortalidade infantil em populações asiáticas, mas muito raro em países mais ricos (KAUFFMAN, COATS, *et al.*, 2012).

Coats e colaboradores avaliaram se o diagnóstico clínico em 27 casos de beribéri foi verdadeiramente associado com os níveis de tiamina difostato (TDP) no sangue de crianças e se essa deficiência poderia ter relação com os níveis sanguíneos de metais pesados (chumbo, arsênico, cádmio, mercúrio e tálio) encontrados nos mesmos indivíduos ou com hábitos alimentares regionais. O estudo envolveu além dos 27 casos de diagnóstico de beribéri no Camboja e suas mães, 27 crianças saudáveis e suas respectivas mães, também Cambojanas, e

20 crianças saudáveis e suas mães residentes na cidade Olmsted, em Minnesota (EUA). Os resultados do estudo mostraram que as crianças do Camboja, principalmente as diagnosticadas com beribéri, apresentaram níveis de TDP marcadamente menores que as crianças dos EUA. Essa tendência também foi observada em suas respectivas mães. Os resultados também mostram que não há qualquer relação entre os níveis de metal pesado no sangue dos indivíduos com quadro clínico do beribéri, mas sim com a insuficiência alimentar (COATS, SHELTON-DODGE e OU, 2012).

A doença pode ainda ter outras causas como o alcoolismo crônico, dietas de redução de peso e dietas com altas proporções de carboidratos, insuficiências gástricas ou abuso de antiácidos, o uso de contraceptivos orais e doenças como diabetes mellitus, Alzheimer e AIDS (BASF, 2003). Antagonistas da tiamina presentes em tanino (chá), café, noz de betel, bem como tiaminases presentes em fermentados de peixe, podem bloquear a absorção de tiamina, bem como sua biodisponibilidade (COATS, SHELTON-DODGE e OU, 2012).

1.1.4. Piridoxina (Vitamina B₆)

A vitamina B₆ é o nome que abrange piridoxina, piridoxal e piridoxamina, bem como as formas fosfatadas. A piridoxina está disponível no mercado na forma hidrocloreto, sendo um pó cristalino sem cheiro, solúvel em água (20 g por 100 ml a 25 °C), pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter, clorofórmio e acetona (BASF, 2003). A estrutura molecular da piridoxina se apresenta na Figura 4.

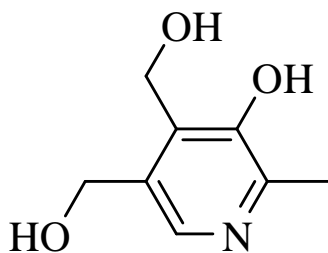


Figura 4 - Estrutura molecular da piridoxina.

A piridoxina é muito estável no estado puro cristalino, em misturas secas (por exemplo, comprimidos) e em soluções. Esta substância é resistente ao aquecimento na presença de bases e ácidos, mas degrada pela ação da luz em soluções neutras e alcalinas. Não é aconselhável que haja combinação de ferro na formulação, pois a piridoxina tende a se complexar com esse metal. A piridoxina pode ser usada em praticamente todas as formas de dosagem com propósitos terapêuticos e preventivos (BASF, 2003).

Na forma de coenzimas, piridoxal-5-fosfato (PLP) e piridoxamina-fosfato (PMP), a vitamina B₆ desempenha um papel chave no metabolismo dos aminoácidos (SINGH, POON e ENGMAN, 2013). Esta vitamina é necessária no sistema nervoso central como coenzima para a síntese de aminas biogênicas. Também desempenha um papel importante no metabolismo dos carboidratos, especialmente no desprendimento de glicose do glicogênio, e influencia na conversão de aminoácido, triptofano a niacina, na biossíntese de porfirina, em certas funções no sistema nervoso e na síntese de hemoglobina (BASF, 2003). Há pelo menos 100 reações dependentes de piridoxal fosfato no ser humano (BOWLING, 2011).

A ocorrência da piridoxina nos reinos vegetal e animal é muito ampla, sendo encontradas em altas concentrações principalmente nas vísceras e laticínios. Alimentos vegetais, tais como, batata, legumes, bananas, couve e alface também são boas fontes de piridoxina. Nos vegetais a vitamina B₆ pode estar presente na forma de piridoxina glicosídica, que possui uma bioavaliabilidade reduzida por causa da necessidade de ser previamente hidrolisada por uma glicosidase intestinal para ser absorvida. Gorduras, óleos e açúcar não contém vitamina B₆ (BASF, 2003) (BOWLING, 2011).

A deficiência isolada de vitamina B₆ é muito rara em humanos, em vista que se há escassez dessa, a deficiência de outras vitaminas do complexo B estão associadas e os sintomas de deficiência dessas outras vitaminas já estão presentes no indivíduo. Os sintomas típicos incluem a pelagra; dermatite seborroica nas regiões do nariz, boca e olhos; inflamações na boca e nos lábios; insônia; desordens nervosas; irritabilidade; cólicas de origem cerebral em bebês; anemia hipocrômica; aumento da eliminação renal de ácido oxálico acompanhada da formação de pedras no trato urinário eferente. As deficiências de piridoxina geralmente estão associadas a uma dieta pobre por um longo período de tempo, à hemodiálise, ao uso de algumas drogas continuamente, ao alcoolismo crônico e a várias desordens metabólicas e intestinais (BALL, 2004).

Outra circunstância que a deficiência pode ocorrer é durante a gravidez e a lactação. Nesses períodos o organismo requer maiores quantidades de piridoxina e o consumo deve ter um aumento proporcional. Por isso a quantificação de vitamina B₆ (e os compostos relacionados a ela) em leite humano, tem sido extensamente estudada, especialmente porque o leite é a única fonte de nutrientes para crianças de até 4-6 meses de idade (YAGI, IWAMOTO, *et al.*, 2013).

1.1.5. Cianocobalamina (Vitamina B₁₂)

Vitamina B₁₂ (Cobalamina) é um termo coletivo que abrange um conjunto de compostos que possui um átomo de cobalto no centro de um sistema de anel do tipo porfirina, mas que possuem diferentes substituintes. Seis formas de cobalamina (cianocobalamina, hidroxocobalamina, cobalamina R, cobalamina S, metilcobalamina e adenosilcobalamina) demonstraram atividade de vitamina B₁₂ nos organismos humanos (BASF, 2003).

A cianocobalamina cristaliza facilmente em agulhas vermelho escuras insípidas e inodoras, é muito solúvel em água, em álcool, insolúvel em éter, acetona e clorofórmio, e funde numa faixa de 210 a 220 °C com decomposição. Os cristais são bastante higroscópicos e podem absorver até cerca de 12% de água da atmosfera. A cianocobalamina se decompõe em soluções básicas, ou fortemente ácidas, ou na presença de agentes redutores, e, quando exposta à radiação UV, em soluções neutras e ligeiramente ácidas, mas é relativamente estável na presença de oxigênio atmosférico ou submetida a aquecimento. Em solução aquosa é mais estável numa faixa de pH de 4,5 a 5,0. A estrutura molecular genérica das cobalaminas se apresenta na Figura 5. A cianocobalamina, especificamente, tem na posição do radical R um grupo ciano (–CN).

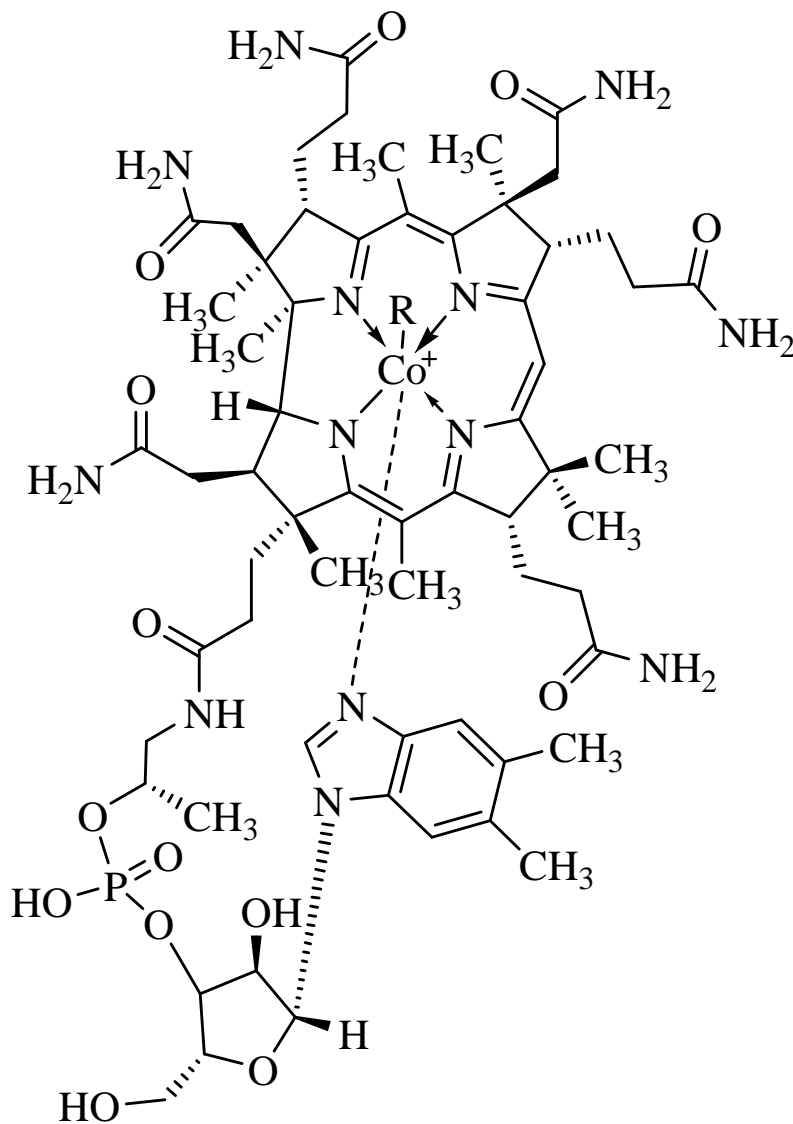


Figura 5 - Estrutura molecular genérica da cobalamina.

As vitaminas provenientes da dieta são convertidas em suas formas ativas – as coenzimas adenosilcobalamina e metilcobalamina. A primeira é responsável pelo rearranjo intramolecular de grupos alquil e na degradação de ácidos adiposos bifurcados e de número ímpar, bem como de certos aminoácidos (COMBS, 2008). Já a metilcobalamina desempenha um papel importante na transferência de grupos metil na síntese do aminoácido metionina a partir da homocisteína, que algumas vezes depende da presença de folatos, na mitocôndria das células. Assim, a vitamina B₁₂ também desempenha um papel importante na conversão, transporte e estocagem das formas do ácido fólico em suas formas ativas, que são requeridos na hemogênese (BASF, 2003). Também está indiretamente envolvida na síntese de ácidos nucleicos, e proteínas via biossíntese de bases púricas e pirimídicas, e de metionina, com um importante papel no crescimento e processos de desenvolvimento (BASF, 2003).

A cobalamina ocorre apenas em alimentos de origem animal. As maiores quantidades são encontradas no fígado. Outras fontes de vitamina B₁₂ incluem substâncias musculares, peixe, gema de ovo, leite e queijo (BALL, 2004) (CASTELLI, WONG, *et al.*, 2011). Alimentos de origem vegetal, podem apenas conter traços dessa vitamina se forem submetidas à fermentação bacteriana, como no caso de bebidas fermentadas. Assim, uma dieta estritamente vegetariana está quase totalmente livre dessa vitamina (CASTELLI, WONG, *et al.*, 2011).

A baixa ingestão de cobalamina na dieta é extremamente rara. Os sintomas de deficiência geralmente ocorrem em desordens orgânicas que levam ao impedimento da absorção dessa vitamina pelo organismo. Dentre essas desordens se destacam a baixa acidez estomacal (isto é, ausência de ácido clorídrico), atrofia da mucosa gástrica ou cirurgia que levem à diminuição do fator intrínseco (IF), formação de anticorpos contra o IF ou contra o complexo IF-B₁₂, presença de certas bactérias ou parasitas no trato gastrointestinal, desordens no fígado que reduzem o estoque de vitaminas B₁₂ e desordens metabólicas intracelular com formação inadequada das formas da vitamina com atividade (CASTELLI, WONG, *et al.*, 2011).

Castelli e colaboradores pesquisaram a farmacocinética e tolerabilidade de duas formulações de cianocobalamina, uma amostra de mercado e uma amostra formulada com N-[8-(2-hidroxi-benzoil)amino]caprilato de sódio (SNAC), para estabelecer a viabilidade do uso desse melhorador de absorção. Os resultados mostram que há um aumento significativo da média absoluta de bioavaliabilidade com relação à amostra comercial (5,09% vs 2,16%, respectivamente), e uma diminuição do tempo máximo de disponibilidade (T_{máx}) (0,5 horas vs 6,83 horas, respectivamente). A formulação de cianocobalamina/SNAC foi bem tolerada, e não foram reportados efeitos adversos (CASTELLI, WONG, *et al.*, 2011).

Os sintomas de deficiência de cianocobalamina consistem nos seguintes:

- Anemia megaloblástica – formação defeituosa das células na medula óssea conduz a essa anemia, com supercrescimento característicos dos corpúsculos vermelhos do sangue;
- Desordens neurológicas – um sério resultado da deficiência de vitamina B₁₂ é a degeneração de certas áreas do cordão espinhal, que é frequentemente irreversível e pode causar danos permanentes no sistema nervoso, caracterizado pelo despreendimento da mielina, necrose de células do cordão espinhal e do córtex

cerebral. Tais desordens são acompanhadas de formigamento das mãos e pés, perda do tato, dos movimentos de reflexo, da memória e do poder visual, confusões, mudanças de caráter, alucinações e psicoses (BASF, 2003). O déficit de cianocobalamina pode simular uma enfermidade de Creutzfeldt-Jakob, com combinação variável de demência, ataxia, mioclonías, e sinais piramidais e extrapiramidais (ORTIZ, SIMÓN, *et al.*, 2011).

1.1.6. Acetato de Tocoferol (Vitamina E)

A vitamina E é essencial para os processos metabólicos da respiração e metabolismo de ácidos nucleicos em todas as células; muito atuante naquelas do sistema nervoso. A vitamina E desempenha um importante papel como agente antioxidante contra radicais livres na proteção de lipídios e da vitamina A. O antioxidante lipossolúvel de ocorrência natural mais ativo é a vitamina E (KRUMOVA, FRIEDLAND e COSA, 2012)) e da vitamina A. Nessa função também estão a vitamina C, o betacaroteno e substâncias enzimáticas, como as glutatona peroxidases. A vitamina E desativa produtos formados em cadeias de reações radicalares, que podem danificar a membrana celular, acelerar processos de envelhecimento, e danificar o DNA, com conseqüentes possibilidades mutagênicas e efeitos carcinogênicos (BALL, 2004). A vitamina E também influencia a síntese de prostaciclina e o metabolismo de eicosanoides e por sua vez indiretamente previne trombooses e reações de inflamação (BASF, 2003).

O termo vitamina E engloba todos os derivados de tocol e tocotrienol que exibem qualitativamente a atividade biológica do α -tocoferol. A estrutura genérica desses derivados de tocol e tocotrienol é apresentada nas Figura 6 e Figura 7.

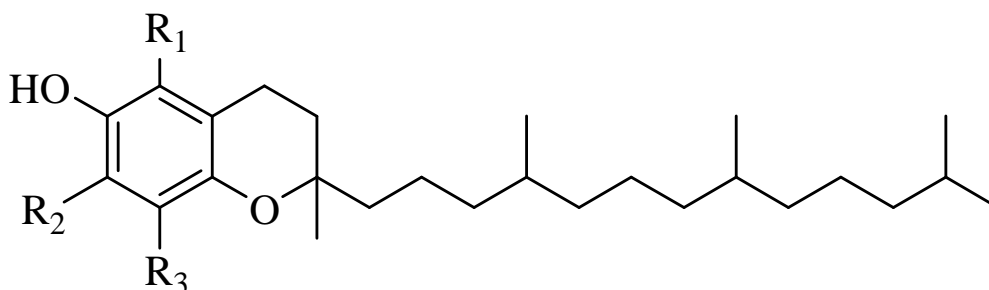


Figura 6 - Estrutura genéricas dos derivados de tocol.

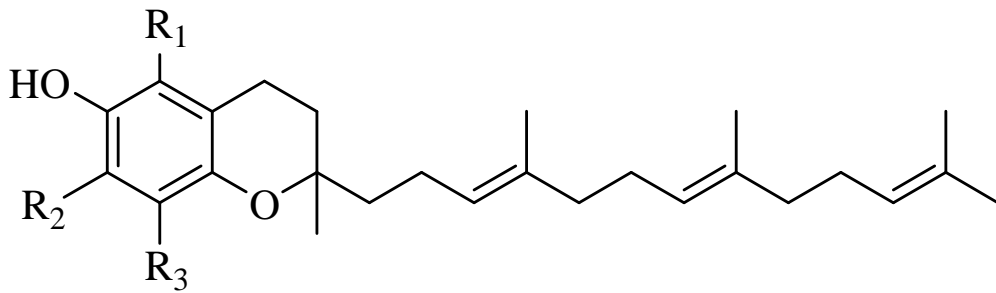


Figura 7 - Estrutura genérica dos derivados de tocotrienol.

A palavra tocoferol é usada para designar todo mono-, di- e trimetil tocóis independente da atividade biológica, enquanto tocol se refere apenas às estruturas desmetiladas. O Quadro 1 resume os nomes e as combinações de radical existentes para essas estruturas.

Quadro 1 - Nome dos tocóis e tocoferóis segundo os seu radicais.

Vitâmeno	R ₁	R ₂	R ₃
α -tocoferol/ α -tocotrienol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tocoferol/ β -tocotrienol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tocoferol/ γ -tocotrienol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tocoferol/ δ -tocotrienol	H	H	CH ₃
tocol/tocotrienol	H	H	H

Muitos estereoisômeros também são possíveis, principalmente para o tocol e para os tocoferóis, nos quais estão presentes três carbonos quirais. Cada estrutura difere grandemente nas atividades biológicas relacionadas à vitamina E, principalmente com relação à posição e o número de grupos metila, como é apresentado no Quadro 2. Outra possibilidade de estrutura para as vitaminas E são as formas de éster, como o acetato de tocoferol, o hidrogeno succinato e o polietilenoglicol succinato (BASF, 2003).

Quadro 2 - Atividade de vitamina E de diversos tocoferóis e tocotrieno.

Nome	Biopotência * (UI/mg)
R,R,R- α -Tocoferol	1,49
R,R,R- α -Tocoferol acetato	1,36
all-rac- α -Tocopherol	1,1
all-rac- α -Tocoferol acetato	1
R,R,R- β -Tocoferol	0,12
R,R,R- γ -Tocoferol	0,05
R- α -Tocotrienol	0,32
R- β -Tocotrienol	0,05
R- γ -Tocotrienol	-

*Unidades internacionais por miligrama do material

Alimentos animais e vegetais contêm diferentes quantidades de tocoferóis, mas são sintetizadas apenas por plantas. Altos conteúdos dessa vitamina são encontrados em óleos vegetais (por exemplo, de soja, de milho e de semente de girassol), e especialmente no óleo de germe de trigo. Nesses óleos, o conteúdo de vitamina E está correlacionado com a proporção de ácidos graxos não saturados, o que providencia uma proteção natural contra agentes oxidantes. Também está presente, mas em menores quantidades, em sementes e grãos em geral, vegetais verdes e legumes (BASF, 2003). Os únicos estereoisômeros que ocorrem naturalmente são do tipo R,R,R (BASF, 2003).

Com a diminuição da vitamina E no organismo, o número de radicais livres aumenta, e isso leva à oxidação dos lipídios, que por sua vez conduzem a sintomas de deficiência de metabolismo muscular, funções da membrana e sistema nervoso. Os sintomas clínicos incluem um aumento da taxa de hemólise de eritrócitos, formação de corpos de Heinz, fraqueza muscular, deposição de lipo-pigmentos, disfunções neuromusculares com tremulação do andar e paralisia dos nervos faciais (COMBS, 2008). Recentemente foi demonstrado que uma proteína derivada da vitamina E (α -tocoferol transfer proteína (TTP)) é essencial nos primeiros estágios de desenvolvimento do sistema nervoso central de vertebrados (MILLER, ULATOWSKI, *et al.*, 2012).

Condições envolvendo a má absorção de lipídio podem também conduzir à deficiência de vitamina E. Tais condições incluem aquelas resultantes da perda das funções exócrinas pancreáticas (por exemplo, pancreatite, tumor pancreático, atrofia pancreática nutricional, ocasionadas pela deficiência de selênio), outras envolvendo a deficiência luminal da bile, ou devido a defeito de lipoproteínas (abetalipoproteinemia) (COMBS, 2008). Outra causa de deficiência da vitamina E advém do fato que ela não atravessa prontamente a placenta, por isso recém-nascidos estão particularmente sujeitos ao risco de sua deficiência, especialmente se prematuros (BASF, 2003).

O acetato de tocoferol, uma das formas da vitamina E, é um óleo viscoso de coloração amarela e praticamente inodora, solúvel em hidrocarbonetos, álcoois, gorduras e óleos, mas insolúvel em água. Com relação à sua estabilidade, em contraste com a forma álcool da vitamina, a forma acetato é resistente ao aquecimento e à presença de oxigênio, não é resistente à álcalis, pois reage por saponificação, nem à presença de agentes oxidantes fortes (BASF, 2003). A estrutura molecular do acetato de tocoferol é apresentada na Figura 8.

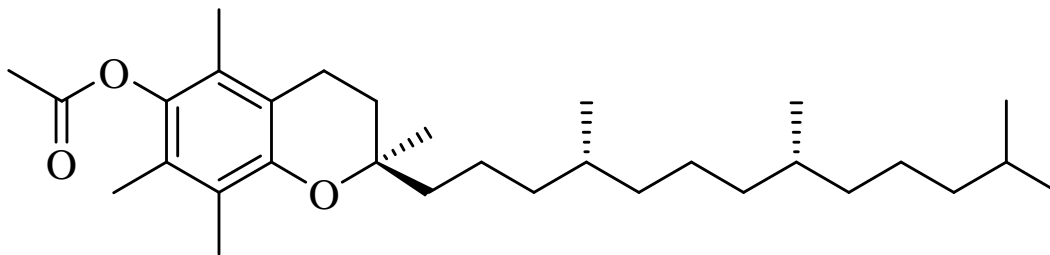


Figura 8 - Estrutura molecular do acetato de tocoferol.

Devido às suas propriedades, o acetato de tocoferol pode ser usado em preparações farmacêuticas em base lipofílica, como cremes e óleos. Para preparações em base aquosa, como xaropes, gotas, solubilizáveis e injetáveis, é necessário o uso de agentes solubilizantes (BALL, 2004). Outra aplicação comum é como antioxidante em alimentos industrializados ou preparações farmacêuticas para manter a estabilidade dos produtos susceptíveis à oxidação (COMBS, 2008).

1.2. Cromatografia líquida: HPLC e UPLC

O processo de separação na técnica de HPLC está baseado no transporte forçado do líquido (fase-móvel), que conduz a mistura de analitos através de um meio poroso, e nas diferenças de interações entre esses analitos e a superfície desse meio poroso e estático que resultam em diferentes tempos de migração para a mistura de componentes (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

A técnica de HPLC é a principal ferramenta analítica aplicada em todos os estágios de descoberta, desenvolvimento e produção de medicamentos. A técnica de UPLC surgiu como uma adaptação às pressões cada vez maiores que eram exigidas para se bombear a fase móvel através das colunas cromatográficas que possuíam tamanho de partículas cada vez menores. Os principais componentes de um sistema de cromatografia líquida moderno são: a bomba, um gerenciador de amostras, um injetor, a coluna cromatográfica, o detector e um computador para gravar e processar os dados (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

O funcionamento de um sistema de cromatografia líquida é esquematizado na Figura 9. Uma bomba de alta pressão é usada para gerar um fluxo específico da fase móvel. O injetor é um dispositivo capaz de trazer a amostra para o início da coluna, isto é, para a extremidade na qual a fase móvel entra. A coluna está preenchida com a fase estacionária, que fornece a separação dos constituintes da amostra. O detector é responsável por perceber a presença dos compostos separados à medida que eluem da coluna cromatográfica e está ligado a um

sistema computacional que grava os sinais necessários para gerar o cromatograma e quantificar os constituintes da amostra (WATERS, 2013).

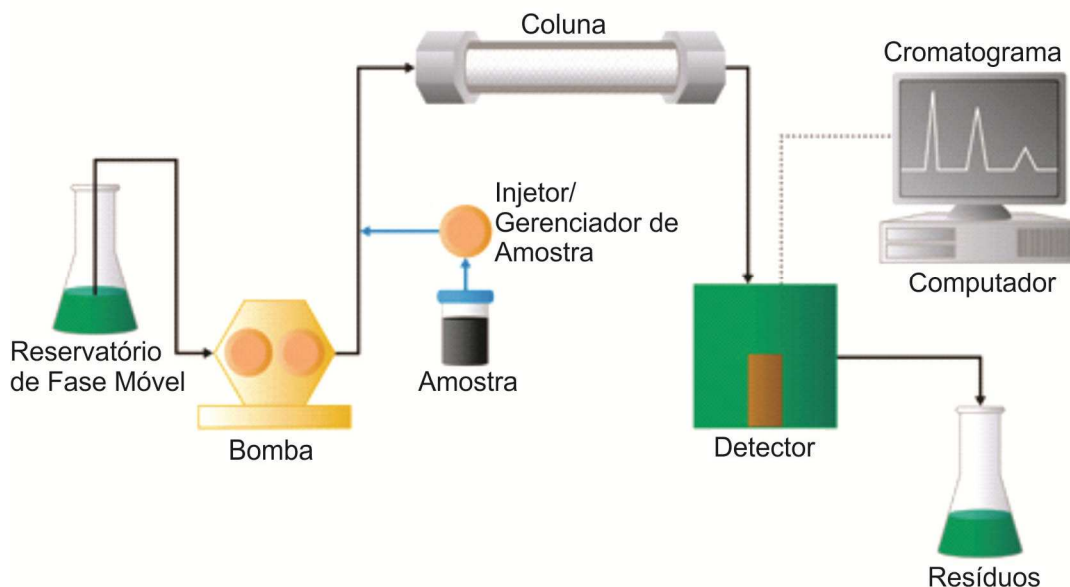


Figura 9 - Esquema dos componentes e funcionamento de um HPLC.

A forma com que a separação dos componentes é alcançada é ilustrada na Figura 10. A imagem do topo representa a coluna no tempo inicial, logo após a injeção da amostra. Decorridos alguns minutos de passagem da fase móvel pela fase estacionária da coluna percebe-se que os analitos representados pelas bandas coloridas, se moveram com velocidades diferentes, o que se deve a eles possuírem diferentes atrações pela fase estacionária. Nesse caso o constituinte da banda amarela possui a menor atração, o constituinte da azul a maior atração e o constituinte da vermelha apresenta uma atração intermediária (WATERS, 2013).

Banda cromatográficas da injeção da amostra

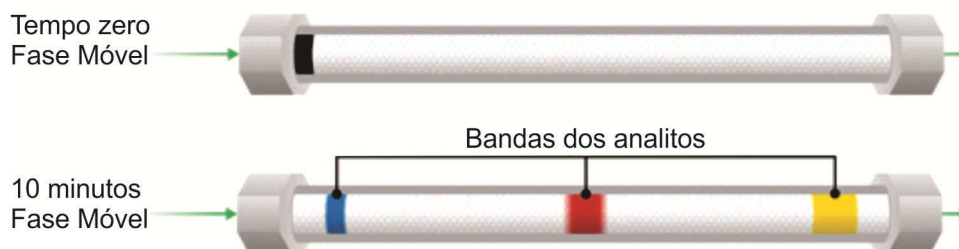


Figura 10 - Esquema do modo como ocorre a retenção dos diversos componentes contidos na amostra.

Por fim é gerado o cromatograma no qual os vários picos erguem-se da linha base ao longo do eixo do tempo. Esse processo de construção do cromatograma é representado na Figura 11 (WATERS, 2013).

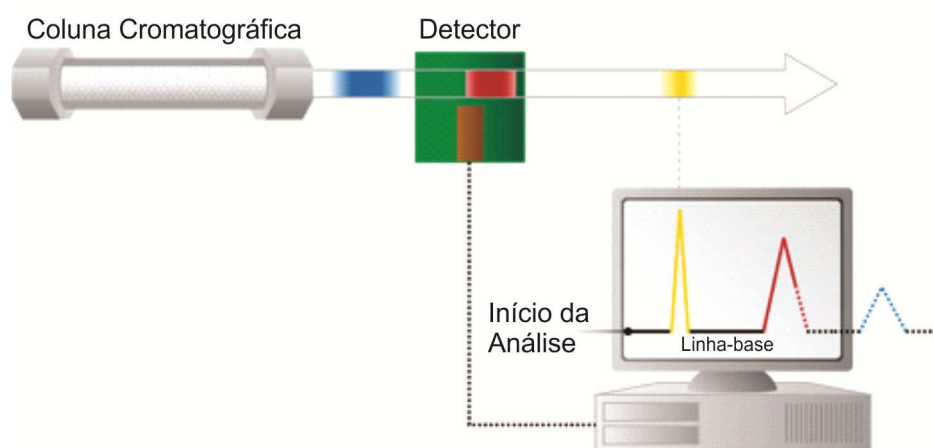


Figura 11 - Esquema de como se dá a formação do cromatograma.

A coluna cromatográfica de HPLC está empacotada com um suporte sólido constituído geralmente de partículas esféricas porosas à base de sílica. O amplo uso da sílica como suporte se deve a algumas características que possui, como alta área superficial e porosidade, fácil preparação, polaridade ajustável, boa resistência mecânica além da possibilidade de sua superfície ser modificada quimicamente (ADAMOVIĆ, 1997).

A superfície do suporte sólido pode ser modificada pela reação com diversos ligantes, o que aumenta a versatilidade da técnica porque diferentes formas de interação podem ser incorporadas com esse procedimento. O ligante mais comum é a cadeia alquila com 18 carbonos, C18, que retém por interações do tipo hidrofóbicas (apolares) os componentes que devem ser separados. As fases estacionárias que têm esse tipo de interação hidrofóbica são classificadas como fase reversa, em oposição às primeiras formas de cromatografia usarem as interações do tipo hidrofílicas (polares) para a retenção e separação dos componentes. A superfície da sílica pode ser modificada também com outras cadeias de carbono, como C8, C4 e Fenil, com espécies químicas para retenção de compostos aniônicos e catiônicos, com proteína, para a retenção substratos enzimáticos específicos (essa técnica é chamada de cromatografia por afinidade), dentre outras possibilidades (ADAMOVIĆ, 1997) (SILVA, JARDIM e AIROLDI, 2004).

Os principais parâmetros cromatográficos são o número de pratos teóricos, a fator capacidade e a simetria da banda. O número de pratos teóricos é experimentalmente calculado pela fórmula $N = 16 (t_R / w)^2$, sendo N o número de pratos teóricos, t_R o tempo de retenção do pico e w a largura da banda cromatográfica. O fator capacidade é calculado pela fórmula $K' = (t_R - t_0) / t_0$, sendo t_0 o tempo de volume morto que corresponde ao tempo que um analito não retido é eluído desde o momento da injeção da amostra. A simetria da banda cromatográfica é

calculada pela razão entre as partes posterior e anterior da banda a uma altura definida (geralmente na metade ou a um décimo da altura do pico) com relação ao eixo perpendicular ao eixo do tempo que intercepta o ápice do pico (HARRIS, 2005).

A eficiência do processo cromatográfico é medida pelo número de pratos teóricos ou pela altura dos pratos teóricos (H) da banda cromatográfica (ou pico), onde $H = N / L$ (sendo L o comprimento da coluna). A altura do prato é uma função da velocidade linear (u) conforme mostra a equação de Van Deemter ($H = A + B/u + Cu$). A diminuição da eficiência é indicada pelo aumento da altura dos pratos ou pela diminuição do número de pratos e implica no alargamento da banda cromatográfica. O alargamento é um fenômeno indesejável, pois quanto maior a largura das bandas menor a separação entre duas bandas adjacentes. Além da velocidade linear vários fatores implícitos nos coeficientes A, B e C da equação de Van Deemter contribuem para o alargamento da banda. Nessa equação o primeiro (A) termo está relacionado com os caminhos múltiplos percorridos pelo soluto, o segundo termo (B/u) se relaciona com a da difusão longitudinal do soluto e o terceiro termo (Cu) se relaciona com a transferência de massa entre as fases móvel e estacionária. A Figura 12 representa a contribuição de cada termo isoladamente e em conjunto para a altura do prato (BORGES, BOTTOLI e COLLINS, 2010).

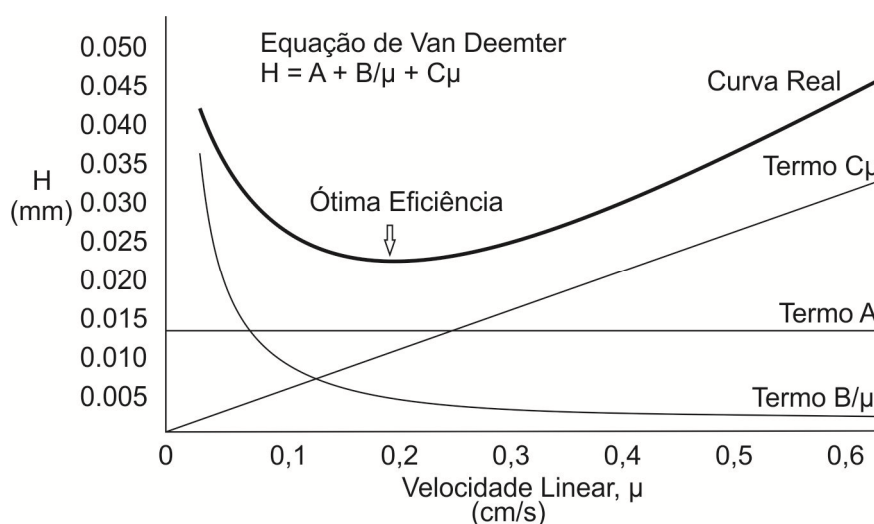


Figura 12 - Ilustração da contribuição de cada termo da Equação de Van Deemter para a curva real da eficiência em função do fluxo linear.

O alargamento da banda devido aos caminhos múltiplos pode ser entendido como o aumento das possibilidades de caminhos que o analito pode percorrer, sendo influenciado por fatores como a regularidade das partículas da fase estacionária (representada na Figura 13 na qual a coluna com partículas mais regulares possibilita a formação de bandas mais estreitas),

com o tamanho das partículas e com a uniformidade do leito do empacotamento. O termo A, dentre os três termos, é o que mais influencia no alargamento das bandas (HARRIS, 2005).

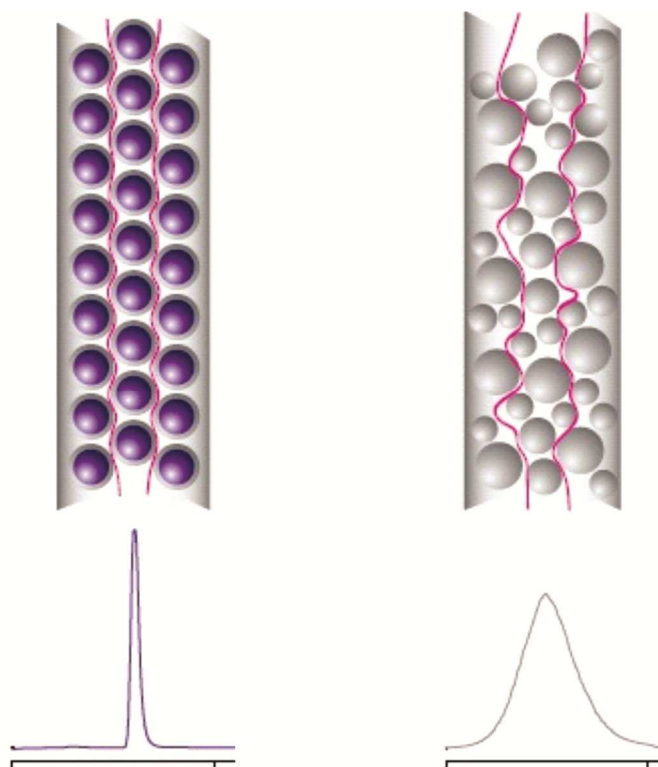


Figura 13 - Comparação do efeito dos caminhos múltiplos entre um empacotamento de partículas com tamanho uniforme e de outro empacotamento contendo partículas de tamanho desuniforme.

O segundo termo da equação (B/u) se relaciona com a difusão do analito na fase móvel. Quanto menor o fluxo linear mais tempo o analito permanecerá na coluna e mais ele será espalhado por difusão provocando um alargamento da banda. O valor de B está relacionado com o coeficiente de difusão da fase móvel (HARRIS, 2005).

O terceiro termo da equação, coeficiente de transferência de massa, é o segundo que mais influencia no alargamento da banda. Esse termo é diretamente proporcional com o fluxo da fase móvel porque maiores velocidades interferem no equilíbrio entre o analito, fase móvel e a fase estacionária (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). Além disso, a constante C é diretamente proporcional com o tamanho da partícula, já que quanto maior o diâmetro menor a área superficial e por sua vez a troca de massa entre as duas fases (WREN e TCHELITCHEFF, 2006).

Assim, dentre outras implicações, a equação de Van Deemter mostra a relação diretamente proporcional que a eficiência do processo cromatográfico tem com a diminuição do tamanho das partículas. A Figura 14 representa graficamente essa relação (NOVÁKOVÁ, MATYSOVÁ e SOLICH, 2005).

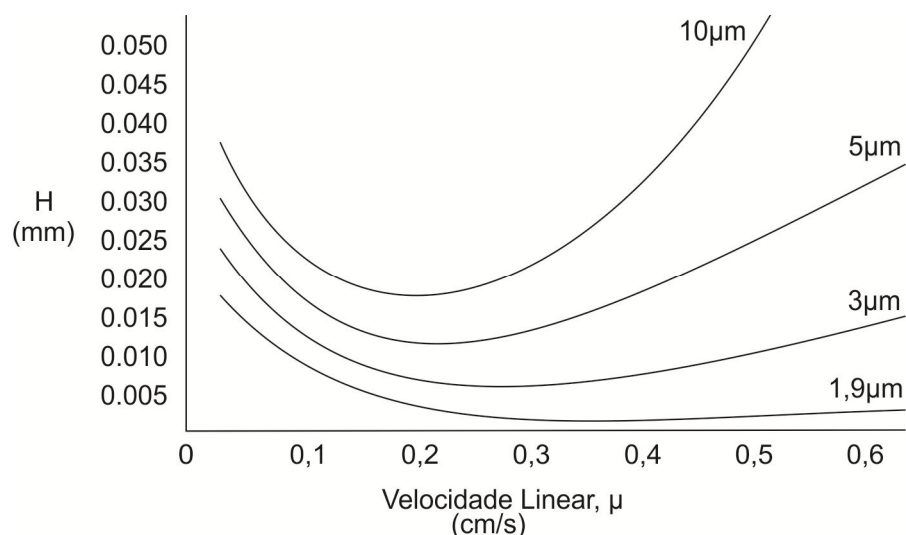


Figura 14 - Efeito da diminuição do tamanho das partículas de sílica na curva da equação de Van Deemter.

Contudo, a diminuição do tamanho das partículas está limitada pelo aumento da pressão que é necessária para manter o fluxo linear. Vários trabalhos foram publicados desde 1997 abordando a diminuição das partículas das colunas comumente usadas até aquele momento, mas algumas preocupações práticas ainda impediam a aplicação de equipamentos de HPLC adaptados para o trabalho em pressões ainda maiores bem como o uso dessas colunas com tamanho reduzido de partículas. A repetibilidade comprometida das injeções, a detecção ainda limitada e a necessidade em se usar tubulações extremamente estreitas para minimizar qualquer alargamento das bandas devido ao volume morto foram os principais fatores limitantes da difusão dessa técnica (NOVÁKOVÁ, MATYSOVÁ e SOLICH, 2005).

Somente por volta do ano de 2004 foi disponível comercialmente o primeiro sistema cromatográfico capaz de trabalhar com pressões mais elevadas que o convencional. Enquanto os sistemas convencionais eram limitados às pressões de 35-40 MPa esse sistema pioneiro, Acquity UPLC da Waters Corporation, possibilitava o trabalho com pressões até 103,5 MPa (15000 Psi) (NOVÁKOVÁ, MATYSOVÁ e SOLICH, 2005). Desde então muitos trabalhos que demonstram as vantagens do uso do UPLC têm sido publicados.

Um exemplo desses trabalhos que ilustram as vantagens da nova tecnologia de UPLC foi desenvolvido por Wren e Tchelitcheff. As Figura 15 e Figura 16 apresentam os cromatogramas da análise de uma substância por HPLC e por UPLC, na qual se pode observar que a principal vantagem do uso da tecnologia de UPLC é a diminuição do tempo de análise cromatográfica na ordem de 8 vezes. Nesse trabalho Wren e Tchelitcheff demonstram que os cromatogramas da análise de impureza em matéria prima por UPLC apresentaram pelo

menos a mesma qualidade de separação que a análise feita por HPLC, mas com a vantagem da diminuição do tempo da análise cromatográfica (WREN e TCHELITCHEFF, 2006).

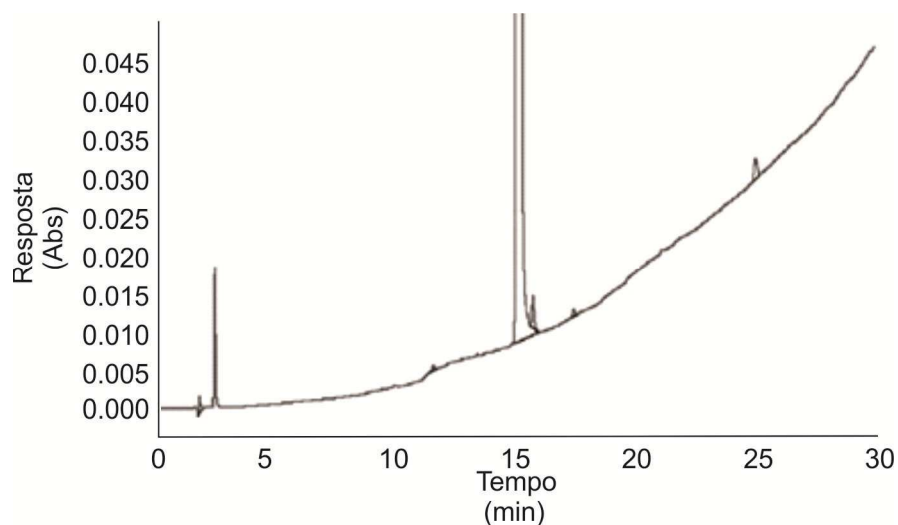


Figura 15 – Cromatograma de método desenvolvido para análise de ingrediente ativo por HPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).

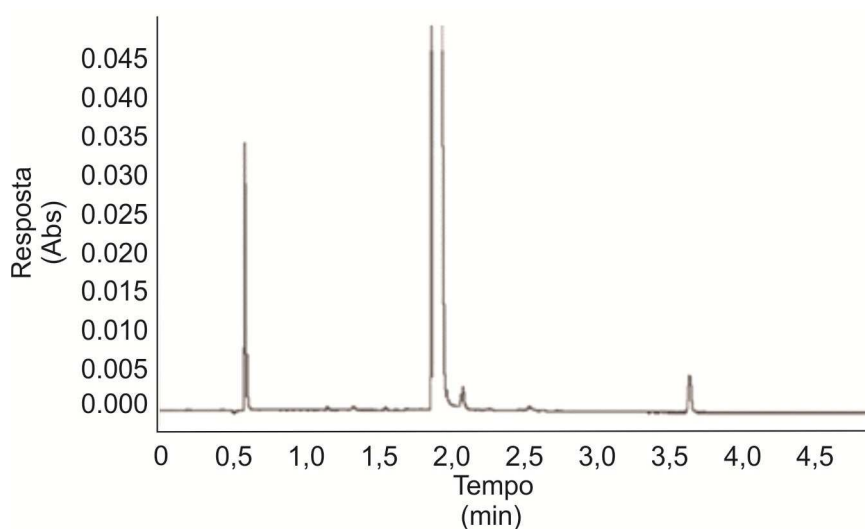


Figura 16 - Cromatograma de método desenvolvido para análise de ingrediente ativo por UPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).

Outro exemplo que demonstra a vantagem do uso da tecnologia de UPLC com relação à de HPLC é mostrado nas Figura 17 e Figura 18. Nesse trabalho uma série de derivados de ácido cafeínico foram separados a partir de um derivado de *Echinacea purpúrea*, um produto natural, sendo que o uso do UPLC possibilitou o tempo de análise 7 vezes menor que o uso de HPLC (SWARTZ, 2008).

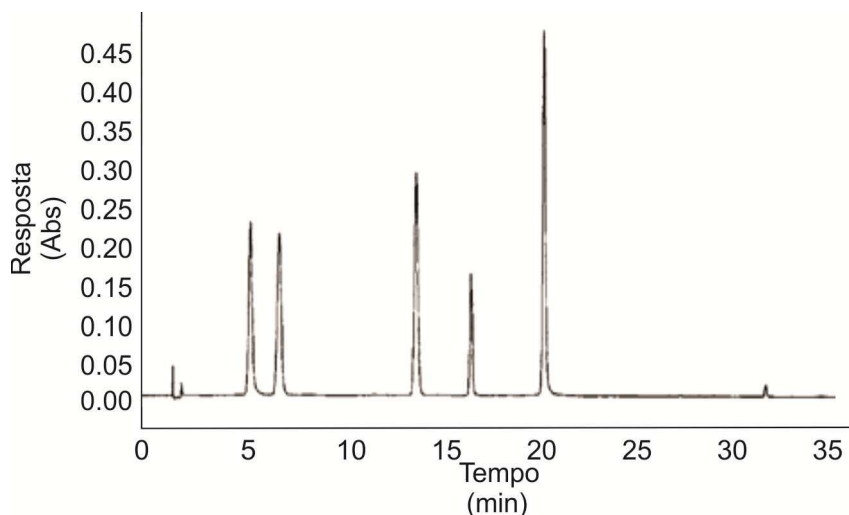


Figura 17 - Cromatograma da análise de derivados de ácido cafeínico separado a partir de um derivado de Echinacea purpúrea por HPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).

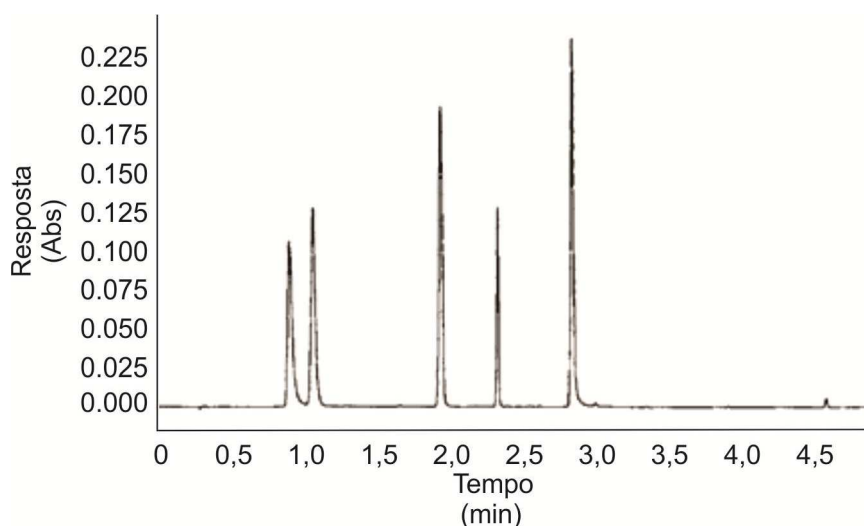


Figura 18 - Cromatograma da análise de derivados de ácido cafeínico é separado a partir de um derivado de Echinacea purpúrea por UPLC (adaptada de (WREN e TCHELITCHEFF, 2006)).

1.3. Métodos para Determinação de Vitaminas

A quantidade de vitaminas em alimentos pode cair durante o processamento da comida, pela estocagem, ou com o tempo mesmo, pela diminuição através de reações químicas (MORENO e SALVADÓ, 2000) (LI e CHEN, 2001). Nesse contexto é importante que se tenha disponíveis preparações farmacêuticas com a finalidade de reposição de vitaminas para complementação alimentar (MORENO e SALVADÓ, 2000). Isto justifica o desenvolvimento de métodos para a determinação de vitaminas particularmente em três matrizes: preparações farmacêuticas, alimentos *in natura* ou enriquecidos (como ferramenta auxiliar em pesquisas, por exemplo, de alimentos potenciais fontes de vitaminas ou controle

de qualidade dos alimentos enriquecido), ou em fluidos biológicos (como auxiliares no diagnóstico para a medicina e também na pesquisa).

Na literatura diversas técnicas têm sido empregadas para a determinação de vitaminas, se destacando a espectrofotometria (KLEJDUS, PETRLOVÁ, *et al.*, 2004) (LI, 2002) (LI e CHEN, 2001) (GILPIN, 1999), fluorimetria (KLEJDUS, PETRLOVÁ, *et al.*, 2004) (LI, 2002) (LI e CHEN, 2001), quimioiluminescência (KLEJDUS, PETRLOVÁ, *et al.*, 2004) (LI e CHEN, 2001), eletroforese capilar (FOTSING, FILLET, *et al.*, 1997) (GILPIN, 1999), cromatografia gasosa (ALMAGRO, ANDRES e VERA, 2002) e líquida, polarografia (LI, 2002), processos enzimáticos (MORENO e SALVADÓ, 2000) (GILPIN, 1999), microbiológicos (CHEN e WOLF, 2007) (LI e CHEN, 2001), absorção atômica (MORENO e SALVADÓ, 2000) e espectrometria de massa (CHEN e WOLF, 2007).

Os trabalhos mais recentes estão voltados para a quantificação de vitaminas por HPLC acoplada com umas das diversas técnicas de detecção citadas anteriormente, já que a cromatografia apenas fornece a separação dos componentes. A detecção UV/VIS é tecnicamente simples, por isso uma das mais baratas e fácil de trabalhar (apenas 3 variáveis principais são necessárias para se estabelecer as condições de detecção: taxa de captura, comprimento de onda e potência da energia luminosa que incide), de se manter e a mais difundida.

Contudo, os métodos encontrados na literatura têm desvantagens tais como os altos custos técnico (materiais) e/ou operacionais (tempo de mão de obra e ocupação do equipamento – HPLC), sendo inviáveis para análises de rotina (LI, 2002). Há métodos que foram desenvolvidos para abranger diferentes matrizes, e por isso precisam ser muito robusto e o mais universal possível (CHEN e WOLF, 2007), mas em contrapartida usam equipamentos muito caros (espectrometria de massa) para aquisição, manutenção e custo de análise, de tal forma que seria interessante que seu uso fosse apenas para aplicações que não conseguem mesmo quantificar as amostras com outra técnica de detecção.

Particularmente para as análises de vitaminas lipossolúveis os resultados obtidos de farmacopeias dependem da habilidade do técnico para a análise em particular, e por isso geralmente deixam a desejar em precisão intermediária e extralaboratorial (WIELINSKI e OLSZANOWSKI, 1999). Além disso, nenhum desses métodos é objetivo o suficiente para um método de rotina num laboratório de controle de qualidade, particularmente naqueles que

o custo efetivo é importante, principalmente por causa do tempo consumido na preparação das amostras (WIELINSKI e OLSZANOWSKI, 1999).

A diminuição do custo analítico é umas das motivações principais de alguns trabalhos (MULHOLLAND e DOLPHIN, 1985). A diminuição do diâmetro das colunas, por exemplo, em nada impacta no poder de separação e de detecção do método, e deve sempre ser avaliada (CHEN e WOLF, 2007). Por mais de quatro décadas a redução das partículas de fase estacionária têm sido exploradas para melhorar e eficiências das separações cromatográficas. Até recentemente, as tecnologias em cromatografia líquida haviam atingido um platô no qual os benefícios da diminuição dos tamanhos de partículas não poderiam ser completamente obtidos devido à influência negativa que tinham o alargamento de banda do pico cromatográfico ou às faixas de pressão que os sistemas cromatográficos suportavam. O desenvolvimento de sistemas que trabalhem na ordem de pressão que são exigidas às colunas de partículas de tamanho de 1,7 μm , e que tenham um mínimo volume extra coluna, são recentes (a partir de 2004), e possibilitaram a diminuição do tempo de análise cromatográfica e, por sua vez, do consumo de solventes na ordem de 10 vezes (WATERS, 2009).

Klejduš e colaboradores (KLEJDUŠ, PETRLOVÁ, *et al.*, 2004) propuseram a análise de cerca de 20 vitaminas hidro e lipossolúveis em uma só análise cromatográfica de trinta e seis minutos. Para isso usaram uma coluna de fase reversa C18, de 150 x 4,6 mm e 3 μm de tamanho de partícula. A separação foi alcançada por meio de gradiente entre uma fase aquosa com 0,01% de ácido trifluoroacético e metanol, usando detecção UV/VIS a 230, 266 e 280 nm. A seleção da coluna foi feita com base no desempenho da separação de vitaminas próximas estruturalmente. Os pesquisadores concluíram que apenas uma de três colunas testadas fornecia separação suficiente entre as vitaminas investigadas, em particular entre os picos de tiamina e ácido nicotínico e entre os picos de acetato de retinol e acetato de transretinol, que têm muita semelhança estrutural.

Na análise de polivitamínicos feita por Ke li (LI, 2002) foi estabelecido um método com o uso de agente pareador iônico. A fase móvel empregada foi uma mistura de metanol e solução aquosa (com 0,5% de ácido acético contendo 2,5 mM de hexanosulfonato de sódio) na proporção de 18 para 82. Como resultado foi conseguido a separação de vitaminas do complexo B em menos de vinte minutos de análise cromatográfica usando uma coluna Hypersil C₁₈ (dimensões: 150 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 μm).

Wielinski procurou alcançar em uma só análise cromatográfica a quantificação de várias vitaminas lipossolúveis. Após investigar uma série de condições o autor estabeleceu que o uso de uma coluna LiChrosorb RP-8 250 x 4,6 mm juntamente com uma fase móvel constituída de acetonitrila e metanol na proporção de 95 para 5 (v/v) fornecia os melhores resultados. Nessa condição, o acetato de tocoferol foi eluído em 6 minutos, e bem resolvido das outras vitaminas estudadas (WIELINSKI e OLSZANOWSKI, 1999).

Chen desenvolveu um método para a determinação somente de vitaminas hidrossolúveis, usando uma coluna Hydro-RP C18 250 x 2,0 mm 4 µm (Phenomenex) e como fase móvel um gradiente entre água e acetonitrila (ambos com 0,1% de ácido fórmico) num tempo total de análise cromatográfica de 25 minutos e um fluxo de 0,25 ml/min (CHEN e WOLF, 2007).

A sensibilidade do método é algumas vezes a etapa mais crítica em trabalhos de desenvolvimento do procedimento analítico. Hua-Bin Li e colaboradores, desafiados pela baixa concentração de vitamina B12 presente em formulações e que possui uma limitada absorvidade molar, desenvolveu um método com detecção por fluorescência e alcançou um limite de quantificação de 0,1 ng/mL. A coluna usada foi a µBondapak C₁₈ (300 x 3,9 mm; 10 µm) e como fase móvel foi usado metanol e água na proporção de 30 para 70. A detecção, por fluorescência, teve detecção a 305 nm com excitação a 275 nm (LI, CHEN e JIANG, 2000).

Em matrizes mais complexas, como as de origem biológicas, um método seletivo é difícil de ser alcançado por meio de detecções fotométricas. Para isso a opção mais adotada é a detecção por espectrometria de massa. Bishop propôs um método para a quantificação de riboflavina em urina humana por espectrometria de massa (tandem MS/MS), e as condições cromatográficas determinadas foram: coluna – Atlantis HILIC Sílica (4,6 x 100 mm, 3 µm, Waters); fase móvel – acetonitrila : água : ácido fórmico (80 : 20 : 0,2); fluxo de 0,7 ml/min; para a detecção os íons da riboflavina e do padrão interno protonados (M+H)⁺ foram separados no primeiro quadrupolo e os principais íons de transição foram monitorados no segundo. O preparo da amostra envolveu um procedimento de extração por fase sólida (SPE), no qual o uso de padrão interno é imprescindível para minimizar qualquer potencial efeito da matriz, e por isso riboflavina deuterada foi empregada com padrão interno. Bishop validou todo o procedimento e mostrou que o método proposto era linear, preciso e apresentava uma eficiência de recuperação superior a 96% (BISHOP, FERNANDEZ, *et al.*, 2011).

Hampel e colaboradores propuseram um método de determinação de várias vitaminas hidrossolúveis em outra matriz biológica (leite humano) usando UPLC acoplada com espectrometria de massa (MS/MS). Foram analisadas as vitaminas tiamina, riboflavina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), nicotinamida e piridoxal. Para a separação foi usada uma coluna de fase reversa Acquity UPLC HSS T3 (2,1 x 50 mm, 1,8 µm) e empregado um gradiente entre a fase aquosa com 10 mmol/L de formato de amônio e acetonitrila. A separação dos analitos foi possível em menos de 4 minutos de análise cromatográfica. A quantificação foi feita por padronização interna com isótopos das vitaminas investigadas. O preparo da amostra envolveu centrifugação, para separar os componentes insolúveis, e extração líquido-líquido com éter etílico, para separar os componentes não polares da matriz. O método foi validado e demonstrou ser linear, preciso e exato, apresentando recuperação entre 95,6 e 101,4% para todas as vitaminas analisadas (HAMPEL, YORK e ALLEN, 2012).

Anyakora e colaboradores desenvolveram um método para análise por HPLC das vitaminas nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina em alimentos enriquecidos provenientes da Nigéria. No método foi empregada uma coluna Nova-Pack C₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm), a 20 °C, e como fase móvel uma mistura de tampão (contendo o pareador iônico hexanosulfonato de sódio) e metanol na proporção 70 para 30. O fluxo de fase móvel foi 1,0 ml/min e o comprimento de onda de aquisição dos dados foi 254 nm. O tempo total de análise cromatográfica foi de 25 minutos. As vitaminas presentes nas amostras e as vitaminas preparadas como padrão foram solubilizadas em tampão de hexanosulfonato de sódio. O único teste de validação que o autor deixou explícito ter sido realizado foi a linearidade. Estabelecidas as condições do método o autor aplica-o na análise de 12 amostras diferentes de fortificantes vitamínicos, e descobre que muitas dessas amostras têm concentrações de vitaminas bem diferentes daquelas sugeridas pelos fabricantes do alimento enriquecido (ANYAKORA, AFOLAMI, *et al.*, 2008).

Garmonov e colaboradores desenvolveram um método por HPLC para análise de teor de ácido ascórbico, tiamina, riboflavina, nicotinamida e piridoxina em comprimido polivitamínico por HPLC. A coluna empregada nesse método foi uma Discovery RP Amide C16 de 250 mm de comprimento; para a separação das vitaminas foi estabelecido um gradiente entre uma fase aquosa (contendo tampão fosfato a um pH de 2,3) e acetonitrila. Foram usados dois comprimentos de onda para a detecção: as vitaminas B₁, nicotinamida, ácido ascórbico e vitamina B₂ absorveram melhor num comprimento de onda de 245 nm, enquanto a vitamina B₆ absorveu melhor a 290 nm. O gradiente começava com 99,8% de fase

aquosa, permanecendo assim por 5 minutos, e mudava linearmente para 70% de acetonitrila em 3 minutos; permanecia nessa proporção por 6 minutos e então reequilibrava nas condições iniciais do método por mais seis minutos. Assim, cada análise cromatográfica tinha a duração de 20 minutos. O preparo da amostra consistiu na extração das vitaminas do comprimido com água deionizada mantida a 50 °C em banho de ultrassom por 5 minutos. O método desenvolvido foi validado e demonstrou ser específico, preciso, acurado e linear na faixa de concentração esperada para a formulação farmacêutica (GARMONOV, SALAKHOV, *et al.*, 2011).

Kuminek e colaboradores desenvolveram um método para a determinação de cianocobalamina em associação a outros componentes (buclizina, triptofano e piridoxina). A maior dificuldade nesse trabalho foi conseguir quantificar a cianocobalamina simultaneamente aos outros componentes, devido à sua baixa concentração na formulação. Para a separação usou uma coluna X-Bridge RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); um gradiente entre metanol e um tampão de fosfato 0,015 mol/L e pH 3,0 a um fluxo de 1,0 ml/min foi empregado na análise; como diluente, tanto do padrão como da amostra, foi usada uma solução de metanol e água na proporção de 1 : 1; cada componente foi quantificado no comprimento de onda em que apresentou a maior absorvidade, que foram: 230 nm para a buclizina, 280 nm para a piridoxina e para o triptofano, e 360 nm para a cianocobalamina. O método desenvolvido foi validado e demonstrou ser seletivo, sensível, linear, preciso, exato e robusto. Apesar de a cianocobalamina estar presente na formulação em uma concentração 100 vezes menor que a concentração dos demais ativos foi possível a quantificação simultânea desses componentes (KUMINEK, STULZER, *et al.*, 2011).

Outro aspecto primordial de uma metodologia analítica é o estudo da preparação da amostra, isto é, da condição em que todo o analito fique disponível na solução a ser analisada. Klejdus e colaboradores estabeleceram uma metodologia na qual as amostras foram homogeneizadas em um triturador elétrico. Uma alíquota desse material homogêneo era extraída com diluente (solução aquosa de ácido trifluoroacético 0,01% misturada com metanol numa proporção de 1 : 1) pela agitação em vórtex por 15 minutos, e o sobrenadante, límpido após decantação, era diretamente analisado por HPLC (KLEJDUS, PETRLOVÁ, *et al.*, 2004). Este mesmo procedimento foi adotado para a análise das vitaminas hidro e lipossolúveis. Para a avaliação da recuperação do método, o autor simplesmente confrontou os resultados da própria análise com o valor declarado pelo fabricante. Isso é bastante questionável, já que o próprio fabricante tem uma margem de aceitação para liberar o produto

para consumo, e sendo assim, o resultado para um lote específico pode ser qualquer valor dentro de uma faixa, geralmente, de 20% (USP35, 2013).

Muitos trabalhos publicados validam apenas superficialmente os métodos, algumas vezes realizando somente a linearidade e a precisão. A exatidão, considerado o teste mais importante (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007), é negligenciada, e o aspecto cromatográfico, no que diz respeito à linha base, resolução entre as espécies, limites de quantificação e simetria dos picos, foram visivelmente ruins em vários artigos. Chen e Wolf (CHEN e WOLF, 2007) questionam isso quando afirmam que as publicações recentes de análises de polivitamínicos não são rigorosamente validadas.

Em algumas matrizes alimentícias a eliminação de proteínas e grupos fosfatos nos quais as vitaminas tiamina e riboflavina estão ligadas pode ser a etapa mais crítica do procedimento analítico. Mondragón e colaboradores estabeleceram um protocolo de extração dessas vitaminas em verduras de folhagem (como alface e couve) empregando a enzima clara-díastase. Uma quantidade finamente moída da amostra era pesada e transferida para frasco âmbar, que era mantido em banho-maria a 100 °C por 30 minutos, seguida da adição de 15 ml de ácido clorídrico 0,1 mol/L. Deixava-se que o frasco atingisse a temperatura ambiente e ajustava-se o pH para 4,45 pela adição de solução de acetato de sódio 2,5 mol/L. Em seguida era adicionada 10 mg de clara-díastase e a mistura era incubada a 50 °C por 3 horas, e após esse período a solução era filtrada. Para a análise de riboflavina, que tem uma propriedade fluorescente, uma porção dessa solução era filtrada em membrana 0,2 µm antes de ser levada para o equipamento de HPLC. Para conferir uma propriedade fluorescente à tiamina era feita uma derivatização com hexacianoferrato de potássio misturando 2,5 ml da solução amostra com 1,25 ml de hidróxido de sódio 0,375 mol/L contendo 1,0% de hexacianoferrato de potássio e neutralizada após 1 minuto desde o momento da mistura. Em seguida essa solução com tiamina derivatizada passava por um processo de extração em um cartucho de fase reversa SPE (*Solid-phase extraction*), modelo Sep-Pak Vac C18, para eliminação de interferentes. O método de HPLC desenvolvido para a separação dessas vitaminas empregou a coluna Kromasil 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) e como fase móvel uma mistura de solução tampão de acetato de amônio 0,005 mol/L (pH 6,0) e metanol em uma proporção de 72 : 28 a um fluxo e 0,8 ml/min; a detecção, por fluorescência, teve os comprimentos de onda de excitação/emissão de 370/435 nm para a tiamina e 370/520 nm para a riboflavina. O método foi validado e mostrou ser específico, linear, preciso, sensível e exato para as aplicações pretendidas (MONDRAGÓN, VÁZQUEZ e ROMERO, 2011).

Chen e Wolf no estudo de quantificação de vitaminas hidrossolúveis (CHEN e WOLF, 2007) extraíram todos os componentes dos comprimidos finamente pulverizados com tampão fosfato pH 2,5. Os autores não desprezaram o volume que o material sólido ocupa, e ao final da diluição em balão volumétrico, é adicionado o volume supostamente ocupado pela aproximação de densidade igual a 1,0, usando sempre vidrarias volumétricas âmbar para evitar degradação fotolítica durante o procedimento. Estes autores trabalharam com uma nova abordagem para a avaliação da exatidão, diferente das comumente relatadas, onde o sólido insolúvel remanescente na solução da amostra preparada é recuperado por meio da centrifugação e um procedimento de extração adicional é efetuado. A intenção é determinar o quanto de ativo ficou adsorvido nesse material, e por sua vez a exatidão do método por meio da seguinte equação:

$$E.E. (\%) = 100 * \frac{E1}{E1 + E2}$$

Sendo E.E.(%) a eficiência da extração em porcentagem, E1 e E2 são as quantidade de vitaminas medidas respectivamente na primeira e na segunda extração.

Moreno e Salvadó quantificaram vitaminas hidro e lipossolúveis empregando a mesma coluna Nova-Pack C18 (150 x 4,6 mm 4 µm), porém com fases móveis diferentes. A separação das vitaminas hidrossolúveis foi alcançada usando gradiente com metanol e acetato de amônio 0,05 mol/L, num tempo de análise cromatográfica de cerca de 20 minutos. Para a quantificação das vitaminas lipossolúveis a fase móvel empregada foi uma mistura de metanol e acetonitrila na proporção de 95 : 5 e tempo de análise cromatográfica de 10 minutos (MORENO e SALVADÓ, 2000). No preparo das amostras empregaram a extração com SPE usando uma coluna SPEC C₁₈ AR 3 mL (ANSYS Diagnostics, USA) como artifício para eliminar a interferência mútua que as vitaminas hidro e lipossolúveis podem ter na análise cromatográfica umas das outras. Primeiro se eluíam as vitaminas hidrossolúveis, que ficavam pouco retidas na fase estacionária do cartucho. Então as vitaminas lipossolúveis eram recolhidas em seguida pelo aumento da força do eluente. Com o procedimento desenvolvido houve recuperação de 96% da vitamina B12, acima de 98% das outras vitaminas hidrossolúveis e 100% do acetato de tocoferol.

Em uma compilação de aplicações (WATERS, 2009) foi encontrado a descrição de um método que quantifica diversas vitaminas (nicotinamida, piridoxal, ácido nicotínico, ácido ascórbico, riboflavina, ácido fólico, tiamina e cobalamina) com o uso de uma coluna Acquity UPLC BEH Amide, fabricada pela Waters Corporation, de 2,1 mm de diâmetro interno, 50

mm de comprimento e empacotada com partículas de 1,7 µm de diâmetro. A eluição dos componentes foi feita empregando-se um gradiente entre água e acetonitrila, ambos tamponados com acetato de amônio em pH 9,0. Conseguiu a resolução completa entre todas as vitaminas envolvidas em um tempo de análise cromatográfica de 7,5 minutos.

Viñas e Lopez desenvolveram uma metodologia para a determinação de tiamina em alimentos empregando microextração líquido-líquido dispersiva miniaturizada e quantificando a vitamina por HPLC com detecção por fluorescência. A vitamina era previamente derivatizada por meio da oxidação com solução de ferrocianeto 5×10^{-5} mol/L para potencializar a sua fluorescência. Em seguida uma alíquota de 10,0 ml da amostra derivatizada era tratada com 90 µl de tetracloroetano disperso em 0,5 ml de acetonitrila para extração da tiamina. Formava-se uma emulsão cujas fases eram separadas posteriormente por centrifugação. A fase líquida inferior era então submetida à cromatografia. A coluna cromatográfica tinha como fase estacionária sílica com ligantes amida, e a fase móvel consistiu em tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,0 e acetonitrila em uma proporção de 90 para 10; o comprimento de onda de excitação foi de 375 nm e o comprimento de onda de emissão foi de 438 nm. O limite de detecção foi de 0,09 ng/ml e o método se demonstrou satisfatório nos parâmetros de validação analítica avaliados para a especificidade, linearidade, precisão e recuperação. O método determinado foi aplicado para a determinação de vitaminas em diferentes alimentos: cerveja, fermento de cerveja, mel e alimentos infantis, incluindo fórmulas infantis, leite fermentado, cereais e papinhas (VIÑAS e LÓPEZ, 2012).

1.4. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica

Validar um método é confirmar que o método é adequado e confiável para o propósito intentado. Entende-se por método um processo que mede um atributo de uma substância ou produto acabado. Embora os requerimentos de uma validação sejam claramente definidos por autoridades regulatórias (ICH, USP, FDA, e no Brasil, ANVISA), a abordagem para validação é variada e aberta à interpretação (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007) (SHABIR, 2003).

A validação de metodologias analíticas por HPLC é dividida em categorias segundo os testes a serem realizados como se apresenta a seguir (ADAMOVICS, 1997) (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007):

- Testes de identificação;
- Avaliação quantitativa do conteúdo de substâncias relacionadas;

- Testes limites e semi-quantitativos para o controle de substâncias relacionadas;
- Avaliação quantitativa do conteúdo dos principais componentes ativos (e às vezes dos conservantes);

Alguns requisitos são requeridos pelos órgãos regulatórios para que se conduza uma validação quando se almeja o registro de um medicamento, e deve ser uma atitude tomada por qualquer laboratório sério de pesquisa, cujos princípios são confiabilidades de seus resultados. Dois dos principais requisitos são a qualificação e calibração periódicas dos instrumentos (SHABIR, 2003) e o treinamento periódico dos usuários. Além disso, é exigido o uso de materiais de referência caracterizados e com pureza documentada, durante toda a realização do estudo de validação (KZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). Outro requerimento é a avaliação da adequação do sistema, antes de qualquer experimento de validação, para se verificar que os parâmetros cromatográficos e a repetibilidade das injeções estão adequadas para a análise a ser realizadas (SHABIR, 2003).

A validação é estabelecida através da evidência documentada demonstrando a acurácia (ou exatidão), precisão, linearidade, seletividade, limites de detecção e quantificação e a robustez do método. Dependendo da aplicação do método alguns desses testes não são necessários. Essa relação está expressa no Quadro 3 (ADAMOVICS, 1997).

Quadro 3 - Características do desempenho analítico.

Tipo do processo analítico	Identificação	Testes de impurezas		Teor
		Quantificação	Limites	
Exatidão	-	+	-	+
Precisão				
Repetibilidade	-	+	-	+
Precisão intemediária	-	+	-	+
Reprodutibilidade	-	+a	-	-a
Especificidade	+	+	+	+
Limite de Detecção	-	+	+	-
Limite de Quantificação	-	+	-	-
Linearidade	-	+	-	+

a - pode ser necessária no caso de metodologias que serão usadas por laboratórios fisicamente distintos.

1.4.1. Especificidade

A especificidade é a capacidade do método em medir com acurácia o analito junto a interferentes que possam estar presentes no produto: precursores sintéticos, excipientes, enantiômeros (quando aplicável) e degradantes. Em técnicas de separação isso significa uma resolução de pelo menos 1,5 (ADAMOVICS, 1997).

Os meios para satisfizer os critérios de especificidade diferem para cada tipo de processo analítico: para identificação, em fase de desenvolvimento, implica o uso de técnicas que permitem a avaliação da estrutura do analito; já em controle de qualidade, basta a comparação com uma substância de referência; para testes de pureza, isso significa, certificar-se de que todo o processo permite um estabelecimento exato do conteúdo das impurezas de um analito; para a medição do teor, certificar que o sinal medido é proveniente apenas da substância sendo analisada (PETERS, DRUMMER e MUSSHOFF, 2006).

Uma abordagem pratica para se avaliar a especificidade é comparar os resultados de uma amostra contendo as impurezas contra uma amostra que não contém. Isso só é aplicável quando os interferentes são conhecidos e disponíveis ao analista para essa contaminação controlada (SHABIR, 2003).

Existem abordagens universais para se demonstrar a especificidade de métodos cromatográficos, quando a detecção se faz por técnicas que geram espectros em cada instante. Nessa abordagem é avaliada a homogeneidade do pico pela constância do espectro por todo período de eluição. Nas formas mais simples, essa avaliação é feita pela medida da proporção entre duas latitudes do espectro (dois valores de razão e/m ou dois valores de comprimento de onda). Se há uma homogeneidade nessa proporção significa que o pico é puro e atribuído a apenas um componente. Essa técnica é adequada na maioria dos casos, mas imprópria em duas circunstâncias: quando há uma sobreposição perfeita dos picos ou quando os espectros dos dois componentes não são suficientemente diferentes (ADAMOVICS, 1997).

1.4.2. Linearidade

O propósito desse teste é demonstrar que o sistema analítico como um todo exibe uma resposta linear sobre uma faixa específica de concentração do analito, a qual depende da finalidade do método proposto (SHABIR, 2003). Pelo menos cinco concentrações devem ser avaliadas dentro da faixa de trabalho (*range*). As faixas mostradas no Quadro 4 têm sido recomendadas pela literatura e exigido por órgãos regulatórios (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

Quadro 4 - Faixas recomendadas para o teste de linearidade (em preparações farmacêuticas).

Tipo de processo analítico	Faixa a ser coberta
Teor (conteúdo)	80-120% do valor declarado
Teor (uniformidade de conteúdo)	70-130% do valor declarado
Teor (dissolução)	±30% de faixa especificada
Impurezas/produtos de degradação	do LQ* ou nível de reporte até pelo menos 120% da especificação (limite da impureza)
Teor e produtos de degradação	do LQ* ou nível de reporte até 120% do teor declarado para o ativo

Para os testes de teor e de uniformidade os critérios de aceitação para os resultados da linearidade são geralmente julgados examinando-se o coeficiente de correlação e o desvio padrão residual (erro comparando a resposta real com o valor teórico a determinado nível, calculado pelo desvio padrão relativo das razões individuais das respostas – área ou altura do pico – pelas concentração naquele nível). Para produtos farmacêuticos, um coeficiente $> 0,990$ é considerado aceitável, bem como um desvio padrão residual menor que 2,0% (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

Uma abordagem estatística adicional para examinar a linearidade, deveria incluir a avaliação extra dos resíduos. Nesse caso, a curva tende à perfeita linearidade se os resíduos apresentam um comportamento randômico e uma média fechada em zero. Qualquer comportamento linear ou parabólico do gráfico do erro *versus* concentração indica que a curva está se desviando da linearidade (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

1.4.3. Limites de medição

A avaliação dos limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) é especialmente importante sempre que a concentração do analito é baixa. Essas duas formas de ensaio limite são definidas a seguir (USP35, 2013):

- LD: é a menor concentração na qual o analito pode ser detectado, não necessariamente quantificado, nas condições experimentais estabelecidas, é um parâmetro de testes limites;
- LQ: é a menor concentração na qual uma amostra pode ser medida com um nível aceitável de precisão e exatidão nas condições experimentais estabelecidas, é um parâmetro para teores quantitativos para compostos presentes em baixos níveis.

Para métodos instrumentais o LD é, estatisticamente em termos gerais, reconhecido como o nível em que o analito produz uma razão sinal ruído de cerca de 3 : 1, ao passo que o LQ é aquele que produz uma relação de 10 : 1 (SHABIR, 2003). Outra abordagem aceita relaciona esses limites com o desvio padrão relativo (DPR%) que determinado nível resulta: LD, $DPR \% \leq 20\%$; e LQ, $DPR \leq 10\%$, ou o próprio limite aceito como critério de adequabilidade de sistema (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

1.4.4. Precisão

A avaliação da precisão dá um indicativo do nível de erro aleatório associado às análises (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007), mais precisamente de uma série de medições obtidas de múltiplas amostragens do mesmo material homogêneo (ADAMOVICS, 1997).

Para a validação de métodos de análise por cromatografia a precisão é subdividida em quatro níveis:

- Repetibilidade da injeção: avaliação da resposta de múltiplas injeções da mesma preparação de uma dada amostra (SHABIR, 2003);
- Repetibilidade de análise: quantificação de múltiplas preparações do mesmo analista e/ou mesmo equipamento em um curto intervalo de tempo, feitas a partir do mesmo material homogêneo (ADAMOVICS, 1997) (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007);
- Precisão intermediária: quantificação de múltiplas preparações comparadas de analistas diferentes, em equipamentos diversos, em um curto intervalo de tempo, feitas a partir do mesmo material homogêneo (ADAMOVICS, 1997);
- Reprodutibilidade: expressa a precisão quando se está desenvolvendo um método que será aplicado a diferentes laboratórios (caso das metodologias farmacopeicas). A metodologia deve ser avaliada em diferentes laboratórios, com todas as variações citadas acima e com equipamentos de marcas diferentes, usando também regentes de outros fabricantes (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

O valor mais aceito para a precisão é $DPR \leq 2,0\%$ para todos os casos de método de teor de ingrediente ativo em formulação (HAMPEL, YORK e ALLEN, 2012).

1.4.5. Exatidão (ou acurácia)

A exatidão é medida pela aproximação do valor encontrado para a amostra com aquele valor que é tido como verdadeiro (ADAMOVICS, 1997). O valor de referência pode ser obtido pela avaliação do resultado contra um segundo procedimento bem caracterizado, por exemplo, um farmacopeico (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

No caso de procedimentos inéditos o placebo é contaminado com quantidades conhecidas dos analitos e o procedimento segue como no preparo das amostras. Com relação ao delineamento do estudo, se requerer – pela literatura científica e órgão regulatório – uma avaliação estatística mais consistente, que avalie um mínimo de 9 determinações, a pelo menos 3 níveis dentro da faixa avaliada (isto é, três concentrações, com três preparações em cada) (PETERS, DRUMMER e MUSSHOFF, 2006). Os resultados devem estar em uma faixa de $\pm 2,0\%$ relativo em cada nível. Contudo faixas mais largas podem ser usadas levando em conta principalmente a própria especificação do método. Se a faixa for, por exemplo, 90 a 110% ainda é aceitável que a exatidão trabalhe com uma faixa de $\pm 5,0\%$. A regra é que a especificação da exatidão nunca seja maior que o critério de aceitação (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

1.4.6. Estabilidade de solução

A avaliação da estabilidade de solução analítica é feita para se verificar por quanto tempo as soluções padrão e amostra são estáveis ou para se demonstrar que são estáveis pelo menos durante a duração normal da sequência analítica (SHABIR, 2003). Fica a critério do laboratório avaliar essa estabilidade num tempo maior do que o necessário, o que é interessante para uma distribuição melhor da rotina do laboratório, como a disponibilidade de equipamento ou mão de obra para o preparo do teste. A aceitabilidade é uma variação de $\pm 2,0\%$ para os testes de teor e uniformidade de conteúdo (ADAMOVICS, 1997) (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). A forma mais simples de avaliar a estabilidade é injetando as soluções padrão e amostra em intervalos de tempo predefinidos. Nesse caso é feita uma avaliação da variação das respostas desde o momento inicial até os tempos de injeção. A avaliação assim definida é principalmente aplicável quando é feita uma avaliação do tempo mínimo de estabilidade, isto é, tempo máximo permitido para que a sequência analítica se complete.

Outra forma para avaliação da estabilidade é confrontar os resultados da análise de uma solução preparada a algum tempo contra uma recém preparada. Este tipo de teste é

importante quando se quer demonstrar que a solução analítica é válida por um período maior de tempo, por exemplo, 24, 48 ou 72 horas (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

1.4.7. Robustez

Robustez se relaciona com a confiabilidade de uma análise em relação às variações deliberadas que um método é passível. Dizer que um método é robusto é dizer que os resultados não sofrerão alterações significativas caso essas variações involuntariamente ocorram (PETERS, DRUMMER e MUSSHOF, 2006). Cada parâmetro é avaliado individualmente para determinar seu efeito no resultado final. Previamente a essa avaliação um conjunto de parâmetros de adequação de sistema deve ser estabelecida, que são os critérios de aceitação da resposta de um método que ainda garantem a confiabilidade dos resultados, por exemplo, a resolução, eficiência e simetria picos. Contudo uma não conformidade nesses estudos não invalida um método, mas sugere que determinado parâmetro deve ser criteriosamente controlado (PETERS, DRUMMER e MUSSHOF, 2006).

Em métodos cromatográficos, os parâmetros que podem ser deliberadamente modificados são: composição da fase móvel, pH da fase móvel (se aplicável), concentração do modificante da fase móvel (caotrópico, pareador iônico), fluxo da fase móvel, lote da coluna ou fabricante, temperatura da coluna, membrana filtrante, etc (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Amostra Teste e Placebo

Um único lote piloto do polivitamínico foi produzido e usado como material teste para o desenvolvimento e validação do método analítico. A seguir se apresenta a relação dos constituintes do comprimido:

Excipientes / Função:

- celulose microcristalina PH 200 – agente suspensor, adsorvente;
- copovidona – aglutinante;
- sorbitol em pó – diluente e edulcorante;
- dióxido silício coloidal – deslizante;
- estearato de magnésio – lubrificante;
- álcool polivinílico (PEG) talco – polímero ;
- corante vermelho 40 alumínio laca – corante;
- corante azul brilhante alumínio laca – corante.

Vitaminas/dosagem por comprimido:

- Tiamina (vitamina B1) – 10,5 mg;
- Riboflavina (vitamina B2) – 10,5 mg;
- Nicotinamida (vitamina PP) – 10,5 mg;
- Piridoxina (vitamina B6) – 10,5 mg;
- Cianocobalamina (vitamina B12) – 105 µg;
- Acetato de tocoferol (vitamina E) – 10,5 mg.

O peso médio dos comprimidos obtidos de uma média de 20 unidades foi de 980,0 mg. Sendo este valor usado nos testes de validação analítica.

2.2. Reagentes

Os reagentes usados e os respectivos fabricantes estão resumidos no Quadro 5.

Quadro 5 - Reagentes usados e os respectivos fabricantes.

Reagente	Fabricante
Acetonitrila	Merk
Metanol	Merk
Acetato de amônio	J.T.Baker
Hidróxido de Amônio	J.T.Baker
ácido Fórmico	Merk

A água usada, de grau UPLC, foi preparada em um sistema de purificação com dois módulos: Elix®35 e Milli-Q Gradient, ambos da Millipore – França. Os padrões de vitamina foram obtidos da USP (United States Pharmacopeia – Rockville, Md.).

2.3. Equipamentos

As pesagens foram feitas em balança analítica de precisão 0,1 mg da marca Toledo – modelo Ohaus Adventurer AR2140, verificada diariamente, o aparelho de ultrassom é da marca Unique – modelo USC-5050A, o banho-maria, do fabricante Nova Ética – modelo 314/10D e o pHmetro da marca Micronal – modelo B474.

2.4. Preparo das amostras

2.4.1. Análise do teor de Acetato de tocoferol

Preparo do padrão: Pesou-se o equivalente a 52,5 mg de acetato de tocoferol e transferiu-se para um béquer de 50,0 ml. Adicionou-se 5,0 ml de água e levou-se ao banho-maria por 10 minutos a 40 °C. Esperou-se que esfriasse e transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 ml. Enxaguou-se o resíduo do béquer com duas porções de 10,0 mL de metanol, transferindo os enxágues para o balão, e completou-se o volume com esse mesmo solvente. Levou-se o balão ao ultrassom por 15 minutos e pipetou-se 5,0 ml para um balão de 50 ml. Completou-se o volume com metanol e filtrou-se em membrana 0,45 µm diretamente no *vial* (concentração: 0,105 mg/ml).

Preparo das amostras: Pesou-se 980,0 mg dos comprimidos finamente pulverizados (equivalente a 10,5 mg de acetato de tocoferol), transferiu-se para um béquer de 100,0 ml e adicionou-se 5,0 ml de água. O béquer foi levado ao banho-maria a 40 °C por 10 minutos. Transferiu-se para balão volumétrico, enxaguou-se o resíduo do béquer com duas porções de 10,0 mL de metanol, transferindo os enxágues para o balão, e completou-se o volume com esse mesmo solvente. Levou-se ao ultrassom por 15 minutos e filtrou-se em membrana 0,45 µm diretamente no *vial* (concentração: 0,105 mg/ml).

2.4.2. Análise do teor de Cianocobalamina

Preparo do padrão: Pesou-se o equivalente a 21,0 mg de cianocobalamina e transferiu-se para balão volumétrico âmbar de 100,0 ml. Completou-se o volume com água e agitou-se até completa solubilização. Pipetou-se 2,0 ml, transferiu-se para balão volumétrico âmbar de 100,0 ml e completou-se o volume com água. Filtrou-se com membrana 0,45 µm diretamente em *vial* âmbar (concentração: 0,0042 mg/ml).

Preparo da amostra: Pesou-se 980,0 mg dos comprimido finamente pulverizados (equivalente a 0,105 mg de cianocobalamina) e transferiu-se para um frasco âmbar com capacidade de 30 ml. Adicionou-se 25,0 ml de água com pipeta volumétrica e agitou-se vigorosamente por 2 minutos observando se houve desintegração completa dos grumos. Levou-se ao ultrassom por 15 minutos e filtrou-se em membrana 0,45 µm diretamente em *vial* âmbar (concentração: 0,0042 mg/ml).

2.4.3. Análise do teor das Vitaminas: Nicotinamida, Piridoxina, Riboflavina e Tiamina

Para a extração das vitaminas e solubilização dos padrões foi usado um diluente com a seguinte composição: 37,5 partes de acetonitrila, 12,5 partes de metanol, 50,0 partes de água e 0,1 parte de ácido fórmico.

Preparo do padrão: Pesou-se o equivalente a 26,25 mg de cada uma das vitaminas e transferiu-se para béquer de 50,0 ml. Adicionou-se 25,0 mL do diluente e levou-se ao banho-maria mantido a 60 °C por 10 minutos até que a solução ficasse translúcida, indicando completa solubilização das vitaminas. Esperou-se que a solução esfriasse, transferiu-se para balão volumétrico de 50,0 mL, enxaguou-se o béquer com duas porções de 10,0 mL, transferindo os enxágues para o balão, e completou-se o volume com o mesmo com diluente. Homogeneizou-se, pipetou-se 5,0 ml para outro balão volumétrico de 50,0 ml e completou-se com a fase móvel A (descrita na parte de condições cromatográficas). Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana 0,45 µm (concentração 0,0525 mg/ml de cada uma das vitaminas).

Preparo da amostra: Pesou-se 980,0 mg dos comprimidos finamente pulverizados (equivalente a 10,5 mg de cada uma das vitaminas) e transferiu-se para um béquer de 50,0 mL. Adicionou-se 20,0 ml do diluente e levou-se ao banho-maria mantido a 60 °C por 10 minutos. Esperou-se que a solução esfriasse e transferiu-a para balão volumétrico de 200,0 mL. Enxaguou-se o béquer com duas porções de 10,0 mL de fase móvel A, transferindo os enxágues para o balão, e completou-se o volume com esse mesmo solvente. Homogeneizou-

se e filtrou-se em membrana 0,45 µm diretamente no *vial* (concentração 0,0525 mg/ml de cada uma das vitaminas).

2.4.4. Preparo das soluções placebo

Os comprimidos para os testes com placebo foram preparados pelo setor de desenvolvimento farmacotécnico da indústria fabricante, conforme a formulação e o processo empregado no preparo do produto, excluindo-se as vitaminas em estudo.

Em cada análise a solução placebo foi preparada de modo idêntico ao preparo das amostras, exceto que ao invés de amostra, era pesada a massa correspondente de placebo e adicionadas as massas correspondentes das vitaminas não analisadas no método em questão. Assim, no preparo do placebo de acetato de tocoferol pesou-se 937,9 mg de placebo, 10,5 mg de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina e 0,1 mg de cianocobalamina. No preparo do placebo de cianocobalamina pesou-se 937,9 mg de placebo, 10,5 mg de nicotinamida, piridoxina, riboflavina, tiamina e de acetato de tocoferol. Na análise de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina pesou-se 937,9 mg de placebo, 10,5 mg de acetato de tocoferol e 0,1 mg de cianocobalamina.

2.5. Condições Cromatográficas – análises por UPLC

As análises por UPLC foram realizadas em um cromatógrafo modelo Acquity UPLC, fabricado pela Waters Corporation, composto por um gerenciador de solvente quaternário modelo Acquity H Class, um gerenciado de amostras modelo Sample Manager FTN e um detector de arranjo de fotodiodo modelo Detector PDA eλ. Os dados coletados foram posteriormente processados com o Software Empower 2, desenvolvido pela Waters Corporation.

Na análise de determinação de acetato de tocoferol usou-se a coluna Acquity UPLC BEH C18, fabricada pela Waters Corporation, de 2,1 mm de diâmetro interno, 50 mm de comprimento e empacotada com partículas de 1,7 µm de diâmetro. Como fase móvel foi usada acetoneitrila a um fluxo de 0,5 ml/min. O volume de injeção das amostras foi 1,0 µl e o tempo de análise cromatográfica gasto em cada injeção foi de 2,5 minutos. O comprimento de onda de leitura das análises cromatográficas foi de 285,5 nm a taxa de captura de dados 20 pps (pontos por segundo). A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o compartimento das amostras refrigerado a 10 °C.

Na análise de determinação de cianocobalamina a coluna usada foi a mesma empregada na análise de acetato de tocoferol. Como fase móvel foi usada uma mistura de água e metanol na proporção de 80 para 20 a um fluxo de 0,5 ml/min. O volume de injeção das amostras foi 4,0 µL e o tempo de análise cromatográfica necessário em cada injeção foi de 2,5 minutos. O comprimento de onda de leitura das análises cromatográficas foi de 550,0 nm a uma taxa de captura de dados de 20 pps. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o compartimento das amostras refrigerado a 10 °C.

Na análise das vitaminas nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina foi empregada outra coluna: Acquity UPLC BEH Amida, fabricada pela Waters Corporation, de 2,1 mm de diâmetro interno, 50 mm de comprimento e empacotada com partículas de 1,7 µm de diâmetro. A separação foi alcançada adotando-se o gradiente descrito a seguir: de 0,0 a 0,2 minutos a análise cromatográfica mantém a proporção de 90 : 10 respectivamente entre as fases A e B; de 0,2 a 2,0 minutos, faz um gradiente linear até a proporção de 70 : 30; de 2,0 a 2,5 retorna à condição inicial em um gradiente linear. Durante o gradiente o fluxo de fase móvel foi mantido a 0,5 ml/min. O preparo das fases móveis A e B é descrito a seguir:

- Fase móvel A: Preparou-se uma solução misturando 900 ml de acetonitrila com 100 ml de água. Adicionou-se acetato de amônio a esta solução para obter uma concentração de 0,01 mol/L. Ajustou-se o pH dessa solução para 9,0 com hidróxido de amônio.
- Fase móvel B: Preparou-se uma solução misturando 500 ml de acetonitrila com 500 mL de água. Adicionou-se acetato de amônio a esta solução para se ter uma concentração de 0,01 mol/L. Ajustou-se o pH dessa solução para 9,0 com hidróxido de amônio.

O volume de injeção das amostras foi de 1,0 µL. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C e o compartimento das amostras refrigerado a 10 °C. O comprimento de onda de detecção mais adequado para a quantificação dos quatro componentes ativos foi de 265 nm, a uma taxa de captura de dados de 20 pps.

2.6. Testes para validação das metodologias de teor das vitaminas

2.6.1. Adequação de sistema

A adequação de sistema consiste em verificar se os parâmetros analíticos estabelecidos como adequados para o método foram atendidos. Não é propriamente um teste de validação, mas um item de boas práticas laboratoriais que garante que o sistema como um todo está apto

para o início dos testes (SHABIR, 2003). Para essa avaliação foram injetadas cinco vezes as soluções padrão.

2.6.2. Especificidade

Para a avaliação da especificidade as soluções, padrão, amostra, placebo, diluente e fase móvel, foram injetadas e seus resultados comparados. Em paralelo foi realizada a varredura espectral de cada uma das soluções utilizando o detector de arranjo de fotodiodos na faixa de comprimento de 200 a 400 nm, para as vitaminas nicotinamida, piridoxina, riboflavina, tiamina e acetato de tocoferol, e na faixa de 200 a 700 nm na análise de cianocobalamina. Essa varredura foi feita para verificar se os picos são puros, confirmando que eles são atribuídos a um só componente.

2.6.3. Estabilidade das soluções

Para o estudo de estabilidade as soluções analíticas do padrão e da amostra foram analisadas imediatamente após seu preparo e reanalisadas em intervalos de tempo de 6 em 6 horas até completar-se 18 horas decorridas desde o preparo. A avaliação de estabilidade de cada solução analítica foi feita pela variação dos resultados encontrados das áreas dos picos cromatográficos, dada pela diferença percentual desde o momento inicial.

2.6.4. Linearidade

O teste de linearidade do método foi planejado para que atendesse tanto a faixa requerida para a avaliação do teor, quanto para o teste de uniformidade. Foram preparadas soluções dos padrões de vitamina em concentrações correspondentes a 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120% e 130% da concentração das vitaminas na solução amostra. A justificativa da escolha desses valores é que deve haver pelo menos cinco níveis de concentração entre 80% e 120% da concentração teórica da solução amostra, requeridos para a avaliação da linearidade de um método de teor, além dos níveis de concentração de 70% e 130%, para abrangerem os requerimentos de linearidade de um teste de uniformidade (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007).

Para o preparo dos sete níveis de concentração foram tomados 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 ml de cada solução padrão estoque para respectivamente sete balões de 50,0 ml (no preparo dos níveis de concentração do método de análise de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina, e do método de análise de acetato de tocoferol) e sete balões de 250,0 ml (no preparo dos níveis de concentração do método de análise de cianocobalamina), e o

volume completado com o diluente descrito no preparo dos padrões. Cada solução preparada foi injetada em triplicata.

2.6.5. Precisão

A avaliação da precisão dos métodos de rotina em um laboratório requer o estudo da repetibilidade e da precisão intermediária. Assim, os resultados das análises das amostras feitas por analistas diferentes, e em dias diferentes, devem ser convergentes. Para cada método, dois analistas, em dias diferentes, prepararam seis soluções amostras partindo do mesmo material homogêneo. Os valores das áreas dos picos foram usados para se calcular o desvio padrão relativo (%) entre as preparações. A repetibilidade foi avaliada pelo desvio das áreas das múltiplas preparações do mesmo analista, enquanto que a precisão intermediária foi avaliada pelo desvio das áreas das preparações dos dois analistas.

2.6.6. Exatidão

O preparo das amostras para a avaliação da exatidão foi feito de modo semelhante ao preparo das amostras descrita no item 2.4, sendo que, ao invés de se pesar a amostra, a massa do placebo e dos ativos era pesada separadamente e transferida para o balão. Para a avaliação da exatidão de cada método de análise foram preparadas nove amostras: três em cada um dos níveis 80%, 100% e 120% da concentração teórica.

No preparo das amostras para avaliação da exatidão de cianocobalamina, houve a necessidade de uma adaptação: uma solução estoque de cianocobalamina foi preparada e a quantidade correspondente de ativo que deveria ser pesada foi transferida dessa solução com pipeta volumétrica. Isso foi necessário porque a balança disponível não era sensível para pesar com exatidão a massa de ativo que deveria ser transferida (0,1050 mg de cianocobalamina). Cada solução preparada foi injetada em triplica.

2.6.7. Robustez

Para a avaliação da robustez foram preparadas as soluções padrão e amostra e injetadas, respectivamente, cinco e duas vezes em cada condição avaliada. A Quadro 6 resume as condições que foram variadas e o quanto foram alteradas para cada método de análise.

Quadro 6 - Variação das condições empregada na avaliação da robustez.

Método/Ativo(s)	Variação	Nível da Variação
Análise de Nicotinamida, Piridoxina, Riboflavina e Tiamina	Fluxo da Fase Móvel	± 2,0%
	Composição da Fase Móvel	± 1,0%
	Lote da Coluna Cromatográfica	3 lotes diferentes
	Temperatura da coluna	± 3,0 °C
	pH da Fase Móvel	0,20 Unidades de pH
Análise de Acetato de Tocoferol	Fluxo da Fase Móvel	± 2,0%
	Lote da Coluna Cromatográfica	3 lotes diferentes
	Temperatura da coluna	± 3,0°C
Análise de cianocobalamina	Fluxo da Fase Móvel	± 2,0%
	Composição da Fase Móvel	± 1,0%
	Lote da Coluna Cromatográfica	3 lotes diferentes
	Temperatura da coluna	± 3,0°C

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Determinação de Nicotinamida, Piridoxina, Riboflavina e Tiamina

Para estabelecer o procedimento de extração das vitaminas presentes na formulação procurou-se um diluente no qual fossem solúveis todas as vitaminas que iam ser analisadas. A melhor solubilidade foi alcançada usando o diluente já descrito no preparo das amostras (item 2.4.3). A eficiência da extração foi avaliada no procedimento de teste de extração.

As primeiras análises cromatográficas feitas usando a leitura no modo de varredura possibilitaram determinar o melhor comprimento de onda de leitura para ser utilizado no método em estudo. O comprimento de onda escolhido foi de 265,0 nm porque a maioria das vitaminas possuem um pico no espectro de absorção próximo a esse valor (nicotinamina – 261,7 nm, riboflavina – 267,7 nm e tiamina – 266,5 nm). A piridoxina absorve bem nesse comprimento de onda apesar de apresentar um pico de absorção 20 nm acima (em 283,1 nm). A Figura 19 apresenta os espectros de cada uma das vitaminas extraídas das análises cromatográficas, nos momentos de ápice dos picos, feitas no modo de varredura.

As condições cromatográficas da separação para as vitaminas nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina foram escolhidas após uma série de testes de gradiente, partindo da condição estabelecida no trabalho da Waters (WATERS, 2009). O tempo do gradiente proposto é, contudo, duas vezes menor que o proposto por Waters.

O fabricante da coluna garante que pela tecnologia empregada na síntese das partículas de sílica (Ethylene Bridged Hybrid (BEH) – partículas híbridas de ponte de etileno) é possível trabalhar a qualquer valor de pH dentro da faixa 1 - 12. Se assim não fosse, não seria viável o uso de amida, molécula básica, como grupo ligante da sílica.

A amida como ligante para a fase estacionária tem como principais mecanismos de retenção para os analitos interações polares, o que a enquadra na classificação de fase estacionária normal. Além das pontes de hidrogênio que podem ser formadas, moléculas com carga positiva também terão forte interação com os potenciais elétricos negativos do oxigênio e do nitrogênio dos grupos amidas. Uma relação direta entre o número de hidroxilas, amidas e aminas nas moléculas de vitamina e o tempo de retenção da nicotinamida, piridoxina e riboflavina foi observada. A nicotinamida é uma molécula pequena e possui apenas dois hidrogênios de um grupo amida (que formam pontes de hidrogênios menos forte que os hidrogênios de grupos hidroxilas), e por isso foi a menos retida. A piridoxina possui três

hidroxilas, ao passo que a riboflavina possui quatro hidroxilas além de um hidrogênio de grupo amida, o que justifica a riboflavina ter ficado mais retida que a piridoxina. A tiamina, com carga efetiva positiva e, portanto, a molécula mais polar dentre as vitaminas analisadas, foi a que ficou mais retida. Assim, a ordem de eluição observada das vitaminas é coerente com suas estruturas moleculares e com a característica polar da fase estacionária (amida).

O gradiente descrito no item 2.5 garantiu uma resolução mínima de 4,9 entre todos os picos cromatográficos correspondentes às vitaminas analisadas. A eluição por gradiente foi necessária, pois, se a fase móvel fosse isocrática e muito polar as três primeiras vitaminas eluídas se aproximariam. Mas, por outro lado, se a fase móvel fosse isocrática e mais apolar o tempo de corrida, por causa da eluição retardada da tiamina, seria muito estendido. Os cromatogramas mostrando o tempo de retenção de cada uma das vitaminas podem ser visto na Figura 20, cujos valores estão na ordem de 5 a 10 vezes menor que os tempos encontrados na maioria das literaturas consultadas.

Não se observou nenhum interferente relevante nos tempos de retenção das vitaminas nas análises cromatográficas do diluente e da solução do placebo. As Figura 20 e Figura 21 mostram os cromatogramas das injeções das soluções padrão, amostra, placebo e diluente na condição determinada. O tempo de análise cromatográfica foi de 2,5 minutos, sendo que entre as injeções a coluna era reequilibrada por 1 minuto nas condições iniciais do gradiente para que não houvesse variações nos tempos de retenção das vitaminas entre múltiplas análises cromatográficas. Estabelecidas às condições cromatográficas tiveram início os testes de validação.

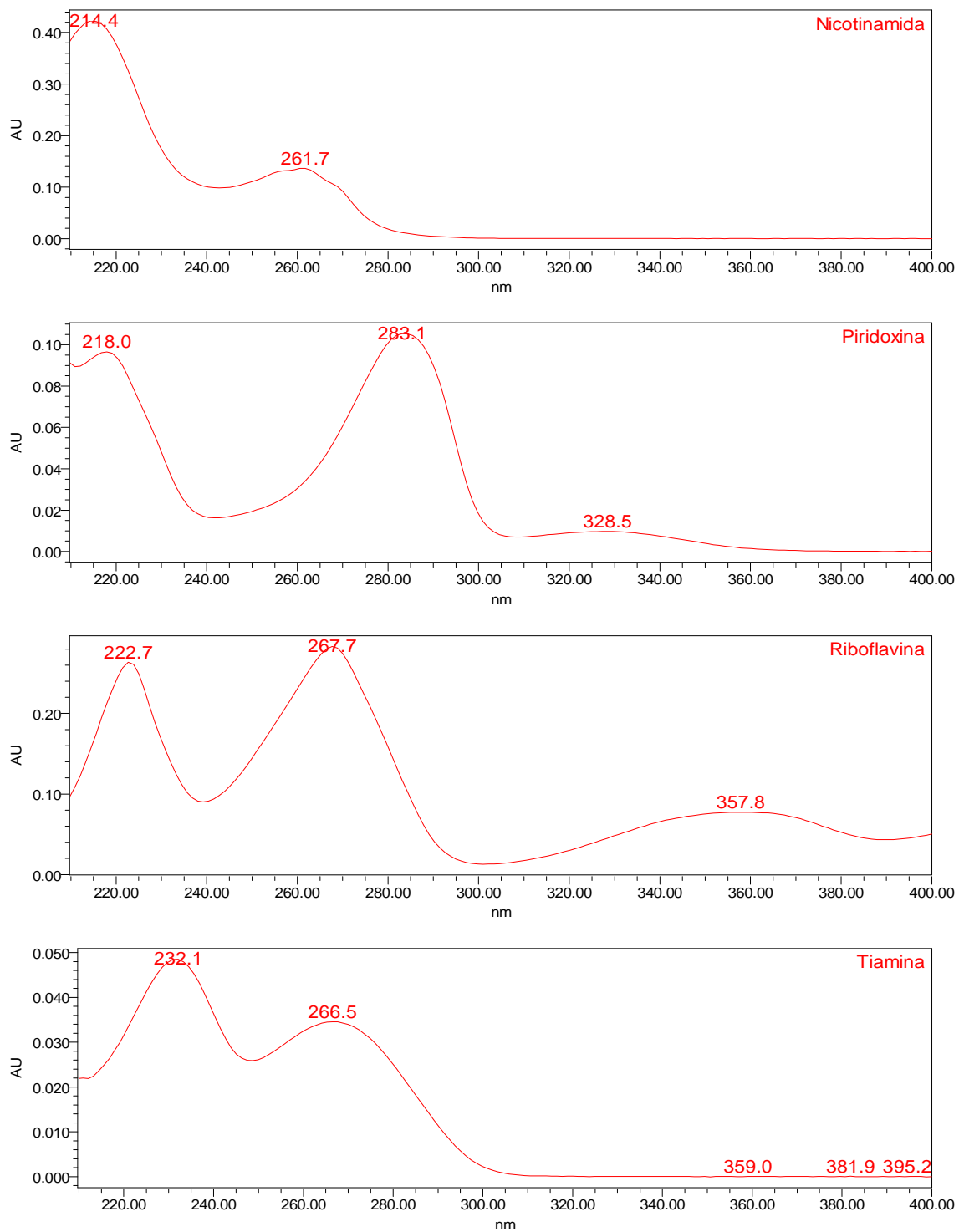


Figura 19 - Espectros extraídos das análises cromatográficas em Arranjo de Fotodiodo referente às vitaminas nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina.

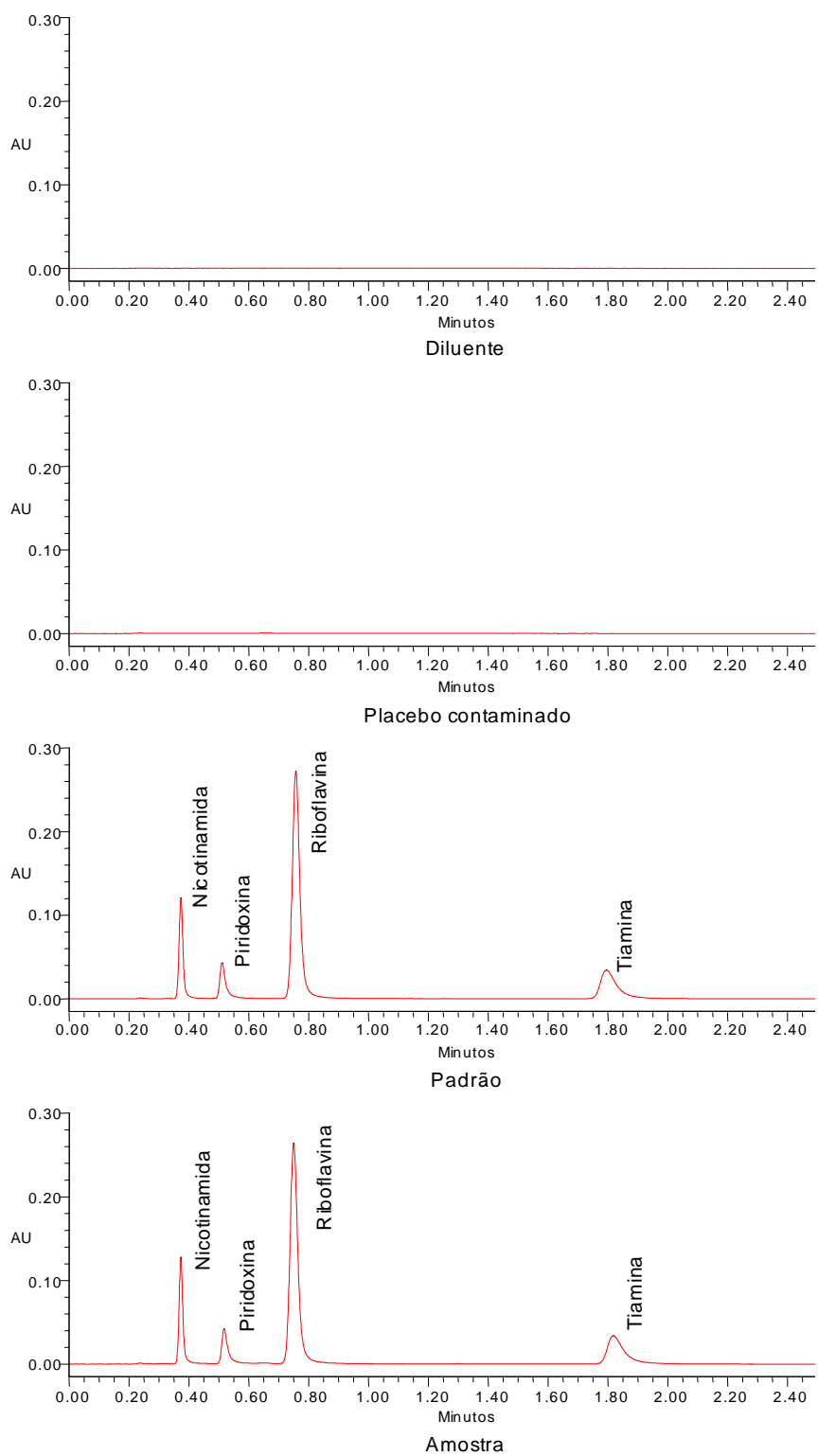


Figura 20 - Cromatogramas das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina.

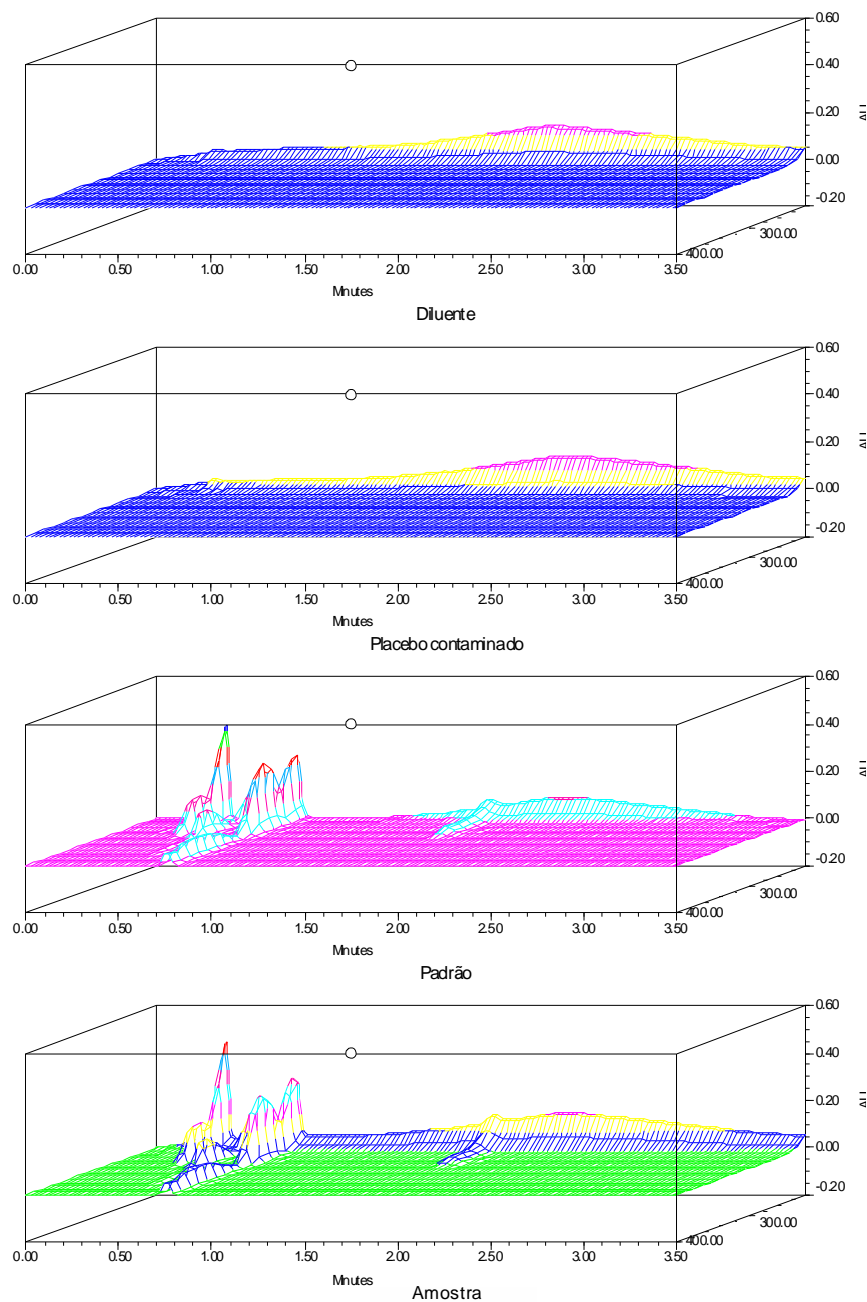


Figura 21 - Cromatogramas de varredura dos espectros das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina.

3.2. Determinação de Acetato de Tocoferol

De acordo com Basf (BASF, 2003) o acetato de tocoferol é muito solúvel em metanol, e o uso deste foi suficiente para solubilizar e preparar a solução padrão. No preparo das amostras foi necessário o uso de 5,0 ml de água a 40 °C para dispersar os excipientes antes da extração do acetato de tocoferol com metanol. A exatidão, discutida mais adiante, demonstrou que esse procedimento foi suficiente para a extração da amostra num nível aceitável.

O comprimento de onda de detecção adotado no método foi determinado pela avaliação do espectro do pico. Foi adotado um dos pontos de máximo, 285,5 nm, para a análise dessa vitamina, o que forneceu ao cromatograma uma linha de base límpida com uma ótima relação sinal-ruído – cerca de 400. A Figura 22 mostra o espectro do acetato de tocoferol extraído do cromatograma que correu em varredura de comprimentos de onda.

Para a determinação da condição cromatográfica para análise de acetato de tocoferol, partiu-se de uma força de eluente próxima à adotada por Wielinsky e colaboradores na determinação de múltiplas vitaminas lipossolúveis (WIELINSKI e OLSZANOWSKI, 1999). Assim, testou-se a eluição com acetonitrila. O resultado foi satisfatório e desnecessário testar outra condição. Injetaram-se as soluções placebo e amostra e verificou-se que não havia interferência no tempo de retenção do acetato de tocoferol (1,9 minutos). As Figura 23 e Figura 24 mostram o cromatogramas dessa condição determinada. Observou-se que as outras vitaminas foram eluídas próximas ao volume morto, nas soluções amostra e placebo, formando um pico bem maior que o pico de acetato de tocoferol. Na solução padrão é observado, além do acetato de tocoferol, um pico próximo ao volume morto correspondente ao diluente.

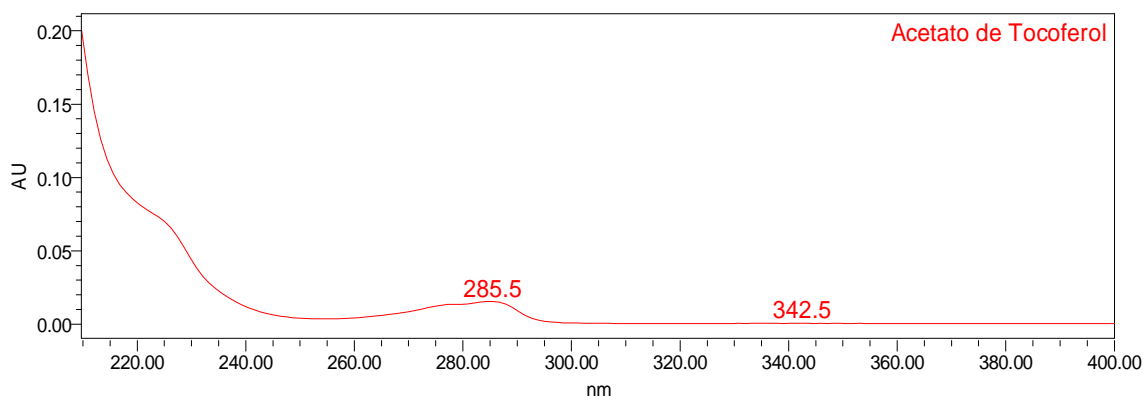


Figura 22 - Espectro extraídos das análises cromatográficas em Arranjo de Fotodiodo referente ao acetato de tocoferol.

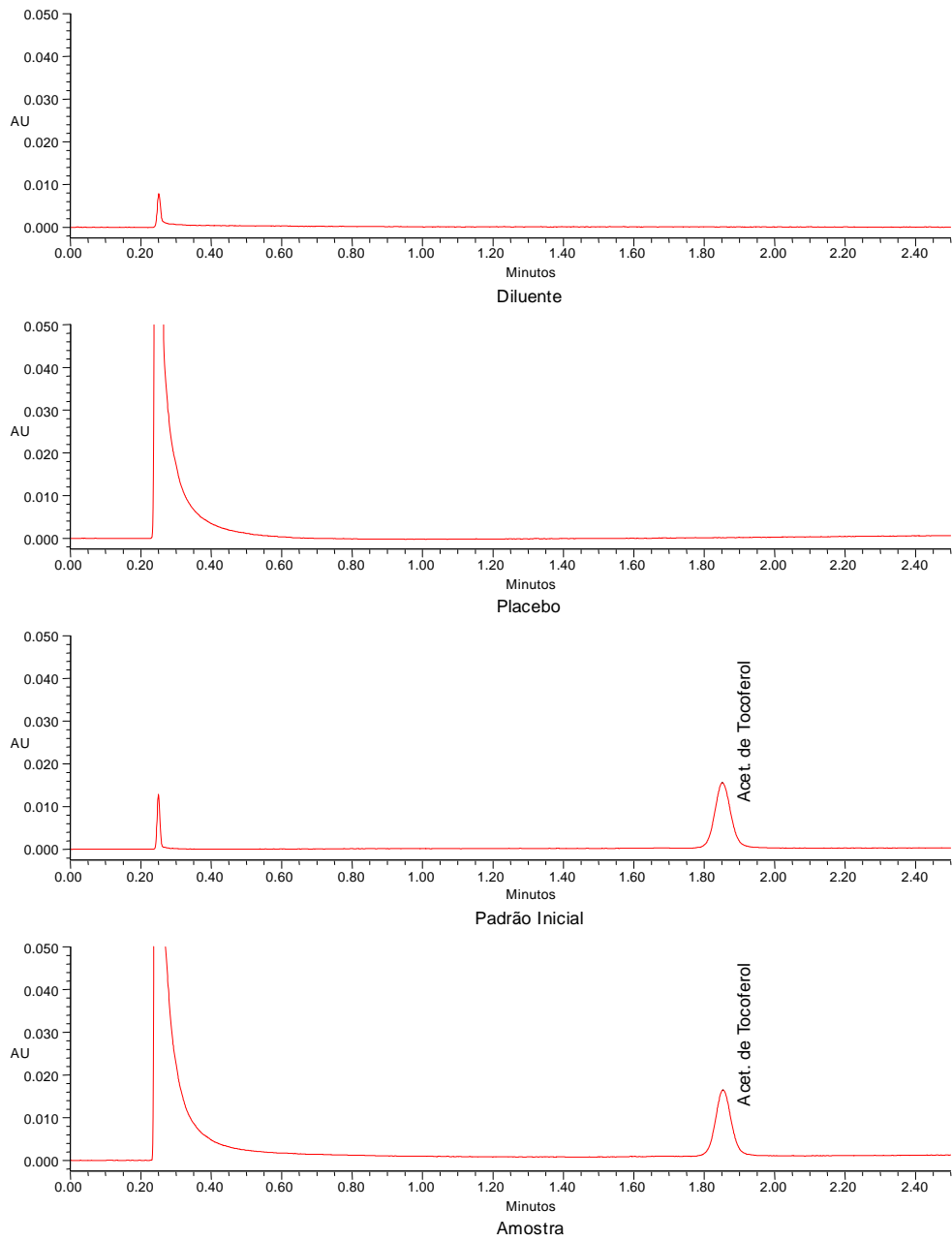


Figura 23 - Cromatogramas das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de acetato de tocoferol.

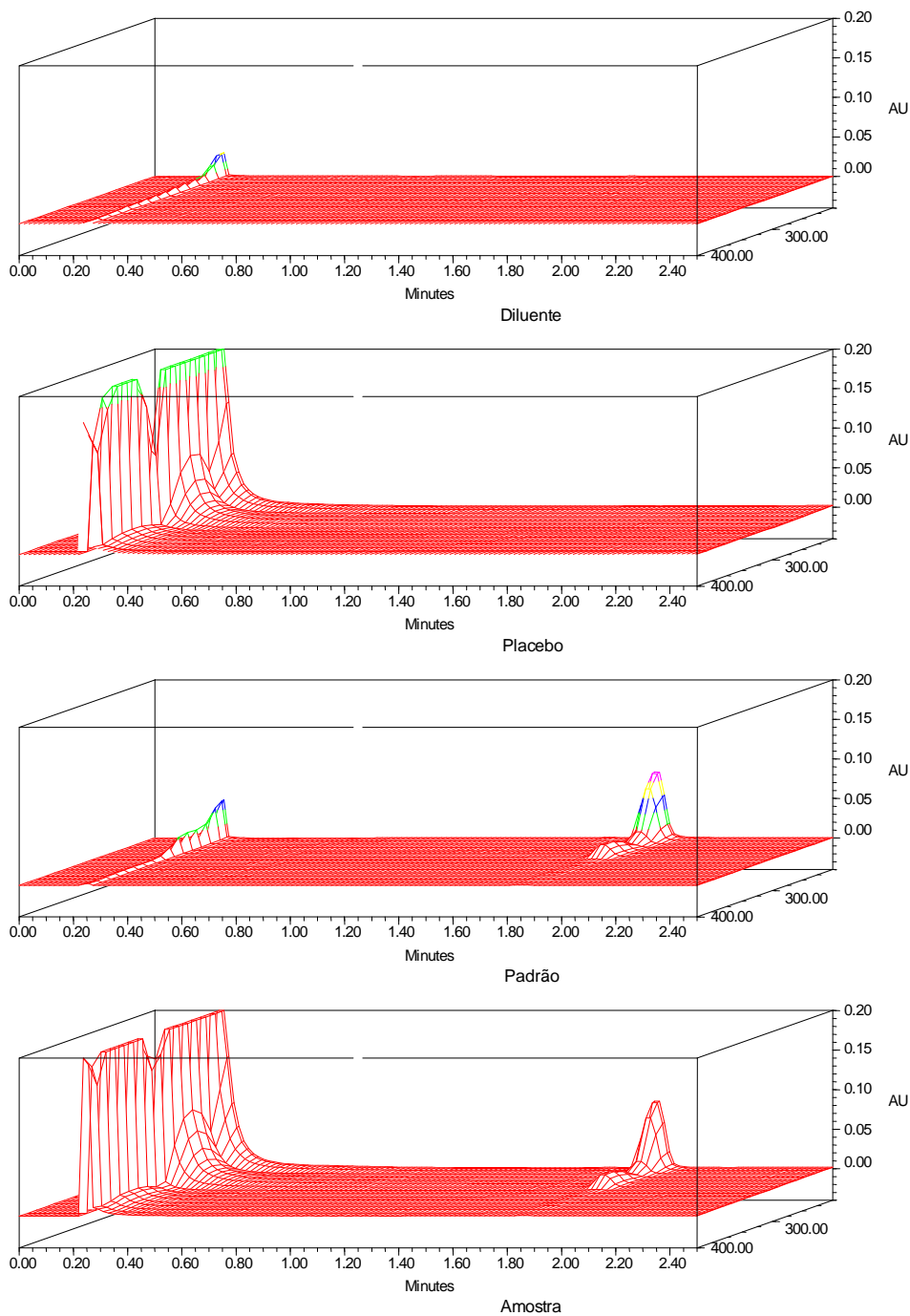


Figura 24 - Cromatogramas de varredura dos espectros das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de acetato de tocoferol.

3.3. Determinação de Cianocobalamina

A água, na qual a cianocobalamina é muito solúvel, foi usada como solvente para preparar a solução padrão e extrair a cianocobalamina da preparação farmacêutica. Tomou-se a precaução de usar somente vidrarias âmbar, pois a solução de cianocobalamina em pH ligeiramente ácido ou neutro está sujeita à degradação fotolítica (BASF, 2003).

Um ponto crítico na determinação de cianocobalamina é a baixa quantidade em que ela está presente na formulação (0,105 mg por comprimido). Damos preferência em desenvolver a metodologia de detecção no UV/VIS por ser uma metodologia mais acessível. Apenas se não conseguisse um sinal acima do limite de quantificação é que partiríamos para a detecção por fluorescência, por ser uma técnica mais sensível para essa espécie. O comprimento de onda de detecção adotado para as análises cromatográficas foi 550,0 nm porque, apesar de não ser o de maior absorvidade ao longo do espectro da cianocobalamina (como se observa na Figura 25, as absorções em 277,2 nm e 361,4 nm são mais acentuadas que aquela verificada em 550,0 nm) a interferência de outras vitaminas, praticamente sem absorvidade nesse comprimento de onda, é menor.

A fase móvel inicialmente usada foi composta de água e metanol na proporção de 70 : 30, mesma fase móvel empregada por Hua-Bin Li em seu trabalho de quantificação de vitamina B12 em meio de fermentação e em preparação farmacêutica (LI, CHEN e JIANG, 2000). Alguns ajustes foram feitos e o uso de água e metanol na proporção de 80 para 20 mostrou-se mais adequado. Para melhorar a razão sinal-ruído do pico de cianocobalamina o volume de injeção foi aumentado para 4,0 µl. Uma boa sensibilidade foi alcançada nessas condições, apresentando uma razão sinal-ruído de 60 e desvio padrão de múltiplas injeções da solução padrão inferior a 2,0%. Os cromatogramas dessas análises podem ser vistos nas Figura 26 e Figura 27.

Após 2,0 minutos do início da análise cromatográfica foi observada uma perturbação na base do cromatograma semelhante a um pico invertido. O espectro extraído da análise nesse tempo indicou que a perturbação é devido à absorção da riboflavina, e deve ser resultado da fluorescência desse composto no comprimento de onda em que o cromatograma foi obtido. Outra perturbação presente em todos os cromatogramas (das soluções padrão, amostra, placebo e diluente) a 0,25 minutos está relacionada com o diluente das injeções.

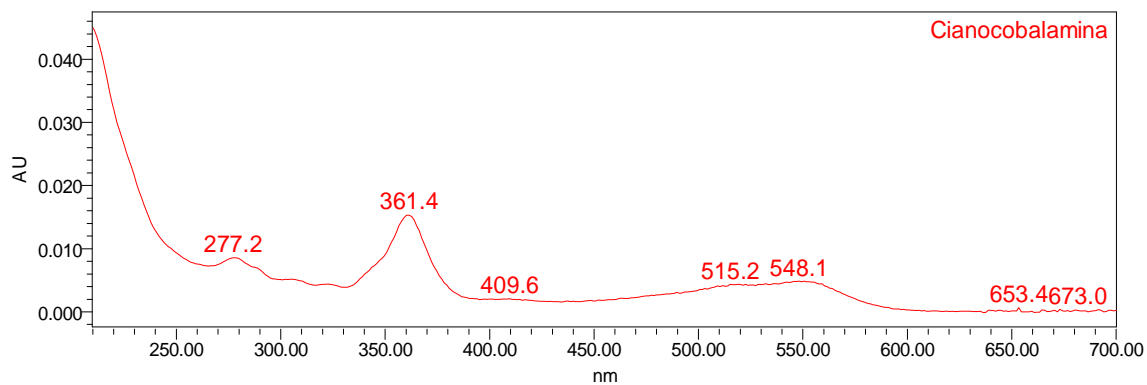


Figura 25 - Espectro extraído das análises cromatográficas em Arranjo de Fotodiodo referente à cianocobalamina.

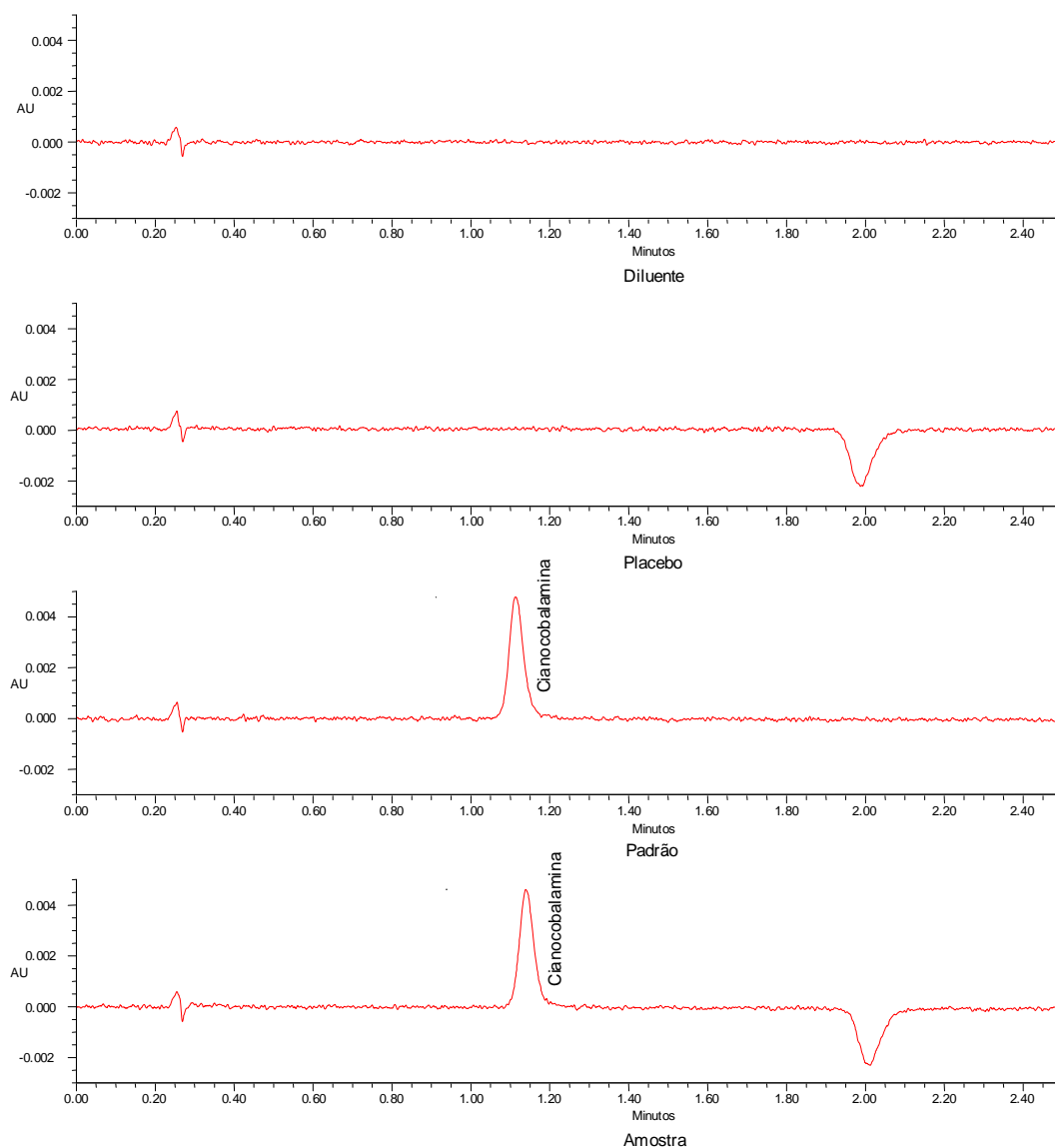


Figura 26 - Cromatogramas das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de cianocobalamina.

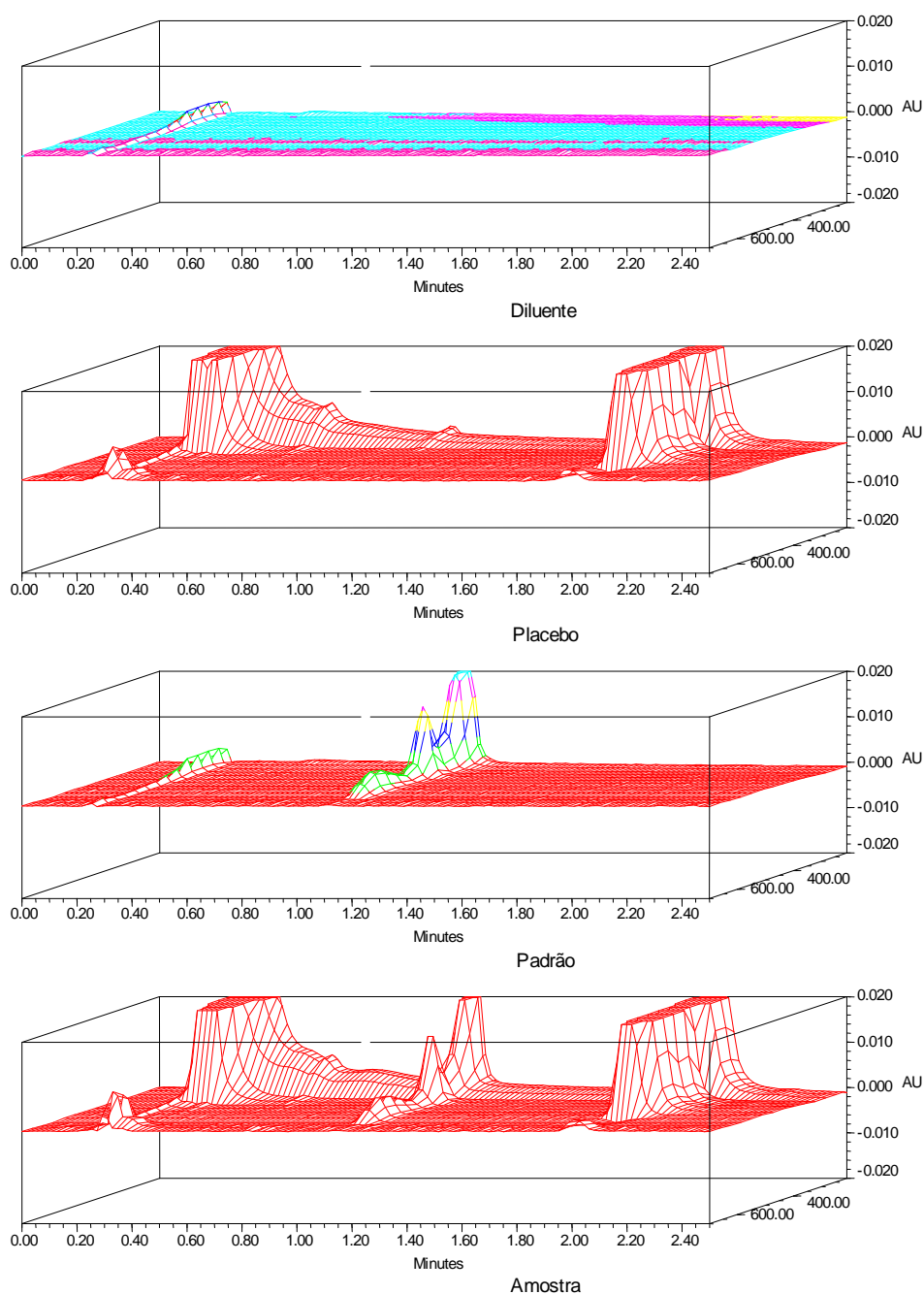


Figura 27 - Cromatogramas de varredura dos espectros das análises cromatográficas nas condições definitivas do método de análise de cianocobalamina.

3.4. Validação das metodologias analíticas

3.4.1. Adequação de Sistema

A avaliação de que o sistema está adequado para o início dos testes de validação foi obtida fazendo cinco injeções consecutivas de cada solução padrão. Os resultados desses testes mostram que não houve variação significativa no tempo de retenção dos ativos; o desvio da área dos picos cromatográficos de cada vitamina foi menor que 1,50%, sendo

considerado aceitável até dois por centos. A avaliação dos parâmetros cromatográficos, tais como pratos teóricos, simetria do pico e resolução ficaram nos valores esperados para estudos de desenvolvimento de metodologias analíticas por UPLC nas condições das análises. Concluindo assim que o sistema está adequado para o início dos testes de validação. Os resultados de adequação de sistema se apresentam nas Tabela 4 a Tabela 9

3.4.2. Especificidade

Não houve qualquer substância nas injeções das soluções placebo, diluente ou fase móvel que pudessem interferir na quantificação das amostras ou do padrão. A avaliação da pureza do pico, usando o software Empower 2, relaciona a sua homogeneidade espectral com os parâmetro de *Purity Angle* (ângulo de pureza – PA) e *Threshold* (limiar – TH). Se PA for menor que TH significa que o espectro é homogêneo por toda extensão da banda cromatográfica. Essa pureza foi alcançada para todos os picos, sendo assim, é possível atribuir o pico cromatográfico a um único componente.

Dessa forma pode-se afirmar que o método é específico, cumprindo todos os requisitos estabelecidos nessa avaliação. Os resultados de especificidade incluindo a pureza dos picos são apresentados nas Tabela 10 a Tabela 15.

3.4.3. Estabilidade de Soluções

A avaliação da estabilidade das soluções analíticas foi feita previamente aos outros testes para que o preparo das soluções e as análises cromatográficas fossem programados dentro de um tempo no qual as soluções fossem estáveis. A estabilidade das soluções foi avaliada por um período de 18 horas para as vitaminas nicotinamida, piridoxina, riboflavina, tiamina e acetato de tocoferol, e por 24 horas para a cianocobalamina. Os resultados são mostrados nos Gráfico 1 ao Gráfico 6, construídos a partir das Tabela 16 a Tabela 21.

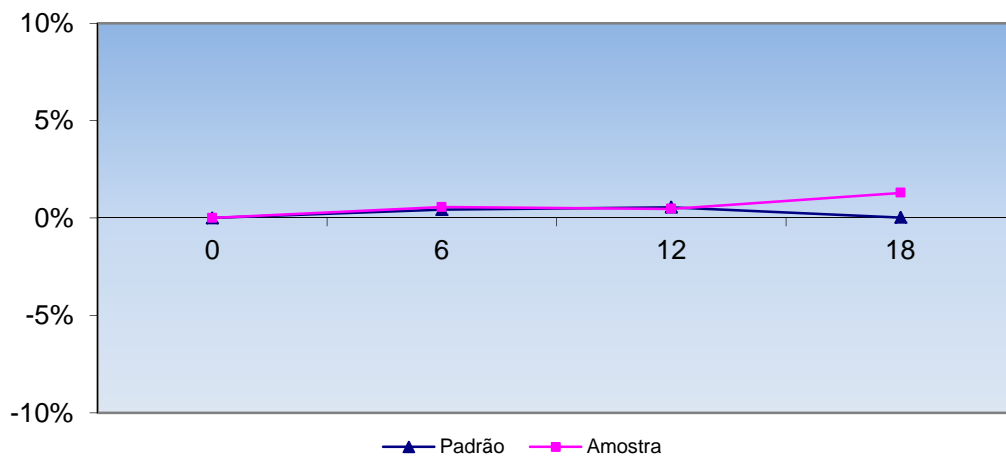


Gráfico 1 - Estabilidade das soluções analíticas de nicotinamida (% x horas)

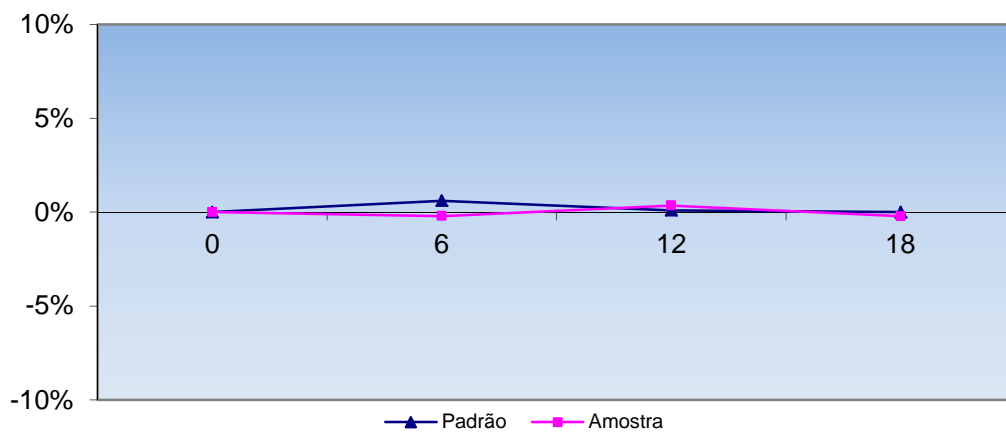


Gráfico 2 - Estabilidade das soluções analíticas de piridoxina (% x horas).

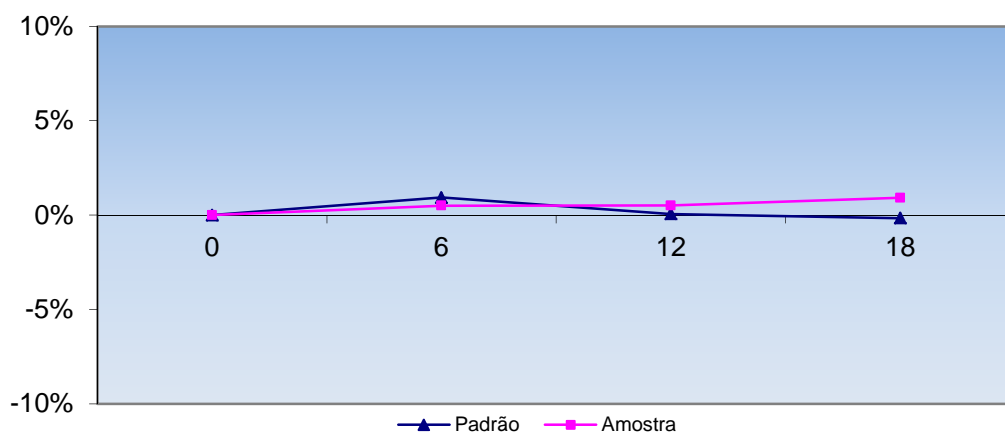


Gráfico 3 - Estabilidade das soluções analíticas de riboflavina (% x horas).

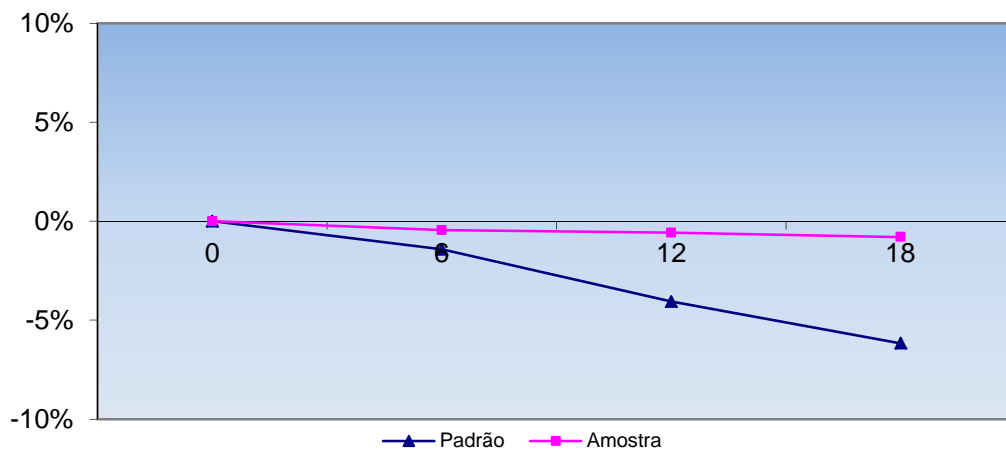


Gráfico 4 - Estabilidade das soluções analíticas de tiamina (% x horas).

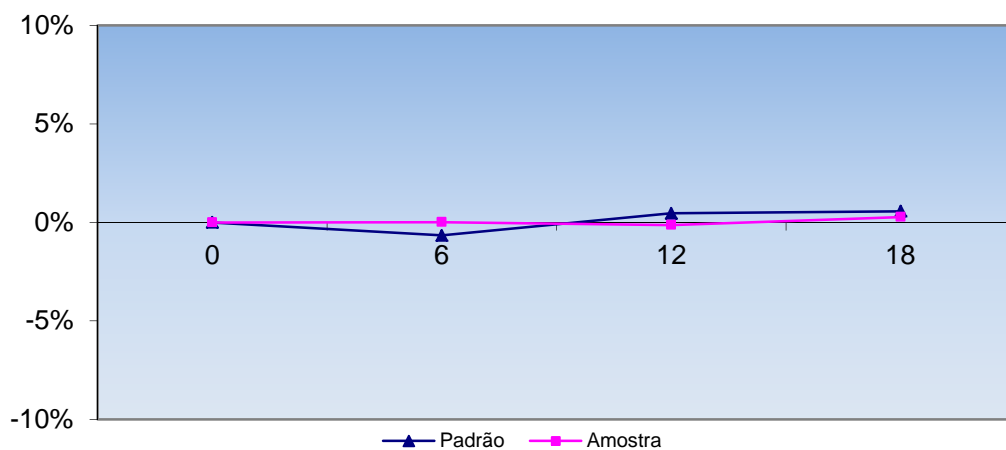


Gráfico 5 - Estabilidade das soluções analíticas de acetato de tocoferol (% x horas).

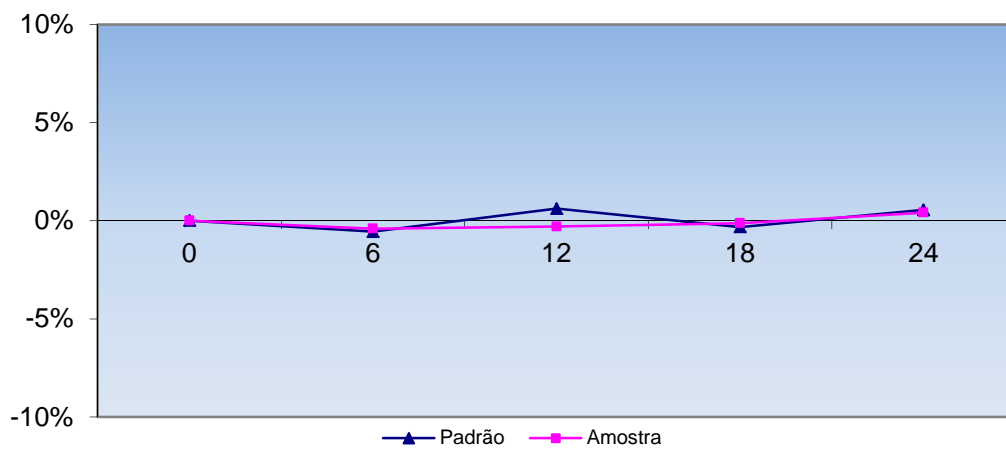


Gráfico 6 - Estabilidade das soluções analíticas de cianocobalamina (% x horas).

Pode-se concluir com esse estudo que, com exceção da solução padrão da vitamina tiamina, todas as outras são estáveis por 18 horas. Mas como a análise de nicotinamida, piridoxina, riboflavina e tiamina são simultâneas o tempo máximo que deve decorrer desde o preparo das soluções até o término da sequência nesse método é de 6 horas, que corresponde ao período em que o resultado de teor da tiamina na solução padrão encontra-se dentro de uma faixa de $\pm 2,0\%$ do valor inicial.

O Gráfico 4 apresenta o comportamento decrescente da curva do teor de tiamina da solução padrão, e com menos intensidade da solução amostra, com o decorrer do tempo. A degradação observada para a tiamina deve ter sido ocasionada porque o anel tiazolio da tiamina decompõe-se muito rápido em soluções alcalinas (o pH das soluções padrão e amostra é 9,0) (BASF, 2003). Washabaugh e colaboradores estudaram a cinética da degradação do anel tiazolio da tiamina em uma faixa de pH de 3 a 11, e propuseram que a degradação em pH básico ocorre por meio da adição nucleofílica do íon hidróxido ao carbono existente entre o nitrogênio positivo e o heteroátomo de enxofre. A estrutura intermediária formada (T°) é instável e o anel se rompe, formando uma estrutura acíclica (2) (WASHABAUGH, YANG, *et al.*, 1992). A Figura 28 apresenta o esquema desse mecanismo de degradação proposto por Washabaugh e colaboradores.

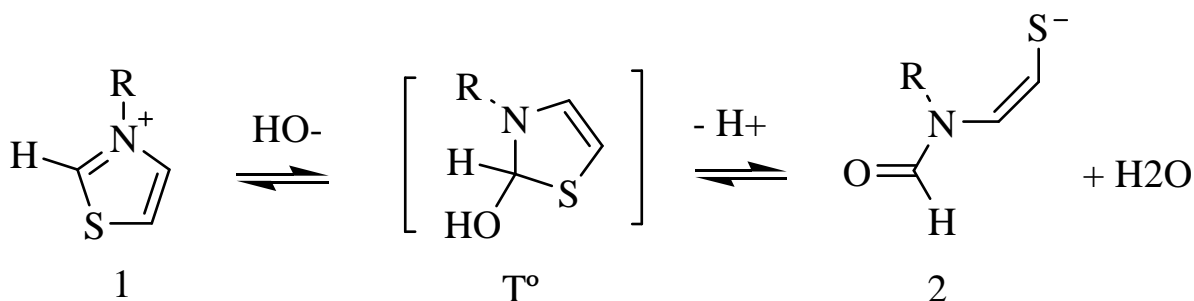


Figura 28 - Esquema da degradação do anel tiazolio da tiamina em pH básico. O equilíbrio é deslocado para a direita.

As soluções analíticas preparadas para a determinação de acetato de tocoferol, e aquelas preparadas para a determinação de cianocobalamina demonstraram-se estáveis por um período de respectivamente 18 e 24 horas, e esses são os tempos máximos que podem decorrer desde o preparo das soluções até o término das análises cromatográficas.

3.4.4. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada para cada vitamina pelo cálculo do coeficiente de correlação linear, equação da reta e seus resíduos pelo método dos mínimos quadrados.

Nas Tabela 22 a Tabela 39 se apresentam os resultados das análises cromatográficas para o teste de linearidade. Os resultados da regressão linear e seus resíduos são apresentados nos Gráfico 7 ao Gráfico 18.

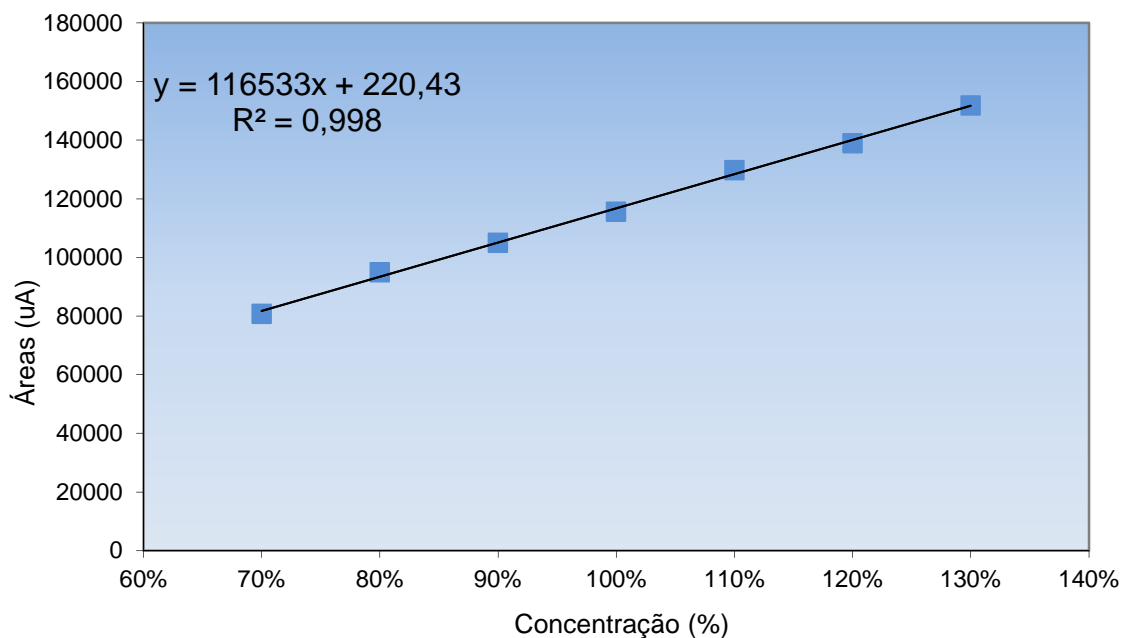


Gráfico 7 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Nicotinamida

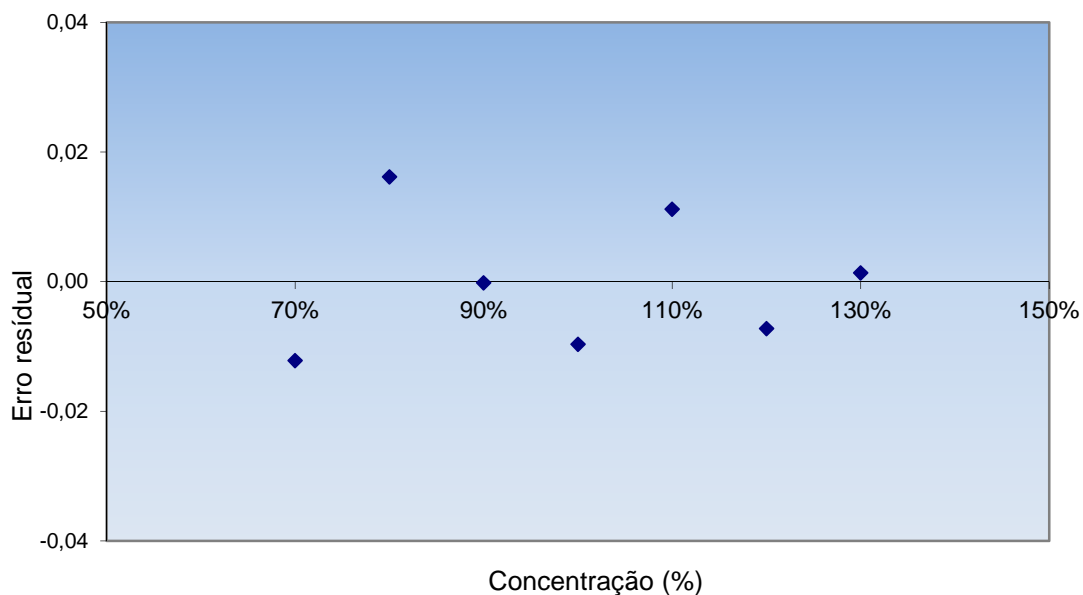


Gráfico 8 - Distribuição dos erros residuais - Nicotinamida

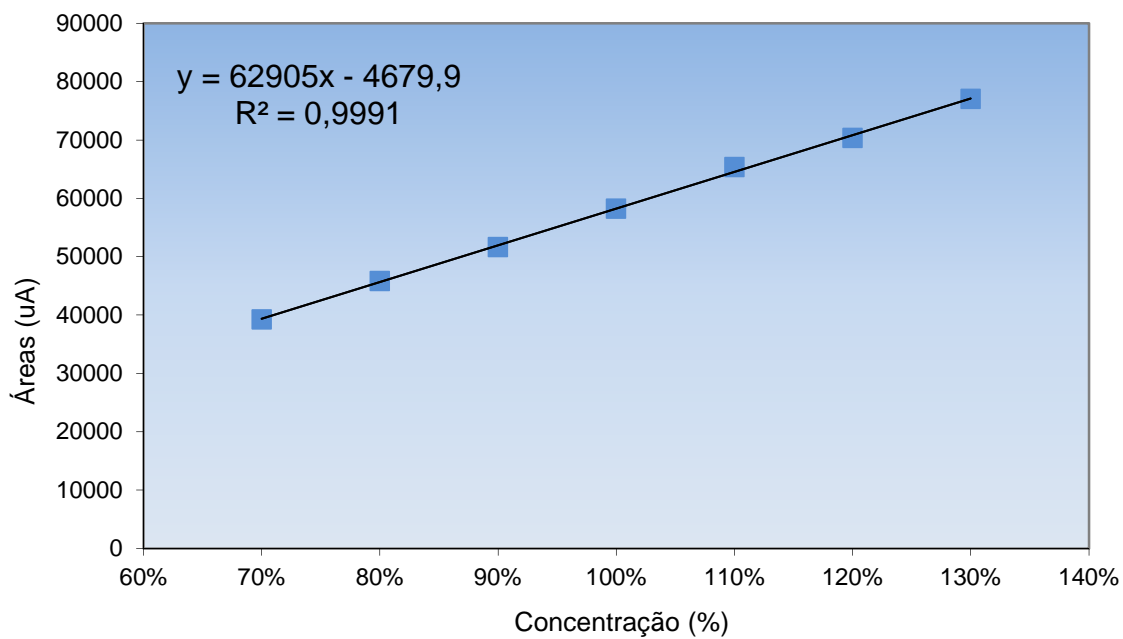


Gráfico 9 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Piridoxina.

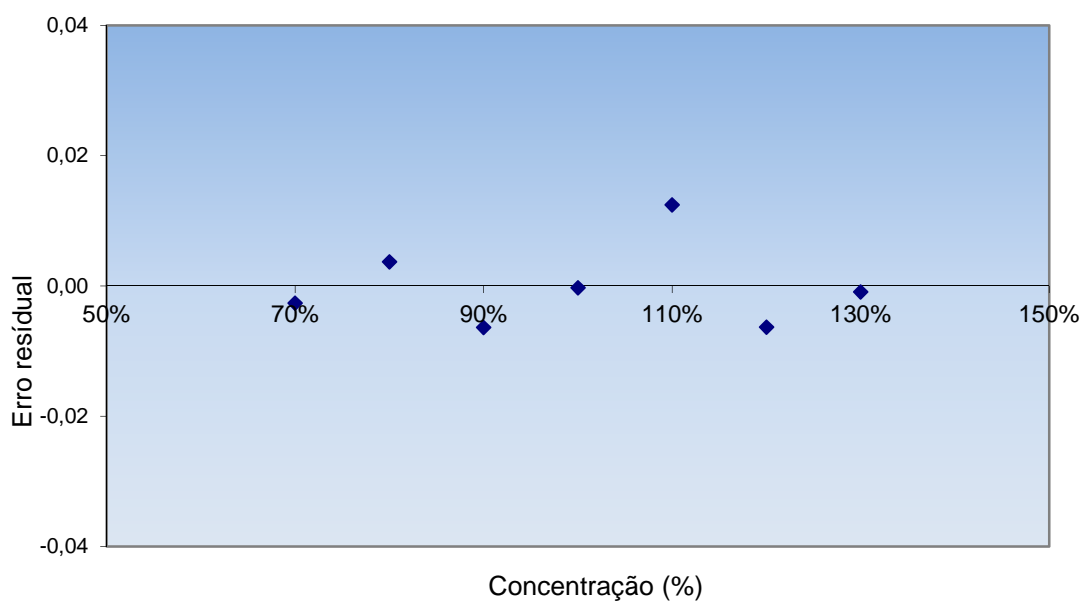


Gráfico 10 - Distribuição dos erros residuais - Piridoxina.

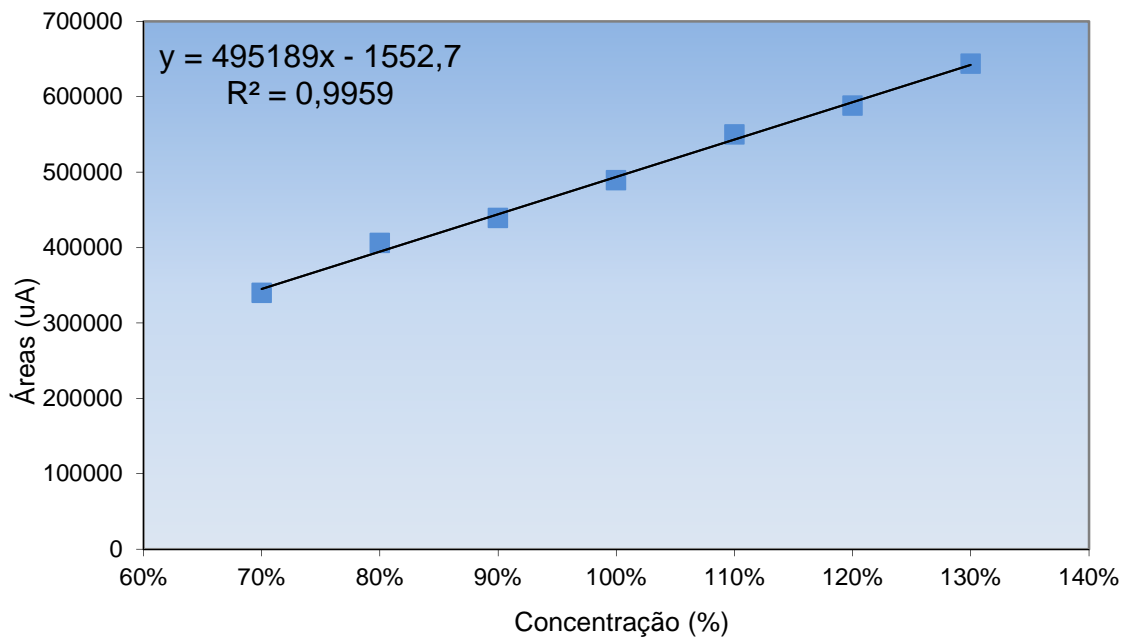


Gráfico 11 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Riboflavina.

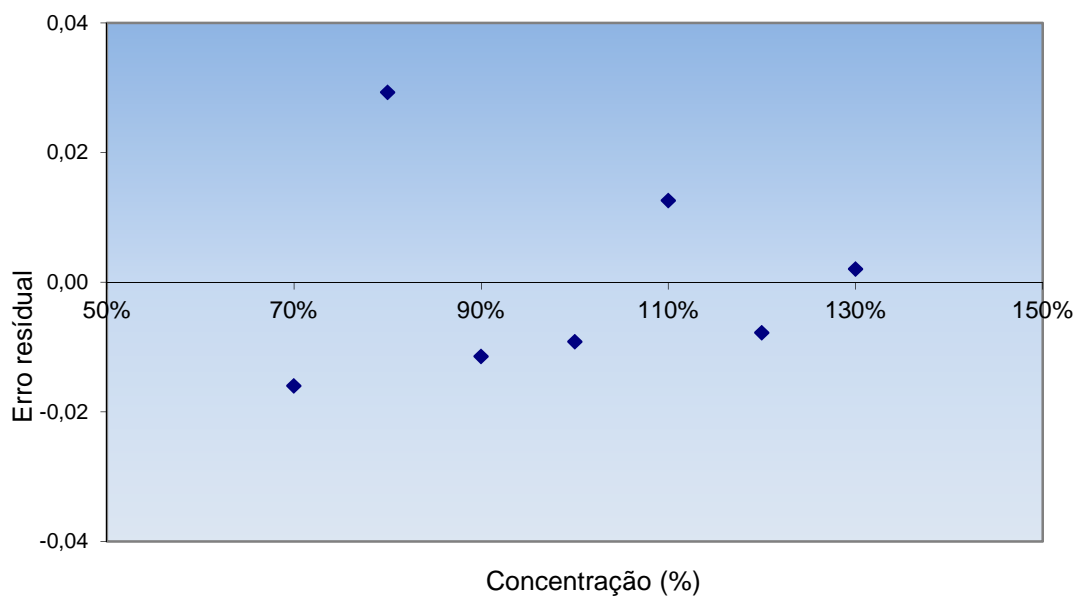


Gráfico 12 - Distribuição dos erros residuais - Riboflavina.

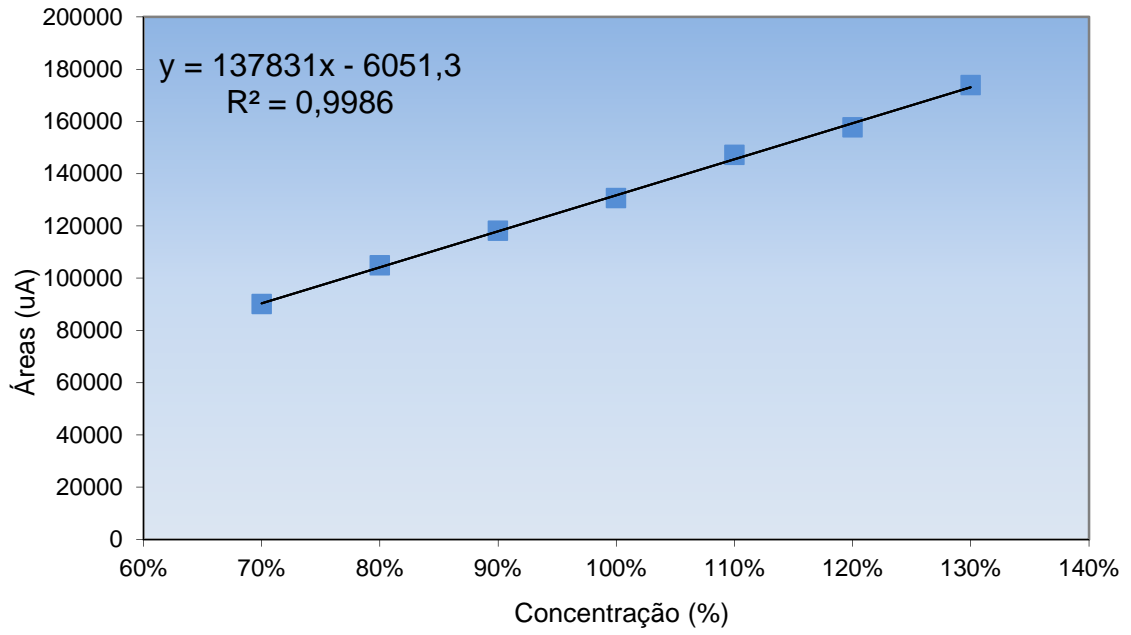


Gráfico 13 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Tiamina.

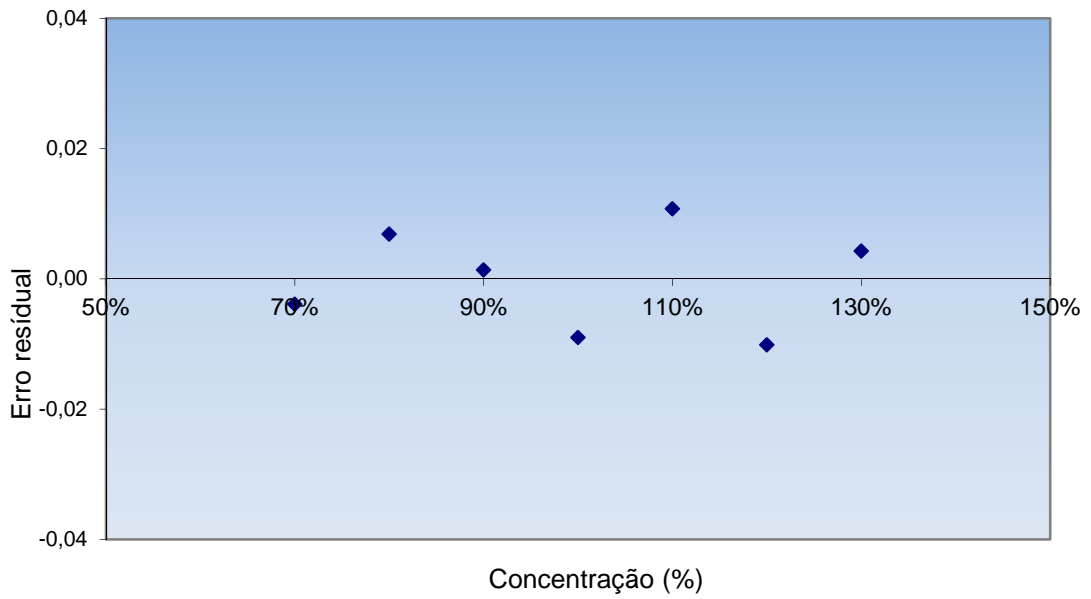


Gráfico 14 - Distribuição dos erros residuais - Tiamina.

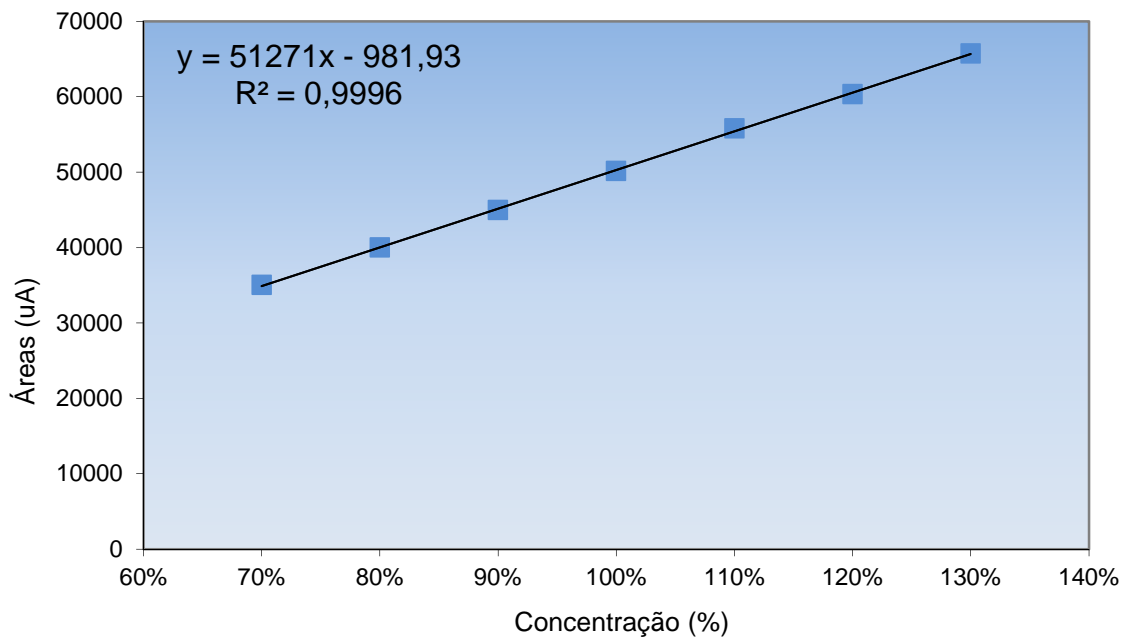


Gráfico 15 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Acetato de Tocoferol.

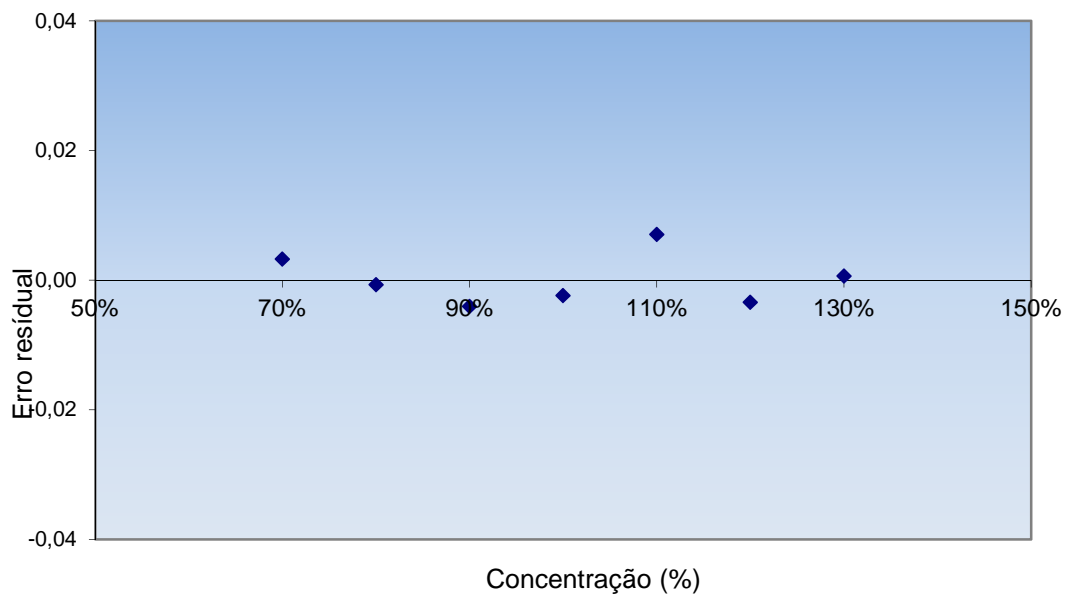


Gráfico 16 - Distribuição dos erros residuais - Acetato de Tocoferol.

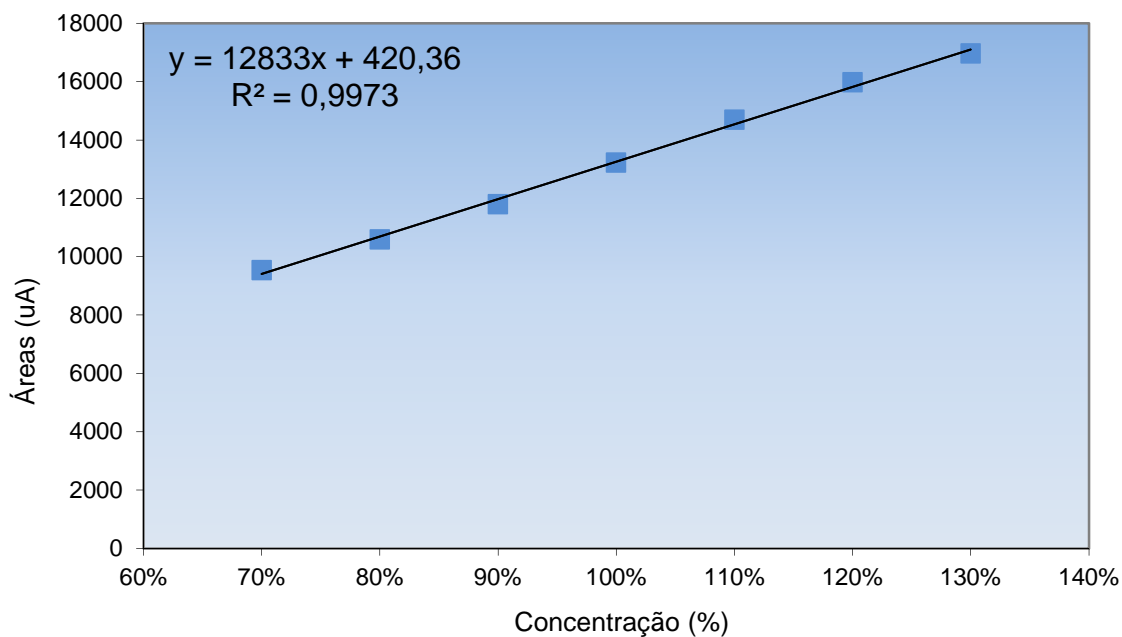


Gráfico 17 - Equação da reta obtida pela regressão linear - Cianocobalamina.

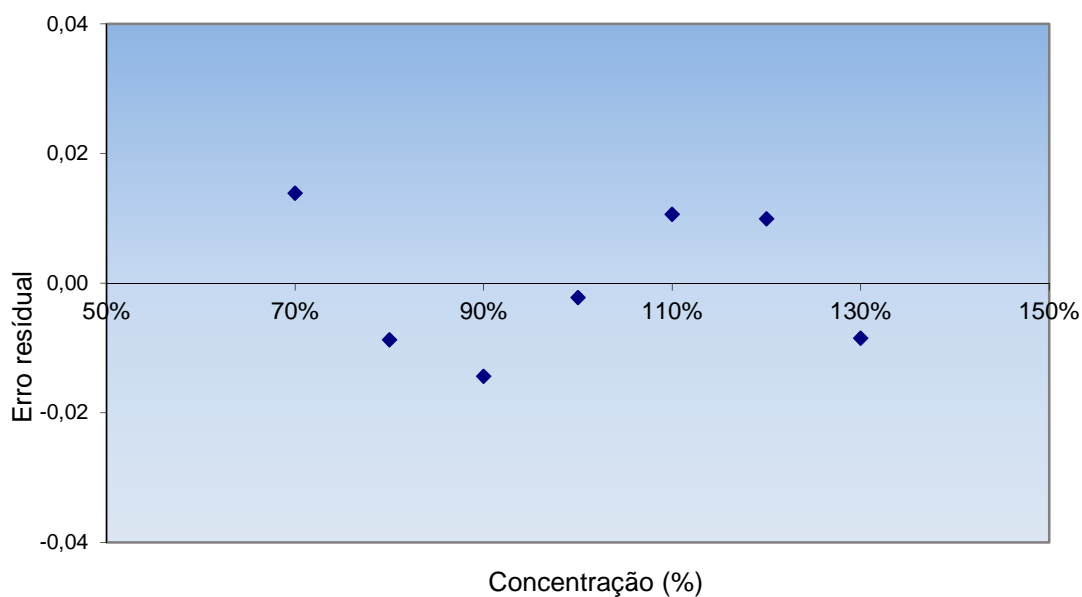


Gráfico 18 - Distribuição dos erros residuais - Cianocobalamina.

Os coeficientes de correlação linear (R) encontrados para as respostas de todas as vitaminas foram superiores a 0,998. Segundo Kasakevich (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007), um valor de R acima de 0,990 é suficiente para demonstrar a linearidade de um método para a determinação do teor de produto farmacêutico.

O desvio padrão relativo residual é aceitável se apresentar um valor menor que 2,0%. A Tabela 1 mostra a diferença residual percentual de cada análise cromatográfica para cada ativo e os resultados dos desvios padrão relativo residual. Para todos os componentes foram encontrados valores dentro do limite aceitável de 2,0%.

Tabela 1 - Análise do desvio padrão relativo (DPR) residual.

Composto	Nicotinam.	Piridox.	Riboflav.	Tiamina	Ac. Tocoferol.	Cianocob.
Desvio residual percentual por injeção para cada ativo	98,78%	99,73%	98,40%	99,61%	100,32%	101,39%
	99,08%	100,09%	98,67%	99,72%	100,31%	101,83%
	98,99%	100,16%	98,66%	99,79%	100,33%	98,87%
	101,62%	100,37%	102,93%	100,68%	99,93%	99,12%
	99,48%	101,63%	99,47%	99,93%	100,35%	101,86%
	98,93%	100,88%	98,81%	99,07%	100,29%	99,45%
	99,98%	99,36%	98,86%	100,14%	99,59%	98,56%
	98,84%	100,63%	98,99%	99,00%	99,34%	100,33%
	100,52%	102,34%	100,63%	100,58%	100,32%	100,10%
	99,03%	99,97%	99,08%	99,09%	99,76%	99,78%
	99,61%	100,79%	99,72%	99,94%	99,58%	99,62%
	99,15%	99,96%	99,23%	99,26%	99,73%	101,99%
	101,12%	101,24%	101,26%	101,07%	100,70%	101,06%
	101,03%	101,68%	100,98%	101,27%	99,75%	101,74%
	100,69%	101,35%	100,63%	100,67%	99,85%	100,19%
	99,28%	99,37%	99,22%	98,98%	99,66%	100,99%
	98,62%	98,38%	98,52%	97,87%	99,89%	100,67%
	98,75%	98,19%	98,62%	97,87%	99,66%	99,42%
	100,13%	99,91%	100,20%	100,42%	100,06%	99,15%
	101,46%	101,15%	101,55%	101,65%	99,76%	99,84%
101,71%	100,63%	102,69%	101,70%	99,99%	99,50%	
DPR (%) Residual	1,05%	1,04%	1,37%	1,08%	0,35%	1,07%

3.4.5. Precisão

Os resultados para o teste de precisão estão resumidos na Tabela 2, que mostra o desvio padrão relativo das preparações de cada analista e o desvio de todas as preparações para a mesma vitamina. Os resultados de cada análise estão relatados nas Tabela 40 a Tabela 57.

Tabela 2 - Resultados das precisões - Desvio padrão de múltiplas preparações.

Analíto	Precisão Analista 1*	Precisão Analista 2*	Precisão Intermediária*
Nicotinamida	1,19	0,61	0,90
Piridoxina	1,13	0,63	0,88
Riboflavina	1,15	0,81	0,98
Tiamina	1,10	0,72	0,91
Acetato de Tocoferol	0,42	1,05	0,74
Cianocobalamina	1,10	0,95	1,03

*Desvio padrão relativo (%) das múltiplas preparações

Todos os desvios foram menores que 2,0%. Desvios baixos como este são difíceis de serem alcançados quando o tratamento da amostra se dá por procedimentos mais complexos, como extração líquido-líquido ou derivatizações.

3.4.6. Exatidão

Para avaliar a exatidão determinou-se a eficiência da extração dos ativos no procedimento de preparo das amostras. Os valores de teor encontrados para cada nível de concentração preparado são mostrados nas Tabela 58 a Tabela 63. Os resultados das médias em cada nível estão resumidos na Tabela 3 e apresentados nos Gráfico 19 ao Gráfico 24. Os limites máximo e mínimo das barras delimitam a região de $\pm 2,0\%$ relativo ao valor teórico do nível. Também são apresentados os valores máximo e mínimo obtidos na avaliação de exatidão.

Tabela 3 - Recuperação das vitaminas no teste de exatidão.

Analíto	Nível		
	80%	100%	120%
Nicotinamida	100,3	100,0	100,5
Piridoxina	99,1	99,1	99,4
Riboflavina	100,0	100,3	100,9
Tiamina	100,4	100,8	101,3
Acetato de Tocoferol	100,4	99,4	99,5
Cianocobalamina	100,2	100,3	99,9

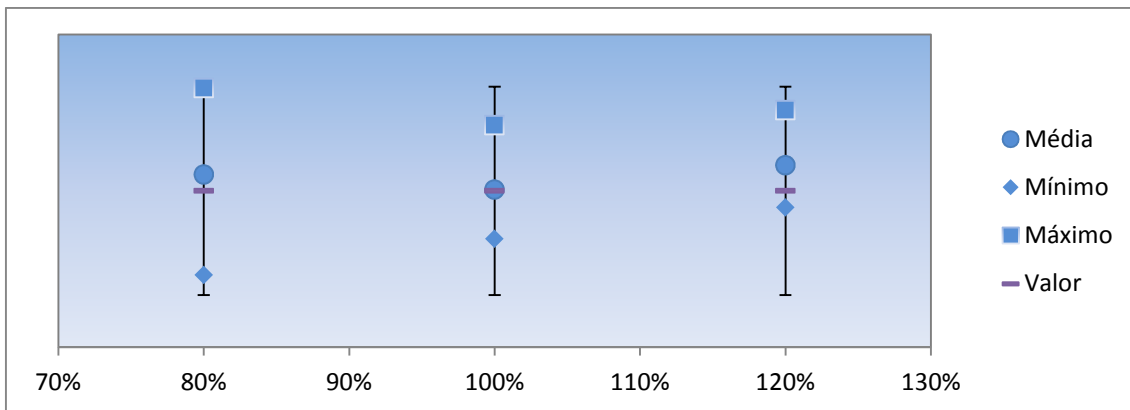


Gráfico 19 - Representação gráfica dos valores da recuperação - nicotinamida.

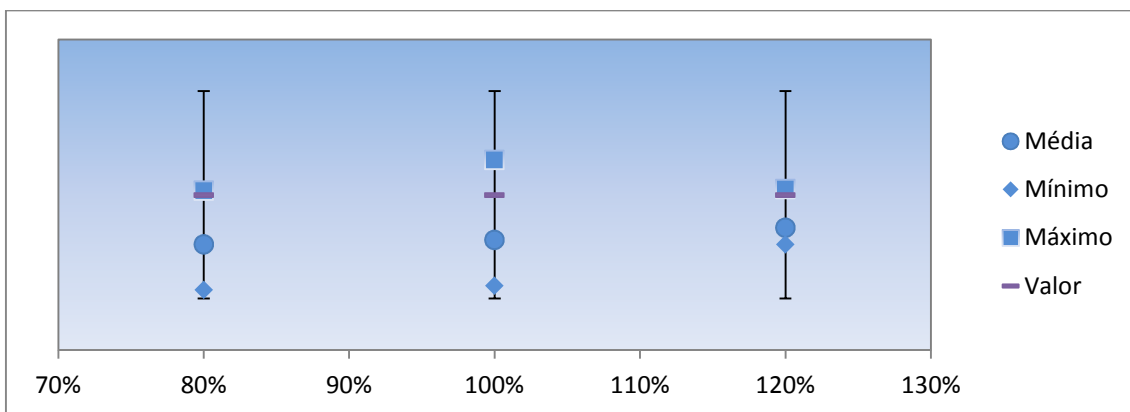


Gráfico 20 - Representação gráfica dos valores da recuperação - piridoxina.

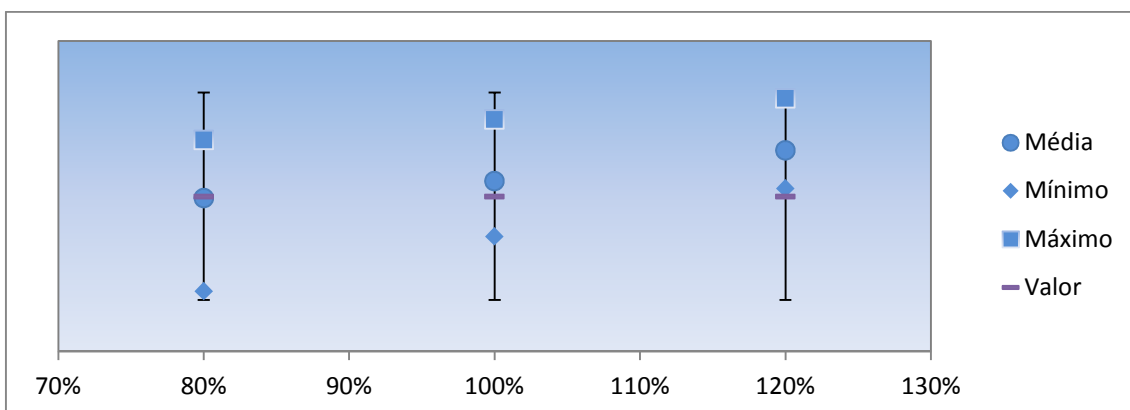


Gráfico 21 - Representação gráfica dos valores da recuperação - riboflavina.

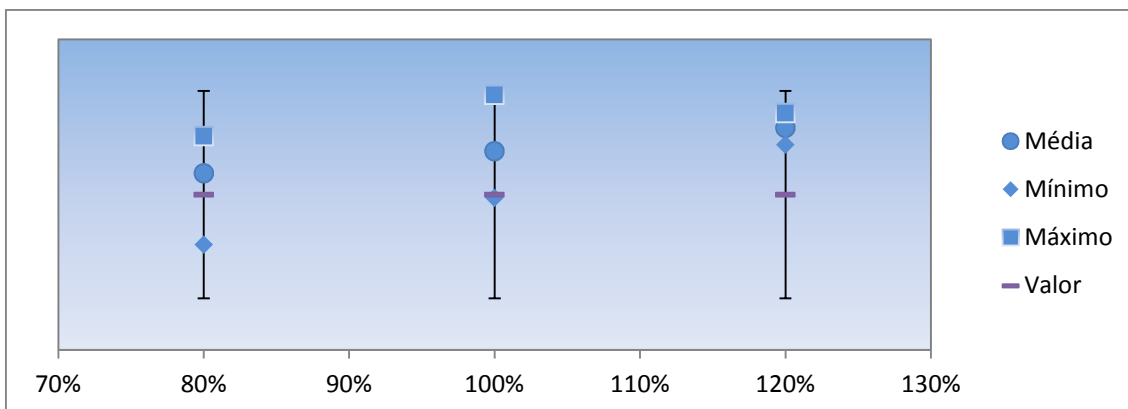


Gráfico 22 - Representação gráfica dos valores da recuperação - tiamina.

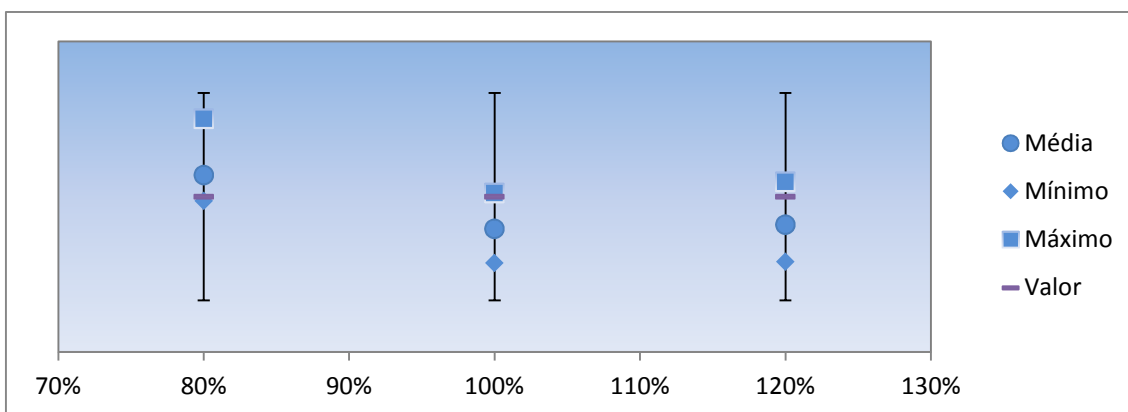


Gráfico 23 - Representação gráfica dos valores da recuperação - acetato de tocoferol.

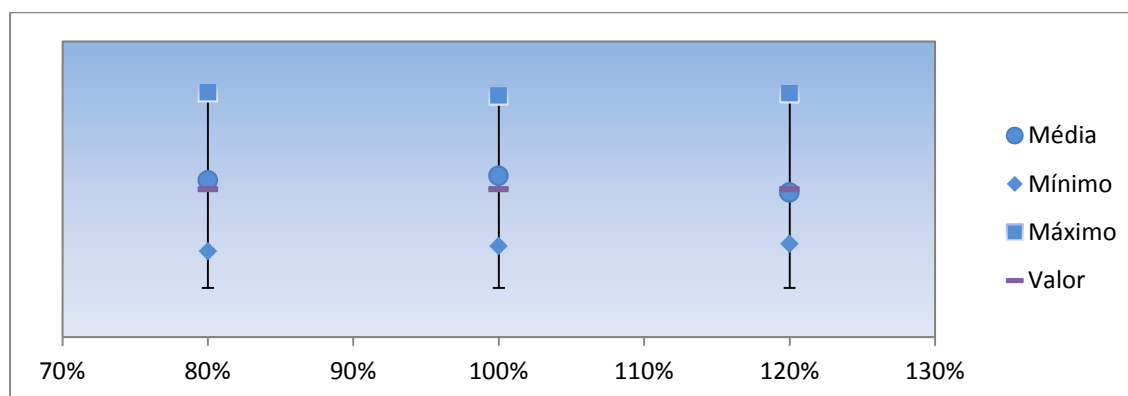


Gráfico 24 - Representação gráfica dos valores da recuperação - cianocobalamina.

Considerando que o grau de recuperação aceito está entre 98,0% e 102,0% (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007) pode-se concluir que o método é exato nas condições propostas.

3.4.7. Robustez das metodologias analíticas

O estudo da robustez de metodologia analítica foi planejado para confrontar os resultados de teor e dos principais parâmetros cromatográficos contra as variações das condições originais do método que podem ter maior influência nos resultados. Assim, a variação do fluxo da fase móvel, da composição da fase móvel, do lote da coluna cromatográfica, da temperatura da coluna e do pH da fase móvel, quando aplicáveis, foram escolhidos para essa avaliação. Os parâmetros avaliados foram: o desvio padrão relativo das injeções da solução padrão, a eficiência da separação (número de pratos teóricos), a simetria do pico, o fator capacidade, e tempo de retenção, e a variação do teor das amostras. Os resultados estão reportados nas Tabelas 64 a 90 e mostram que não houve desvios significativos nesses parâmetros, o que significa que o método é robusto frente às variações propostas.

4. CONCLUSÕES

- Foram estabelecidos três métodos para a determinação de 6 vitaminas presentes em comprimido de polivitamínico – nicotinamida (10,5 mg), piridoxina (10,5 mg), riboflavina (10,5 mg), tiamina (10,5 mg), acetato de tocoferol (10,5 mg) e cianocobalamina (10,5 µg).
- Nos três métodos foi usada coluna de UPLC, com tamanho das partículas de sílica na ordem de 1,7 µm que possibilitou que as análises fossem feitas em tempo 5 a 10 vezes inferior aos comumente encontrados na literatura, 2,5 minutos para as análises de acetato de tocoferol e cianocobalamina e 2,5 minutos para a análise em uma única análise cromatográfica das outras 4 vitaminas.
- Os baixos tempos de análise cromatográfica dos métodos desenvolvidos representam economia de reagente e solvente.
- As fases móveis usadas nos métodos desenvolvidos estão constituídas por solventes e tampões compatíveis com a detecção por espectrometria de massa, pelo que torna as condições cromatográficas compatíveis com essa tecnologia.
- As metodologias foram individualmente validadas e os resultados demonstram que os métodos são confiáveis para as aplicações pretendidas.
- A simplicidade do processo faz com que ele seja muito desejável para laboratórios de controle de qualidade de indústrias farmacêuticas que manipulem este tipo de formulação.
- O problema do baixo nível de vitamina B12 na formulação foi solucionado pelo emprego de um método específico e otimizado só para essa análise.
- Dado o interesse regional e buscando maior aproximação entre a universidade e o setor produtivo, este trabalho visou atender uma demanda específica da indústria farmacêutica local, contribuindo para o desenvolvimento do estado de Goiás.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOVIĆ, J. A. **Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals**. New York: Marcel Dekker, 1997.

ALMAGRO, I.; ANDRES, M. P. S.; VERA, S. Determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical preparation by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a mobile phase containing sodium dodecylsulphate and n-propanol. **Chromatography**, fev. 2002. 185-188.

ANAND, G. et al. Early use of high-dose riboflavin in case of Brown-Vialetto-Van Laere syndrome. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 2011. 187-189.

ANYAKORA, C. et al. HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2(2), 13 mar. 2008. 29-36.

BALL, G. F. M. **Vitamins - Their role in the human body**. Oxford - UK: Blackwell Publishing, 2004.

BASF. **Products for the food and pharmaceutical industry**. Singapore: Basf Corporation, 2003.

BISHOP, A. M. et al. Quantification of riboflavin in human urine using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 6 maio 2011. 1823-1826.

BORGES, E. M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. Possibilidades e Limitações do uso da Temperatura em Cromatografia Líquida de Fase Reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 945-953, abr. 2010.

BOWLING, F. G. Pyridoxine supply in human development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 22, 2011. 611-618.

BUSZEWSKI, B.; ZBANYSZEK, W. Determination of different solubility vitamins in pharmaceutical preparations. I. HPLC column switching. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technology**, 2002. 1229-1241.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação**. [S.l.]: UFSCar, 2001.

CASTELLI, M. C. et al. Pharmacokinetics of Oral Cyanocobalamin Formulates With Sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]carylate (SNAC): An Open-Label, Randomized, Single-dose, Parallel-Group Study in Healthy Male Subjects. **Clinical Therapeutics**, 33 No.7, jul. 2011. 934-945.

CHEN, P.; WOLF, W. R. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 2007. 2441-2448.

COATS, D.; SHELTON-DODGE, K.; OU, K. Thiamine Deficiency in Cambodian Infants with and without Beriberi. **The Journal of Pediatrics**, 161 No.5, 2012. 843-847.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed. [S.l.]: Unicamp, 1995.

COMBS, G. F. **The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health**. San Diego - California: Elsevier Academic Press, 2008.

DELGADILLO, J.; AYALA, G. Efectos de la deficiencia de riboflavina sobre el desarrollo del tejido dentoalveolar, en ratas. **Anales de la Facultad de Medicina**, 70(1), 2009. 19-27.

FOTSING, L. et al. Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 1997. 1113-1123.

GARMONOV, S. Y. et al. Assay of ascorbic acid, thiamine, riboflavin, nicotinamide, and pyridoxine in "Hexavit" by HPLC. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, 45, jul. 2011. 440-443.

GAZANION, E. et al. In vitro activity of nicotinamide/antileishmanial drug combinations. **Parasitology International**, 2011. 19-24.

GILPIN, R. K. Pharmaceutical and Related Drugs. **Analytical Chemistry**, 71, 15 June 1999. 217R-233R.

GUIOCHON, G. **Basic principles of Chromatography**. 6. ed. [S.l.]: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2002.

HAMPEL, D.; YORK, E. R.; ALLEN, L. H. Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous

analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk. **Journal of Chromatography B**, 21 jun. 2012. 7-13.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

IVANOCIC, D. et al. Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceutical. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 1999. 999-1004.

KAUFFMAN, G. et al. Thiamine Deficiency in ill Children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, n. doi: 10.3945/ajcn.111.018457, 2012. 616.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

KLEJDUS, B. et al. Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamin in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with array detection. **Analytica Chimica Acta**, 9 abr. 2004. 57-67.

KRUMOVA, K.; FRIEDLAND, S.; COSA, G. How lipid Unsaturation, Peroxyl radical Partitioning, and Chromanol Lipophilic Tail Affect the Antioxidant Activity of α -Tocopherol: Direct Visualization via High-Throughput Fluorescence Studies Conducted with Fluorogenic α -Tocopherol Analogues. **Journal of the American Chemical Society**, 134, 2012. 10102-10113.

KUMINEK, G. et al. High-Performance Column Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination Of Buclizine, Tryptophan, Pyridoxine, and Cyanocobalamin in Tablets and Oral Suspension. **Journal of AOAC International**, 96, n. 6, 2011. 1785-1790.

LI, H. B.; CHEN, F. Simultaneous determination of twelve water- and fat-soluble vitamins by high-performance liquid chromatography with diode array detection. **Chromatographia**, ago. 2001. 270-273.

LI, H.-B.; CHEN, F.; JIANG, Y. Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, 2000. 243-247.

LI, K. Simultaneous determination of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate and riboflavin in multivitamin with minerals tablets by reversed-phase

ion-pair high performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, 2002. 504-507.

LU, J.; FRANK, E. L. Rapid HPLC Measurement of Thiamine and Its Phosphate Esters in Whole Blood. **Clinical Chemistry - Automation and Analytical Techniques**, 2008. 901-906.

MILLER, G. W. et al. The α -Tocopherol Transfer Protein Is Essential for Vertebrate Embryogenesis. **Plos One**, 7, n. 10, out. 2012. 1-9.

MONDRAGÓN, P. A. D. C.; VÁZQUEZ, O. L.; ROMERO, R. Á. Development and validation of an HPLC Method for the Determination of Thiamine and Riboflavin in Green Leafy Vegetables Using Clara-Diastase. **Journal of Food Science**, 76, n. 4, 2011. C639-C642.

MORENO, P.; SALVADÓ, V. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulation by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 2000. 207-215.

MULHOLLAND, M.; DOLPHIN, R. J. Analysis of the fat-soluble vitamins using narrow-bore high-performance liquid chromatography with multichannel UV-VIS detection. **Journal of Chromatography**, 1985. 285-291.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, 27 jul. 2005. 908-918.

ORTIZ, M. P. et al. Déficit de cianocobalamina que simula una enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. **Neurologia**, 5, 2011. 307-318.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, 6 jun. 2006. 216-224.

SAKODYNSKII, K.; CHMUTOV, K. M. S. Tswett and Chromatography. **Chromatographia**, v. 8, p. 471-476, 1972.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, USP and ICH. **Journal of Chromatography A**, 987, 2003. 57-66.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C. S. F.; AIROLDI, C. H. C. E. C. Novas Fases Estacionárias à Base de Sílica para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 270-276, 2004.

SINGH, V. P.; POON, J.-F.; ENGMAN, L. Turning Pyridoxine into a Catalytic Chain-Breaking and Hydroperoxide-Decomposing Antioxidant. **The Journal of Organic Chemistry**, 14 jan. 2013. 1478-1479.

SWARTZ, M. E. 6 Contemporary liquid chromatographic systems for method development. **Separation Science and Technology**, 8, 2008. 145-187.

USP35, **Validation of compendial Methods**. [S.l.]: [s.n.], 2013.

VIÑAS, P.; LÓPEZ, I. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 15 fev. 2012. 1059-1066.

WASHABAUGH, M. W. et al. Mechanism of Hydrolysis of a Thiazolium Ion: General Acid-Base Catalysis of the Breakdown of the Tetrahedral Addition Intermediate. **Bioorganic Chemistry**, n. 20, p. 296-312, 1992.

WATERS. Sobre o processo de separação cromatográfica. **Site da Waters Corporation**, 2013. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055>. Acesso em: 25 jun. 2013.

WATERS, C. F. 1 508 872 1990, 2009.

WIELINSKI, S.; OLSZANOWSKI, A. Simultaneous determination of retinol acetate, retinol palmitate, cholecalciferol, alpha-tocopherol acetate and alpha-tocopherol in capsules by non-aqueous reversed-phase HPLC and column backflushing. **Chromatographia Vol.50**, jun. 1999. 109-112.

WILLIAMS, A. Lessons From Pellagra. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, doi: 10.1136/Jnnp-2011-300645.17, 2011. 4-5.

WREN, S. A. C.; TCHELITCHEFF, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**, 1119, 2006. 140-146.

YAGI, T. et al. Contents of All Forms of Vitamin B6, Pyridoxine-b-Glucoside e 4-Pyridoxic Acid in Mature Milk of Japanese Women according to 4-Pyridoxolactone-Conversion High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology** , 59, 2013. 1-15.

6. ANEXOS

Tabela 4 - Resultados de adequação do sistema - Nicotinamida.

Parâmetro	Especificação	Resultado
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0%	0,85
Eficiência da Separação (Nº de Pratos Teóricos)	≥ 2000	4168,26
Fator de Cauda (Simetria do Pico)	entre 0,8 e 2,0	1,22
Resolução	≥ 2,0	4,95
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	1,19
Tempo de Retenção	informativo	0,37

Tabela 5 - Resultados de adequação do sistema - piridoxina.

Parâmetro	Especificação	Resultado
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0%	1,11
Eficiência da Separação (Nº de Pratos Teóricos)	≥ 2000	3651,65
Fator de Cauda (Simetria do Pico)	entre 0,8 e 2,0	1,86
Resolução	≥ 2,0	4,95
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	1,99
Tempo de Retenção	informativo	0,51

Tabela 6 - Resultados de adequação do sistema - riboflavina.

Parâmetro	Especificação	Resultado
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0%	0,83
Eficiência da Separação (Nº de Pratos Teóricos)	≥ 2000	4413,96
Fator de Cauda (Simetria do Pico)	entre 0,8 e 2,0	1,24
Resolução	≥ 2,0	6,21
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	3,4
Tempo de Retenção	informativo	0,67

Tabela 7 - Resultados de adequação do sistema - tiamina.

Parâmetro	Especificação	Resultado
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0%	1,49
Eficiência da Separação (Nº de Pratos Teóricos)	≥ 2000	5569,64
Fator de Cauda (Simetria do Pico)	entre 0,8 e 2,0	1,8
Resolução	≥ 2,0	15,18
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	9,53
Tempo de Retenção	informativo	1,79

Tabela 8 - Resultados de adequação do sistema - acetato de tocoferol.

Parâmetro	Especificação	Resultado
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0%	0,43
Eficiência da Separação (Nº de Pratos Teóricos)	≥ 2000	7979,2
Fator de Cauda (Simetria do Pico)	entre 0,8 e 2,0	1,08
Resolução	≥ 2,0	n/a
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	9,89

Tempo de Retenção	informativo	1,85
-------------------	-------------	------

Tabela 9 - Resultados de adequação do sistema - cianocobalamina.

Parâmetro	Especificação	Resultado
Desvio Padrão Relativo (DPR)	$\leq 2,0\%$	1,48
Eficiência da Separação (Nº de Pratos Teóricos)	≥ 2000	4312,13
Fator de Cauda (Simetria do Pico)	entre 0,8 e 2,0	1,24
Sinal Ruído	$\geq 10,0$	67,72
K' (Fator de Capacidade)	$\geq 1,0$	5,55
Tempo de Retenção	informativo	1,11

Tabela 10 - Resultados de especificidade/seletividade - Nicotinamida.

Solução	Especificação	Concentração Corrigida (%)	E = 100 - I (%)	PA	TH
Padrão 100%	$PA < TH$	100,00%	-	2,307	3,805
Fase móvel	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução diluente	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução amostra	$PA < TH$	100,50%	-	0,879	2,206
Solução placebo	98% a 102%	0,00%	100,00%	-	-

Legenda: E = Especificidade ; I = Interferência ; PA = Purity Angle , TH = Threshold , - = não aplicável

Tabela 11 - Resultados de especificidade/seletividade - piridoxina.

Solução	Especificação	Concentração Corrigida (%)	E = 100 - I (%)	PA	TH
Padrão 100%	$PA < TH$	100,00%	-	1,269	2,115
Fase móvel	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução diluente	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução amostra	$PA < TH$	98,56%	-	1,047	1,374
Solução placebo	98% a 102%	0,00%	100,00%	-	-

Legenda: E = Especificidade ; I = Interferência ; PA = Purity Angle , TH = Threshold , - = não aplicável

Tabela 12 - Resultados de especificidade/seletividade - riboflavina.

Solução	Especificação	Concentração Corrigida (%)	E = 100 - I (%)	PA	TH
Padrão 100%	$PA < TH$	100,00%	-	0,947	1,833
Fase móvel	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução diluente	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução amostra	$PA < TH$	100,75%	-	0,88	1,124
Solução placebo	98% a 102%	0,00%	100,00%	-	-

Legenda: E = Especificidade ; I = Interferência ; PA = Purity Angle , TH = Threshold , - = não aplicável

Tabela 13 - Resultados de especificidade/seletividade - tiamina.

Solução	Especificação	Concentração Corrigida (%)	E = 100 - I (%)	PA	TH
Padrão 100%	$PA < TH$	100,00%	-	1,579	7,945

Fase móvel	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução diluente	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução amostra	PA < TH	100,43%	-	2,19	6,691
Solução placebo	98% a 102%	0,00%	100,00%	-	-

Legenda: E = Especificidade ; I = Interferência ; PA = Purity Angle , TH = Threshold , - = não aplicável

Tabela 14 - Resultados de especificidade/seletividade - acetato de tocoferol.

Solução	Especificação	Concentração Corrigida (%)	E = 100 - I (%)	PA	TH
Padrão 100%	PA < TH	100,00%	-	2,697	3,521
Fase móvel	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução diluente	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução amostra	PA < TH	105,50%	-	1,979	3,068
Solução placebo	98% a 102%	0,00%	100,00%	-	-

Legenda: E = Especificidade ; I = Interferência ; PA = Purity Angle , TH = Threshold , - = não aplicável

Tabela 15 - Resultados de especificidade/seletividade - cianocobalamina.

Solução	Especificação	Concentração Corrigida (%)	E = 100 - I (%)	PA	TH
Padrão 100%	PA < TH	100,00%	-	1,705	2,232
Fase móvel	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução diluente	E de 98 % a 102%	0,00%	100,00%	-	-
Solução amostra	PA < TH	97,37%	-	3,095	4,342
Solução placebo	98% a 102%	0,00%	100,00%	-	-

Legenda: E = Especificidade ; I = Interferência ; PA = Purity Angle , TH = Threshold , - = não aplicável

Tabela 16 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo – nicotinamida

Tempo (H)	0	6	12	18
Padrão	0,00%	0,43%	0,55%	0,02%
Amostra	0,00%	0,56%	0,47%	1,29%

Tabela 17 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - piridoxina.

Tempo (H)	0	6	12	18
Padrão	0,00%	0,61%	0,10%	0,00%
Amostra	0,00%	-0,21%	0,36%	-0,22%

Tabela 18 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - riboflavina.

Tempo (H)	0	6	12	18
Padrão	0,00%	0,93%	0,05%	-0,16%
Amostra	0,00%	0,50%	0,51%	0,91%

Tabela 19 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - tiamina.

Tempo (H)	0	6	12	18
Padrão	0,00%	-1,43%	-4,06%	-6,17%

Amostra 0,00% -0,45% -0,59% -0,80%

Tabela 20 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo - acetato de tocoferol.

Tempo (H)	0	6	12	18
Padrão	0,00%	-0,66%	0,46%	0,56%
Amostra	0,00%	0,02%	-0,13%	0,27%

Tabela 21 - Estabilidade da solução - variação da respostas (%) em função do tempo – cianocobalamina.

Tempo (H)	0	6	12	18	24
Padrão	0,00%	-0,56%	0,61%	-0,33%	0,55%
Amostra	0,00%	-0,40%	-0,30%	-0,13%	0,41%

Tabela 22 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - nicotinamida.

%	Concentração (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
70%	0,037	80799	80936
		81039	
		80969	
80%	0,042	94958	93457
		92963	
		92450	
90%	0,047	105084	104869
		103878	
		105644	
100%	0,053	115624	115894
		116297	
		115760	
110%	0,058	129843	129621
		129726	
		129293	
120%	0,063	139049	138496
		138129	
		138309	
130%	0,068	151916	153383
		153932	
		154302	

Tabela 23 - Regressão linear dos dados da linearidade - Nicotinamida.

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	<i>informativo</i>	220,4
b coeficiente angular	<i>informativo</i>	116533
Equação da Reta	<i>informativo</i>	$y = 116533x + 220,4$
R coeficiente de correlação	> 0,99	0,9990

Tabela 24 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Nicotinamida.

Conc. (%)	Área prevista (uA)	Resíduos (uA)	Resíduos (%)
70%	81793	-994	-1,22%
	81793	-754	-0,92%
	81793	-824	-1,01%
80%	93447	1511	1,62%
	93447	-484	-0,52%
	93447	-997	-1,07%
90%	105100	-16	-0,02%
	105100	-1222	-1,16%
	105100	544	0,52%
100%	116753	-1129	-0,97%
	116753	-456	-0,39%
	116753	-993	-0,85%
110%	128407	1436	1,12%
	128407	1319	1,03%
	128407	886	0,69%
120%	140060	-1011	-0,72%
	140060	-1931	-1,38%
	140060	-1751	-1,25%
130%	151713	203	0,13%
	151713	2219	1,46%
	151713	2589	1,71%
Soma Residual		-1855	-3,19%

Tabela 25 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Piridiorina.

%	Concentração (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
70%	0,037	39249	39351
		39387	
		39418	
80%	0,042	45813	46082
		46389	
		46044	
90%	0,047	51603	52340
		52264	
		53152	
100%	0,053	58207	58364
		58682	
		58204	
110%	0,058	65318	65435
		65601	
		65386	
120%	0,063	70358	69847
		69658	
		69524	
130%	0,068	77025	77529
		77982	
		77580	

Tabela 26 - Regressão linear dos dados da linearidade - Piridoxina.

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	<i>informativo</i>	-4679,9
b coeficiente angular	<i>informativo</i>	62905
Equação da Reta	<i>informativo</i>	$y = 62905x + -4679,9$
R coeficiente de correlação	> 0,99	0,9995

Tabela 27 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Piridoxina.

Conc. (%)	Área prevista (uA)	Resíduos (uA)	Resíduos (%)
70%	39353	-104	-0,27%
	39353	34	0,09%
	39353	65	0,16%
80%	45644	169	0,37%
	45644	745	1,63%
	45644	400	0,88%
90%	51934	-331	-0,64%
	51934	330	0,63%
	51934	1218	2,34%
100%	58225	-18	-0,03%
	58225	457	0,79%
	58225	-21	-0,04%
110%	64515	803	1,24%
	64515	1086	1,68%
	64515	871	1,35%
120%	70806	-448	-0,63%
	70806	-1148	-1,62%
	70806	-1282	-1,81%
130%	77096	-71	-0,09%
	77096	886	1,15%
	77096	484	0,63%
Soma Residual		4125	7,82%

Tabela 28 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Riboflavina.

%	Concentração (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
70%	0,037	339571	340178
		340498	
		340466	
80%	0,042	406165	396194
		392512	
		389904	
90%	0,047	439042	441866
		439642	
		446913	
100%	0,053	489112	490390
		492244	
		489813	
110%	0,058	550007	548345
		548468	

		546561	
		588056	
120%	0,063	583916	585482
		584474	
		643498	
130%	0,068	652115	651702
		659493	

Tabela 29 - Regressão linear dos dados da linearidade - Riboflavina.

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	<i>informativo</i>	-1552,7
b coeficiente angular	<i>informativo</i>	495189
Equação da Reta	<i>informativo</i>	$y = 495189x + -1552,7$
R coeficiente de correlação	> 0,99	0,9980

Tabela 30 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Riboflavina.

Conc. (%)	Área prevista (uA)	Resíduos (uA)	Resíduos (%)
	345079	-5508	-1,60%
70%	345079	-4581	-1,33%
	345079	-4613	-1,34%
	394598	11567	2,93%
80%	394598	-2086	-0,53%
	394598	-4694	-1,19%
	444117	-5075	-1,14%
90%	444117	-4475	-1,01%
	444117	2796	0,63%
	493636	-4524	-0,92%
100%	493636	-1392	-0,28%
	493636	-3823	-0,77%
	543155	6852	1,26%
110%	543155	5313	0,98%
	543155	3406	0,63%
	592674	-4618	-0,78%
120%	592674	-8758	-1,48%
	592674	-8200	-1,38%
	642192	1306	0,20%
130%	642192	9923	1,55%
	642192	17301	2,69%
Soma Residual		-3883	-2,87%

Tabela 31 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Tiamina.

%	Concentração (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
		90078	
70%	0,037	90179	90166
		90242	
80%		104925	

	0,042	104138 103244	104102
90%	0,047	118157 116815 118684	117885
100%	0,053	130587 131701 130808	131032
110%	0,058	147124 147418 146539	147027
120%	0,063	157725 155953 155955	156544
130%	0,068	173865 175979 176068	175304

Tabela 32 - Regressão linear dos dados da linearidade - Tiamina.

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	<i>informativo</i>	-6051,3
b coeficiente angular	<i>informativo</i>	137831
Equação da Reta	<i>informativo</i>	$y = 137831x + -6051,3$
R coeficiente de correlação	> 0,99	0,9993

Tabela 33 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Tiamina.

Conc. (%)	Área prevista (uA)	Resíduos (uA)	Resíduos (%)
70%	90431	-353	-0,39%
	90431	-252	-0,28%
	90431	-189	-0,21%
80%	104214	711	0,68%
	104214	-76	-0,07%
	104214	-970	-0,93%
90%	117997	160	0,14%
	117997	-1182	-1,00%
	117997	687	0,58%
100%	131780	-1193	-0,91%
	131780	-79	-0,06%
	131780	-972	-0,74%
110%	145563	1561	1,07%
	145563	1855	1,27%
	145563	976	0,67%
120%	159346	-1621	-1,02%
	159346	-3393	-2,13%
	159346	-3391	-2,13%
130%	173130	735	0,42%
	173130	2849	1,65%
	173130	2938	1,70%

Soma Residual	-1199	-1,68%
----------------------	--------------	---------------

Tabela 34 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Acetato de Tocoferol.

%	Concentração (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
70%	0,074	35020	35020
		35016	
		35024	
80%	0,084	40007	40112
		40177	
		40152	
90%	0,095	44977	45050
		44866	
		45308	
100%	0,105	50168	50134
		50078	
		50155	
110%	0,116	55805	55473
		55279	
		55335	
120%	0,126	60336	60382
		60474	
		60337	
130%	0,137	65711	65628
		65512	
		65661	

Tabela 35 - Regressão linear dos dados da linearidade - Acetato de Tocoferol.

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	<i>informativo</i>	-981,9
b coeficiente angular	<i>informativo</i>	51271
Equação da Reta	<i>informativo</i>	$y = 51271x + -981,9$
R coeficiente de correlação	> 0,99	0,9998

Tabela 36 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Acetato de Tocoferol.

Conc. (%)	Área prevista (uA)	Resíduos (uA)	Resíduos (%)
70%	34908	112	0,32%
	34908	108	0,31%
	34908	116	0,33%
80%	40035	-28	-0,07%
	40035	142	0,35%
	40035	117	0,29%
90%	45162	-185	-0,41%
	45162	-296	-0,66%
	45162	146	0,32%
100%	50289	-121	-0,24%
	50289	-211	-0,42%

	50289	-134	-0,27%
110%	55416	389	0,70%
	55416	-137	-0,25%
	55416	-81	-0,15%
120%	60543	-207	-0,34%
	60543	-69	-0,11%
	60543	-206	-0,34%
130%	65670	41	0,06%
	65670	-158	-0,24%
	65670	-9	-0,01%
Soma Residual		-674	-0,81%

Tabela 37 - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Cianocobalamina.

%	Concentração (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
70%	0,00294	9534	9469
		9576	
		9297	
80%	0,00336	10593	10702
		10886	
		10628	
90%	0,00378	11798	11930
		12010	
		11982	
100%	0,00420	13224	13315
		13203	
		13517	
110%	0,00462	14691	14682
		14790	
		14565	
120%	0,00504	15977	15877
		15926	
		15728	
130%	0,00546	16958	17018
		17077	
		17018	

Tabela 38 - Regressão linear dos dados da linearidade - Cianocobalamina.

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	<i>informativo</i>	420,4 (3,00%)
b coeficiente angular	<i>informativo</i>	12833
Equação da Reta	<i>informativo</i>	$y = 12833x + 420,4$
R coeficiente de correlação	> 0,99	0,9986

Tabela 39 - Demonstrativo das somas dos resíduos para o teste de linearidade - Cianocobalamina.

Conc. (%)	Área prevista (uA)	Resíduos (uA)	Resíduos (%)
70%	9404	130	1,39%
	9404	172	1,83%

	9404	-107	-1,13%
80%	10687	-94	-0,88%
	10687	199	1,86%
	10687	-59	-0,55%
90%	11970	-172	-1,44%
	11970	40	0,33%
	11970	12	0,10%
100%	13254	-30	-0,22%
	13254	-51	-0,38%
	13254	263	1,99%
110%	14537	154	1,06%
	14537	253	1,74%
	14537	28	0,19%
120%	15820	157	0,99%
	15820	106	0,67%
	15820	-92	-0,58%
130%	17104	-146	-0,85%
	17104	-27	-0,16%
	17104	-86	-0,50%
Soma Residual		653	5,46%

Tabela 40 - Resultados de precisão - repetibilidade - Nicotinamida (1° dia - Analista 1).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	114666	114671
	2	114676	
2	1	115300	115166
	2	115032	
3	1	114065	114392
	2	114719	
4	1	114894	115016
	2	115137	
5	1	113902	113664
	2	113426	
6	1	116681	117661
	2	118640	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			1,19%

Tabela 41 - Resultados de precisão - repetibilidade - Nicotinamida (2° dia - Analista 2).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	115278	115610
	2	115942	
8	1	115557	115872
	2	116186	
9	1	114724	114740
	2	114755	
10	1	114487	114069
	2	113650	

11	1	115606	114897
	2	114188	
12	1	115040	115715
	2	116390	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,61%

Tabela 42 - Resultados de precisão intermediária - Nicotinamida.

Preparação	Área Média Corrigida (uA)	Preparação	Área Média Corrigida (uA)
1	114671	7	115610
2	115166	8	115872
3	114392	9	114740
4	115016	10	114069
5	113664	11	114897
6	117661	12	115715
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,90%

Tabela 43 - Resultados de precisão - repetibilidade - Piridoxina (1° dia - Analista 1).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	58198	58217
	2	58235	
2	1	59303	58757
	2	58210	
3	1	57670	57842
	2	58013	
4	1	58086	58103
	2	58119	
5	1	57445	57309
	2	57173	
6	1	58631	59154
	2	59677	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			1,13%

Tabela 44 - Resultados de precisão - repetibilidade - Piridoxina (2° dia - Analista 2).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	58586	58243
	2	57900	
8	1	57931	58100
	2	58268	
9	1	57531	57537
	2	57542	
10	1	57588	57362
	2	57135	

11	1	57988	57594
	2	57199	
12	1	57703	58063
	2	58422	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,63%

Tabela 45 - Resultados de precisão intermediária - Piridoxina.

Preparação	Área Média Corrigida (uA)	Preparação	Área Média Corrigida (uA)
1	58217	7	58243
2	58757	8	58100
3	57842	9	57537
4	58103	10	57362
5	57309	11	57594
6	59154	12	58063
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,95%

Tabela 46 - Resultados de precisão - repetibilidade - Riboflavina (1º dia - Analista 1).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	487739	487907
	2	488074	
2	1	490399	489812
	2	489224	
3	1	485081	486571
	2	488060	
4	1	488793	489066
	2	489338	
5	1	484470	483671
	2	482871	
6	1	495718	500176
	2	504634	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			1,15%

Tabela 47 - Resultados de precisão - repetibilidade - Riboflavina (2º dia - Analista 2).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	489543	490981
	2	492418	
8	1	491848	492761
	2	493674	
9	1	478815	483317
	2	487818	
10	1	486550	484845
	2	483139	

11	1	491266	488243
	2	485219	
12	1	488966	492224
	2	495482	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,81%

Tabela 48 - Resultados de precisão intermediária - Riboflavina.

Preparação	Área Média Corrigida (uA)	Preparação	Área Média Corrigida (uA)
1	487907	7	490981
2	489812	8	492761
3	486571	9	483317
4	489066	10	484845
5	483671	11	488243
6	500176	12	492224
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,95%

Tabela 49 - Resultados de precisão - repetibilidade - Tiamina (1° dia - Analista 1).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	133228	133271
	2	133313	
2	1	133922	133755
	2	133587	
3	1	132296	132697
	2	133098	
4	1	133579	133707
	2	133835	
5	1	131839	131467
	2	131095	
6	1	134650	135919
	2	137187	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			1,10%

Tabela 50 - Resultados de precisão - repetibilidade - Tiamina (2° dia - Analista 2).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	132579	133029
	2	133478	
8	1	133447	133783
	2	134118	
9	1	132328	132153
	2	131977	
10	1	131635	131134
	2	130632	

11	1	133202	132070
	2	130937	
12	1	132435	133220
	2	134005	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,72%

Tabela 51 - Resultados de precisão intermediária - Tiamina.

Preparação	Área Média Corrigida (uA)	Preparação	Área Média Corrigida (uA)
1	133271	7	133029
2	133755	8	133783
3	132697	9	132153
4	133707	10	131134
5	131467	11	132070
6	135919	12	133220
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,96%

Tabela 52 - Resultados de precisão - repetibilidade - Acetato de Tocoferol (1° dia - Analista 1).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	52076	52206
	2	52335	
2	1	52318	52103
	2	51888	
3	1	52192	52352
	2	52511	
4	1	52294	52094
	2	51894	
5	1	52889	52679
	2	52468	
6	1	52487	52318
	2	52149	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,42%

Tabela 53 - Resultados de precisão - repetibilidade - Acetato de Tocoferol (2° dia - Analista 2).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	51470	51810
	2	52150	
8	1	51052	51140
	2	51227	
9	1	52122	52363
	2	52604	
10	1	51030	51108
	2	51186	

11	1	51336	51704
	2	52071	
12	1	52626	52295
	2	51963	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			1,05%

Tabela 54 - Resultados de precisão intermediária - Acetato de Tocoferol.

Preparação	Área Média Corrigida (uA)	Preparação	Área Média Corrigida (uA)
1	52206	7	51810
2	52103	8	51140
3	52352	9	52363
4	52094	10	51108
5	52679	11	51704
6	52318	12	52295
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,94%

Tabela 55 - Resultados de precisão - repetibilidade - Cianocobalamina (1º dia - Analista 1).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	12996	12991
	2	12986	
2	1	12743	12764
	2	12785	
3	1	13006	13098
	2	13189	
4	1	13053	13112
	2	13171	
5	1	12849	13012
	2	13174	
6	1	12912	12826
	2	12740	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			1,10%

Tabela 56 - Resultados de precisão - repetibilidade - Cianocobalamina (2º dia - Analista 2).

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	12959	12896
	2	12833	
8	1	12822	12799
	2	12776	
9	1	13269	13163
	2	13057	
10	1	12927	12999
	2	13070	

11	1	13011	13008
	2	13004	
12	1	13085	12929
	2	12772	
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,95%

Tabela 57 - Resultados de precisão intermediária - Cianocobalamina.

Preparação	Área Média Corrigida (uA)	Preparação	Área Média Corrigida (uA)
1	12991	7	12896
2	12764	8	12799
3	13098	9	13163
4	13112	10	12999
5	13012	11	13008
6	12826	12	12929
Desvio Padrão Relativo (DPR)			0,98%

Tabela 58 - Exatidão (grau de recuperação) - nicotinamida.

Replicata	80%	100%	120%
	Conc. (%)	Conc. (%)	Conc. (%)
A1	79,74	100,85	120,02
	80,79	100,33	119,62
	80,57	101,26	120,09
A2	78,71	99,08	120,26
	79,78	99,71	120,11
	81,58	99,57	120,31
A3	80,32	99,45	121,69
	80,29	100,04	121,86
	80,49	99,97	121,37
<i>Média</i>	80,25	100,03	120,59
<i>Mínimo</i>	78,71	99,08	119,62
<i>Máximo</i>	81,58	101,26	121,86
<i>Exatidão</i>	98,0	a	
102,0%	100,32	100,03	100,49

Tabela 59 - Exatidão (grau de recuperação) - piridoxina.

Replicata	80%	100%	120%
	Conc. (%)	Conc. (%)	Conc. (%)
A1	78,54	100,07	119,09
	79,69	99,82	118,85
	79,40	100,68	119,13
A2	79,25	98,25	119,32
	78,72	98,79	119,04
	80,07	98,66	118,90

		79,12	98,27	120,14
A3		79,05	98,98	119,15
		79,30	98,67	119,55
<i>Média</i>		79,24	99,13	119,24
<i>Mínimo</i>		78,54	98,25	118,85
<i>Máximo</i>		80,07	100,68	120,14
<i>Exatidão</i>	98,0 a			
102,0%		99,05	99,13	99,37

Tabela 60 - Exatidão (grau de recuperação) - riboflavina.

Replicata		80% Conc. (%)	100% Conc. (%)	120% Conc. (%)
A1		79,55	101,02	120,53
		80,57	100,58	120,18
		80,34	101,48	120,54
A2		78,54	99,22	120,75
		79,46	100,00	120,58
		80,87	99,91	120,83
A3		80,02	99,64	121,80
		80,13	100,31	122,08
		80,31	100,49	122,27
<i>Média</i>		79,98	100,30	121,06
<i>Mínimo</i>		78,54	99,22	120,18
<i>Máximo</i>		80,87	101,48	122,27
<i>Exatidão</i>	98,0 a			
102,0%		99,97	100,30	100,88

Tabela 61 - Exatidão (grau de recuperação) - tiamina.

Replicata		80% Conc. (%)	100% Conc. (%)	120% Conc. (%)
A1		80,09	101,93	121,59
		80,84	101,42	121,25
		80,90	101,37	121,61
A2		79,23	99,94	121,89
		79,90	100,58	121,60
		80,63	100,40	121,55
A3		80,51	100,32	121,16
		80,39	100,82	121,77
		80,50	100,76	121,54
<i>Média</i>		80,33	100,84	121,55
<i>Mínimo</i>		79,23	99,94	121,16
<i>Máximo</i>		80,90	101,93	121,89
<i>Exatidão</i>	98,0 a			
102,0%		100,41	100,84	101,29

Tabela 62 - Exatidão (grau de recuperação) - acetato de tocoferol.

Replicata	80% Conc. (%)	100% Conc. (%)	120% Conc. (%)
A1	80,14	99,65	119,25
	80,70	98,72	119,55
	80,24	99,29	119,90
A2	80,54	99,75	118,49
	80,33	98,94	119,70
	79,99	100,07	118,95
A3	81,20	99,27	119,21
	79,95	99,92	120,34
	79,93	98,84	118,81
<i>Média</i>	80,34	99,38	119,35
<i>Mínimo</i>	79,93	98,72	118,49
<i>Máximo</i>	81,20	100,07	120,34
<i>Exatidão</i> 98,0 a			
102,0%	100,42	99,38	99,46

Tabela 63 - Exatidão (grau de recuperação) - cianocobalamina.

Replicata	80% Conc. (%)	100% Conc. (%)	120% Conc. (%)
A1	80,59	99,74	119,12
	81,57	100,86	118,67
	79,47	101,36	122,34
A2	78,99	99,56	119,68
	79,46	100,07	121,83
	81,48	100,90	119,90
A3	81,08	101,91	118,94
	79,37	99,25	119,47
	79,30	98,85	119,35
<i>Média</i>	80,15	100,28	119,92
<i>Mínimo</i>	78,99	98,85	118,67
<i>Máximo</i>	81,57	101,91	122,34
<i>Exatidão</i> 98,0 a			
102,0%	100,18	100,28	99,94

Tabela 64 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Nicotinamida.

Parâmetro	Especificação	Tipo	0,49	0,50*	0,51
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,46	1,34	0,56
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3627,93	3537,37	3210,92
		A	3374,60	3177,79	3232,62
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,28	1,29	1,29
		A	1,26	1,24	1,24
K' (Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	1,24	1,20	1,15
		A	1,23	1,19	1,14
Tempo de Retenção	informativo	P	0,38	0,37	0,37
		A	0,38	0,37	0,36

Teor da Amostra (%)	entre 98,34% e 102,34%	A	100,67	100,34	100,78
---------------------	------------------------	---	--------	--------	--------

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 65 - Robustez - Resultados da variação na composição da fase móvel - Nicotinamida.

Parâmetro	Especificação	Tipo	+ 1,0% FaseA	Normal*	- 1,0% FaseA
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,69	1,34	0,52
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3275,91	3537,37	3595,79
		A	3106,71	3177,79	3615,18
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,30	1,29	1,28
		A	1,26	1,24	1,26
K' (Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	1,21	1,20	1,18
		A	1,20	1,19	1,18
Tempo de Retenção	informativo	P	0,38	0,37	0,37
		A	0,37	0,37	0,37
Teor da Amostra (%)	entre 98,34% e 102,34%	A	100,68	100,34	99,88

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 66 - Robustez - Resultados da variação de diferentes lotes de coluna - Nicotinamida.

Parâmetro	Especificação	Tipo	Coluna 02	Coluna 01*	Coluna 03
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,31	1,34	0,25
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3669,02	3537,37	3934,55
		A	3994,61	3177,79	4006,03
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,28	1,29	1,30
		A	1,26	1,24	1,38
K' (Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	1,16	1,20	1,14
		A	1,16	1,19	1,13
Tempo de Retenção	informativo	P	0,37	0,37	0,36
		A	0,37	0,37	0,36
Teor da Amostra (%)	entre 98,34% e 102,34%	A	99,81	100,34	100,41

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 67 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Nicotinamida.

Parâmetro	Especificação	Tipo	27 °C	30 °C*	33 °C
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,81	1,34	0,83
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3461,80	3537,37	3609,63
		A	3440,23	3177,79	3714,52
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,29	1,29	1,28
		A	1,26	1,24	1,26
K' (Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	1,20	1,20	1,20
		A	1,19	1,19	1,19
Tempo de Retenção	informativo	P	0,37	0,37	0,37
		A	0,37	0,37	0,37

Teor da Amostra (%)	entre 98,34% e 102,34%	A	100,66	100,34	100,97
---------------------	------------------------	---	--------	--------	--------

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 68 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Nicotinamida.

Parâmetro	Especificação	Tipo	8,80	9,00	9,20
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,34	1,34	0,38
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3195,20	3537,37	3949,49
		A	3039,60	3177,79	3843,93
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,34	1,29	1,29
		A	1,29	1,24	1,26
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	1,22	1,20	1,17
		A	1,21	1,19	1,16
Tempo de Retenção	informativo	P	0,38	0,37	0,37
		A	0,38	0,37	0,37
Teor da Amostra (%)	entre 98,34% e 102,34%	A	100,74	100,34	100,89

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 69 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Piridoxina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	0,49	0,50*	0,51
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,74	1,08	0,6
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3577,65	3539,3	3480,13
		A	3502,22	3456,47	3447,8
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,77	1,67	1,77
		A	1,68	1,64	1,64
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	2,15	2,09	2,02
		A	2,14	2,07	2,01
Tempo de Retenção	informativo	P	0,54	0,52	0,51
		A	0,53	0,52	0,51
Teor da Amostra (%)	entre 96,64% e 100,64%	A	99,2	98,64	98,31

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 70 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Piridoxina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	+1%FaseA	Normal*	-1%FaseA
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	1,72	1,08	0,68
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3578,02	3539,30	3509,55
		A	3520,60	3456,47	3437,71
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,77	1,67	1,80
		A	1,64	1,64	1,68
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	2,13	2,09	2,04
		A	2,11	2,07	2,03
Tempo de Retenção	informativo	P	0,53	0,52	0,52
		A	0,53	0,52	0,52
Teor da Amostra (%)	entre 96,64% e 100,64%	A	98,00	98,64	99,00

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 71 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Piridoxina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	Coluna 02	Coluna 01*	Coluna 03
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,36	1,08	0,65
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3509,53	3539,30	3467,62
		A	3464,70	3456,47	3398,86
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,74	1,67	1,74
		A	1,70	1,64	1,66
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	2,01	2,09	1,94
		A	2,01	2,07	1,94
Tempo de Retenção	informativo	P	0,51	0,52	0,50
		A	0,51	0,52	0,50
Teor da Amostra (%)	entre 96,64% e 100,64%	A	98,86	98,64	98,39

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 72 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Piridoxina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	27 °C	30 °C*	33 °C
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,84	1,08	0,83
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3573,57	3539,30	3568,08
		A	3543,04	3456,47	3547,74
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,72	1,67	1,75
		A	1,59	1,64	1,63
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	2,09	2,09	2,08
		A	2,08	2,07	2,07
Tempo de Retenção	informativo	P	0,52	0,52	0,52
		A	0,52	0,52	0,52
Teor da Amostra (%)	entre 96,64% e 100,64%	A	98,29	98,64	98,22

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 73 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Piridoxina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	8,8	9,0*	9,2
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,42	1,08	0,78
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3558,77	3539,30	3545,79
		A	3505,12	3456,47	3467,57
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,71	1,67	1,78
		A	1,69	1,64	1,64
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	2,15	2,09	2,01
		A	2,13	2,07	1,99
Tempo de Retenção	informativo	P	0,54	0,52	0,51
		A	0,53	0,52	0,51
Teor da Amostra (%)	entre 96,64% e 100,64%	A	98,39	98,64	99,04

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 74 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Riboflavina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	0,49	0,50*	0,51
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,50	1,38	0,57
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	4154,84	4103,95	4008,46
		A	3844,65	3787,21	3769,87
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,24	1,24	1,23
		A	1,24	1,23	1,23
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	3,54	3,45	3,36
		A	3,52	3,43	3,34
Tempo de Retenção	informativo	P	0,77	0,76	0,74
		A	0,77	0,75	0,74
Teor da Amostra (%)	entre 98,46% e 102,46%	A	100,58	100,46	100,90

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 75 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Riboflavina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	+1%FaseA	Normal*	-1%FaseA
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,70	1,38	0,79
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	4117,76	4103,95	4040,03
		A	3845,61	3787,21	3816,68
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,23	1,24	1,25
		A	1,22	1,23	1,25
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	3,63	3,45	3,29
		A	3,61	3,43	3,27
Tempo de Retenção	informativo	P	0,79	0,76	0,73
		A	0,79	0,75	0,73
Teor da Amostra (%)	entre 98,46% e 102,46%	A	100,64	100,46	99,34

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 76 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Riboflavina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	Coluna 02	Coluna 01*	Coluna 03
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,27	1,38	0,29
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	4037,71	4103,95	3970,70
		A	3863,67	3787,21	3753,11
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,24	1,24	1,25
		A	1,24	1,23	1,25
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	3,25	3,45	2,97
		A	3,23	3,43	2,95
Tempo de Retenção	informativo	P	0,72	0,76	0,67
		A	0,72	0,75	0,67
Teor da Amostra (%)	entre 98,46% e 102,46%	A	99,66	100,46	99,89

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 77 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Riboflavina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	27 °C	30 °C*	33 °C
------------------	----------------------	-------------	--------------	---------------	--------------

Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,80	1,38	0,98
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	4084,39	4103,95	4123,14
		A	3832,12	3787,21	3923,16
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,24	1,24	1,24
		A	1,23	1,23	1,24
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	3,46	3,45	3,45
		A	3,44	3,43	3,43
Tempo de Retenção	informativo	P	0,76	0,76	0,76
		A	0,75	0,75	0,75
Teor da Amostra (%)	entre 98,46% e 102,46%	A	100,81	100,46	100,84

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 78 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Riboflavina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	8,8	9,0*	9,2
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,36	1,38	0,38
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	4177,92	4103,95	4032,36
		A	3927,32	3787,21	3801,34
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,22	1,24	1,25
		A	1,22	1,23	1,24
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	3,82	3,45	3,14
		A	3,79	3,43	3,11
Tempo de Retenção	informativo	P	0,82	0,76	0,70
		A	0,82	0,75	0,70
Teor da Amostra (%)	entre 98,46% e 102,46%	A	101,19	100,46	100,86

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 79 - Robustez - Resultados da variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Tiamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	0,49	0,50*	0,51
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,5	1,44	0,68
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	5590,04	5493,11	5352,94
		A	5667,16	5565,72	5443,92
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,8	1,75	1,77
		A	1,76	1,72	1,71
K´(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	10,06	9,85	9,65
		A	10,05	9,83	9,63
Tempo de Retenção	informativo	P	1,88	1,84	1,81
		A	1,88	1,84	1,81
Teor da Amostra (%)	entre 99,44% e 103,44%	A	101,55	101,44	101,38

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 80 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Tiamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	+1%FaseA	Normal*	-1%FaseA
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,82	1,44	0,65
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	5875,98	5493,11	5179,85

		A	5925,53	5565,72	5189,93
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,78	1,75	1,79
		A	1,74	1,72	1,79
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	10,18	9,85	9,55
		A	10,16	9,83	9,54
Tempo de Retenção	informativo	P	1,90	1,84	1,79
		A	1,90	1,84	1,79
Teor da Amostra (%)	entre 99,44% e 103,44%	A	101,40	101,44	101,82

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 81 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Tiamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	Coluna 02	Coluna 01*	Coluna 03
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,41	1,44	0,30
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	5120,13	5493,11	4433,99
		A	5182,27	5565,72	4505,48
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,80	1,75	1,80
		A	1,80	1,72	1,75
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	9,46	9,85	8,95
		A	9,44	9,83	8,94
Tempo de Retenção	informativo	P	1,78	1,84	1,69
		A	1,77	1,84	1,69
Teor da Amostra (%)	entre 99,44% e 103,44%	A	101,93	101,44	101,43

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 82 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Tiamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	27 °C	30 °C*	33 °C
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,86	1,44	1,01
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	5491,14	5493,11	5460,56
		A	5572,67	5565,72	5567,63
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,77	1,75	1,77
		A	1,71	1,72	1,72
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	9,88	9,85	9,87
		A	9,87	9,83	9,85
Tempo de Retenção	informativo	P	1,85	1,84	1,85
		A	1,85	1,84	1,85
Teor da Amostra (%)	entre 99,44% e 103,44%	A	101,89	101,44	102,07

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 83 - Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel - Tiamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	8,8	9,0	9,2
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,39	1,44	0,57
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	6286,55	5493,11	4906,43
		A	6404,82	5565,72	4983,59
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,78	1,75	1,76

		A	1,71	1,72	1,69
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	10,51	9,85	9,29
		A	10,47	9,83	9,26
Tempo de Retenção	informativo	P	1,96	1,84	1,75
		A	1,95	1,84	1,74
Teor da Amostra (%)	entre 99,44% e 103,44%	A	101,77	101,44	102,66

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 84 - Robustez - Variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Acetato de Tocoferol.

Parâmetro	Especificação	Tipo	0,49	0,50*	0,51
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,36	0,47	0,3
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	8259,15	7986,79	8217,53
		A	8456,84	8325,4	8415,37
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,07	1,07	1,08
		A	1,04	1,05	1,06
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	10,14	9,89	9,7
		A	10,17	9,9	9,72
Tempo de Retenção	informativo	P	1,9	1,85	1,82
		A	1,89	1,85	1,82
Teor da Amostra (%)	entre 97,01% e 101,01%	A	105,06	99,01	105,36

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 85 - Robustez - Variação de lotes de coluna - Acetato de Tocoferol.

Parâmetro	Especificação	Tipo	Coluna 02	Coluna 01*	Coluna 03
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,26	0,47	0,11
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	8569,34	7986,79	8583,11
		A	8760,40	8325,40	8735,81
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,08	1,07	1,08
		A	1,05	1,05	1,06
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	11,03	9,89	10,53
		A	11,07	9,90	10,53
Tempo de Retenção	informativo	P	2,04	1,85	1,96
		A	2,05	1,85	1,96
Teor da Amostra (%)	entre 97,01% e 101,01%	A	105,45	99,01	105,46

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 86 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Acetato de Tocoferol.

Parâmetro	Especificação	Tipo	27 °C	30 °C*	33 °C
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,60	0,47	0,63
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	9319,04	7986,79	9790,00
		A	9595,73	8325,40	9932,60
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,06	1,07	1,04
		A	1,02	1,05	1,01
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	10,05	9,89	10,08

		A	10,07	9,90	10,10
Tempo de Retenção	informativo	P	1,88	1,85	1,88
		A	1,88	1,85	1,89
Teor da Amostra (%)	entre 97,01% e 101,01%	A	105,50	99,01	106,06

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 87 - Robustez - Variação no fluxo da fase móvel (mL/min) - Cianocobalamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	0,49	0,50*	0,51
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	0,47	1,14	1,38
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3929,99	4145,39	3861,78
		A	3690,22	3871,34	3884,87
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,23	1,16	1,22
		A	1,22	1,25	1,17
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	5,87	5,7	5,6
		A	5,83	5,69	5,61
Tempo de Retenção	informativo	P	1,17	1,14	1,12
		A	1,16	1,14	1,12
Teor da Amostra (%)	entre 96,29% e 100,29%	A	97,9	98,29	97,4

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 88 - Robustez - Variação na composição da fase móvel - Cianocobalamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	81:19	80:20*	79:21
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	1,72	1,14	0,99
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	4221,75	4145,39	3848,23
		A	4384,00	3871,34	3827,50
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,17	1,16	1,24
		A	1,20	1,25	1,20
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	7,20	5,70	4,59
		A	7,19	5,69	4,58
Tempo de Retenção	informativo	P	1,39	1,14	0,95
		A	1,39	1,14	0,95
Teor da Amostra (%)	entre 96,29% e 100,29%	A	97,85	98,29	97,28

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 89 - Robustez - Variação de diferentes lotes de coluna - Cianocobalamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	Coluna 02	Coluna 01*	Coluna 03
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	1,36	1,14	2,09
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3360,66	4145,39	3116,24
		A	3208,54	3871,34	3128,48
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,22	1,16	1,29
		A	1,20	1,25	1,29
K'(Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	3,75	5,70	3,47
		A	3,74	5,69	3,48
Tempo de Retenção	informativo	P	0,81	1,14	0,76

		A	0,81	1,14	0,76
Teor da Amostra (%)	entre 96,29% e 100,29%	A	97,39	98,29	98,64

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método

Tabela 90 - Robustez - Variação na temperatura da coluna - Cianocobalamina.

Parâmetro	Especificação	Tipo	27 °C	30 °C*	33 °C
Desvio Padrão Relativo	≤ 2,0%	P	1,29	1,14	0,64
Nº de Pratos Teóricos	≥ 2000	P	3363,96	4145,39	3142,97
		A	3121,48	3871,34	3259,74
Simetria do Pico	entre 0,8 e 2,0	P	1,22	1,16	1,21
		A	1,19	1,25	1,19
K' (Fator de Capacidade)	≥ 1,0	P	5,72	5,70	5,65
		A	5,71	5,69	5,65
Tempo de Retenção	informativo	P	1,14	1,14	1,13
		A	1,14	1,14	1,13
Teor da Amostra (%)	entre 96,29% e 100,29%	A	97,15	98,29	97,23

Legenda: P - Solução padrão , A - Solução amostra , * - Condição original do método